

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

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ VATANDAŞI VE YABANCI
UYRUKLU PULMONER TÜBERKÜLOZLU
HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *Mycobacterium*
tuberculosis KOMPLEKS SUŞLARININ FİLOGENETİK
İLİŞKİSİNİN MIRU-VNTR VE SPOLİGOTİPLEME İLE
TESPİTİ**

Gülfer YAKICI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2020

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

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ VATANDAŞI VE YABANCI
UYRUKLU PULMONER TÜBERKÜLOZLU
HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *Mycobacterium
tuberculosis* KOMPLEKS SUŞLARININ FİLOGENETİK
İLİŞKİSİNİN MIRU-VNTR VE SPOLİGOTİPLEME İLE
TESPİTİ**

Gülfer YAKICI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışma TDK-2016-5106 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

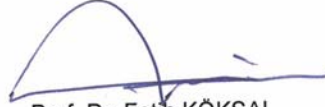
ADANA-2020

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan
“Türkiye Cumhuriyeti Vatandaşı ve Yabancı Uyruklu Pulmoner Tüberkülozlu Hastalardan İzole
edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Suşlarının Filogenetik İlişkisinin MIRU-VNTR ve
Spoligotipleme ile Tespiti”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 11/ 05 / 2020

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Fügen YARKIN
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. İsmail HANTA
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Gönöl Aslan
Mersin Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve

sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 11/05/2020



İMZA

Adı Soyadı

Gülfer YAKICI

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı
Tezin Konusu : Türkiye Cumhuriyeti Vatandaşı ve Yabancı Uyraklı
Pulmoner Tüberkülozlu Hastalardan İzole edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks
Suşlarının Filogenetik İlişkisinin MIRU-VNTR ve Spoligotipleme ile Tespiti
Tezin Türü Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 05418524450
E-Posta : fkoksak@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 05374701210
E-Posta : gulferyakici@gmail.com
: Cemalpaşa mah. 63007 sok. Akasya
Adresi : apartmanı Seyhan/ADANA

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalanma imkanı bulduğum, beni her konuda sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof Dr. Fatih KÖKSAL'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, Sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT'e, doktora eğitimim boyunca bana destek olan Dr. Öğr. Üyesi Begüm KAYAR, Emel YARAR, Fırat KARSLI ve Ali ÜÇKAYABAŞI olmak üzere tüm tüberküloz çalışma grubu ve Ç.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki bütün çalışma arkadaşlarıma, eğitimim boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen bölüm sekreterimiz Sn. Suna GÖKMEN'e ve son olarak hayatımın her anında yanımda olup beni destekleyen anne ve babama benimle birlikte attıkları her adım için teşekkür ederim.

Gülfer YAKICI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	5
2.1.1. Morfolojik özellikler	5
2.1.2. Mikobakteri Hücre Duvarı Yapısı	5
2.1.3. Kültür karakterleri ve üreme özellikleri	6
2.1.4 Mikobakterilerin Genom Yapısı	6
2.1.5. Mikobakterilerin sınıflandırılması	6
2.1.5.1 Fenotipik özelliklerine göre sınıflandırma	7
2.1.5.2. Genotipik özelliklerine göre sınıflandırma	7
2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi ve İnsan Hareketleri	9
2.2.1. Türkiye’de Tüberküloz ve Göç	11
2.3. Tüberküloz Tedavisi	13
2.3.1. Anti-tüberküloz ilaçlar ve Direnç Mekanizmaları	14
2.3.1.1 Streptomisin (STR)	14
2.3.1.2. İzonyazid (INH)	14
2.3.3. Rifampisin (RIF)	15
2.3.4. Etambutol (EMB)	16
2.3.5. Pirazinamid (PZA)	17
2.4. Mikobakterilerde Antibiyotik Duyarlılık Testleri	18

2.4.1. Konvansiyonel Yöntemler	18
2.4.2. Moleküler Yöntemler ile Direnç Analizi	19
2.4.2.1. GeneXpert MTB/RIF	19
2.4.2.2. Genotip MTBDRplus.....	19
2.4.2.3. DNA Dizi Analizi	20
2.4.2.4. TB-SPRINT	21
2.5. <i>M. tuberculosis</i> kompleksinin Genotiplemesinde Kullanılan Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler.....	22
2.5.1. IS6110-RFLP	23
2.5.2. MIRU-VNTR.....	24
2.5.3. Spoligotipleme	25
2.5.3.1. Membran Temelli Spoligotipleme	30
2.5.3.2. Mikro Boncuk Temelli Hibridizasyon (TB-SPOL)	30
3. MATERYAL VE METOD	32
3.1. Örneklerin Toplanması	32
3.2. Moleküler Yöntemler için Genomik DNA Ekstraksiyonu	32
3.3. Ekstrakte edilen DNA'ların MIRU-VNTR ve Spoligotiplemeleri	33
3.3.1. MIRU-VNTR.....	33
3.3.1.1. Multipleks PCR Primer Setleri ve Amplifikasyon Aşamaları	33
3.3.1.2. PCR Ürününün Agaroza Jele Yüklenmesi, Elektroforezi ve Yorumlanması.....	35
3.3.2. Spoligotipleme	36
3.3.2.1. PCR Amplifikasyonu.....	36
3.3.2.2. PCR Ürünlerinin Mikro Boncuklara Multipleks Hibridizasyonu...	37
3.3.2.3. Hibridizasyon Sonrası Örneklerin Luminex Cihazına Yüklenmesi	38
3.3.2.4. Hibridizasyon Sonuçlarının Analizi.....	38
3.3.2.5. Spoligotip Kümelerinin Değerlendirilmesi.....	38
3.4. <i>rpoB</i> , <i>katG</i> ve <i>inhA</i> Gen Bölgelerinde Mutasyon Varlığının Araştırılması.....	39
3.4.1. DNA Dizi Analizi Yöntemi	39
3.4.1.1. Mutasyon Araştırılacak Gen Bölgelerinin PCR Amplifikasyonu...	39
3.4.1.1.1. <i>rpoB</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu	39

