

**BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİNDE TÜBERKÜLOZLU  
HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS* KOMPLEKS İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
YÖNTEMLER İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NURCİHAN BİLTEKİN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN**

**Kasım - 2019**

**BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİNDE TÜBERKÜLOZLU  
HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS* KOMPLEKS İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
YÖNTEMLER İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NURCİHAN BİLTEKİN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

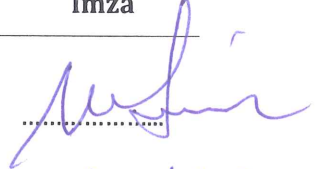


**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER**

**MERSİN  
Kasım - 2019**

## ONAY

Nurcihan BİLTEKİN tarafından Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER danışmanlığında hazırlanan "Bir Üniversite Hastanesinde Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının Moleküler Yöntemler ile Genotiplendirilmesi" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 28 Kasım 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Toğrul NAĞIYEV	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.11.2019 tarih ve 2019.../..550... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

28 Kasım 2019 / 28 November 2019



İmza / Signature

Nurcihan BİLTEKİN

## ÖZET

### BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİNDE TÜBERKÜLOZLU HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS İZOLATLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE GENOTİPLENDİRİLMESİ

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) üyesinden *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) bakterisinin neden olduğu tüberküloz (TB), ülkemizde ve dünyada halen en sık görülen bulaşıcı ve ölümcül hastalıktan biri olmaya devam etmektedir. Son yıllarda genomik polimorfizmlerin doğrudan analizine dayanan moleküler tiplendirme yöntemleri artık yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MTK izolatlarının moleküler epidemiyolojine bakıldığında belirlenen bölgedeki etkin izolatı bulmak ve hastalıkla mücadele etmek farklı coğrafi bölgelerdeki TB salgınlarının kaynağını bulmak için günümüzde Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) tiplendirmesi, IS6110 Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Polymerase Chain Reaction (PZR)-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing) gibi en son moleküler genotiplendirme yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında Mersin ilinde TB'li hastalardan izole edilen ve MTK olarak tanımlanan klinik izolatların moleküler genotiplendirilmesinin yapılarak bu mikroorganizma için ilimizde moleküler epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 01.01.2016 ve 31.12.2017 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda klinik materyalinin kültüründe MTK izole edilen ve +4°C'de saklamaya alınan kültür koleksiyonundaki 103 klinik izolat dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen izolatların DNA'ları MGIT sıvı besiyerinden Mickle cihazı kullanılarak elde edildi. Bu izolatların moleküler genotiplendirilmesi spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile yapıldı. 103 izolatın 10 spoligotiplendirme kümesi içerisinde yoğunlaştığı tespit edildi. En büyük kümenin 48 (%46,6) izolat ile T ailesi olduğu, ikinci sırada Haarlem ailesinin 16 (%15,5) izolat içerdiği, TUR ailesinin 13 (%12,6) izolat, S ailesinin 10 (%9,7) izolat, Beijing ailesinin 4 (%3,9) izolat, LAM ailesinin 4 (%3,9) izolat, Bovis ailesinin 3 (%2,9) izolat, NEW-1 ailesinin 3 (%2,9) izolat, Delhi/CAS ailesinin 1 (%1) izolat, H37Rv ailesinin 1 (%1) izolat içerdiği görüldü. Çalışma sonuçlarımıza göre, ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan farklı fakat Çukurova bölgesinde yapılan çalışmaya benzer şekilde, T ailesinin (%46,6) en sık görülen aile olduğu tespit edildi. Beijing ailesinin varlığı bu çalışma ile ilimizde de tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu tür moleküler çalışmaların yeni izole edilecek izolatlar ile yapılmasıyla, ilimizdeki bu bakterinin hareketinin izlenmesi suretiyle TB'nin kontrol altına alınmasında yararlı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *M. tuberculosis*, MTK, Tüberküloz, Spoligotiplendirme, MIRU-VNTR, Moleküler Tiplendirme.

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### GENOTYPING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATES ISOLATED FROM TUBERCULOSIS PATIENTS IN A UNIVERSITY HOSPITAL BY MOLECULAR METHODS

Tuberculosis (TB) caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), is still one of the most common infectious and deadly diseases in our country and in the world. In recent years, molecular typing methods based on direct analysis of genomic polymorphisms have been widely used. When the molecular epidemiology of MTC isolates is examined, the latest molecular genotyping methods such as Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) typing, IS6110 Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and spoligotyping have been used to find the effective isolate in the determined region and to find the source of TB outbreaks in different geographical regions. In this study, it was aimed to molecular genotyping of clinical isolates, isolated from TB patients and identified as MTC in Mersin province, and to obtain molecular epidemiological data for this microorganism in our city. Between 01.01.2016 and 31.12.2017, 103 clinical MTC isolates, from culture collection stored at +4°C in the Mycobacteriology Laboratory, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Mersin University, were included in this study. DNAs of the isolates included in the study were obtained from MGIT liquid medium using Mickle device. Molecular genotyping of these isolates was performed by spoligotyping and MIRU-VNTR methods. 103 isolates were clustered in 10 spoligotyping clusters. The largest cluster was the T family with 48 (46,6%) isolates, the Haarlem family contained 16 (15,5%) isolates, TUR family contained 13 (12,6%) isolates, S family contained 10 (9,7%) isolates, Beijing family contained 4 (3,9%) isolates, LAM family contained 4 (3,9%) isolates, Bovis family contained 3 (2,9%) isolates, NEW-1 family contained 3 (2,9%) isolates, Delhi/CAS family contained 1 (1%) isolates, and H37Rv family contained 1 (1%) isolates respectively. According to the our results, T family (46,6%) was found to be the most common family, which is different from other studies in our country but similar to the study in Çukurova region. The presence of the Beijing family was also detected in our province with this study. As a result, it is thought to be useful to control TB by monitoring the movement of this bacterium in our province by conducting such molecular studies with new isolates.

**Keywords:** *M. tuberculosis*, MTC, Tuberculosis, Spoligotyping, MIRU-VNTR, Molecular Typing

**Advisor:** Assist. Prof. Dr. Mahmut ÜLGER, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Microbiology, University of Mersin, Mersin.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her konuda yardımını, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimim süresinde destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen MEÜ. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN'e ve Sayın Doç. Dr. Aylin DÖĞEN'e teşekkür ederim. Tez çalışmam sürecinde ve tezimin bulgularının değerlendirilmesine yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a ve Arş. Gör. Gülfer YAKICI'ya; Gaziantep Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Begüm KAYAR'a teşekkür ederim. Tez çalışma sürecinde laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN'a ve bu Anabilim Dalında görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Hayatım boyunca varlıkları ile bana güç veren, attığım her adımda bana destek olan ve tez çalışma sürecimde sabırla beni destekleyen aileme sonsuz teşekkürler.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>2</b>
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi	2
2.2. Epidemiyoloji	4
2.3. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri	5
2.4. <i>M. tuberculosis</i> Kompleks (MTK)	8
2.4.1. <i>M. tuberculosis</i>	8
2.4.2. <i>M. bovis</i> ve <i>M. bovis</i> BCG	9
2.4.3. <i>M. microti</i>	9
2.4.4. <i>M. africanum</i>	9
2.4.5. <i>M. pinnipedii</i>	10
2.4.6. <i>M. canetti</i>	10
2.4.7. <i>M. caprae</i>	10
2.5. <i>M. tuberculosis</i> 'in Genetik Özellikleri	10
2.6. Tüberkülozda Bulaş ve İmmünopatogenez	11
2.6.1. Tüberküloz İmmünolojisi	12
2.7. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı	13
2.7.1. Mikroskopi	13
2.7.2. Kültür	14
2.8. Tiplendirme Yöntemleri	14
2.8.1. Fenotipik Yöntemler	14
2.8.2. Genotipik Yöntemler	15
2.9. İlaç Direnci	15
2.10. Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler	16
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>20</b>
3.1. <i>M. tuberculosis</i> suşları	20
3.2. Moleküler Analiz	20
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu	20
3.2.2. Spoligotiplendirme Yöntemi	20
3.2.3. MIRU-VNTR	25
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	<b>28</b>
4.1. Hastaların Genel Özellikleri	28
4.2. Moleküler Tiplendirme (Spoligotiplendirme) Sonuçları	28
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	<b>38</b>
KAYNAKLAR	39
EK 1	47
ÖZGEÇMİŞ	48

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1. Woods ve Washington tarafından yapılan mikobakterilerin sınıflandırılması	7
Tablo 2.2. TB immünopatogenezi ile ilgili 4 evre aşaması	11
Tablo 2.3. EZN ve florokrom boyama ile klinik örnekte ARB varlığının değerlendirilmesi	14
Tablo 3.1. Spoligotiplendirme yönteminin PZR reaksiyon karışımı	21
Tablo 3.2. Spoligotiplendirme amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları	21
Tablo 3.3. 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi için kullanılan primerler	25
Tablo 3.4. MIRU-VNTR yönteminde tekli ve multipleks çalışılan lokusların listesi	26
Tablo 3.5. MIRU26 lokusu için gerçekleştirilen PZR reaksiyon karışımı	26
Tablo 3.6. MIRU26 lokusunun amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları	27
Tablo 4.1. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olduğu belirlenen 43 hastanın direnç profili	28
Tablo 4.2. Çalışmaya dahil edilen bazı izolatlara ait örnek spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR sonuçları	30
Tablo 4.3. 103 izolata ait spoligotiplendirme aileleri ve görülme oranları	31
Tablo 4.4. Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli 43 izolatın spoligotiplendirme küme dağılımı	31

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Mısır mumyaların kemik lezyonlarında Pott hastalığının görüntüsü	3
Şekil 2.2. <i>Mycobacterium</i> hücre duvar yapısının görüntüsü	6
Şekil 2.3. MTK türleri arasındaki filogenetik ilişkisinin görüntüsü	8
Şekil 2.4. Farklı MTK suşlarının DR bölgelerinde polimorfizm şematik gösterimi	17
Şekil 2.5. DR bölgelerinin amplifikasyon prensibi	17
Şekil 2.6. Spoligotiplendirme yönteminin sonuç örneği iki farklı bakterinin genotiplendirilmesi	18
Şekil 2.7. <i>M. tuberculosis</i> H37Rv referans suşu	19
Şekil 3.1. Spoligotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan Oktal kod anahtarı	24
Şekil 4.1. MIRU40 örnek jel görüntüsü	32
Şekil 4.2. MIRU26 örnek jel görüntüsü	32
Şekil 4.3. ETRC örnek jel görüntüsü	33
Şekil 4.4. ETRA örnek jel görüntüsü	33

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ARB	Asido Resistant Bacil
BCG	Bacillus Calmette Guerin
ÇİD-TB	Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
DR	Direct Repeat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMB	Etambutol
EZN	Erlich Ziehl Nelsen
HIV	Human Immunodeficiency Virus- İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
INH	İzoniazid
INF	İnterferon
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number of Tandem Repeat
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleksi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
RIF	Rifampisin
SM	Streptomisin
TB	Tüberküloz
TDM	Tüberküloz Dışı Mikobakteri
VSD	Verem Savaşı Dispanseri

## 1. GİRİŞ

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) üyesinden *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) bakterisinin neden olduğu tüberküloz (TB), ülkemizde ve dünyada halen en sık görülen bulaşıcı ve ölümcül hastalıktan biri olmaya devam etmektedir [1]. TB basili dünya nüfusunun yaklaşık üçte birini enfekte etmekte ve her yıl yaklaşık iki milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır [2].

2017 yılında, TB, HIV-negatif kişilerin yaklaşık 1.3 milyonunun (1.2-1.4 milyon arasında) ve buna ek olarak HIV-pozitif kişiler arasında da yaklaşık 300 bininin (266-335 bin arası) ölümüne sebep olmuştur [3].

TB basili vücuda inhalasyon yolu ile girer ve genellikle akciğerleri tutan, makrofajlar içinde çoğalan ve latent fazda uzun süre hücre içinde canlı kalabilen bir bakteridir [4].

*M. tuberculosis*'in en iyi karakterize edilmiş suşu H37Rv'dir, genom analizlerinde sıklıkla referans olarak kullanılmaktadır [5].

MTK izolatların moleküler epidemiyolojisine bakıldığında belirlenen bölgedeki etkin izolatı bulmak ve hastalıkla mücadele etmek farklı coğrafi bölgelerdeki TB salgınlarının kaynağını bulmak için günümüzde MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat) tipleme, IS6110 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Polymerase Chain Reaction)-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing) gibi en son moleküler genotipleme yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır [6].

IS6110 PZR-RFLP yönteminin zaman alıcı ve ayırım gücünün yüksek olması, spoligotiplendirme yönteminin ise ayırım gücünün düşük olması, MIRU-VNTR yönteminin hızlı, kolay ve ayırım gücünün yüksek olması, kısa sürede epidemiyolojik inceleme yapması bakımından sıklıkla tercih edilmektedir [7,8].

Son yıllarda genomik polimorfizmlerin doğrudan analizine dayanan moleküler tipleme yöntemleri artık yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *M. tuberculosis*'in moleküler tiplemesinde, popülasyonlar arasındaki basilin geçişini ölçmek ve ilaca karşı direnç ile spesifik genotipler arasındaki ilişkiyi saptamak için çeşitli epidemiyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle MIRU-VNTR tipleme ve spoligotiplendirme kombinasyonunun hızlı ve güvenilir bir genotiplendirme elde etmenin uygun bir yolu olarak kabul edilmiştir [9].

Bu tez çalışmasında Mersin ilinde TB'li hastalardan izolen edilen ve *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan klinik izolatların spoligotiplendirme ve Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) yöntemleri ile moleküler genotiplendirilmesinin yapılarak bu mikroorganizma için ilimizde moleküler epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

TB etkenlerinin varlığı, insanın varoluşundan çok öncelere dayanmaktadır. Bu hastalığın başlaması ve yayılması insanlık tarihi ile başlamıştır. Toplu yaşama geçilmesiyle bulaşlar başlamış ve ardından ise salgınlar meydana gelmiştir [10].

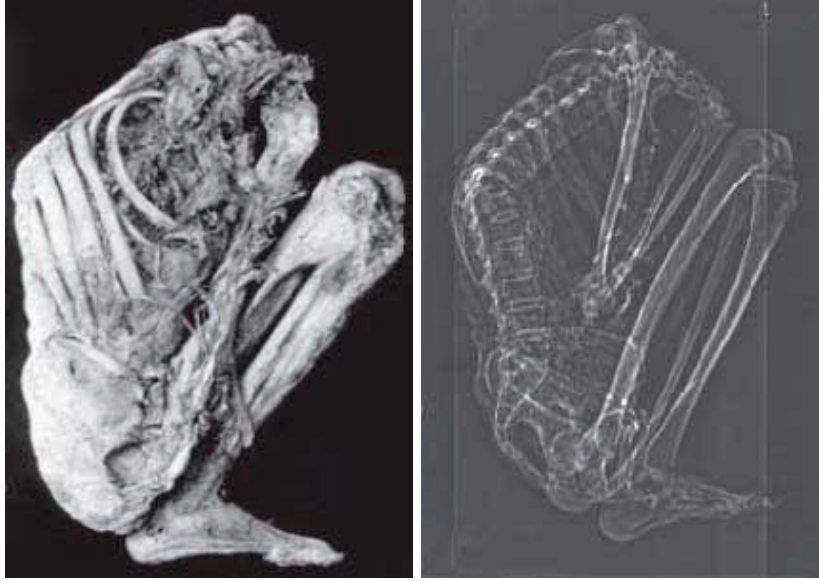
MTK'nın bazı türleri, özellikle *M. tuberculosis*, dünyadaki tek bir patojene bağlı ölümlerin ilk sebebidir [11].