3.4.1.1.2. <i>katG</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu	39
3.4.1.1.3. <i>inhA</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu.....	40
3.4.1.2. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	40
3.4.1.3. Cycle Sekans PCR Amplifikasyonu	40
3.4.1.4. Cycle Sekans PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi Cihazına Yüklenmesi.....	41
3.5. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	43
5.TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Brosh'un Modern Sınıflandırması (19).....	8
Şekil 2.2. Dünya TB İnsidansı (2).....	10
Şekil 2.3. 2005-2017 Yılları Arasında Türkiye TB İnsidansı(10).....	12
Şekil 2.4. Birleşmiş Milletler Mülteciler Yüksek Ajansı Mülteci ve Sığınmacıların Akış Diyagramı(24).....	12
Şekil 2.5. GeneXpert overlapping prob dizileri.....	19
Şekil 2.6. Genotip MTBDRplus <i>rpoB</i> gen bölgesi için kullanılan prob çeşitleri	20
Şekil 2.7. Genotip MTBDRplus strip görüntüsü(47)	20
Şekil 2.8. 41 MIRU lokusunun <i>M. tuberculosis</i> genomu üzerindeki konumu (63).....	25
Şekil 2.9. Spoligotipleme DR lokusları ve türlere özgü spacer bölgeler.....	26
Şekil 2.10. MTBK suşlarının tüm genom temelli filogenetik sınıflandırılması (69).....	27
Şekil 2.11. <i>M. tuberculosis</i> kompleks suşlarının küresel filogenetik yapısı (73)	28
Şekil 2.12. MTBK suşlarının global dağılımı (74).....	29
Şekil 4.1. İzolatların direnç profillerinin hasta uyruklarına göre dağılım yüzdeleri.....	45
Şekil 4.2. İzolatların Direnç Profillerinin illere göre dağılımları	46
Şekil 4.3. T.C. vatandaşı hastalarına ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılım yüzdeleri.....	47
Şekil 4.4. Yabancı uyruklu hastalara ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılım yüzdeleri	48
Şekil 4.5. Spoligotip Ailelerinin İllere Göre Dağılımları	51
Şekil 4.6. Spoligotip Ailelerinin Direnç Profillerine Göre Oranları.....	53
Şekil 4.7. MIRU-VNTR ile tiplendirme ve filogenetik ilişki oluşturmak amacı ile PCR'ı gerçekleştirilen DNA ekstraktlarının jel görüntüleri. (Şekil 4.7).	57
Şekil 4.8. İzolatların filogenetik ağaç ile ilişkilendirilmesi.....	59

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Spoligotipleme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan Oktal kod anahtarı	30
Tablo 3.1. MIRU-VNTR PCR amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri.....	34
Tablo 3.2. MIRU-VNTR metodu için kullanılan primer çift grupları	34
Tablo 3.3. MIRU-VNTR PCR aşamasında kullanılacak malzemeler ve miktarları	35
Tablo 3.4. VNTR bölgelerine spesifik Primer çiftleri için kullanılan Amplifikasyon aşamaları.....	35
Tablo 3.5. MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları	36
Tablo 3.6. <i>rpoB</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyon aşamaları	39
Tablo 3.7. <i>katG</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyon aşamaları.....	40
Tablo 3.8. <i>inhA</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyon aşamaları	40
Tablo 3.9. Cycle Sekans PCR Amplifikasyonu için kullanılan bileşenler ve hacimleri	41
Tablo 3.10. Cycle Sekans Amplifikasyon Aşamaları	41
Tablo 4.1. TC vatandaşı ve yabancı uyruklu hastalara ait izolatların illere göre dağılımları	44
Tablo 4.2. İzolatların Hastaların uyruklarına göre direnç profillerinin dağılımları	45
Tablo 4.3. İzolatların Direnç Profillerinin illere göre dağılımları.....	46
Tablo 4.4. T.C. vatandaşı hastalarına ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılımları	47
Tablo 4.5. Yabancı uyruklu hastalara ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılımları	48
Tablo 4.6. Dirençli izolatlarına ait mutasyonlar ve dağılımları	49
Tablo 4.7. İzolatların Spoligotip Profil ve Genotip Dağılımları	50
Tablo 4.8. Spoligotip Ailelerinin Direnç Profillerine Göre Dağılımları	52
Tablo 4.9. T.C. vatandaşı ve yabancı uyruklu hastalara ait izolatların spoligotip profilleri	53
Tablo 4.10. T1 ve TUR ailelerinin Hastaların uyruklarına göre dağılımları	55
Tablo 4.11. T.C. vatandaşı ve yabancı uyruklu hastalara ait MDR izolatların spoligotip profilleri	56
Tablo 4.12. T1 ve TUR ailelerinin en az bir ilaca dirençli Hasta izolatlarının uyruklarına göre dağılımları	57
Tablo 4.13. Simpson İndeksine Göre yüksek Ayırım Gücüne sahip MIRU-VNTR lokusları.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARB	: Asido Resistant Bacil
BCG	: Bacillus Calmette Guerin
BP	: Baz Çifti
CRISPR	: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- düzenli kümelenmiş spacer arası kısa palindromik tekrarlar
ÇİD-TB	: Çoklu İlaç Dirençli Tüberküloz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Direct Repeat
DGT-DOTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMB	: Etambutol
ETR	: Exact Tandem Repeat
EZN	: Erlich Ziehl Nelsen
GI	: Üreme İndeksi
HIV	: Human Immune Deficiency Virus
Hsp	: Heat Shock Protein-Isı Şok Proteini
INH	: İzoniazid
INF	: İnterferon
IS	: Insertion Sequence
MDR-TB	: Multi Drug-Resistant Tuberculosis-Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
MGIT 960	: Mycobacterium Growth Indicator Tube
MIRU	: Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
PCR	: Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPD	: Purified Protein Derivative-Saflaştırılmış protein derivesi
RD-TB	: Rifampisin Dirençli Tüberküloz
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	: Rifampisin

SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
STR	: Streptomisin
TB	: Tüberküloz
TB-SPRINT	: Tuberculosis-Spoligo-Rifampin-Isoniazid Typing
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeat
XDR-TB	: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis
YİD-TB	: Yaygın ilaç dirençli Tüberküloz