*M. tuberculosis* basilini taşıyan bir hastanın hapşırması, öksürmesi ya da konuşması ile havaya karışan basillerin solunum yolu ile sağlıklı kişilerin akciğerlerine geçmesine ve onlarında hasta olmasına neden olmaktadır [12].

TB, tarih üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. TB'nin tanısını işaret eden birkaç fiziksel semptom vardır; kronik öksürük, kanlı balgam, gece terlemeleri, kilo kaybı, hemoptizi gibi belirtilerdir. Bunlara ek olarak TB, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan epidemik bir hastalıktır [13].

TB, insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olup ilk bulunan bilgiler M.Ö. 3000'de Nil nehri kenarında bulunan Dra Abu-El Naga kasabasında yaşamış olan genç bir kızın kanlı balgam çıkararak ölmesiyle öğrenilmiştir [14].

Paleopatolojik kanıtlar M.Ö. 8000'e kadar uzanmaktadır ve Neolitik dönemden kalma kemiklerde TB'nin bulgularına rastlanılmıştır. M.Ö. 2400'lü yıllarda Mısır mumyalar ve Taş Devri'nden kalan iskeletler ve Mısır mumyaları üzerinde yapılan incelemeler sonucunda, TB olacağı düşündürülen kemik lezyonlarına (Pott hastalığı) ve aside dirençli basillere rastlanmıştır [15,16].



**Şekil 2.1:** Mısır mumyaların kemik lezyonlarında Pott hastalığının görüntüsü sağ taraftaki görüntü bilgisayarlı tomografi ile çekilmiştir [17].

TB hastalığı çağlar boyunca, beyaz ölüm ya da beyaz veba, tüketim hastalığı gibi pek çok insanın ölümüne sebep olduğu için ölümün kaptanı olarak birçok isimle anılmıştır. Romalılar bu hastalığı tanımlarken öksürükle balgam atma ve hırıltılı nefes alıp verme anlamına gelen “Phthisis” isimi vermişlerdir. Ülkemizde ise ince hastalık olarak anılmaktadır [14].

Robert Koch, Alman bir fizikçi ve bilim adamıdır. 4 Mart 1882’de mikroskopik gözlemle TB basiliyi keşfetmiştir. Bu keşfinin ardından 1905’de Tıp alanında Nobel ödülünü almıştır [10,17].

Calmette ve Guerin birlikte Lille Pasteur Enstitüsü’nde sağlık sorunu olan TB’nin önemi ve kontrolü üzerinde çalışarak virülansı düşük olan bir bakteri elde etmişler ve TB basiline karşı bağışıklık yapan bakteriye Bacillus Calmette-Guerin (BCG) adını vermişlerdir [18].

TB günümüzde halen önemini koruyan bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Son yıllarda HIV’in ortaya çıkması ile çoklu ilaca dirençli (ÇİD) hastalarda ölüm oranları da artmaktadır [15].

Koch’un keşfi, bu ölümcül hastalığın kontrolü ve ortadan kaldırılması yönünde atılmış en önemli adımdır. Bir asır sonra, 24 Mart Dünya TB Günü olarak belirlenmiş ve halkı TB’nin dünyadaki etkileri konusunda eğitmek ve bilgilendirmek için önemli bir gün olarak tarihe geçmiştir [19].

## 2.2. Epidemiyoloji

- **Dünyada Tüberküloz**

DSÖ, 1933 yılında TB hastalığının yayılması durumunda, gerekli önlemlerin alınması için ulusal bir yayınla durumu ilan etmiştir. Ardından ise 1994 yılında TB ile daha aktif mücadele edebilmek için "Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS)" adı ile yeni programını açıklamıştır [20].

DSÖ, 1997 yılından bu yana her yıl küresel TB raporu yayımlanmaktadır. DSÖ'nün raporuna göre, dünya genelinde TB ölümlerin ilk 10 nedeninden biridir ve tek bir enfeksiyöz ajanın (HIV/AIDS'in üzerinde) önde gelen nedenidir [3].

DSÖ ve yerel kaynaklar tarafından bildirilen raporlara göre 2017 yılında 6,4 milyon yeni TB vakası tespit edilmiştir. Her yıl milyonlarca insan bu hastalığa yakalanmaya devam etmektedir. Ortalama olarak 10 milyon yeni TB vakası tahmin edilmektedir. Bu da yaklaşık her 100.000 kişiden 133'üne denk gelmektedir [3].

Küresel olarak en iyi tahmin, 2017 yılında 10 milyon insanda (9,0-11,1 milyon) bu hastalığın gelişmesidir. Bunlardan 5,8 milyonunun erkek, 3,2 milyonunun kadın ve bir milyonunun çocuk olduğu tahmin edilmektedir. Tüm dünyada HIV negatif olup TB'den ölenlerin sayısı 2000 yılında 2017 yılına kadar %29 oranında azalmıştır. Bu sayılara baktığımızda 2000 yılında 1,8 milyon iken 2017 yılında 1,3 milyona inmiştir. Bununla birlikte 2015 yılında TB sonlandırılması stratejisi planının ortaya konulması ile bu oran %5 azalmıştır [3].

HIV pozitif olup TB'den ölenlerin sayısı ise 2015'te %20 azalmışken, 2017'ye kadar bu oran %44 azalmıştır. Rakamlara bakıldığında 2000 yılında 534.000 kişinin öldüğü rapor edilirken 2017 yılında bu sayı 300.000'e inmiştir [3].

Her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olan (2000-2017 yılları arasında 54 milyonun üzerinde ölüm rapor edilmiştir) TB, teşhisi ve tedavisi üzerinde başarı sağlanmasına rağmen hala hastalığın tespiti ve tedavi edilmesi noktasında ciddi boşluklar bulunmaktadır [3].

- **Türkiye'de Tüberkülozun Durumu**

TB, genellikle gençlerin ve yaşlıların ölümüne sebep olan önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya genelinde mortalite ve insidans oranının fazla olduğu yerler, Güneydoğu Asya ve Afrika ülkeleridir. Türkiye ise DSÖ Avrupa Bölgesi'nde bulunmaktadır. Global TB 2016 Raporuna bakıldığında Türkiye'nin 2015 yılı tahmini insidans hızı yüz binde 18 ve tahmini mortalite hızı yüz binde 0,96 olarak verilmiştir [21].

Ülkemizdeki VSD kayıtlarına göre, 2014 yılı yeni+nüks olgularda tedavi başarısı %87 ve önceden tedavi görmüş olgularda tedavi başarısı %50'dir. Türkiye çok ilaca dirençli (ÇİD)-TB açısından yüksek hastalık yüküne sahip 27 ülke arasında değildir. Küresel Tüberküloz 2016 Raporu, ÇİD-TB haritalarında Türkiye'de yeni TB olgularında rifampisin dirençli (RD)/ÇİD-TB oranı %3-5,9 aralığında, önceden tedavi görmüş TB olgularında RD/ÇİD-TB oranı ise %12-29,9 aralığındadır. Türkiye'de 2015 yılında kayıtlara göre 12.772 TB olgusundan 8.906'sına (%69,7) HIV testi yapılmıştır. Türkiye'de 2015 yılında kayıtlara giren 12.772 TB olgusundan 61'inin (%0,48) HIV pozitif olduğu tespit edilmiştir. Küresel Tüberküloz 2016 Raporunda Türkiye'nin 2015 yılı yeni ve nüks TB olgularında HIV prevalansı %0-4,9 aralığında verilmiştir [21].

Olgularda akciğer TB'si %62,9 (7.427) iken akciğer dışı TB oranı %37,1 (4.376)'dir. Cinsiyet dağılımına bakıldığında, olguların %56,5 (7.210)'i erkek, %43,5 (5.562)'i ise kadındır. Rapora göre olguların 872'sinin yabancı uyruklu olduğu bildirilmiştir. Bu yabancı uyruklu olguların %56,1'i yani 489 kişinin Suriye doğumlu olduğu belirtilmiştir [21].

### 2.3. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri

Mikobakteriler, *Mycobacteriaceae* ailesine bağlı *Mycobacterium* cinsi içinde yer alır [22]. Mikolik asit üretme ve benzer (G+S) oranına sahip olmasıyla ve bununla birlikte ortak özellikleri nedeniyle *Cornynebacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi bakterilerinde içinde bulunduğu *Actinomycetales* sınıfında yer alır [16,23].

Mikobakteriler kapsülsüz, aerop, sporsuz, hareketsiz, hafif kavisli veya düz basillerdir. Uzunluğu 1-10 µm ve genişliği 0,2-0,6 µm arasında olan mikroorganizmalardır [24]. Mikobakteriler genel olarak 37°C'de iyi üreme gösterirler. Ortalama ikiye bölünme süreleri türden türe değişmekle birlikte 12-18 saat arasında değişmektedir [16].

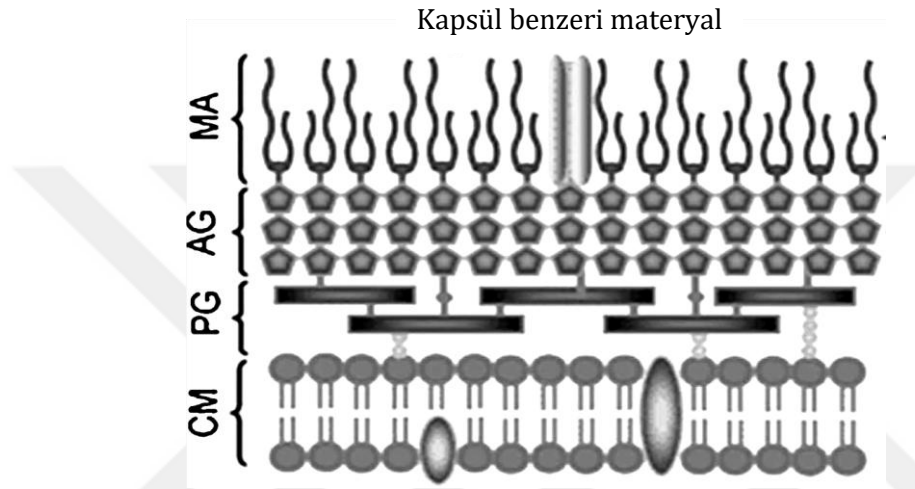
Mikobakterilerin hücre duvarı lipid bakımından zengin olup, yüzeyi hidrofobik olmasından dolayı Gram boyalar ile zor boyanırlar. Mikobakteriler aside dirençli olmalarından dolayı ile asit-alkol karışımı ile yapılan dekolorizasyon işlemine direnç gösterirler. Bu özelliğinden aside dirençli basil (ARB) olarak da adlandırılırlar [25].

Aside dirençli boyamada en sık kullanılan teknik Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemidir. EZN ile boyanması için alevden geçirme ve karbol fuksin uygulanması gerekir. Hücre içine giren boya asit-alkol karışımı ile dekolorizasyonun ardından metilen mavisi (zit boya) uygulamasında boyanmaz, mikroskop incelemesinde lacivert zeminde, parlak pembe-kırmızı renklere aside dirençli basiller olarak görünür [26].

Diğer bir boyama yöntemi ise Auramine-Rhodamine boyama yöntemi olup, bu yöntemde zit boya olan potasyum permanganat ile boyanma sonrası UV ışınli floresan mikroskobu ile incelendiğinde, yeşil zemin üzerinde sarı-turuncu parlak renkte görünürler [27].

Mikobakteri hücre duvarının esas bileşeni hidrofobik mikolik asittir. Bu mikolik asit tüm hücre duvar ağırlığının %50'sini oluşturmaktadır. Kalın mikolik asit tabakası, besinlerin girişini ve mikobakterilerin yavaş büyümesine neden olur fakat lizozomal enzim ile bozunmaya karşı hücrel olarak direnci arttırmaktadır [28].

Sitoplazmik fosfolipid veya iç membranın yanı sıra bir peptidoglikan tabakasına sahip olan mikobakteri hücre duvar yapısı; a) peptidoglikan çapraz bağlı bir polimer, (b) çok dallanmış bir arabinogalaktan tabanlı polisakkarit ve (c) karakteristik uzun zincirli mikolik asit bileşenlerinden meydana gelmektedir [29].



**Şekil 2.2:** *Mycobacterium* hücre duvar yapısı MA: Mikolik asit, AG: Arabinogalaktan, PG: Peptidoglikan, CM: Sitoplazmik membran [29].

Mikobakterilerin hücre duvarı kendine özgül yapıya sahip olmasıyla bileşiklere ve ilaçlara karşı güçlü bariyer sağlamakta ve aynı zamanda virülansta önemli rol oynamaktadır [30].

Mikobakterilerin taksonomik sınıflandırması şu şekildedir [31],

Alem : Prokaryot (Bakteri)

Bölüm : *Firmicutes*

Sınıf : *Actinobacteria*

Takım : *Actinomycetales*

Aile : *Mycobacteriaceae*

Genus : *Mycobacterium*

Tür : *M. tuberculosis*

Kompleks üyeleri arasındaki benzerlik ve yüksek genomik DNA benzerliğinden dolayı yakın ilişkili türler MTK olarak adlandırılır. MTK'da yer alan türler *M. tuberculosis*, alt varyant

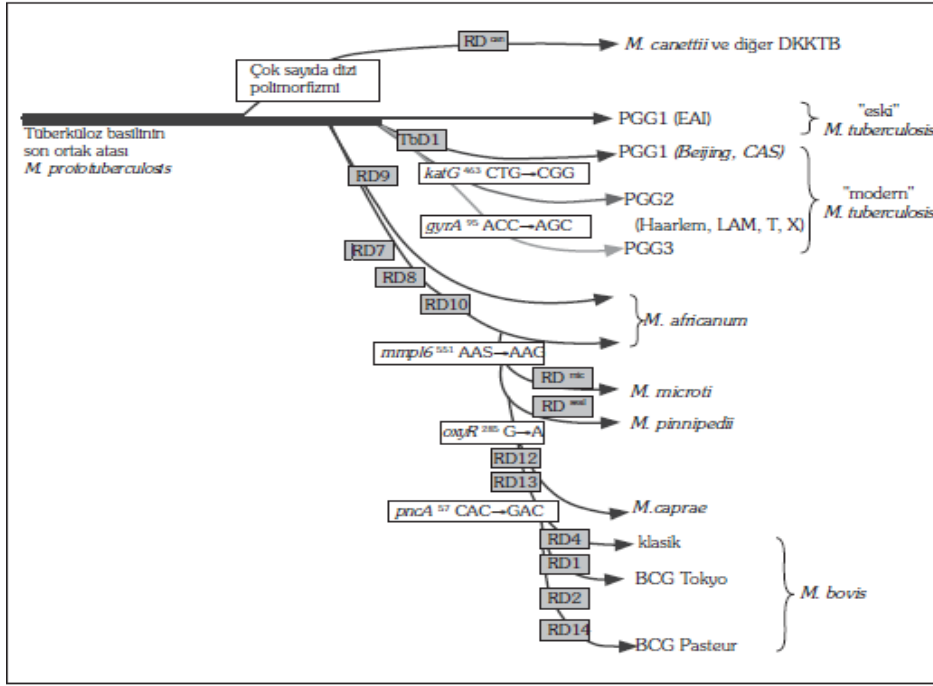
tipi olan *M. africanum* ve *M. canneti* insanlar için patojenik özellik taşımaktadır. *M. bovis* ve *M. microti* ise hayvanlar için patojenik özelliktedir. Bu özellik insanlara geçebilmektedir [32].

Woods ve Washington'ın 1987'de yaptıkları klinikle uyumlu *M. tuberculosis* sınıflandırması Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1:** Woods ve Washington tarafından yapılan mikobakterilerin sınıflandırılması [33].

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

*M. tuberculosis*'in dayandığı soya bakıldığında RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13 ve RD14 delesyonu olmaması *M. tuberculosis*'i MTK'nın diğer üyelerinden ayırır. *M. tuberculosis* soyunun büyük bir kısmında TbD1 (*M. tuberculosis specific deletion 1*) olduğu bilinir [34].



Şekil 2.3: MTK türleri arasındaki filogenetik ilişkinin görüntüsü [34].

## 2.4. *M. tuberculosis* Kompleksi (MTK)

MTK, hayvan ve insanlarda yüksek oranda patojen basillerden meydana gelmektedir. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. canettii* ve *M. caprae* türlerinden oluşur. MTK türleri genetik olarak %99,9 oranında benzerlik göstermektedirler. Fenotipik (mikroskopik görüntü, koloni morfolojisi, biyokimyasal testler ve büyüme hızı) özellikler ile moleküler (DNA fingerprint) analizler kullanılarak kompleks içerisindeki farklı türler tanımlanmıştır [35].

### 2.4.1. *M. tuberculosis*

TB basili 1882 yılında Koch tarafından tanımlanmıştır. İnsanları etkileyen önemli patojen olup dünya çapında insanlarda yaygın bir kronik enfeksiyöz hastalığının nedenidir [36]. TB basili, makrofajlar içinde çoğalır, senelerce latent fazda stabilitesini koruyarak yaşamını devam ettirir. Evrimsel süreçte *M. tuberculosis* özgül *TbD1* delesyon bölgesi ile atasal suştan ayrılmıştır ve *M. tuberculosis* basilinin esas ana konağının insan olduğu belirtilmiştir [35]. Katı besiyeri ve aerop ortamda, 37°C'de inkübe edilir, 2-4 haftadan sonra üreme göstererek R koloni oluştururlar. Tween-albumin sıvı besiyerinde 37°C'de inkübe edildiğinde, 10-15 gün içinde dallanmış basil görünümü ile kord faktör oluşturabilmektedir [16]. TB basili, ortama niasin salar, niasin testi ile diğer türlerden ayrılabilir, tiofen-2-karboksilik asit hidrazit (thiophene-

2-carboxylic acid hydrazide-T2H) duyarlılığı yoktur, pirazinamidaz aktivitesi ve niasin birikimi pozitifdir; nitratı nitrite indirger. Katalaz aktivitesi ise düşük veya yoktur [37].

#### **2.4.2. *M. bovis* ve *M. bovis* BCG**

*M. bovis*, başta sığırlarda olmak üzere, evcil ve yabani hayvanlar ile insanlarda enfeksiyona yol açmaktadır [38]. *M. bovis*, MTK üyeleri arasında en kapsamlı konak aralığına sahip olan türdür ve bundan dolayı hayvanları veya insanları enfekte edebilmektedir [39]. İnsanlar, pastörize edilmemiş süt ürünleri veya enfekte hayvanlarla yakın temasta bulunma ve bundan dolayı mikobakteri ile kontamine aerosollerini soluyarak enfekte olurlar. *M. bovis*'in sebep olduğu hastalığın klinik özelliği, *M. tuberculosis* enfeksiyonuna benzer özellik gösterdiği için ayırt edilmesi oldukça güçtür [40]. *M. bovis* BCG suşu, 1908 yılında gliserinli, patatesli ve sığır safralı agarda 231. pasajdan sonra elde edilmiştir [41]. *M. bovis* yavaş büyüyen, aerobik bir bakteridir, 37°C'de 21 gün inkübasyon ile R ve S tipi koloni oluşturur [24]. *M. bovis*'in T2H'ye duyarlı olması, pirazinamidaz aktivitesi gözlenmemesi, niasin negatif olması, nitratları nitrite indirgememesi ve yüksek katalaz aktivitesi göstermesi ile diğer türlerden ayrılır [37].

#### **2.4.3. *M. microti***

Wells 1937 yıllarında, *M. microti* basilini tarla faresinde keşfetmiştir. Sadece yabani kemirgenlerin değil kedilerin, domuzların, tavşanların, sıçanların ve diğer küçük memelilerin düşük dozda bile olsa *M. microti* enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlı olduğu gözlenmiştir. *M. microti* son yıllarda nadir de olsa insanlarda enfeksiyona neden olabilmektedir [35,42]. Sıvı kültür yöntemi pratiktir ve aynı zamanda fazla miktarda basil üremesine olanak sağlar. Fenotipik yöntemlerle *M. tuberculosis*, *M. bovis* ya da *M. africanum*'dan ayırt edilmesi oldukça güçtür [35]. *M. microti*, MTK suşlarından farklı morfolojik ve kültürel özellik göstermesinden dolayı spoligotiplendirme ile analiz edilmektedir [42]. İki farklı tip (Lama ve vole) spoligotip profili bulunmaktadır ve bu tipler insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır [43].

#### **2.4.4. *M. africanum***

*M. africanum*, 1968 yılında Afrika'da Senegalli bir hastada tanımlanarak izole edilmiştir [35]. Dünyanın birçok yerine göç olmasına rağmen Batı Afrika'da spesifiktir. Bundan dolayı *M. africanum*, Batı Afrika ülkelerinde endemiktir. *M. tuberculosis* ve *M. africanum*, insanlarda küresel olarak hastalığın birincil nedenidir [44]. Fenotipik özelliğine bakıldığında *M. bovis* ile *M. tuberculosis* arasında yer alır. *M. africanum* genetik olarak ikiye ayrılmıştır, bunlar Batı Afrika

(subtip I) ve Doğu Afrika (subtip II)'dir. Batı Afrika *M. africanum*'u iki dala (lineage) ayırmıştır. RD711 bölgesi Lineage 1'de; RD7, RD8, RD9, RD10, RD701 ve RD702 bölgeleri ise lineage 2'de delesyona uğramıştır [35]. *M. africanum* daha çok *M. tuberculosis*'e benzer. Yumurtalı besiyerinde R görünümünde koloni morfolojisi oluşturur. T2H'ye duyarlı değildir, nitratı indirgeyemezler, pirazinamidaz aktiviteleri pozitifdir [37].

#### **2.4.5. *M. pinnipedii***

*M. pinnipedi* ilk olarak Batı Avustralya'da deniz kıyısında deniz aslanları ve fok balıklarında TB'ye neden olan basilin IS6110 yöntemi ile tanımlanması sonucu keşfedilmiştir [45]. *M. pinnipedii* yavaş büyüyen bir bakteridir. Pirazinamid duyarlılığı ve EZN boyasında gevşek kord formasyonu oluşturmasından dolayı *M. bovis*'den ayrılır [35].

#### **2.4.6. *M. canetti***

*M. canetti*, ilk olarak 1969 yılında akciğer TB'si olan Fransız bir çiftçi olan G. Canetti'den izole edilmiştir. MTK üyeleri ile benzer 16S rRNA dizilerine sahiptir [46]. *M. canetti*, nadir olarak görülen *M. tuberculosis* varyantıdır. Morfolojik olarak düzgün, yuvarlak ve parlak görümlü kolonileri oluşur. *M. canetti* suşları arasında IS1081 kopya sayısı housekeeping gen polimorfizmi, koloni morfolojisi, hücre duvarı ve lipid içeriği gibi farklılıklar gözlemlenir [35].

#### **2.4.7. *M. caprae***

*M. caprae*, ilk kez İspanya bölgesinde bulunan keçilerde tanımlanarak izole edilmiştir. *M. caprae*, insanlarda ve hayvanlarda TB'ye neden olur, ancak Dünya çapında insanlarda insidansı oldukça düşüktür [47]. *M. caprae*'nin diğer MTK üyelerinden farklı olarak, pirazinamid duyarlılığının yanı sıra epidemiyolojik ve biyokimyasal özellikleri hariç gen (*pncA*, *oxyR*, *katG* ve *gyrA*) polimorfizm kombinasyonları gibi farklı özellikleri bulunmaktadır [35].

### **2.5. *M. tuberculosis*'in Genetik Özellikleri**

*M. tuberculosis* H37Rv'nin genomu  $4,4 \times 10^6$  bç'den oluşmaktadır ve yaklaşık 4000 gen içermektedir [48]. Kromozol yapısı halkasal olup, büyüklük olarak *Escherichia coli* genomuyla aynıdır. Bakteri genomunda guanin ve sitozin (G+C) oranı %65,6'dır. Bu guanin ve sitozin oranı bakterinin aerobik yaşamıyla ilişkilidir. Anaerobik ortamlara da adapte olabilecek metabolik yapıya sahiptir. *M. tuberculosis* diğer bakterilerden radikal olarak farklıdır, çünkü kodlama

kapasitesinin çok büyük bir bölümü lipogenez ve lipolizde yer almaktadır [34, 49]. Bakteriler arasında genlerin transferi plazmidler, transpozonlar ve fajlar ile gerçekleşir. *M. tuberculosis* H37Rv'de kopya sayısı 16 iken diğer kökenlerde 0 ile >25 sayıları arasında farklılık göstermektedir. Bu özelliğinden moleküler epidemiyolojik çalışmalarda IS6110 tiplendirme yöntemi başarıyla kullanılmaktadır [34].

## 2.6. Tüberkülozda Bulaş ve İmmünopatogenez

TB, insanların yaşam kalitesini düşüren, fiziksel, duygusal ve sosyal yönden olumsuz etkileyen kronik bir hastalıktır. Bu hastalık ile mücadele etmek için immün sistemimizin özel bir mekanizması yoktur. Bundan dolayı TB'ye yakalanma olasılığımız bulunmaktadır [50].

TB, iki aşamalı bir hastalıktır. Birinci aşamada basil akciğere gelmekte ve primer TB enfeksiyonu oluşmaktadır. İkinci aşama ise postprimer TB olarak kabul edilmektedir [51] (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2:** TB immünopatogenezi ile ilgili 4 evre aşaması [52].

Evre I - Bulaşma-başlangıç evresi (1. hafta)
Evre II - Enfeksiyon, çoğalma ve yayılma evresi (2-3 hafta)
Evre III - Konakçıda immün yanıt gelişim evresi
Evre IV - Likefaksiyon ve hızlı basil çoğalması, yeniden bulaşma evresi

1930'lu yıllarda Wells ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda TB'nin hava yolu ile bulaşmasının mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır. Bu teoriye göre, hastalığın "damlacık çekirdekleri" ile hastalardan sağlam bireylere geçtiği ifade edilmiştir. Hastanın öksürme, hapşırma ya da konuşması ile havaya çok miktarda basil saçılmakta ve bu basiller de damlacıklar halinde havada asılı kalabilmektedir [51,53]. TB kemik, merkezi sinir sistemini ve diğer birçok organ sistemini etkiler ve birçok belirtisi vardır, fakat en önemli bulaş yolu inhalasyondur [48].

Yaklaşık 1-5 µm çapında, içinde 1-3 basil bulunduran damlacık çekirdekleri ilk olarak akciğerin orta-alt loblarına yerleşir ve kolaylıkla alveollere ulaşır, alveollerde bu basiller makrofajlar tarafından fagosite edebilir [16]. *M. tuberculosis*'in sebep olduğu hastalığın klinik olarak meydana gelmesi, basilin virülansı ile birlikte konağın immün savunmasına bağlı olarak şekillenir [52].

TB, konağın mononükleer fagositleri ve T lenfositlerinin birbiri ile olan ilişkisine bağlı olarak gelişen kronik granülomatöz bir enfeksiyon hastalığı olarak belirtilir. Bulaş sonrası enfeksiyon oluşup oluşmaması ya da hastalığa neden olup olmaması konağın direnci ve

bakteriyel virülans arasındaki dengeye bağlıdır. TB’de, doğal ve kazanılmış immünite olmak üzere iki farklı mekanizma rol oynamaktadır [54].

### 2.6.1. Tüberküloz İmmünolojisi

- **Tüberkülozda Doğal İmmün Yanıt**

TB basilleri, alveollere ulaştığında doğal savunma yollarıyla ortadan kaldırılır ya da çoğalarak klinik görünümüne meydana gelir. Konağın doğal savunmasında rol oynayan faktörler; üst solunum yolu fiziksel engeli, makrofajlar, nötrofil lökositler, fagositoz, inflamatuvar hücreler, oksijen ürünleri ve sitokinler, dentritik hücreler, alveolar makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptoz ve genetikdir [55].

- **Tüberkülozda Kazanılmış İmmün Yanıt**

Mikobakterilere karşı doğal dirençte rol oynayan asıl hücreler olan makrofajların ve dendritik hücrelerin kazanılmış direncin başlatılmasında oldukça önemli görevleri vardır. Spesifik inflamatuvar cevabın gelişmesinde rol oynarlar. Konakta, ilk enfeksiyon oluştuktan sonra basil duvarında bulunan lipit tüberküloproteinler tarafından indüklenen spesifik hücrel immün cevap oluşur [54,55].

- **Hümmoral İmmünite**

Mikobakteriyel enfeksiyonlar, hümmoral antikor cevabını uyarırlar. Mikobakterilerin makrofaj ile fagosite edilmesinde opsonize olan antikorların önemli etkileri olmadığı gözlenmiştir [56].

- **Hümmoral İmmünite**

TB, hümmoral immün cevapla kontrol altına alınan hücre içi bir enfeksiyonudur. Hümmoral immünite; T lenfositler, CD4+ ile CD8+ T hücreleri, makrofajlar ve sitokinler ile sağlanır [56].

- **Sitokinler**

Sitokinler, etkin bir şekilde immün cevabı kontrol ederler. Makrofajları aktive eden sitokinleri sentezleyen gama-delta T hücrelerinin, antimikrobakteriyel immün dirençte rol aldıkları bildirilmiştir [57].

- **T lenfositler**

T lenfositler, bir T hücre reseptörü aracılığı ile antijeni tanıdıktan sonra spesifik olarak aktive olurlar [55]. Bakteri ve makrofajlar arasındaki etkileşim sonucu yardımcı T (CD4+) ve

sitotoksik T (CD8+) hücre cevabı oluşur. Enfeksiyonun kontrol altında tutulmasında iki tip T hücre yanıtı arasında farklılıklar olsa da her ikisi de konak savunmasında yer almaktadır [58]. Tüberküloprotein ve lipitler tarafından uyarılan makrofajlardan salınan interlökin (IL)-12 ve interferon (INF)- $\gamma$ , immatür CD4+ Th0 lenfositlerin proliferasyonunu sağlar [55].

- **CD4+T ve CD8+ T Hücreleri**

Mikobakteriyel immünitede dominant olan CD4+ T hücreleri, kompleksi tanır ve aktive olurlar. TB'ye karşı CD4+ T hücreleri enfeksiyonun her evresinde önemini korumaktadır. INF- $\gamma$  makrofajları, IL-2 ise CD8+Tc lenfositleri aktivitesini sağlar [55, 56]. CD4+ yardımcı T lenfositler, INF- $\gamma$  ve farklı sitokin salınım yaparak makrofajları aktive ederler. Spesifik immünite gelişmesinde ise, CD4+ T hücrelerinin dışında, CD8+ Tc hücreleri üzerinde durulmuştur, bunu takiben CD8+ Tc hücreleri TB ile enfekte olan hücreleri antijen spesifik şekilde lize etmektedir [55,58]. CD8+ Tc hücreleri patojenle enfekte ya da malign dönüşümü ile konak hücrelerinin öldürülmesinin nedenidir [59]. CD8+ T hücreleri ise bakteriyi yok edemeyen enfekte fagositleri öldürür. Dolayısıyla serbest kalan bakteriler aktif makrofajlar tarafından alınarak öldürülür [58].

## **2.7. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısı**

TB'nin kesin tanısı, hasta materyalindeki bakterinin izole edilmesi ile konulur. Mikrobiyolojik olarak bakterinin kültürde üretilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir. TB basilinin varlığı akciğer (açlık mide sıvısı, balgam) örnekleri ve akciğer dışı (idrar, steril vücut sıvıları ve doku) örnekler kullanılarak tespit edilir [60].