ÖZET

Türkiye Cumhuriyeti Vatandaşı ve Yabancı Uyruklu Pulmoner Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks Suşlarının Filogenetik İlişkisinin MIRU-VNTR ve Spoligotipleme ile Tespiti

Pulmoner tüberküloz yaklaşık 70 yılı aşkın süredir uygulanan korunma, kontrol ve ilaç ile tedavi çabalarına rağmen, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, halk sağlığını tehdit eden önemli hastalıklar arasında yer almaktadır. Düşük sosyoekonomik seviyeye sahip beslenme ve hijyen şartlarının yetersiz olduğu toplumlarda yüksek insidansa ulaşan tüberküloz, 90'lı yıllardan itibaren tüm dünyada pandemi haline dönüşen HIV enfeksiyonlarından sonra gelişmiş ülkelerdeki refah toplumları için de ciddi tehdit haline gelmiştir. Anti-tüberküloz tedavide kullanılan ilaçların hastalar tarafından tolere edilememesine bağlı olarak irrasyonel kullanımları, tüberküloz tanısında özellikle endemik gelişmekte olan ülkelerde yaşanan yetersizlikler sebebi ile geç tanı ve tedavi başlangıcı ve nihayet hastanın ilaca ulaşamaması *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarında anti-tüberkülozlara karşı ilaç direncini provoke etmiştir. Tek ilaca karşı direnç ile başlayan bu gelişim majör ve minör bütün ilaçlara karşı dirençli XDR (Yaygın ilaç dirençli) suşların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Günümüzde TB tehditinin yeni adı MDR, XDR-MTB'dir.

Bölgemizde, özellikle sınırötesi komşu ülkelerde son 7 yıldır yaşanan sıcak gelişmeler bu ülkelerde sefaletin yanı sıra büyük ölçüde insan hareketlerinin yaşanmasına sebep olmuştur. Bu bağlamda en fazla sayıda göç alan ülkemiz ve özellikle Çukurova bölgesi göç hareketlerinin doğuracağı önemli sağlık problemlerine de açıktır. Bu çalışmada savaş, yokluk ve kötü hijyen şartlarında geniş halk kitleleri arasında kolaylıkla yayılan MTBK türlerinin göç hareketleri sonrasında bölgemizde görülen MTBK türleri ve prevelansına etkisi genotip düzeyinde irdelenecektir.

Bölgemizde sürdürmekte olduğumuz tüberküloz korunma ve kontrol programlarının başarısı ve dış kaynaklı insan hareketlerini bölgedeki MTBK suşların klonal çeşitliliğine etkisini gösterebilmek ve tanımlanan klonların hastaların meşei ile muhtemel ilişkilerini ortaya koymak amacı ile T.C. vatandaşı ve Suriye uyruklu pulmoner tüberkülozlu hastalara ait klinik materyallerden izole edilen MTBK suşlarının; MIRU-VNTR ve mikrobuncukların kullanıldığı spoligotipleme yöntemleri ile genotip düzeyinde tespitini amaçladık.

Bu çalışmaya Ç.Ü. Rektörlüğü THAUM bünyesinde yer alan T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına bağlı 8 ildeki hastane ve VSD'de pulmoner tüberküloz veya şüpheli temas öyküsü ile takip edilen 59'u T.C. vatandaşı, 41'ide Suriye uyruklu hastalara ait klinik materyallerden izole edilen 100 MTBK suşunu dahil ettik. Bu klinik izolatları MIRU-VNTR ve mikro buncukların kullanıldığı TB-SPRINT metodları ile klonal ilişki yönünden değerlendirdik.

Çalışmaya dahil izolatlarımızın, 74'ünün (%75.5) birden çok üyeli 8 kümeye dağıldığı ve 24 suşun da unique profil oluşturduğu toplam 32 farklı spoligotip profili gösterdiğini, Türk ve Suriyeli hasta klinik izolatlarında baskın spoligo ailesinin sırası ile 28/59 (%47.5) ve 17/39 (%43.6) üyeli T1 olduğunu bunu

yine her iki popülasyonda da sırası ile 17/59 (%28.8) ve 11/39 (%28.2) üyeli TUR ailesinin izlediğini gördük. Diğer taraftan suşlarımızın MIRU-VNTR yöntemi ile birden fazla üyeli 10 küme ye dağıldığı, 71 farklı MIRU-VNTR paterni belirledik.

Klonal dağılıma ait genel epidemiyolojik bulguları değerlendirmemiz sonunda; her iki uyruğa ait hasta izolatlarının benzer klonal özelliklere sahip olduklarını, Suriye uyruklu vatandaşlarda T.C. vatandaşlarında görülmeyen, T.C. vatandaşlarında da Suriye’li hasta izolatları arasında yer almayan az sayıda farklı klonun olduğunu, ancak bu klonların sayısının azlığı sebebi ile bölgeye yeni klonların taşındığının söylemenin mümkün olmadığını, indeks çalışma özelliğine sahip olan çalışmamız sonuçlarının periyodik olarak tekrarlanacak benzer çalışmalarda, yani long-term sürveyans ile elde edilecek sonuçlarla kıyaslanması halinde, bölgemizdeki MTBK suşlarının hareketi hakkında daha kesin sonuçlar elde edilebileceği kanaati oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mikrobuncuk, MIRU-VNTR, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, Pulmoner Tüberküloz, Spoligotipleme

ABSTRACT

Determining the phylogenetic relationships of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from Turkish Republic citizens and foreign patients with pulmonary tuberculosis by MIRU-VNTR and Spoligotyping

Pulmonary tuberculosis is one of the major diseases threatening public health, especially in developing countries, despite efforts to prevent, control and treat by medication for more than 70 years. Tuberculosis, which has reached a high incidence in societies with low socioeconomic nutritional and hygienic conditions, has become a serious threat for welfare societies in developed countries after HIV infections, which have turned into a pandemic in the world since the 90's. Irrational use of anti-tuberculosis drugs in treatment, due to the inability to be tolerated by patients, delayed diagnosis and treatment due to insufficiency in the diagnosis of tuberculosis, especially in endemic developing countries and eventually the patient's inaccessibility provoked drug resistance against anti-tuberculosis in *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains. This development, which started with a single drug resistance, resulted in the emergence of XDR (Extensively Drug Resistant) strains resistant to all major and minor drugs. Today, the new name of the TB threat is MDR, XDR-MTB.