TB tanısında etken faktörler, hastanın yanı sıra sağlık hizmeti ile ilgili de olabilmektedir. Bundan dolayı alınan örnekler temiz, steril, vida kapaklı, dayanıklı ve tek kullanımlık kaplara konularak taşınmalıdır. Kontaminasyona sebep olacak mantar ve bakterilerin üremesini önlemek için en kısa sürede laboratuvara gönderilmelidir. TB teşhisinin gecikmesi bulaşıcılık, toplumda hastalığın yayılması ve ölüm riski ile önemli bir sorun oluşturmaktadır. [61].

### **2.7.1. Mikroskopisi**

TB basilin mikroskopla incelenmesi sık kullanılan, basit, hızlı ve ekonomik bir yöntemdir. Alınan örnekten doğrudan preparat hazırlanabileceği gibi homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi sonrasında da preparatlar hazırlanabilir ve ardından boyama işlemi uygulanır. Mikobakteriler için iki farklı boyama yöntemi kullanılabilir. Bunlar karbol fuksin (EZN, Kinyoun) yöntemi veya florokrom (auramin O, auramin-rhodamin) boyalar ile boyama yöntemidir. EZN

yönteminde mikroskop görüntüsü mavi zeminde kırmızı basiller halinde gözükmetedir [62]. Klinik örnekte boyama sonrası ARB varlığının değerlendirilmesi Tablo 2.3'de verilmiştir.

**Tablo 2.3:** EZN ve florokrom boyama ile klinik örnekte ARB varlığının değerlendirilmesi [16].

Sonuç	EZN Yöntemi (1000x)	Florokrom Yöntemi	
		(250x)	(450x)
Aside dirençli basil görülmedi	0	0	0
Şüpheli (yeni örnek tekrarı önerilir)	1-2/300	1-2/30	1-2/70
(1+); Nadir ARB görüldü	1-9/100	1-9/10	2-18/50
(2+); Az sayıda ARB görüldü	1-9/10	1-9/1	4-36/10
(3+); ARB görüldü	1-9/1	19-90/1	4-36/1
(4+); Çok sayıda ARB görüldü	>9/1	>90/1	>36/1

## 2.7.2. Kültür

Kültür yöntemi, TB'nin kesin tanısında altın standart yöntem olarak önemini korumaktadır. Kültür yöntemi hem daha duyarlıdır hem de tür, tip tayini ve ilaç duyarlılık testlerine olanak tanımaktadır. Mikobakteriyel kültür yöntemlerinde en yaygın kullanılan katı besiyeri, Löwenstein-Jensen(LJ)'dir. Diğer en çok tercih edilen agar bazlı besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir [63].

Mikobakterilerin katı ve sıvı besiyerlerinde üreme süreleri 7-21 gündür ve uygun üreme sıcaklıkları 35-37°C'dir. Katı besiyerinde üremeleri ise ortalama 6-8 haftadır. *M. tuberculosis*, yumurta bazlı besiyerinde kolaylıkla ürer, kenarları düzensiz, ortası karnabahar görünümünde, soluk sarı-krem renkli kuru koloniler gözlemlenir [37,62].

Kültür için sıvı bazlı ticari yarı otomatize veya tam otomatize sistemler de kullanılmaktadır. Radyometrik sistemler, floresan esaslı sistemler, kolorimetrik sistemler, gaz basınç değişimini saptayan sistemler gibi farklı kültür sistemleri bulunmaktadır [64,65].

## 2.8. Tiplendirme Yöntemleri

### 2.8.1. Fenotipik Yöntemler

MTK içinde yer alan türlerin tanımlanmasında üreme ısısına, üreme hızına, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine göre tür ayrımı yapılır [58]. Fenotipik tanımlamada ayrıca oksijen kullanımı, katalaz aktivitesi, niasin birikimi, nitrat redüktaz aktivitesi, T2H direnci ve pirazinamidaz üretimi incelenir [67]. Bu testler bakterinin ön tanımlanmasında MTK ve tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) ayırımına yardımcı olmakla birlikte, MTK'nın kesin tanısı için yeterli değildir [68].

## 2.8.2. Genotipik Yöntemler

TB'li hastaların klinik materyallerinde MTK varlığının hızlı bir şekilde gösterilmesinde Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)'nin kullanılması tavsiye edilmektedir [69]. Bu testler içerisinde ilk geliştirilene, her laboratuvarın kendi imkanları doğrultusunda hazırladığı (*in house*) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'dur. Bu yöntem rutin tanı ve araştırma yapan diğer laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır [68]. *M. tuberculosis*'in genotipik tespitinde özgül prob (IS6110, MTP40 gibi hedef dizileri) uygulamaları kullanılmaktadır [69,70]. Kullanılan bu testlerin yıllar içerisinde duyarlılık ve özgüllüklerinin artmasına rağmen, halen kullanılan ticari testlere kıyasla daha düşüktür [68].

## 2.9. İlaç Direnci

TB basiline direnç, doğal direnç geninin varlığı ya da kendiliğinden mutasyona bağlı olarak gelişmektedir. Bakteriler arası gen aktarımıyla direnç meydana gelmemektedir. Doğal direnç olasılığı ise; izoniazid (INH) ve etambutol (EMB) için  $10^{-6}$ , rifampisin (RIF) için  $10^{-8}$ , streptomisin (SM) için  $10^{-5}$ , INH+RF için  $10^{-14}$ , INH+RF+EMB için  $10^{-20}$  kadardır [71]. *M. tuberculosis*'te ilaç direncine neden olan en önemli faktörler hücre duvarındaki yüksek lipid içeriği, yüksek mutasyon oranı ve uygun olmayan ya da yetersiz tedavidir [72].

TB tedavisi, birden fazla ilaç kombinasyonu ile uzun süreli tedavi gerektirebilir. Uzun süreli tedavinin ve TB basiline özelliklerinden dolayı, tedavi almış hastalarda (sekonder) ve tedavi almamışlarda ise (primer) direnç önemlidir [73].

TB tedavisinde kullanılan ilaçlar iki gruba ayrılır. Bunlardan birinci grup olan primer ilaçlar; RIF, pirazinamid (PZA), INH, SM ve EMB'dir. Etambutol hariç diğerleri bakterisidal ilaçlardır. İkinci grup sekonder ilaçlar ise, etiyonamid, sikloserin, kapreomisin, kanamisin ve paraaminosalisilik asit (PAS) gibi ilaçlardır. Bu ilaçlar birinci grup ilaçlara göre fazla toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır [74].

ÇİD-TB, TB tedavisinde kullanılan birinci seçenek anti-TB ilaçlardan özellikle INH ve RIF'e karşı bakterilerin direnç geliştirmesine denir. Son yıllarda anti-TB ilaçlara direncin çok artmasıyla çok daha tehlikeli olan yaygın ilaca dirençli (YİD)-TB ortaya çıkmıştır. YİD-TB, ÇİD-TB'ye (INH ve RIF direnci) ek olarak florokinolon ve herhangi bir parenteral ilaca (amikasin, kapreomisin, kanamisin) karşı direnç kazanma durumuna verilen isimdir [75,76].

## 2.10. Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler

TB ve TDM'nin sebep olduğu hastalıkların epidemiyolojisinde, tüm bulaşıcı hastalıklarda olduğu gibi, enfeksiyon kaynağını tanımlamak ve bu patojenlerin neden olduğu hastalıkları belirlemek için moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılmaktadır [77].

Birçok ülkede hastalık bulaşının anlaşılmasında DNA genotiplendirme teknikleri kullanılmaktadır. Laboratuvarda elde edilen *M. tuberculosis* izolatları arasında ayırım yapılması, iki veya daha fazla izolatta nükleik asit sekanslarının birbiriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır [78].

Moleküler genotiplendirme yöntemi hızlı, güvenilir, ayırım gücü yüksek, değerlendirilmesi ve yorumlaması kolay, tekrarlanabilirliğinin olması çalışmanın güvenilirliğini ve çeşitliliğini arttırmaktadır. DNA parmak izi "fingerprint" olarak adlandırılan yöntem MTK'nın genotip bilgisi ve popülasyonundaki genetik çeşitliliğini belirler. Bu teknikler patojenitesi, virülans, immünojenisite, bulaşabilirlik, ilaç direnç profilleri ve konakçı-patojen ilişkisi gibi MTK suşlarının özelliklerini belirleme olanağı vermektedir [79].

16S rRNA, 16S rRNA-23S rRNA, IS6110-PZR-RFLP, MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme gibi moleküler epidemiyolojik yöntemler, MTK'nın neden olduğu salgınların tanımlanmasında tek başlarına veya çeşitli kombinasyonlarıyla kullanılabilir [67].

- **IS6110 PZR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

MTK izolatları için standardize ve yaygın uygulanan moleküler yöntem IS6110 restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) tiplemesidir. Bu moleküler yöntem, suş başına 0 ile 25 arasında kopya sayılarında sekanslarının kromozomal pozisyonlarındaki değişkenliğine dayanmaktadır. Dizilimlerinin ise farklı çeşitleri bulunmaktadır; IS6110, IS8110, IS1547 ve IS-like'tır. Çalışmalarda en yaygın kullanılanı ise IS6110'dur [80]. RFLP moleküler epidemiyolojide "altın standart" tipleme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Yüksek ayırım gücünden dolayı yeni geliştirilen PZR bazlı yöntemler direkt kullanılmaktadır [81]. Elde edilen klinik izolatların DNA'sı, *PvuII* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilir ve DNA fragmentleri elektroforeze tabi tutularak ayrılır, ardından DNA'lar "southern blotting" tekniği ile naylon membrana transfer edilir. Hibridizasyondan sonra IS6110 prob ve kit ile kolorimetrik bir sistemle görünür hale gelir. Ortaya çıkan görüntü film üzerine aktarılıp yorumlaması yapılır [82].

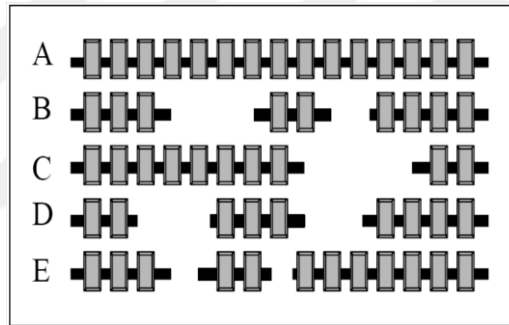
- **Spoligotiplendirme (Spacer oligonucleotide typing)**

Spoligotiplendirme, MTK suşlarının genotipini belirlemek için yaygın olarak kullanılan PZR-bazlı reverse dot blot tekniğidir. Bu yöntem, MTK bakterilerinde belirli bir kromozomal direkt tekrar (Direct repeat-DR) lokusundaki polimorfizmi göstermeye dayanır [83].

*IS6110* integrasyonunun sıcaklık noktası, farklı sayıda 36 baz çiftlik DR bölgesi içermektedir. DR'ler arasında 94 farklı (spacer) bölgesi belirtilmiştir. Fakat bunlardan 43 tanesi laboratuvarında rutin çalışmalarda tercih edilmektedir [84].

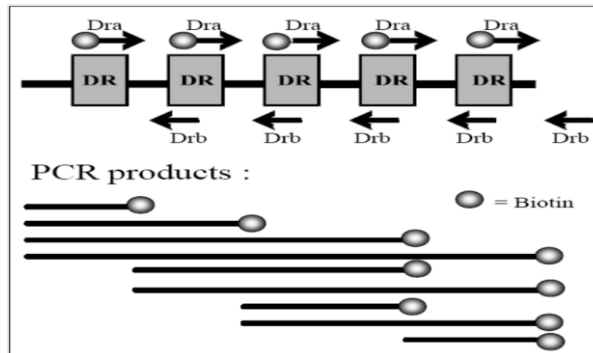
Genellikle moleküler epidemiyoloji, evrim ve popülasyon genetiği gibi araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknik hızlı, kolay ve tekrarlanabilir özelliği ile avantaj sağlamaktadır [85].

DR'lerin kopya sayıları ve farklı (spacer) dizilimlerinin oluşması suşlar arasında farklılık gösterir. Suşlar arasındaki DR ve komşu tekrarlı olmayan ara parçalar ise "Doğrudan Varyant Tekrar" (DVR) olarak adlandırılır [86].



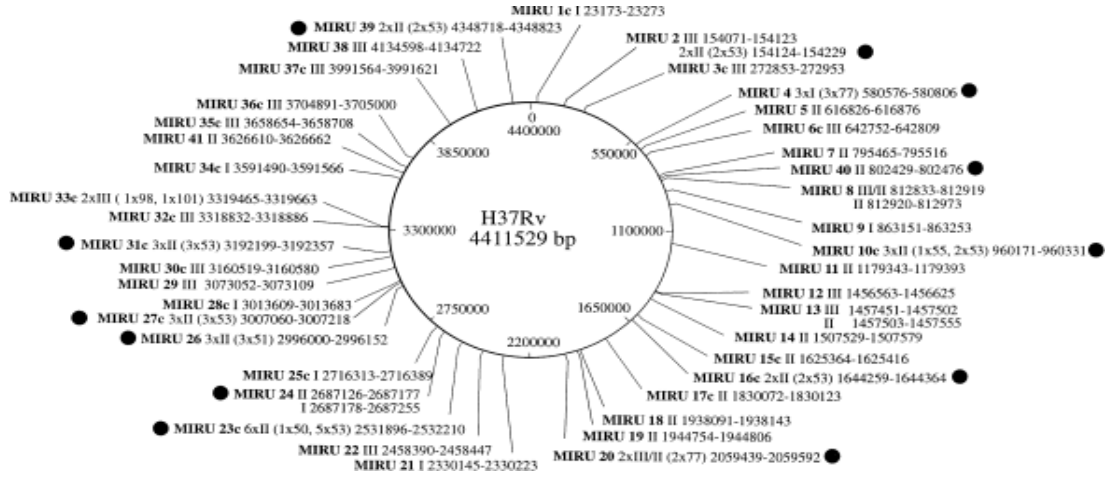
**Şekil 2.4:** Farklı MTK suşlarının DR bölgelerinde polimorfizm şematik gösterimi. DVR blokları, bir diğerine kıyasla bir suшта eksiktir. Spacer düzeni yaklaşık olarak aynı kalır [86].

DR lokusunu hedef alan biotinle işaretlenmiş primerler eklenir. Eklenmiş olan biotinler aralarındaki farklı (spacer) bölgeler amplifiye edilmektedir. Amplifikasyonun ardından elde edilen PZR ürünü denatüre olmaktadır [86].



**Şekil 2.5:** DR bölgelerinin amplifikasyon prensibi [86].





**Şekil 2.7:** *M. tuberculosis* H37Rv referans suşu, 12 tanesi polimorfiktir. MIRU-VNTR tiplemesi için uygun olan 41 MIRU lokusunu içermektedir [89].

Bu polimorfizmin analizi *M. tuberculosis* genotiplendirmesinde kullanılan PZR bazlı bir metottur. MIRU-VNTR tiplendirme yöntemi genom boyunca dağılmış olan izolatlar arasındaki polimorfizmin farklılığını ortaya koyar [84].

MIRU-VNTR, *M. tuberculosis* izolatlarının genomunda çok sayıda minisatelit benzeri lokuslar bulunmaktadır. MIRU-VNTR yönteminin yüksek ayırım gücü, pratik ve hızlı oluşu ve dijital sonuçlar vermesi nedeni ile MTK klonlarının epidemiyolojik özelliklerini belirlemede kullanılan hızlı yöntemdir [90].

*M. tuberculosis*'in genotiplendirilmesinde ilk kez 12 lokus MIRU-VNTR kullanılmıştır ve 12 lokusun gelişmesinin ardından 15 ve 24 lokustan oluşan standart bir format geliştirilmiştir. MIRU 15 lokus bölgesi ise genotipleme için uygun kabul edilmektedir [91].

Spoligotiplendirme ve IS6110 RFLP ile karşılaştırıldığında, MIRU-VNTR tiplemesi ayırıcı bir profil meydana getirmektedir. MIRU-VNTR genotiplendirme yöntemi *M. tuberculosis* suşlarının moleküler epidemiyolojik ve filogenetik taramasında referans yöntem olarak kullanılması tavsiye edilmektedir [92].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın 04.09.2019 tarihli ve 2019/355 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı" nı almıştır.

#### 3.1. *M. tuberculosis* suşları

Bu tez çalışmasına 01.01.2016 ve 31.12.2017 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda klinik materyalinin kültüründe MTK üremesi tespit edilen ve +4°C'de saklamaya alınan kültür koleksiyonundaki 103 klinik izolat dahil edilmiştir. Çalışmaya bir hastadan izole edilen izolatlardan sadece bir tanesi dahil edilmiştir.

#### 3.2. Moleküler Analiz

##### 3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemlerinde kullanılmak üzere 103 *M. tuberculosis* izolatının DNA'sını elde etmek için MGIT sıvı besiyerinden Mickle cihazı kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon ardından spektrofotometre (CHEBIOS) ile DNA ölçümü yapılarak yeterli ve eşit miktarda DNA bulunduğu kontrol edildi. Ekstraksiyon protokolü aşağıda belirtildiği şekildedir.

- **Sıvı Besiyerinden DNA Ekstraksiyonu**
  1. Üreme tespit edilen Middlebrook 7H9 besiyerinden 0,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
  2. 80°C'de 30 dakika inkübe edilerek bakteriler inaktive edildi.
  3. 15000xg'de 15 dakika santrifüj edildi, üst sıvı atıldı.
  4. 0,5 ml 1x TE tampon ilave edildi.
  5. 15000xg'de 15 dakika santrifüj edildi, üst sıvı atıldı.
  6. 0,25 ml 1x TE tampon ilave edildi.
  7. Tüpe 50-100 µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ilave edildi.
  8. İki dakika Mickle (Mickle tissue disintegrator) cihazında hücre parçalama işlemine tabi tutuldu.
  9. 15000xg'de 10 dakika santrifüj edildi, üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
  10. Moleküler çalışmalar yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.2. Spoligotiplendirme Yöntemi

Seçilen 103 *M. tuberculosis* izolatına ekstraksiyon sonrasında spoligotiplendirme yöntemi uygulandı. Spoligotiplendirme yöntemi ile PZR aşamasında 36 bç uzunluğunda DR bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

- **PZR**

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

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

DR bölgesini hedef alan primer sentezletildi. Her bir çalışmada pozitif (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG veya genotipi bilinen klinik izolat) ve negatif kontrol (dH<sub>2</sub>O) kullanıldı. Her bir izolat için Tablo 3.1'de belirtilen miktardaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 3.1:** Spoligotiplendirme yönteminin PZR reaksiyon karışımı

Spoligotiplendirme malzemeleri	Miktar
Distile su	9,5 µl
2X PZR Master Miks (Fermantas)	12,5 µl
DRa (25 pmol/ml)	0,25 µl
DRb (25 pmol/ml)	0,25 µl
DNA	2,5 µl

PZR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cyler (Applied Biosystem AB) cihazına yerleştirilerek Tablo 3.2'deki programda uygulandı.

**Tablo 3.2:** Spoligotiplendirme amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	94	1 dakika	
Primer Bağlanması (Annealing)	55	1 dakika	40
Zincir Uzaması (Extension)	72	45 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	10 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

PZR reaksiyon karışımı mikobakteri DNA'sı içermeyen temiz bir odada hazırlandı. DRa primeri biotininle işaretli olduğundan dolayı +4°C'de saklandı. DRb primeri küçük miktarlara bölünerek -20°C'de saklandı.

- **Spoligotiplendirme Yönteminde Kullanılan Çözeltiler**

Spoligotiplendirme yönteminde kullanılacak çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

**0,5 M EDTA (pH 8,0)**

EDTA	46,53 gr
dH <sub>2</sub> O	250 ml

pH 8,0'e ayarlandı ve otoklavlandı.

**20 mM EDTA (pH 8,0)**

dH <sub>2</sub> O	960 ml
0,5 M EDTA	40ml

**20x SSPE (pH 7,4)**

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

**2x SSPE**

20x SSPE	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

**%10 SDS**

Önceden ısıtılmış	250 ml (60°C) dH <sub>2</sub> O
SDS	25 gr

**2x SSPE / %0,1 SDS**

dH <sub>2</sub> O	890 ml
20X SSPE	100 ml
%10 SDS	10 ml

SSPE solüsyonu ve SDS solüsyonu ayrı mezürlerde ölçüldü.

### **2x SSPE/%0,5 SDS solüsyonu**

dH <sub>2</sub> O	850 ml
20x SSPE	100 ml
%10 SDS	50 ml

### **%1 SDS**

%10 SDS	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

### **10x TE**

Tris HCl	15,764 gr (100 mM)
0,5M EDTA	20 ml (10mM)
dH <sub>2</sub> O	980 ml

#### **• PZR Ürününün Hibridizasyonu ve Görünür Hale Getirilmesi**

Biotin ile işaretli primerler kullanılarak ve DR bölgesi hedef alınarak gerçekleştirilen PZR sonrası ampliconların hibridizasyonu gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası ürünlerin streptavidin alkalen fosfataz enzimi ve fosfatlı kemifloresan substratı eklenerek görünür hale getirilme prosedürü aşağıdaki gibi yapıldı.

- 1- Bütün tampon çözeltileri önceden çalışılmak istenen ısıya getirildi. Bir membran için gereken miktarlar;

80 ml 2x SSPE/%0,1 SDS, 60°C
160 ml 2x SSPE/%0,5 SDS, 60°C
160 ml 2x SSPE/%0,5 SDS, 42°C
160 ml 2x SSPE, oda sıcaklığı

- 2- 150 ml 2x SSPE/%0,1 SDS üzerine 20 ml PZR ürünü ilave edildi.
- 3- PZR ürünlerini 99°C'de 10 dakika boyunca denatüre edildi.
- 4- PZR ürünleri denatüre edilirken, membran (ISOGEN) 80 ml 2x SSPE/%0,1 SDS ile 60°C'de 5 dakika yıkandı.
- 5- Sünger yastığı (İmmunetiks Plastic Cushion PC200) ve membranı miniblotter'a (Miniblotter-3024) yerleştirirken, miniblotter'ın slotlarının membrana çizgi şeklinde bağlanmış oligonukleotidlere dikey konumda olmasına dikkat edildi.

- 6- Slotlarda kalan residüel sıvı aspirasyonla uzaklaştırıldı.
- 7- Slotlar dilüe edilmiş sıcak PZR ürünü ile dolduruldu. Miniblotter horizontal konumda 60°C'de 60 dakika hibridize (FINEPCR- combi-SV120) edildi.
- 8- Örnekler slotlardan aspire edildi ve plastik penset kullanarak membran miniblotter'dan çıkarıldı.
- 9- Membran iki kez 80 ml 2x SSPE/%0,5 SDS ile 60°C'de 10 dakika yıkandı.
- 10- Membran bir poşet dosya içine koyuldu.
- 11- 5 ml 2x SSPE/%0,5 SDS üzerine 1,25 ml streptavidin-alkalen fosfataz konjugatı (500 U/ml) (Promega) ilave edildi, karışım üç tarafı kapatılmış poşet dosya içindeki membrana döküldü, hava kabarcıkları uzaklaştırılarak, poşet dosyanın açık kenarı ısıtılarak kapatıldı. 45-60 dakika boyunca 42°C'de inkübe edildi.
- 12- Membran iki kez 80 ml 2x SSPE/%0,5 SDS ile 10 dakika 42°C'de inkübe edildi, 80 ml 2x SSPE ile 5 dakika oda sıcaklığında durulandı.
- 13- Membran üzerine 5 ml ECF substratı (Attophos AP Flourescent Substrate, Promega) ilave edildi, poşet dosya içinde 60 dakika boyunca inkübe edildi.
- 14- Membran stretch film ile sarılarak uygun illuminasyon kasetinde (450 nm) 20 saniye expose edilerek (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M) görüntü alındı.

- **Membranın Görüntülenmesi ve Yorumlanması**

Spoligotiplendirme yönteminde, sonuçların yorumlanması aşamasında spacer oligonükleotidlerin kovalent bağlandığı membranla PZR ürünü hibridizasyonu sonucu oluşan blotlanmalar dikkate alınarak spacer bölgelerinin varlığı değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 3.1'de belirtilen Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan "Oktal kod" formatına çevrildi. Elde edilen veriler SpolDB4 veritabanı kullanılarak kümeler ve familyalar (clade) belirlendi. Database adres:

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

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

**Şekil 3.1:** Spoligotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan Oktal kod anahtarı

- **Membranın Regenerasyonu**

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

- 1- Membran iki kez %1 SDS ile 80°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 2- Membran 20 mM EDTA pH 8 ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 3- Poşet dosya içerisine alınan membrana 20 mM EDTA pH 8 ilave edildi, poşet dosya üzerine, kullanım sayısı ve tarih yazılarak +4°C'de saklandı.

### 3.2.3. MIRU-VNTR

Bu tez çalışmasında 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi kullanıldı. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primerler sentezlendi [94] (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3:** 15 lokus MIRU-VNTR yöntemi için kullanılan primerler

Locus	Alias	PZR primeri (5' - 3')
424	Mtub04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC (FAM)
577	EtrC	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
580	MIRU04 EtrD	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAAACGCCAGC
802	MIRU40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
960	MIRU10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
1644	MIRU16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
1955	Mtub21	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
2163b	Qub11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
2165	EtrA	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT
2401	Mtub30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
2996	MIRU26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
3192	MIRU31 EtrE	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
3690	Mtub39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG
4052	Qub26	AACGCTCAGCTGTCCGAT (NED) CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT
4156	Qub4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)

- **PZR**

Her bir izolata özgü 15 MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesi için 15 PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu tez çalışmasında bazı MIRU lokusları tekli, bazıları ise multipleks olarak çalışıldı. Tekli ve multipleks çalışılan MIRU lokusları ve bunların PZR işlemleri esnasında kullanılan primerlerinin miktarları Tablo 3.4’de verilmiştir.

**Tablo 3.4:** MIRU-VNTR yönteminde tekli ve multipleks çalışılan lokusların listesi

**Primerler (Forward ve Reverse beraber)**

MIRU04 (2 µl) - MIRU10 (2 µl)*
MIRU26 (2 µl)
MIRU40 (2 µl)
MIRU16 (2 µl) - Qub11b (3 µl)*
EtrC (2 µl)
EtrA (3 µl)
Mtub21 (2 µl) - Mtub39 (3 µl)*
EtrE (2 µl)
Mtub04 (2 µl)
Qub4156 (3 µl)
Qub26 (3 µl)
Mtub30 (2 µl)

\*Multipleks çalışılacak primerler

MIRU-VNTR yönteminde, MIRU26 lokusu için gerçekleştirilen PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.5’de verilmiştir.

**Tablo 3.5:** MIRU26 lokusu için gerçekleştirilen PZR reaksiyon karışımı

<b>MIRU-VNTR malzemeleri</b>	<b>Miktar</b>
Distile su	4,5 µl
DMSO (Sigma)	1 µl
2X PZR Master Miks (Thermo science)	12,5 µl
Primerler (Forward ve Reverse)	2 µl
DNA	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 µl</b>

\*Primer miktarına göre miks örnek başına 20 µl olacak şekilde H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

PZR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cyclus (Applied Biosystem AB) cihazına yerleştirilerek Tablo 3.6’daki programda uygulandı.

**Tablo 3.6:** MIRU26 lokusunun amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)**	61	30 saniye	35
Zincir Uzaması (Extension)	70	1 dakika	
Son Uzaması (Extension)	72	7 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

\*\*Mtub39-Mtub21 lokusları PZR reaksiyon koşullarında primer bağlanması (annealing): 55°C ve 30 saniyedir.

- **PZR Ürününün Agaroz Jele Yüklenmesi, Elektroforezi ve Yorumlanması**

PZR sonrası oluşan ampikonlar 150 Voltta, 180 dakika, etidyum bromürlü %2'lik agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu. Elektroferez sonrası jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) ile görüntülendi. Bant büyüklüğünün tespitinde 100 bç'lik marker (Thermo Scientific™ Gene Ruler 100 bp DNA Ladder) kullanıldı. Bant büyüklüklerine dayanarak 15 lokus MIRU-VNTR tiplendirme sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayıları EK 1'deki Tabloya göre ve miruvnrplus veritabanı ([www.miruvnrplus.org](http://www.miruvnrplus.org)) kullanılarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Hastaların Genel Özellikleri

Bu çalışmaya 01.01.2016-31.12.2017 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen tüberküloz ön tanıli hastalara ait klinik örneklerden izole edilen, 103 *M. tuberculosis* izolatı dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 103 hastanın 74 (%71,9)'ü erkek, 29 (%28,1)'u kadın ve yaş ortalamaları 47,35'dir. (minimum: 6, maksimum: 92). Hastaların 91 (%88,3)'i akciğer TB'si iken geri kalan 12 (%11,7)'si akciğer dışı TB olarak tespit edildi.

Bu izolatların 43 (%41,7)'ü birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine dirençli, geri kalan 60 (%58,3) izolat ise bu ilaçlara duyarlıdır.

**Tablo 4.1:** Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olduğu belirlenen 43 hastanın direnç profili

Birinci seçenek anti-TB ilaç	Dirençli
SM	27 (%62,8)
INH	19 (%44,2)
RIF	7 (%16,3)
EMB	4 (%9,3)
SM + INH	7 (%16,3)
SM + RIF	4 (%9,3)
INH + RIF	3 (%7)
SM + EMB	3 (%7)
SM + INH + RIF	3 (%7)
<b>Toplam</b>	<b>43</b>

TB: Tüberküloz, SM: Streptomisin, INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin EMB: Etambutol

### 4.2. Moleküler Tiplendirme (Spoligotiplendirme) Sonuçları

Uluslararası spoligotiplendirme veri tabanı olan SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) ve MIRU-VNTR Plus (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/searchdb.faces>) veri tabanlarında bulunan suşlarla karşılaştırma sonrasında çalışmaya dahil edilen 103 izolatın spoligotiplendirme yöntemi ile elde edilen klonal grup dağılımında; 103 izolatın 10 spoligotiplendirme kümesi içerisinde yoğunlaştığı tespit edildi. En büyük kümenin 48 (%46,6) izolat ile T ailesi (T1 sublineage) olduğu, ikinci sırada Haarlem ailesinin 16 (%15,5) izolat içerdiği, TUR ailesinin 13 (%12,6) izolat, S ailesinin 10 (%9,7) izolat, Beijing ailesinin 4 (%3,9) izolat, LAM ailesinin 4 (%3,9) izolat, Bovis ailesinin 3 (%2,9) izolat, NEW-1 ailesinin 3 (%2,9) izolat, Delhi/CAS ailesinin 1 (%1) izolat, H37Rv ailesinin 1 (%1) izolat içerdiği görüldü. T ailesinin kendi içerisinde 2 farklı spoligotip paterni gösterdiği; 47 (%98)

izolatın T1 alt ailesinde, 1 (%2) izolatın ise T4 alt ailesinde olduğu belirlendi (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3).





**Tablo 4.3:** 103 izolata ait spoligotiplendirme aileleri ve görülme oranları

Spoligotiplendirme kümesi	İzolot sayısı (n)	Görülme oranı (%)
T ailesi	48	46,6
T1 alt ailesi	47	
T4 alt ailesi	1	
Haarlem	16	15,5
TUR	13	12,6
S	10	9,7
Beijing	4	3,9
LAM	4	3,9
Bovis	3	2,9
NEW-1	3	2,9
Delhi/CAS	1	1
H37Rv	1	1
<b>Toplam</b>	<b>103</b>	<b>100</b>

Birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine dirençli 43 izolatın spoligotiplendirme küme dağılımı Tablo 4.4’de verilmiştir.