The emerging events experienced in the last 7 years in our region, especially in neighboring countries, have caused human movements to a large extent in these countries as well as misery. In this context, our country which receives the highest number of immigrants, especially the Cukurova region, is also have an important potential for health problems caused by immigration movements. In this study, the effects of migration on strain diversity and prevalence of MTBC, which are easily spread among the masses of people in war, poverty and poor hygiene conditions, were examined at the genotype level.

We aimed to determine the genotype level by using microbead based spoligotyping and MIRU-VNTR methods; to be able to show the success of ongoing tuberculosis protection and control programs in our region and the effects of outsourced human movements on clonal diversity of MTBK strains in the region and also to reveal possible relationship between clones and patient origin by MTBK strains isolated from clinical materials belonging to TR citizens and Syrian pulmonary tuberculosis patients.

In this study we included 100 MTBC strains, isolated from clinical samples of patients with pulmoner tuberculosis and/or suspected contact cases, which were sent to TR Health Ministry of Public Health Institution Adana Regional Tuberculosis Laboratory that is affiliated to Çukurova University Tropical Disease Research and Application Center from eight city hospitals and Tuberculosis dispensaries. Included 59 and 41 strains were belong to Turkish republic citizens and Syrian patients, respectively. We evaluated these clinical isolates for clonal relation with MIRU-VNTR and TB-SPRINT methods using micro beads.

Our isolates included in the study showed that a total of 32 different spoligotype profiles, of which 74 (75.5%) were distributed to 8 clusters with multiple members and 24 strains were unique profiles. Among the Turkish and

Syrian patients' clinical samples, the major spoligo family was T1 with 28/59 (47.5%) and 17/39 (43.6%) isolates, also we observed that the TUR family with 17/59 (28.8%) and 11/39 (28.2%) members, respectively. On the other hand, we identified 71 different MIRU-VNTR patterns, in which our strains were distributed to 10 clusters with multiple members using the MIRU-VNTR method.

At the end of our evaluation of the general epidemiological findings of the clonal distribution; patient isolates of both nationalities have similar clonal properties. There are a few different clones in Syrian nationals that were not seen among Turkish citizens and also among Syrian patient isolates were not seen in Turkish citizens samples, however, due to the low number of these clones, it is not possible to say that new clones have been moved to the our region. Our research has the index study feature and it is believed that more precise results will be obtained about the movement of MTBC strains in our region, when our results compare with results that will be generated from the periodically repeated long term surveillance studies.

Keywords: Micro beads, MIRU-VNTR, *Mycobacterium tuberculosis* complex, Pulmonary Tuberculosis, Spoligotyping

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) grubuna ait türlerin sebep olduğu yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden kronik ve nekrozitan seyirli ancak tedavi edilebilir bir hastalıktır (1).

Günümüzde dünya nüfusunun dörtte birinin TB basili ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Yaklaşık olarak 50 yıldır sürdürülen yaygın aşı uygulamaları ve etkinliği ispatlanmış antitüberküloz tedavi rejimlerine rağmen, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-2019) verilerine göre dünya genelinde her yıl 10 milyon yeni tüberküloz vakası görülmekte ve yaklaşık 1.5 milyon hasta tüberküloz sebebi ile kaybedilmektedir. Bu verilere göre tüberküloz ölümleri enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır (2). Özetle tanı, tedavi ve immunisasyon çalışmalarında sağlanan ilerlemeler sayesinde son 10 yılda tüberküloz mortalitesinde %3'lük bir düşüş kaydedilmiş olmasına rağmen, hala artan insidans ve daha önemlisi klinik örneklerden artan oranlarda dirençli suşların izole edilmesi tüberkülozun halk sağlığını tehdit eden önemli bir tehdit olma özelliğini sürdürmesine sebep olmuştur. Doğrudan Gözetimli Tedavi (DGT) çabaların yaygınlaştırılması çabalarına rağmen klinik örneklerden giderek artan sıklıkta TB tedavisinde kullanılan majör ilaçlardan en az isoniyazid ve rifampisine dirençli olan çoklu ilaç dirençli (ÇİD-MDR) ve bu iki ilaca ek olarak ikinci seçenek ilaçlardan bir kinolon ve amikasin, kanamisin veya kapreomisin gibi aminoglikozit grubu bir enjektabl ilaca direnci bulunan yaygın ilaç dirençli (YİD-XDR) *M.tuberculosis* suşları izole edilmeye başlanmıştır. İlk defa tanı almış ve tedavi başlanmış hastaların % 3.4'ünde ÇİD-MTB suşları izole edilirken, sekonder tüberküloz tanılı yani daha önce tanı almış ve tedavi başlanmış, klinik kür sağlanmış ancak bir süre sonra reenfeksiyon veya re-aktivasyon sebebi ile akut alevlenmeler görülen hastalardan bu oran % 18'e kadar çıkmaktadır. Tüberküloz tedavisinde 1960'lı yılların sonlarına doğru yer alan ve teorik olarak direnç gelişme ihtimali en düşük olan, en etkili birinci seçenek ilaç "Rifampisin'e" dirençli tüberküloz (RD-MTB) suşları arasında ÇİD-MTB oranı ise %78'lere kadar çıkmaktadır (1, 2).