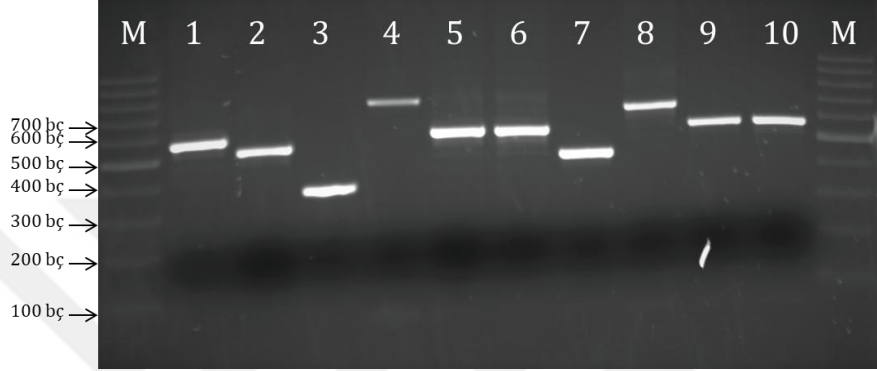
**Tablo 4.4:** Birinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli 43 izolatın spoligotiplendirme küme dağılımı

Spoligotiplendirme kümesi	Dirençli izolat sayısı	
T kümesi	19	Bir ilaca dirençli: 16 SM: 8 INH: 5 RIF: 2 EMB: 1
		İki ilaca dirençli: 3 SM+INH: 2 SM+EMB: 1
Haarlem	10	Bir ilaca dirençli: 6 SM: 1 INH: 4 RIF: 1
		İki ilaca dirençli: 2 SM+INH: 1 SM+RIF: 1
		Üç ilaca dirençli: 2 SM+INF+RIF: 2
S	6	Bir ilaca dirençli: 4 SM: 4
		İki ilaca dirençli: 2 SM+EMB: 2
Beijing	3	Bir ilaca dirençli: 2 SM: 2
		Üç ilaca dirençli: 1 SM+INF+RIF: 1
LAM	3	Bir ilaca dirençli: 3 SM: 1 INH: 2
TUR	1	İki ilaca dirençli: 1 SM+INH: 1
H37Rv	1	Bir ilaca dirençli: 1 INH: 1
<b>Toplam</b>	<b>43</b>	

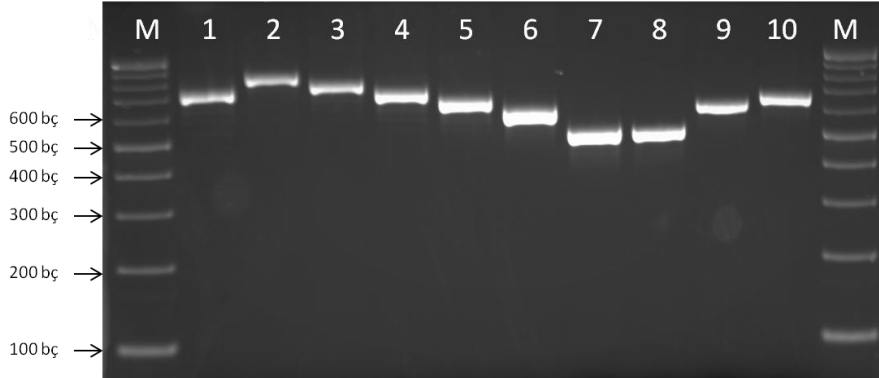
Çalışma sonrası tespit edilen 4 Beijing izolatından (Tablo 4.2) ikisinde SM direnci, birinde is SM+INH+RIF direnci yani ÇİD-TB olduğu belirlendi (Tablo 4.3). Bu izolatların elde edildiği hastaların ikisi yabancı uyruklu olup birinin Rusya vatandaşı, diğerinin ise Kırgızistan

vatandaşı olduğu tespit edildi. Diğer iki hasta ise Türk vatandaşıdır. Bu sonuçlara göre Beijing ailesine ait izolatların da artık Mersin ilinde görülmeye başladığı bu çalışma ile ilk kez belirlenmiştir.

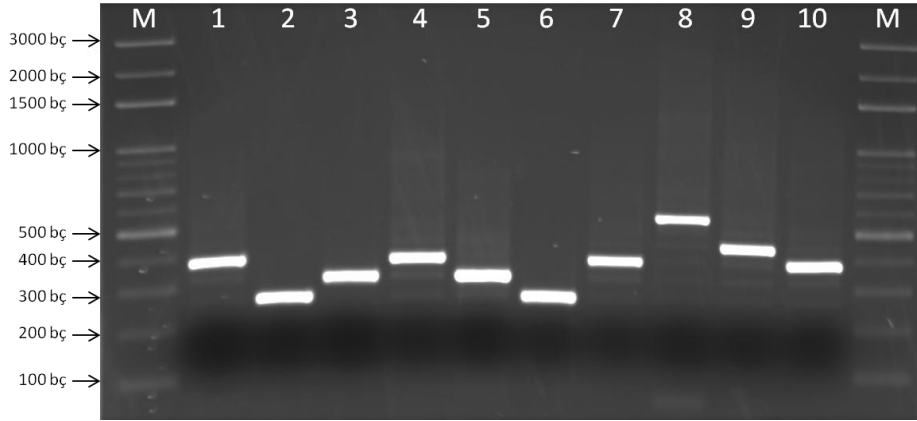
Çalışmaya dahil edilen 103 klinik izolatin MIRU-VNTR yönteminde, PZR amplifikasyonu sonrası elde edilen agaroz jel elektroforez görüntülerinden bazıları Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.



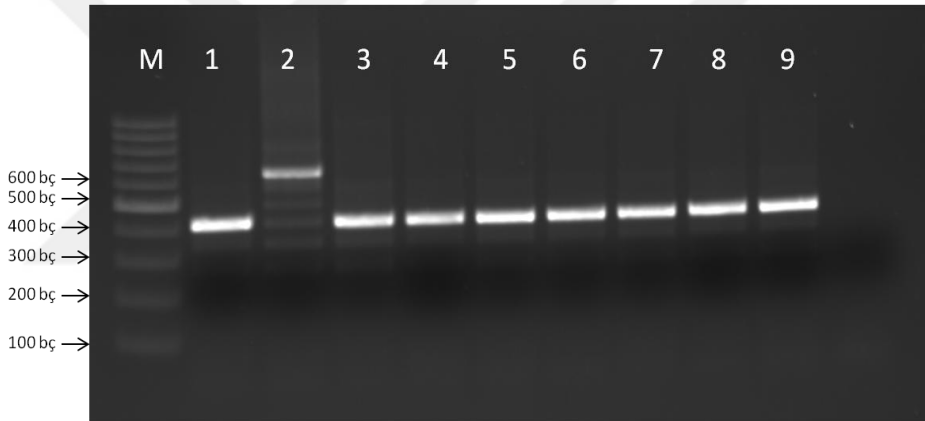
**Şekil 4.1:** MIRU40 örnek jel görüntüsü. M: Marker (Thermo Scientific™ Gene Ruler 100 bp DNA Ladder), Kolon 1: 569 bç=4 tekrar, Kolon 2: 515 bç=3 tekrar, Kolon 3: 353 bç=0 tekrar, Kolon 4: 731 bç=7 tekrar, Kolon 5: 569 bç=4 tekrar, Kolon 6: 569 bç=4 tekrar, Kolon 7: 461 bç=2 tekrar, Kolon 8: 677 bç=6 tekrar, Kolon 9: 623 bç=5 tekrar, Kolon 10: 623 bç=5 tekrar.



**Şekil 4.2:** MIRU26 örnek jel görüntüsü. M: Marker (Thermo Scientific™ Gene Ruler 100 bp DNA Ladder), Kolon 1: 715 bç=5 tekrar, Kolon 2: 817 bç=7 tekrar, Kolon 3: 766 bç=6 tekrar, Kolon 4: 715=5 tekrar, Kolon 5: 664 bç=3 tekrar, Kolon 6: 562 bç=2 tekrar, Kolon 7: 511 bç=1 tekrar, Kolon 8: 511 bç=1 tekrar, Kolon 9: 613 bç=3 tekrar, Kolon 10: 664 bç=4 tekrar.



**Şekil 4.3:** EtrC örnek jel görüntüsü. M: Marker (Amresco K181-500 UL Molecular Weight Marker, DNA, 1 Kb Ladder™), Kolon 1: 346 bç=4 tekrar, Kolon 2: 288bç=2 tekrar, Kolon 3: 288 bç=3 tekrar, Kolon 4: 404 bç=5 tekrar, Kolon 5:288 bç=3 tekrar, Kolon 6: 288bç=2 tekrar, Kolon 7: 346 bç=4 tekrar, Kolon 8: 520bç=7 tekrar, Kolon 9: 404 bç=5 tekrar, Kolon 10: 346 bç=4 tekrar.



**Şekil 4.4:** EtrA örnek jel görüntüsü. M: Marker (Thermo Scientific™ Gene Ruler 100 bp DNA Ladder), Kolon 1: 472 bç=4 tekrar, Kolon 2: 697 bç=7 tekrar, Kolon 3: 472 bç=4 tekrar, Kolon 4: 472 bç=4 tekrar, Kolon 5: 472 bç=4 tekrar, Kolon 6: 472 bç=4 tekrar, Kolon 7: 472 bç=4 tekrar, Kolon 8: 472 bç=4 tekrar, Kolon 9: 472 bç=4 tekrar.

## TARTIŞMA

TB, *M. tuberculosis* basilinin neden olduğu, insanlarda yaygın, bulaşıcı ve önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ülkemizde ve dünya genelinde yüksek mortalite ve morbidite nedenleri arasında yer almakta ve her yıl milyonlarca insan TB hastalığına yakalanmaya devam etmektedir [94].

*M. tuberculosis*, dünya çapında özellikle Asya ve Afrika kıtalarında en yaygın görünen salgın hastalıklardan biridir. ÇİD'in ortaya çıkması, TB salgınının büyük ölçüde artmasına neden olmaktadır. Bu hastalığın tedavi edilememesindeki nedenlerden biri de hastaların ÇİD'li olmaları ve HIV/AIDS ile ko-enfeksiyon olması en önemli sorunlar olarak kabul edilmektedir [95,96].

HIV/AIDS, 1981 yılından günümüze kadar tüm dünyada yaygın bir pandemi olarak ilerlemekte olup ülkemizde HIV/AIDS ve TB fırsatçı enfeksiyonlar arasında yer almaktadır [97].

2017 yılında dünya genelinde 6,4 milyon yeni TB vakası görülmüş ve TB'nin teşhis ve tedavisi HIV/AIDS ilişkili olup HIV-negatif kişilerde yaklaşık 1,3 milyon, HIV-pozitif kişilerde ise yaklaşık 300 bin kişinin ölümüne neden olmuştur. İlaça dirençli TB bir sağlık krizi olmaya devam etmektedir. 2017 yılında dünya genelinde 558 bin kişinin tedavisindeki en etkili birincil basamak ilaç olan rifampisine dirençli TB (RR-TB) hastalığına yakalandığı ve bunların da %82'sinin birçok ilaca karşı dirençli (ÇİD-TB) olduğu belirtilmektedir [3].

Enfeksiyöz patojen *M. tuberculosis*'in genetik çeşitliliği, insanlar da dahil çeşitli konakçı türlerine adaptasyonunda önemli bir rol oynamıştır. Bu çeşitlilik genellikle soyun coğrafi kökeni ile bağlantılıdır. Soy bilgisi, mutasyon oranları, ilaç direnci, bulaşıcılık ve virülansı türün filocoğrafik kanıtı hakkında bize bilgi verir. Soy sınıflandırması ile epidemiyolojik veya klinik veriler birleştirilerek elde edilen toplanmış bilgiler, moleküler süzveyans programının temelini oluşturmaktadır [90].

MTK izolatları genetik olarak monomorfiktir, bu nedenle hastalığın epidemiyolojisinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için genotipleme yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *M. tuberculosis* türlerinin moleküler yöntemler aracılığıyla saptanması, ülkenin TB kontrolü adına büyük bir önem taşımaktadır. MTK izolatların moleküler epidemiyolojik farklılıkların belirlenmesinde MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır [98].

Son zamanlarda, PZR amplifikasyonuna dayalı yeni bir genotiplendirme tekniği olan MIRU-VNTR yönteminin kolay, hızlı, kısa sürede sonuç vermesi ve ayırım gücünün yüksek olması, epidemiyolojik çalışmalarda popüler bir genotiplendirme yöntemi olmasını sağlamıştır. Diğer laboratuvar testlerinde olduğu gibi, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, sonuçların güvenilir olmasını sağlamaktadır. Bu yöntemde farklı lokuslu gen bölgeleri (12 lokus, 15 lokus, 24 lokus)

kullanılarak TB hastalarının, klinik izolatları arasındaki benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır [99].

Spoligotiplendirme, MTK izolatlarının soylarını ve kümeleri belirlemek için kullanılan PZR bazlı reverse dot blot yöntemidir [100]. Bu yöntem, MTK izolatlarındaki belirli bir kromozomal DR (direkt tekrar) bölgesindeki değişkenliği tespit etmektedir. DR bölgesinde, 36 baz çifti ve 94 farklı spacer bölgesi belirlenmiş fakat rutin çalışmalarda sadece 43 tanesi kullanılmaktadır [87].

MTK izolatlarının moleküler özelliklerini ve genetik çeşitliliğini daha iyi anlamak için spoligotiplendirme ve 15-lokus MIRU-VNTR tiplleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu iki yöntemin birlikte kullanılması ise genotiplendirme sonuçlarını güçlendirmektedir [101].

Mersin ilinde TB'li hastalardan izolen edilen ve *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan klinik izolatların spoligotiplendirme ve Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeat (MIRU-VNTR) yöntemleri ile moleküler genotiplendirilmesinin yapılarak bu mikroorganizma için ilimizde moleküler epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Yaptığımız bu tez çalışmasına, 2016-2017 tarihleri arasında klinik materyalinin kültüründe MTK üremesi tespit edilen 103 TB hastasına ait klinik izolat dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 103 hastanın 74 (%71,9)'ü erkek, 29 (%28,1)'u kadın ve yaş ortalamaları 47,35'idi. Hastaların 91 (%88,3)'i akciğer TB'si iken geri kalan 12 (%11,7)'si akciğer dışı TB olarak tespit edildi. Bu izolatların 43 (%41,7)'ü birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine dirençli (Tablo 4.1), geri kalan 60 (%58,3) izolat ise bu ilaçlara duyarlıdır.

SpolDB4 veri bankasındaki suşlarla karşılaştırma sonrasında çalışmaya dahil edilen 103 izolatın spoligotiplendirme yöntemi ile elde edilen klonal grup dağılımında; 103 izolatın 10 spoligotiplendirme kümesi içerisinde yoğunlaştığı tespit edildi. En büyük kümenin 48 (%46,6) izolat ile T ailesi (T1 sublineage) olduğu, ikinci sırada Haarlem ailesinin 16 (%15,5) izolat içerdiği, diğer ailelerin de TUR (n=13), S (n=10), Beijing (n=4), LAM (n=4), Bovis (n=3), NEW-1 (n=3), Delhi/CAS (n=1), H37Rv (n=1) aileleri olduğu görüldü (Tablo 4.3). Yine çok ilaca direnç ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilen Beijing ailesinin varlığı bu çalışma ile gösterilmiştir. Beijing ailesi olarak belirlenen 4 izolatın ikisinde SM dienci, birinde ise ÇİD-TB varlığı (SM+INH+RIF) tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Çukurova bölgesinde Zeytinli ve ark [102] yaptıkları çalışmada, 467 MTK suşundan 24 (% 5,1)'ü orphan suş olarak tanımlanmış, kalan 443 izolatın üye sayısı 2-215 arasında değişen 21 küme içerisine dağıldığı bildirilmiştir. MIRU-VNTR metodunun Spoligotiplendirme metodu ile kombinasyonu sonucunda bölgede en yaygın görülen ailenin T1 (%51,9) olduğu, ikinci en yaygın görülen ailenin ise LAM7 TUR (%11,5) olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, 103 MTK izolatının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemlerinin kombine analizinde izolatların

10 küme içerisinde dağıldığı ve en yaygın kümeyi T (n= 48, %46,6) ailesinin oluşturduğu ikinci sırada Haarlem 16 (%15,5) ailesinin geldiği tespit edildi. Zeytinli ve ark tarafından yapılan çalışmada Mersin ilinde sadece T1 ve LAM7 TUR ailelerinin varlığı tespit edilmişken bizim çalışmamızda T ailesine (T1 alt ailesi) ilaveten ayrıca Haarlem, TUR, S, Beijing, LAM, Bovis, NEW-1, Delhi/CAS ve H37Rv aileleri değişen sayılarda tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Ülkemizde Zozio ve ark [103] tarafından Malatya ve Ankara'daki TB'li hastalardan elde edilen 245 MTK izolatının genotiplendirme sonucunda en yaygın görünen ailenin LAM7 TUR (%21) ailesi olduğu, ikinci yaygın görünen ailenin T1 (%16,3) ailesi olduğu ve ardından Haarlem (%5,3) ailesi geldiği belirtilmiştir.

Malatya'da 2006 yılında yapılan bir tez çalışmasına 450 MTK izolatının (Malatya n=200, Marmara bölgesi n=150, Ege bölgesi n=50, Akdeniz bölgesi n=50) dahil edildiği ve izolatların IS6110 ve spoligotiplendirme yöntemleri ile genotiplendirilmelerinin yapıldığı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda en yaygın görünen ailenin T süper ailesi (%38,6) olduğu, bunu Haarlem (%14,8) ailesinin izlediği belirtilmiştir. Bu çalışmada farklı olarak Hindistan'ın Delhi bölgesine ait CAS1-Delhi genotipinde 2 suş, Beijing genotipinde ise 4 suş tespit edildiği bildirilmiştir [104].

Durmaz ve ark tarafından aynı bölgede bir yıl sonra yapılan farklı bir çalışmada 145 MTK izolatının dahil edildiği ve sonucunda bölgede en yaygın görünen ailelerin LAM7 TUR (%23,9) ve T1 (%22,5) aileleri olduğu bildirilmiştir. [105].

Ülkemizde daha önceden yapılmış olan iki çalışmanın sonucunda LAM7 TUR ailesinin %21 [103] ve %23,9 [105] oranlarıyla en sık görülen aileler olduğu belirtilirken, Günal ve ark tarafından yapılan çalışmada ise [104] T süper ailesinin %38,6 ile bölgede en sık görülen aile olduğu rapor edilmiştir. Diğer iki çalışmanın aksine bizim çalışma sonuçlarımızda da Günal ve ark [104] tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde T ailesi (%46,6) en sık görülen aile olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Kochkaksaraei ve ark tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada, İran'ın kuzeyinde bulunan Golestan eyaletinde izole edilen *M. tuberculosis* izolatlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesinin amaçlandığı belirtilmiştir. Çalışmaya 162 MTK izolatının dahil edildiği ve sonuçta bölgede en yaygın görülen ailenin NEW-1 (%22,2) ailesi olduğu bunu Beijing (%13,6) ailesinin izlediği ifade edilmiştir. Çalışma sonucunda Beijing ailesinin tedavisinde sorunlar olduğu ve diğer ilaçlarla kıyaslandığında SM direncinin hala yüksek olduğu vurgulanmıştır [106].

Puerto ve ark'nın 2019 yılında Kolombiya'da yaptıkları çalışmada, spoligotiplendirme yöntemi ile 234 MTK suşunun genotiplendirmesi sonucu 70 (%29,9) suşun orphan suş olarak tanımlandığı, geriye kalan 164 suşun ise 7 küme içerisinde dağıldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada en yaygın görünen ailenin LAM (%37,2) ailesi olduğu, ikinci yaygın görünen ailenin Haarlem (%5,8) ailesi olduğu, bu aileleri T (%8,1), U (%3,4), S (%2,6), X (%2,1) ve Beijing

(%0,9) ailelerinin izlediği belirtilmiştir. Bu çalışmada Kolombiya yeni bir Beijing suşunun varlığının tespit edildiği bildirilmiştir [107].

Elegail ve ark 2019 yılında Sudan'da MTK suşlarının spoligotiplendirilmesi ve bu suşların GenoType MTBDRplus ile ilaç direnç profillerinin belirlenmesini amaçladıkları çalışmada, 64 örneğin RIF ve INH duyarlı olduğu, 36 örneğin ise sadece ÇİD-TB olduğu, 10 örneğin sadece RIF, 8 örneğin ise sadece INH dirençli olduğu bildirilmiştir. Spoligotiplendirme yöntemi ile 118 MTK klinik izolatatının çalışıldığı ve en yaygın görünen ailenin Delhi/CAS-1 (%43) olduğu bildirilmiştir [100].

Çin'de Qinghai eyaletinden Li ve ark'nın spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile yaptıkları çalışmada, 251 MTK suşunun 49 farklı spoligotip paterni gösterdiği vurgulanmıştır. En yaygın görünen ailenin Beijing (%62,2) olduğu, daha sonra U (%3,6), MANU2 (%3,2), T1 (%1,2), H4 (%0,4) ailelerinin bunu takip ettiği belirtilmiştir. Kuzey Çin'deki Beijing ailesine ait suş oranının, ülkenin güney bölgesine göre daha yüksek olduğu ve bunun da coğrafi konum, iklim, nüfus ve diğer faktörlerle ilgili olabileceği bildirmiştir [101].

Brezilya'da Salvato ve ark tarafından yapılan bir çalışmada, spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile 131 MTK suşunun genotiplendirilmesinin amaçlandığı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda en yaygın görünen ailenin LAM (%65,6) ailesi olduğu, bunu Haarlem (%22,1) ailesinin izlediği bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca H37Rv (%3) ailesinin de tespit edildiği olduğu vurgulanmıştır [108].

Brüksel'de 2017 yılında yapılan bir çalışmada, 2010-2013 yılları arasında MIRU-VNTR ve spoligotiplendirme yöntemleri ile 945 hasta örneğinin çalışıldığı, filogenetik analiz sonuçlarında en yaygın iki ailenin LAM (%16,7) ve Haarlem (%15,7) aileleri olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda Beijing (%39,9) ailesinin ÇİD-TB ile ilişkili çıktığı ifade edilmiştir [109].

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mersin ilinde TB'li hastalardan izole edilen MTK izolatlarının spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile genotiplendirilmesini amaçladığımız bu çalışmada;

- 1- İlimizde yapılan bu çalışma sonucunda, Çukurova bölgesinde yapılan çalışmaya benzer şekilde, fakat ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, T ailesinin (%46,6) en sık görülen aile olduğu,
- 2- Özellikle ÇİD-TB ile ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilen Beijing ailesinin ilimizde de artık tespit edildiği,
- 3- Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile izolatlarımızın tamamının genotiplendirilmesinin yapılabildiği,
- 4- Çalışmamız sonucunda en sık aile olarak tespit edilen T ailesinin T1 ve T4 olmak üzere iki alt aileye ayrıldığı,
- 5- *M. tuberculosis* için yapılacak olan moleküler epidemiyolojik çalışmalarda spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR yöntemlerinin birlikte kullanılmasının bu bakterinin çalışma yapılan bölge içerisindeki hareketinin tespit edilmesinde yararlı olacağı,
- 6- Her iki yöntem birlikte değerlendirildiğinde, hastalığın reaktivasyon olup olmadığının belirlenmesine yardımcı olacağı,
- 7- Bu tür moleküler çalışmaların yeni izole edilecek izolatlar ile yapılmasıyla, ilimizdeki bu bakterinin hareketinin izlenmesi suretiyle TB'nin kontrol altına alınmasında yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR:

- [1]. Havlicek, J., Dachsel, B., Slickers, P., Andres, S., Beckert, P., Feuerriegel, S., & Labugger, I. (2019). Rapid microarray-based assay for detection of pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 94(2), 147-154.
- [2]. Arnold, F. M., Hohl, M., Remm, S., Koliwer-Brandl, H., Adenau, S., Chusri, S., & Seeger, M. A. (2018). A uniform cloning platform for mycobacterial genetics and protein production. *Scientific reports*, 8(1), 9539.
- [3]. World Healty Organization. (2018). *Tuberculosis Fact Sheet*, World Healty Organization, 02.09.2018 tarihinde [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) adresinden erişildi.
- [4]. Evranos-Aksöz, B. (2014). Tüberküloz tedavisinde yeni ilaç adayları. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 71(4). 207-220.
- [5]. Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., & Tekaia, F. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537.
- [6]. Chemed, A., Mihret, A., Abebe, T., Worku, A., & Ameni, G. (2018). Genotyping of mycobacterium tuberculosis isolated from pulmonary tuberculosis patients among people living with HIV in Addis Ababa: Cross-sectional study. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 12, 34-37.
- [7]. Roetzer, A., Schuback, S., Diel, R., Gasau, F., Ubben, T., di Nauta, A., & Niemann, S. (2011). Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4173-4178.
- [8]. Jeon, S., Lim, N., Park, S., Park, M., & Kim, S. (2018). Comparison of PFGE, IS6110-RFLP, and 24-Locus MIRU-VNTR for Molecular Epidemiologic Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Known Epidemic Connections. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(2), 338-346.
- [9]. Ei, P. W., Aung, W. W., Lee, J. S., Choi, G. E., & Chang, C. L. (2016). Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a review of frequently used methods. *Journal of Korean medical science*, 31(11),1673-1683.
- [10]. Seber, E. (2010). Tüberkülozun dünü. *ANKEM Derg*, 24, 52-60.
- [11]. Banuls, A. L., Sanou, A., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*, 64(11), 1261-1269.
- [12]. Dabak, G., Babalık, Aylin. (2015). Türk toraks derneği eğitim kitapları serisi. Ankara: Sentez yayıncılık.
- [13]. Barış, Y. I., Hillerdal, G. (2009). Tuberculosis in the Ottoman harem in the 19th century. *Journal of medical biography*, 17(3), 170-173.
- [14]. Barış, Y. İ. (2010). Dünyada Tüberküloz'un Tarihi. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2011(2),1-4.

- [15]. John, F. (2014). History of Tuberculosis. Part 1-Phthisis, consumption and the White Plague. *Journal of Military and Veterans'Health*, 22(2), 29.
- [16]. Kıyan, M. (1999). Mycobacteriaceae, s: 420-423. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. Ankara: Güneş Kitapevi.
- [17]. Leão, S.C., Portaels, F. History. (2007). In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. 1<sup>st</sup> Ed, Bourcillier Kamps, 25-52.
- [18]. Sakula, A. (1983). BCG: who were Calmette and Guérin?. *Thorax*, 38(11), 806.
- [19]. CDC. *Tuberculosis*. 05.12.2018 tarihinde <https://www.cdc.gov/tb/worldtbd/history.htm> adresinden erişildi.
- [20]. Gümüş, S. (2011). Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics*, 4(2):1-6.
- [21]. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Daire Başkanlığı. "Türkiye'de Verem Savaşı 2017 Raporu". 15.12.2018 tarihinde [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/haberler/verem-savas-raporu-2016-2017/Turkiyede\\_Verem\\_Savasi\\_2017\\_Raporu.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/haberler/verem-savas-raporu-2016-2017/Turkiyede_Verem_Savasi_2017_Raporu.pdf) adresinden erişildi.
- [22]. Köksal, F., Yaman, A. (2003). Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu bildiriler kitabı (ss. 35-47). Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
- [23]. Sakamoto, K. (2012). The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology*, 49(3), 423-439.
- [24]. Mahon, C. R., Lehman, D. C., Manuselis, G. (2000). *Textbook of diagnostic microbiology*. Elsevier Health Sciences. A very good win mycobacteiium tuberculosis and other nontuberculous mycobacteria. s:683-685
- [25]. Albay, A. Mikobakteri. In: Başustaoğlu, A., Yıldırım, T. Ş., Tanyüksel, M., Yapar, M. (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6.baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık. 277 281.
- [26]. Piessens, W. F, Nardell, E. A. Bacteriology of Tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES. (2000). *Tuberculosis A Comprehensive International Approach*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Marcel Dekker. 157-178.
- [27]. Guven, S., Ekinci, M. (2013, April). Detection of tuberculosis bacteria with microscopic image analysis. In *2013 21<sup>st</sup> Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU)* (pp. 1-4). IEEE.
- [28]. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A., Netea, M. G., Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011.
- [29]. Bhat, Z. S., Rather, M. A., Maqbool, M., Lah, H. U., Yousuf, S. K., Ahmad, Z. (2017). Cell wall: a versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1520-1534.

- [30]. Delogu, G., Sali, M., Fadda, G. (2013). The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 5(1). e2013070.
- [31]. Koch, A., & Mizrahi, V. (2018). *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, 26(6), 555-556.
- [32]. ]. Leão, S.C., Portaels, F. (2007). The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*. 1st Ed, Bourcillier Kamps,93-112.
- [33]. Wayne, L. G, Kubica, G. P. (1998). Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1435-1457.
- [34]. Çavuşoğlu, C. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* genomu ve genetik özellikleri. In: Bilgiç, H., Karadağ, M., Tozkoparan, E., Çoskun, F. *Toraks kitapları Tüberküloz*. sayı11, İstanbul. Aves yayıncılık. 52-61.
- [35]. Peterson, R. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*. Karolinska Institutet, Sweden. s:1-4.
- [36]. Kocabaş, A., Kuleci, S. (2004). Tüberküloz. In: Sağlık, Y. *Harrison iç hastalıkları prensipleri*. Cilt 1, Ankara, Nobel Tıp Kitapçılık. 1024-1025.
- [37]. Bilgehan, H. (2002). *Mycobacteriumlar*. *Klinik mikrobiyolojik tanı*. Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları. 572-592.
- [38]. Özbey, G., Kalender, H., Muz, A. (2008). Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi. *FÜ Sağ. Bil. Derg*, 22(5), 307-314.
- [39]. Aslan, G., Kuyucu, N., Çalikođlu, M., Ersöz, G., Ülger, M., Günal, S., Emekdaş, G. (2009). *Mycobacterium Bovis*'in Etken Olduğu Tüberküloz Olguları. *Ankem Derg*, 23(4), 182-187.
- [40]. Nebreda-Mayoral, T., Brezmes-Valdivieso, M. F., Gutiérrez-Zufiaurre, N., García-de Cruz, S., Labayru-Echeverría, C., López-Medrano, R., Rivero-Lezcano, O. (2018). Human *Mycobacterium bovis* infection in Castile and León (Spain), 2006–2015. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)*, 37(1), 19-24.
- [41]. Koç, A. N. (2014). BCG Aşısı ve Yerine Gelecek Yeni Yaklaşımlar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 44(4):123-131.
- [42]. Emmanuel, F. X., Seagar, A. L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., Laurenson, I. (2007). Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerging infectious diseases*, 13(12), 1924.
- [43]. Horstkotte, M. A., Sobottka, I., Schewe, C. K., Schäfer, P., Laufs, R., Rüsç-Gerdes, S., Niemann, S. (2001). *Mycobacterium microti* llama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 406-407.
- [44]. Sharma, A., Bloss, E., Heilig, C. M., & Click, E. S. (2016). Tuberculosis Caused by *Mycobacterium africanum*, United States, 2004–2013. *Emerging infectious diseases*, 22(3), 396.
- [45]. Kriz, P., Kralik, P., Slany, M., Slana, I., Svobodova, J., Parmova, I., Pavlik, I. (2011). *Mycobacterium pinnipedii* in a cap-tive Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Veterinarni Medicina*, 6, 307-313.