Tüberkülozun az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki yüksek insidansına ek olarak, klinik örneklerden izole edilen suşlar arasında ÇİD ve YİD-MTB oranlarındaki artış ve bir anlamda YİD-MTB'nin karakteristik suşu olan *Beijing* suşlarının dünya

genelinde yayılma eğilimi göstermesi dünya genelinde tüberküloz kontrol programlarının yeniden değerlendirilmesini, yeni stratejiler geliştirilmesini ve özellikle eğitim, daha hızlı daha duyarlı, daha özgül ve ulaşılabilir tanı yöntemlerinin geliştirilmesini ve etkili sürveyans çalışmalarının yapılmasını mecbur kılmıştır (3). Bu bağlamda klinik izolatların fenotipik özelliklerini baz alan düşük ayırım gücüne sahip tekrarlanabilirliği düşük fenotipe dayalı sürveyans yerine, MTBK suşlarının evrim özelliklerinin belirlenmesine, kaynak ve portör analizine uygun olup toplum içerisindeki ÇİD-MTB ve YİD-MTB suşlarının hareketinin izlenmesine, bulaşta ve hastalıkta rol oynayan konak-patojen risk faktörlerinin belirlenmesine, tekrar eden tüberküloz olgularında tedavi rejiminin düzenlenmesinde, endojen reaktivasyon veya eksojen reenfeksiyon ayırımının yapılabilmesine imkan veren, klonal düzeyde yüksek ayırım gücüne sahip tekrarlanabilirlikleri ve sonuçlarının standardize edilmesi mümkün olan genotipik sürveyans yöntemlerinin kullanılması (4, 5), DSÖ ve tüberküloz ile ilişkili uluslararası kuruluşların öngördüğü ve planladığı, 2020 yılından 2030'lu yıllara ertelenen “End TB” yani global eradikasyon stratejisine ulaşmada uygulanacak kontrol programlarının başarısının ön şartıdır (2, 6).

Moleküler sürveyans yani genom düzeyinde izlem günümüzde artan insan hareketleri ve TB hastası kadar suşların da toplum içerisindeki hareketinin (dinamiklerinin) klonal düzeyde izlenmesi ve takibini sağlayacak, TB epidemiyolojisi ve kontrol programları ile dirençli suşların moleküler değişimlerinin analizi, dominant genotiplerin orijini, direnç ile olan ilişkileri ve sirkülasyonu hakkında da doğruya en yakın bilgileri sağlayacaktır. Tüberküloz tüm dünyada özellikle düşük sosyo kültürel özelliklere sahip yoksul ve kapalı toplumlarda hala ciddi bir halk sağlığı problemidir. TB insidansı 8185/100.000 olan bir güneydoğu Brezilya cezaevindeki iki blokta mahkumlardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının genotiplerinin tespit edildiği bir çalışmada, farklı hastalardan izole edilen suşların marker spesifik moleküler epidemiyolojik yöntemler ile filogenetik ilişkisinin kurulması, kapalı alan gibi toplu yaşanan yerler veya bölgelerde aynı suşun farklı hastalardan izole edildiğini yani toplum içi bulaş olduğunu göstermiş ve suşların hareketinin izlenmesi ve TB artışını en aza indirebilmek için halk sağlığı ölçümleri hayati önem taşıdığını, moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılarak yapılan aile ve alt dal tanımlamaları *M. tuberculosis* genotip değişimlerinin ölçümlenebilmesi için son derece önemlidir (7).

M. tuberculosis kompleksinin tanımlanması ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacı ile birçok yöntem geliştirilmiş ancak bunlardan; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) tanımlanması yani “spoligotipleme”, insersiyon sekans 6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (IS6110-RFLP), Region of Difference (RD) tekrarları ve Mycobacterial Interspersed Repetitive Units –Variable Number of Tandem Repeats (MIRU-VNTR) polimorfizmini baz alan yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (8). MTBK tiplendirilmesinde ve epidemiyolojik araştırmalarında altın standart olan IS6110-RFLP metodu, zaman alıcı olması, yüksek standardizasyon gerektirmesi, laboratuvarlar arası suş profillerinin karşılaştırılmasındaki zorluklar ve düşük sayılı veya hiç kopya içermeyen suşların ayırımındaki yetersizlikler sebebi ile yerini daha hızlı ve kolay uygulanabilen spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemlerine bırakmıştır (9).

Ülkemiz ve özellikle Çukurova bölgesi 2013 yılından beri komşu ülkelerde yaşanan iç karışıklıklar sebebi ile büyük ölçekli insan göç hareketlerine sahne olmuştur. Bu hareketlilik ile bölgeye mülteci olarak gelen insanlar, uzun süren karışıklık sebebi ile ülkelerindeki sağlık network’ünden ayrılmış, sağlık adına kontrolsüz bireylerden oluşmaktadır ve ülke ve bölgemize alışkın olmadığımız sağlık problemlerini taşıma potansiyeline sahiptir. Bu riskler arasında çeşitli ekzo ve endoparazitler, viruslar ve özellikle düşük hijyen ve beslenme şartlarında insanlar arasında kolaylıkla bulaşarak yayılan *M. tuberculosis* gibi bakteriyel kökenli enfeksiyonlar ilk akla gelenlerdir.

Türkiye, coğrafik konumu itibarıyla ÇİD-TB oranı yüksek olan ülkelerle komşuluk yapmaktadır (2). Dirençli tüberküloz surveians verilerine göre komşu ülkelerden gelenler arasında ÇİD-TB ve YİD-TB tanı ve tedavisi alan hastalar bulunmaktadır (10).

Bu çalışma ile, bölgemizde enfeksiyon hastalıkları açısından risk oluşturabilme potansiyeline sahip olan insan hareketlerinin, MTBK basiller ve pulmonar tüberküloza bağlı olarak oluşturduğu potansiyel riskleri tespiti amacı ile Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı ve Suriye uyruklu hastalardan izole edilen duyarlı ve çoklu ilaç dirençli MTBK suşlarının MIRU-VNTR ve magnetik boncuk hibridizasyon temelli spoligotipleme yöntemleri ile izlenmesi planlanmıştır. Ülkemizdeki yaygın kümelerin membran temelli spoligotipleme yöntemi ile belirlendiği çalışmalar mevcut olup, magnetik boncuk temelli spoligotipleme ve ilaç direnç profillerinin eş zamanlı olarak

belirlendiği çalışma bulunmamaktadır. Elde edilecek sonuçlar hem bölgede sürdürülmekte olan tüberküloz korunma ve kontrol programlarının başarısı hem de muhtemel dış kaynaklı MTBK hareketlerinin gösterilmesine imkan sağlayacak, izolatların klonal düzeyde tespitlerinin yanı sıra klonların hasta menşei ve direnç ile ilişkileri de ortaya konacak aynı zamanda bölgemizin majör spoligotip profilleri belirlenerek coğrafik değişimler incelenecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