- [46]. Koeck, J. L., Fabre, M., Simon, F., Daffe, M., Garnotel, E., Matan, A. B., Pourcel, C. (2011). Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli '*Mycobacterium canettii*' infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 1013-1019.
- [47]. Prodinger, W. M., Brandstätter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschirola, M. L., Skrypnik, A. (2005). Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 4984-4992.
- [48]. Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 471-477.
- [49]. Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Tekaiia, F. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537.
- [50]. Çelik, S. B., Can, H., Kılınc, E. A., Önde, M., Çelepkolu, T., Altuntaş, M. (2012). Aktif tüberküloz hastalarında anksiyete ve depresyon birlikteliği (Anxiety and depression in patients with active tuberculosis). *Smyrna Tıp Dergisi*. Cilt,1. 34-40.
- [51]. Yaman, M. (1999). Tüberküloz patogenezi. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu*, 15-20.
- [52]. Eyüboğlu, F. Ö. (2010). Tüberküloz patogenezi. In: Bilgiç, H., Karadağ, M., Tozkoparan, E., Çoskun, F. *Toraks kitapları Tüberküloz*. sayı11, İstanbul. Aves yayıncılık. 66-70.
- [53]. Alper, D. Tüberkülozda bulaşıcılık. In: Kocabaş, A. (1991). *Tüberküloz kliniği ve kontrolü*. Adana: Çukurova Üniversitesi Basımevi. 63-67.
- [54]. Öztürk, R. (2003). Tüberkülozda doğal direnç ve risk. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu bildiriler kitabı*. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi. 59-73.
- [55]. Özbal, Y. (2006). Immunity of tuberculosis. *Erciyes Medical Journal*, 28(1), 25-34.
- [56]. Çakır, M. (1994). Tüberküloz İmmünolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 14(6), 409-415.
- [57]. Kılıçturgay, K. (1996). Tüberkülozda immunopatogenez. *Turkish journal of infection*.11(4), 7-12.
- [58]. Karakayalı, M., Aydemir, I., Öztürk, F., Gumurdu, A., Sal, D. H., Özkut, M., Tuğlu, M. İ. (2014). Tüberküloz ile ilgili hücrelerin davranışları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*. 20-27.
- [59]. Başkan, E. B. (2013). T hücre immunitesi. *Archives of the Turkish Dermatolog & Venerolog/Turkdem*. 47(1), 18-23.
- [60]. Ceyhan, İ., Şimşek, H., Tarhan, G. (2012). Tüberkülozun tanısında %2 ogawa besiyerinin löwestein-jensen besiyeri ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 46(1), 33-38.
- [61]. Santos, E., Felgueiras, Ó., Oliveira, O., & Duarte, R. (2018). Diagnosis delay of tuberculosis in the Huambo province, Angola. *Pulmonology*, 24(5), 294-299.

- [62]. Ceyhan, İ. (2010). *TB'de Örnek Alma, Mikroskopi ve Mikroskopinin Kalite Kontrolü*. Tüberküloz, Sayı 11, AVES Yayıncılık, 11-28.
- [63]. Çetin, E. S., Aynali, A., Öztürk, T., Özseven, A., Kaya, S. (2012). Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonunda Löwenstein-Jensen besiyeri kültürü, ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube 960 sisteminin değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(1), 12-16.
- [64]. Uzun, M. (2003). Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu bildiri kitabı*. Samsun: Ondokuz Mayıs Ünivesitesi 285-290.
- [65]. Erturan, S. (1999). Erişkin tüberkülozunda mikrobiyolojik tanı. *Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu*, İstanbul, s. 49-52.
- [66]. Sürücüoğlu, S. (2003). Tüberküloz epidemiyolojisinde moleküler yöntemler. In: Bilgiç, H., Karadağ, M., Tozkoparan, E., Çoskun, F. *Toraks kitapları Tüberküloz*. sayı11, İstanbul. Aves yayıncılık s:149-160.
- [67]. Peterson R. (2009). Laboratory diagnosis of tuberculosis. *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*. Karolinska Institutet, Sweden. s:4-6.
- [68]. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). Ankara, 2014. 20.09.2019 tarihinde <http://tb.thsk.gov.tr/UTTR.pdf> adresinden erişildi.
- [69]. Sinha, P., Gupta, A., Prakash, P., Anupurba, S., Tripathi, R., Srivastava, G. N. (2016). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC infectious diseases*, 16(1), 123-132.
- [70]. Majewski, K., Rybczyńska, M., Wódz, K. (2015). Evaluation of Detection and Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Patients in the Łódzkie Voivodship in 2009-2013. *Przegl Epidemiol.* 69:453-458.
- [71]. Durmaz, R. (2005). *Mycobacterium tuberculosis'* de direnç sorunu. *Ankem Derg*, 19(2), 107-110.
- [72]. Alp, A. (2015). Tüberküloz tedavisi için yeni ilaç hedefleri. Albay, A., Aslan, G., Özkütük, N. (Ed.), 7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu bildiriler kitabı içinde (ss.99-100). Mersin: Mersin Üniversite Tıp Fakültesi.
- [73]. Şener, A., Akçalı, A., Karatağ, O., Koşar, Ş., Değirmenci, Y., & Akman, T. (2012). İzoniazid ve Etambutole Primer Dirençli *Mycobacterium tuberculosis'*e Bağlı Epidural Apse. *Mikrobiyol Bul*, 46(4), 689-694.
- [74]. Kiraz, N. (2003). Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu bildiri kitabı*. Samsun: Ondokuz Mayıs Ünivesitesi.174-177.
- [75]. Manning, T., Plummer, S., Baker, T., Wylie, G., Clingenpeel, A. C., Phillips, D. (2015). Development of a three component complex to increase isoniazid efficacy against isoniazid resistant and nonresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(20), 4621-4627.

- [76]. Bakuła, Z., Napiórkowska, A., Kamiński, M., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J., Jagielski, T. (2016). Second-line anti-tuberculosis drug resistance and its genetic determinants in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(3), 439-444.
- [77]. Jagielski, T., Van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P. K., & Bielecki, J. (2014). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed research international*, doi: 10.1155/2014/645802.
- [78]. Coll, P., & de Viedma, D. G. (2018). Molecular epidemiology of tuberculosis. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)*, 36(4), 233-240.
- [79]. Shabbeer, A., Ozcaglar, C., Yener, B., Bennett, K. P. (2012). Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(4), 767-781.
- [80]. Van Soolingen, D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of internal medicine*, 249(1), 1-26.
- [81]. Kanduma, E., McHugh, T. D., Gillespie, S. H. (2003). Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *Journal of applied microbiology*, 94(5), 781-791.
- [82]. Asgharzadeh, M., Kafil, H. S., Roudsary, A. A., Hanifi, G. R. (2011). Tuberculosis transmission in Northwest of Iran: using MIRU-VNTR, ETR-VNTR and IS6110-RFLP methods. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1), 124-131.
- [83]. Zeng, X., Li, H., Zheng, R., Kurepina, N., Kreiswirth, B. N., Zhao, X., Li, Q. (2016). Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by use of ligation-based amplification and melting curve analysis. *Journal of clinical microbiology*, 54(9), 2384-2387.
- [84]. Durmaz, R., Günal, S., Çavuşoğlu, C. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının moleküler epidemiyolojisinde kullanılan yöntemler: IS6110 fingerprinting, spoligotyping ve MIRU-VNTR. In: Durmaz, R. *IV uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kurs kitabı*. Malatya: İnönü Üniversitesi, 214-233.
- [85]. Brudey, K., Driscoll, J. R., Rigouts, L., Prodinger, W. M., Gori, A., Al-Hajj, S. A., Binder, L. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*, 6(1), 23.
- [86]. Spoligotyping Manuel (2019). 15.08.2019 tarihinde <https://gentaur.co.uk/wp-content/uploads/2016/05/Spoligotyping-Manual.pdf> adresinden erişildi.
- [87]. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2004). Guide to the application of genotyping to tuberculosis prevention and control. Handbook for TB controllers, epidemiologists, laboratorians, and other program staff-June 2004 [Internet]. Atlanta. 16.02.2019 erişim alındı.
- [88]. Supply, P. (2005). Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Technical Guide*, 6, 1-74.
- [89]. Hilty, M. (2006). *Molecular epidemiology of mycobacteria: Development and refinement of innovative molecular typing tools to study mycobacterial infections* (Doctoral dissertation, University\_of\_Basel).

- [90]. Thain, N., Le, C., Crossa, A., Ahuja, S. D., Meissner, J. S., Mathema, B., Chindelevitch, L. (2018). Towards better prediction of *Mycobacterium tuberculosis* lineages from MIRU-VNTR data. *Infection, Genetics and Evolution*, 72, 59-66.
- [91]. Alonso-Rodríguez, N., Martínez-Lirola, M., Herránz, M., Sanchez-Benitez, M., Barroso, P., Bouza, E., de Viedma, D. G. (2008). Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC microbiology*, 8(1), 34.
- [92]. Peterson, R. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* Strain Identification of The MTC. *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*. Karolinska Institutet, Sweden. s:6-7.
- [93]. Marzi, M. (2012). *Mycobacterium Tuberculosis İzolatlarının 24 lokus Mycobacterial Interspersed Repetitive Units Variable Number Of Tandem Repeats (MIRU-VNTR) Yöntemi İle Genotiplendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- [94]. Tulu, B., & Ameni, G. (2018). Spoligotyping based genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia: a systematic review. *BMC infectious diseases*, 18(1), 140.
- [95]. Stavrum, R., Mphahlele, M., Øvreås, K., Muthivhi, T., Fourie, P. B., Weyer, K., & Grewal, H. M. (2009). High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. *Journal of clinical microbiology*, 47(6), 1848-1856.
- [96]. Ravansalar, H., Tadayon, K., & Ghazvini, K. (2016). Molecular typing methods used in studies of *Mycobacterium tuberculosis* in Iran: a systematic review. *Iranian journal of microbiology*, 8(5), 338.
- [97]. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Daire Başkanlığı. "Türkiye'de Verem Savaşı 2018 Raporu". 22.10.2019 tarihinde [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz\\_db/dosya/raporlar/Tu\\_rkiye\\_de\\_Verem\\_Savas\\_2018\\_Raporu\\_kapakl\\_.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/dosya/raporlar/Tu_rkiye_de_Verem_Savas_2018_Raporu_kapakl_.pdf) adresinden erişildi.
- [98]. Arias, A. P. J., Lahiguera, M. J., Borrás, R., Cardona, C. G., Silva, M. G., López, M. J. V., & Serrano, M. D. R. G. (2018). Comparative study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Simplified Amplified Fragment Length Polymorphism and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat Analysis. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 39(1). 63-71.
- [99]. Kochkaksaraei, M. B., Kaboosi, H., & Ghaemi, E. A. (2019). Reproducibility of 15-Loci MIRU-VNTR Method in *Mycobacterium tuberculosis* Genotyping. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 12(8). e86396.
- [100]. Elegail, A., Mohamed, N. Y. I., Nour, E. O. M., Hoffner, S., & Haile, M. (2018). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Khartoum, Sudan. *International journal of mycobacteriology*, 7(3), 236.
- [101]. Lil, B., Ma, Y., Liu, H., Shenl, X., Ma, B., Jiang, M., & Zhao, X. (2018). Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Qinghai province of northwest china by spoligotyping and 15-locus MIRUVNTR. *Journal of Microbiology and Biotechnology Reports*, 2(2). 1-4.
- [102]. Zeytinli, Ü. (2010). *Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen Mycobacterium Tuberculosis Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed*

*Repetitive Units Variable Number Of Tandem Repeat) Yöntemiyle Tiplendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

[103]. Zozio, T., Allix, C., Gunal, S., Saribas, Z., Alp, A., Durmaz, R., & Sola, C. (2005). Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC microbiology*, 5(1), 44.

[104].Günel, S. (2006). *Türkiye'nin Farklı Coğrafik Bölgelerinden Toplanan Mycobacterium Tuberculosis İzolatlarının IS6110 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve Spoligotip Profillerinin Belirlenmesi*. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

[105]. Durmaz, R., Zozio, T., Gunal, S., Allix, C., Fauville-Dufaux, M., & Rastogi, N. (2007). Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *Journal of clinical microbiology*, 45(12), 4027-4035.

[106]. Kochkaksaraei, M. B., Kaboosi, H., & Ghaemi, E. A. (2019). Genetic Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* in North of Iran; the Golestan Province. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 21(8). e91553.

[107]. Puerto, D., Erazo, L., Zabaleta, A., Murcia, M. I., Llerena, C., & Puerto, G. (2019). Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from indigenous peoples of Colombia. *Biomédica*, 39, 78-92.

[108]. Salvato, R. S., Schiefelbein, S., Barcellos, R. B., Praetzel, B. M., Anusca, I. S., Esteves, L. S., & de Almeida, I. N. (2019). Molecular characterisation of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high-burden tuberculosis state in Brazil. *Epidemiology & Infection*, 147,1-8.

[109]. Vluggen, C., Soetaert, K., Groenen, G., Wanlin, M., Spitaels, M., de Onate, W. A., & Mathys, V. (2017). Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Brussels, 2010–2013. *PLOS ONE*, 12(2), e0172554.

**EK 1:** 15 lokus MIRU-VNTR allel tekrar sayıları

		<b>0 kopya</b>	<b>1 kopya</b>	<b>2 kopya</b>	<b>3 kopya</b>	<b>4 kopya</b>	<b>5 kopya</b>	<b>6 kopya</b>	<b>7 kopya</b>	<b>8 kopya</b>	<b>9 kopya</b>	<b>10 kopya</b>
<b>ETRA</b>	2165_75 bç		247	322	397	472	547	622	697	772	847	922
<b>ETRC</b>	0577_58 bç		172	230	288	346	404	462	520	578	636	684
<b>MIRU04-ETRD</b>	0580_77 bç	176	253	330	407	484	561	638	715	792	869	
<b>MIRU10</b>	0959_53 bç		535	590	643	696	749	802	855	908	961	1013
<b>MIRU16</b>	1644_53 bç		618	671	724	777	829	882	935	988	1041	
<b>MIRU26</b>	2996_51 bç		511	562	613	664	715	766	817	868	919	
<b>MIRU31-ETRE</b>	3192_53 bç		545	598	651	704	757	810	863	916		
<b>MIRU40</b>	0802_54 bç		407	461	515	569	623	677	731	785	839	893
<b>Mtub04*</b>	0424_51 bç	177	218	269	320	371	422	473	524	575	626	
<b>Mtub21</b>	1955_57 bç		149	206	263	320	377	434	491	548	605	662
<b>Mtub30</b>	2401_58 bç		261	319	377	435	493	551	609	667	725	783
<b>Mtub39*</b>	3690_58 bç	225	283	341	399	457	515	573	631	689	747	
<b>Qub11b</b>	2163_69 bç		136	205	274	343	412	481	550	619	688	757
<b>Qub26</b>	4052_111 bç		264	375	486	597	708	819	930	1041		
<b>Qub4156*</b>	4156_59 bç	563	622	681	740	799	858	917				

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Nurcihan BİLTEKİN

**Doğum Tarihi** : 02.11.1993

**E-mail** : nur.biltekinn@hotmail.com

### Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi	2013-2017
Yüksek lisans	Farmasötik Mikrobiyoloji	Mersin Üniversitesi	2017-2019

### Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl

### ESERLER (Makale ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.