2.1.1. Morfolojik özellikler

Mikobakteriler 0.2-0.6 X 1-10 um boyutlarında, hareketsiz, sporsuz, aerob, kapnofilik, pleomorfik çomaklardır. Hücre duvar yapıları peptidoglikan ihtiva etmesi sebebi ile gram pozitiflere benzer ancak peptidoglikan yapıya teikoik aside benzer fosfodiester bağlar ile bağlı arabinomannan ve arabinogalaktan rezidüleri arasında bol miktarda bulunan çoğunluğunu mikolik asitlerin oluşturduğu uzun zincirli yağ asitleri sebebi ve enerji sentez mekanizmalarının özellikleri ile de gram negatif bakterilere benzerler. Ancak gram boya ile boyanmazlar. Hücre duvarı yüzeyine hidrofobik özellik kazandıran bu zengin lipid yapı, gram boyama da kullanılan anilin boyalara karşı mikobakterileri dirençli hale getirmektedir. Fenolde çözülmüş konsantre bazik fuksin ile muamele edildiklerinde hücre duvarı boyayı alır fuksin, yani kırmızı, renginde görünür ve % 3 asit alkol ile yapılan dekolorizasyon işleminden sonrada boyayı bırakmazlar. Bu sebeple de aside dirençli bakteriler (ARB) olarak tanımlanırlar ve bu prensibe dayalı Kinyoun Asit Fast veya Erlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemleri ile boyanabilirler.

2.1.2. Mikobakteri Hücre Duvarı Yapısı

Üç tabakadan oluşan hücre duvarının temel yapısında en içte plazma membranı bulunmaktadır. Orta tabakanın kor ve duvar iskeleti peptidoglikan arabinogalaktan (AGP)'ın mikolik asit esterinden oluşan mycolylarabinogalaktan peptidoglikandan (mAGP) ve oligosakkarid konjuge lipidler ve fosfatidilinozitol'ün glikozil derivatlarından meydana gelmektedir. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda lipid, glikolipidler ve peptidoglikolipidler hücre duvar ağırlığının %60'ını oluşturur ve bu sayede hücre duvarına hidrofobisite özelliği kazandırır. Lipidler arasında trehalose dimycolates ve trehalose monomycolates gibi açillenmiş trehalozlar cord yapısı oluşturarak fagozomların göçünü önleme ve granülom oluşumunu provake etmeleri sebebi ile virulansta önem arz etmektedir. En dış tabaka ise ağırlıklı olarak polisakkarit ve proteinlerden oluşmaktadır (11).

2.1.3.Kültür karakterleri ve üreme özellikleri

Mikobakteri hücre duvarındaki apolar ve/veya polar lipidler ve mikolik asitler aside dirençliliğin yanı sıra bakterinin virülansı ve bölünme süresinin 12-18 saate kadar uzaması ile de ilişkilidir. Mikobakteriler müşkülpesent mikroorganizmalar olup, in-vitro şartlarda üretilibilmeleri için son derece zenginleştirilmiş, sentetik veya yarı sentetik, katı veya sıvı bazlı besiyerleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında BACTEC-TB 460, MGIT 960, MYCO-ESPII ve MYCOLOR TK sıvı bazlı hızlı besiyerleri olarak katı bazlı yavaş besiyeri olan LJ ile birlikte kullanılmaktadır. Mikobakterilerin optimal üreme ısıları 37 (28-42)C⁰ optimal üreme pH'ları 6.5-6.8 dir. Kapnofilik olan bu mikroorganizmalar % 5-10 CO₂'li atmosferde daha iyi ürerler. Ancak katı besiyerlerinde 10-15 günde başlayan üreme 45. güne kadar gecikirken sıvı bazlı besiyerlerinde bu süre 8-15 güne kadar düşürülmüştür (12).

2.1.4 Mikobakterilerin Genom Yapısı

Mikobakterilerde genom oldukça stabil olup yaklaşık olarak 4.4 mega dalton büyüklüğündedir. DNA'da G+C oranı % 62-70 oranında olup stabilitenin sebebidir. İnsersiyon mutasyonları görülmezken 20 bölgede sessiz delesyonel veya yer değiştirme şeklinde mutasyonlar görülür (13). İlaç direncinin gelişimi ise tek nokta mutasyonları şeklinde gerçekleşir. 70-90 C sayısı içeren mikolik asitlerin varlığı ve DNA'larındaki yüksek G/C oranı ile diğer mikolik asit üreten *Nocardia* (%60-69), *Rhodococcus* (%59-69) ve *Corynebacterium* spp. (%51-59) türlerine benzerlik gösterirler (12).

2.1.5. Mikobakterilerin sınıflandırılması

Actinomycetales takımının Mycobacteriaceae ailesi tek üyesi olan mycobacteria genusu içerisinde 150 den fazla tür yer alır. Bu türler içerisinde çoğu toprak kökenli olup doğada toprakta saprofit olarak yaşarken, *M. tuberculosis* kompleksi üyeleri gibi az sayıda türde insan ve hayvanlarda pulmoner tüberküloz, milier tüberküloz gibi yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyon hastalıklara yol açabilir.

Mikobakteri genom çalışmalarının sonucunda, konak seçiciliklerinde ve patojenitelerinde farklılıklar olmasına rağmen yüksek oranda moleküler benzerliklerinden dolayı yakın ilişkili türlere “kompleks” adı verilmekte ve *M. tuberculosis* kompleks (MTBK) olarak adlandırılmaktadır. MTBK içerisinde *M.*

tuberculosis, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi* ve *M. orygis* olmak üzere 11 alt tür bulunmaktadır. MTBK dışındaki türlere ise, atipik veya Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM) adı verilmektedir (14).

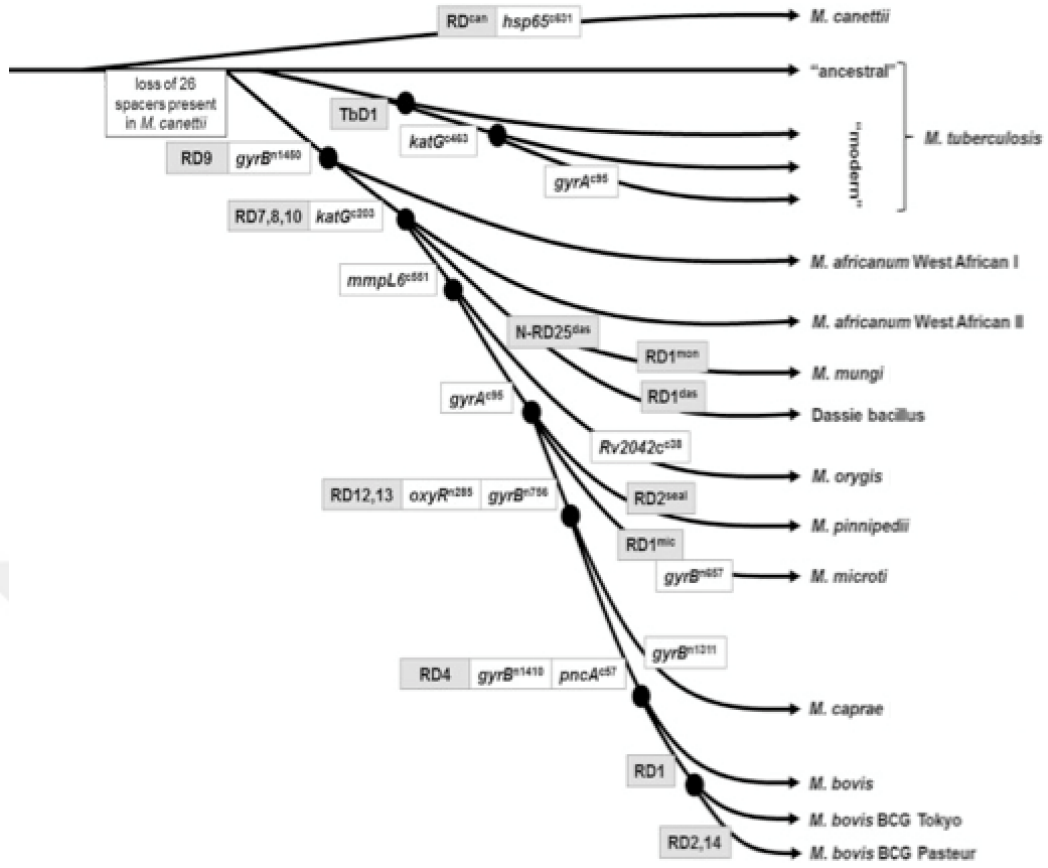
2.1.5.1 Fenotipik özelliklerine göre sınıflandırma

Ernest Runyon tarafından 1950 yılında *Mycobacterium* cinsine ait atipik türler, koloni morfolojileri, pigment üretimi ve üreme hızları gibi özelliklere göre fotokromojen, skotokromojen, nonkromojen ve hızlı üreyenler olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır (15).

Woods ve Washington'ın ise 1987'de Runyon sınıflandırmasını eksik bularak *M. tuberculosis*'in de içinde bulunduğu klinik önemi olan mikobakteriler, insanda potansiyel patojen mikobakteriler ve nadir hastalık etkeni olan türler olmak üzere türlerin klinik uyumlarına göre sınıflandırma önermişlerdir (16).

2.1.5.2. Genotipik özelliklerine göre sınıflandırma

İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturabilen ve bu sebep ile MTBK içerisinde yer verilen türlerin konak ve doku tropizmi coğrafi dağılım gibi fenotipe yansıyan genotipik farklılaşmalarının, yüksek G+C oranları dikkate alındığında muhtemelen, en az 10-15.000 yıl önce tamamlandığı düşünülmektedir. Günümüzde MBTK içerisinde görülen klonal farklılaşmalar genlerdeki konservatif yapıdan dolayı genetik mutasyonlar, klonal farklılıklara yol açan mobil insersiyon segmentleri, delesyonlar ile kaybedilmiş farklılaşma bölgeleri (RD), tuberculosis deletion1 (TbD1) veya H37Rv'deki toplam 20 delesyon bölgesi ile antibiyotiklere direnci sağlayan nokta mutasyonları (SNP) gibi fenotipi değiştirmeyen bir anlamda non sense mutasyonlar şeklinde olmaktadır (17). Brosch ve arkadaşları 2002 yılında bu çeşitliliklerden köken alarak MTBK türlerinin filogenetik ilişkilerini belirlemişlerdir. Yeni eklenen türler ile filogenetik ağaç Şekil 2.1.' de görülen halini almıştır (18, 19).



Şekil 2.1. Brosh'un Modern Sınıflandırması (19)

MTBK türleri arasında meydana gelen bazı gen bölgelerindeki farklılıklar, bu türleri birbirinden ayırmaktadır. Bu türlere ait gen kırılmaları incelendiğinde; MTBK içerisinde meydana gelen ilk ayrışmanın atasal suşa en yakın olduğu TbD1, RD ve RVD gen bölgelerinin korunduğu bilinen *M. canettii*'den olduğu gözlenmiştir. *M. tuberculosis* RD gen bölgelerini korumuş ancak modern suşlarda TbD1 (specific deletion 1) delesyonunun olduğu bilinmektedir (13, 17).

M. africanum, fenotipik özelliklerine bakılarak *M. bovis* ve *M. tuberculosis* arasına yerleştirilmiştir. Batı Afrika suşu olan subtip I ve Doğu Afrika'ya ait subtip II *M. africanum* alt türleri RD9 bölgesinin delesyonu ile *M. tuberculosis* türünden, RD7, RD8 ve RD10 ile de birbirlerinden ayrılmışlardır. RD9, RD7, RD8 ve RD10 bölgelerinin delesyona uğradığı *M. microti*, RD12, RD13, RD4, RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini koruyarak *M. bovis*'den ayrılmıştır. *M. bovis* ise RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini kaybederek atenué BCG suşları ortaya çıkmıştır (17, 18).

M. tuberculosis genomundan RvD1 bölgesinin kaybıyla avirulan H37Rv suşu, TbD1 ve IS6110 gibi bazı polimorfik gen bölgelerinde meydana gelen SNP'ler sonucunda Beijing, African ve Haarlem olarak adlandırılan modern *M. tuberculosis* kökenleri ortaya çıkmıştır (20).

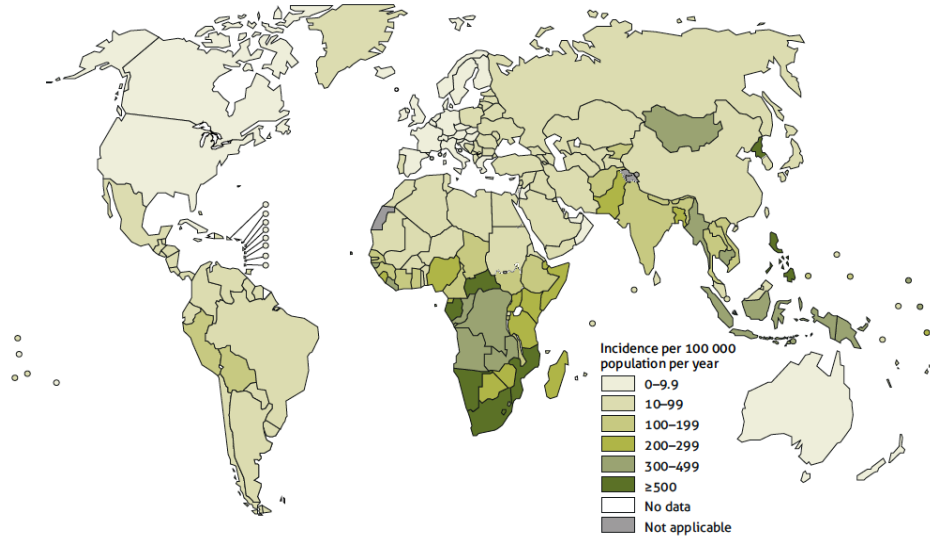
2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi ve İnsan Hareketleri

TB, bütün dünya da gelişmişlik farkı gözetmeksizin bütün ülkelerde görülmekte olup, bütün hastalıkların % 2,5'unu ve önlenebilir ölümlerin % 26'sını oluşturmaktadır. Dünyadaki toplam tüberkülozlu hastaların yaklaşık % 80'i ağırlıklı olarak tüberküloz insidansının yüksek olduğu başta Afrika, Çin ve Hindistan olmak üzere 22 ülkede görülmektedir.

DSÖ'nün 2019'de yayınlanan Global Tüberküloz Kontrol raporuna göre her yıl 10 milyon yeni tüberküloz vakası görülmekte ve yaklaşık 1.5 milyon hasta tüberküloz sebebi ile kaybedilmektedir (2).

Anti-tüberküloz tedavisinin bulunmasına rağmen artan TB insidansı ve anti-tüberküloz ilaca dirençli suşların ortaya çıkışı; önce DGT'nin yaygınlaştırılması ve güçlendirilmesine ve eş zamanlı olarak da TB/HIV koenfeksiyonlu hastalar ile ÇİD-TB ve YİD-TB'lu hastaları, yani yüksek risk grubunda yer alan hastaları hedef alan Stop TB kontrol stratejisinin gündeme gelmesine yol açmıştır (1). Stop TB belirlenmiş öncelikli hedefi, 2015 yılında TB insidansındaki artışı durdurma ve 1990 yılında belirlenen TB prevalans ve insidans oranlarını %50 oranında azaltma ve nihayet 2035 yılında TB'un tamamen eradikasyonu idi (2). Ancak zaman içerisinde elde edilen başarı ölçütlerinin hedefin altında kalması ile tüberkülozun bir milyon nüfusta <1 olgu ya düşürülmesi anlamına gelen "tüberkülozun elimine edilmesi" 2050 yılına ertelenmiş, programın veya yeni hedefin adı "End TB" global eradikasyon stratejisine dönüştürülmüştür (1, 4, 6).

Son otuz yıl içerisinde yaşanan savaşlar, ticaret, turizm ve muhaceret sebebi ile yaşanan yoğun insan hareketleri ve sosyoekonomik problemler tüberküloz tanı ve kontrol programlarında aksamalara sebebiyet vermiş ve özellikle de HIV/AIDS salgının ortaya çıkması ile birçok ülkede tüberküloz insidansında alışılmışın dışında artışa neden olmuştur (Şekil 2.2) (2).



Şekil 2.2. Dünya TB İnsidansı (2)

Çağımızda insanlar, sağlık hizmetlerine erişim yollarının değişkenlik gösterdiği, sosyoekonomik geliri ve farklı sağlık profillerine sahip coğrafi bölgeler veya ülkeler arasında sürekli olarak yer değiştirme arzusu içerisinde.

Dünya genelinde bir milyar kişi bir başka ifade ile her yedi kişiden biri göçmen statüsündedir. Bu hareketliliğin yaklaşık 244 milyonu uluslararası, 740 milyonu ise ülke içerisinde gerçekleşmekte olup, tahminen bu insanların en az 65 milyonu zorunlu göçe tabii tutulanlardır. Bu karmaşa ve yarattığı olumsuzluklar Sağlık hizmetlerine ulaşım da bireylerin sağlıklarını olumsuz yönde etkilemektedir (21).

Tüberküloz insidansının yüksek olduğu bölge ve ülkelere düşük insidanslı bölge ve ülkelere göçün TB epidemiyolojisini etkileyebilmektedir. Diğer taraftan kısıtlı sağlık erişimi olan bölgelerde pulmoner TB enfeksiyonlu hastaların, düzensiz anti-tüberküloz ilaç kullanımları sonucu ortaya çıkması muhtemel ÇİD’li suşlarında çalışma amaçlı veya zorunlu göç sonucu bölgeye gelen göçmenler için ciddi risk faktörü haline gelmektedir.

Uluslararası Göç Örgütü’nün (IOM) Mart 2020’de yayınladığı raporda; 2019 yılında dünya genelinde 428.000 göçmen ve mülteci ile yapılan göç sağlığı değerlendirmelerinde, 590 aktif TB vakası bir başka ifade ile 138/100.000 aktif TB tespit edildiğini duyurmuştur (22).

Göç çözülmesi gereken bir mesele olmaktan ziyade özellikle sağlık ve TB hedeflerine ulaşmak için en yüksek ulusal ve uluslararası düzeyler yeniden programlanarak yönetilmesi için bir fırsattır.

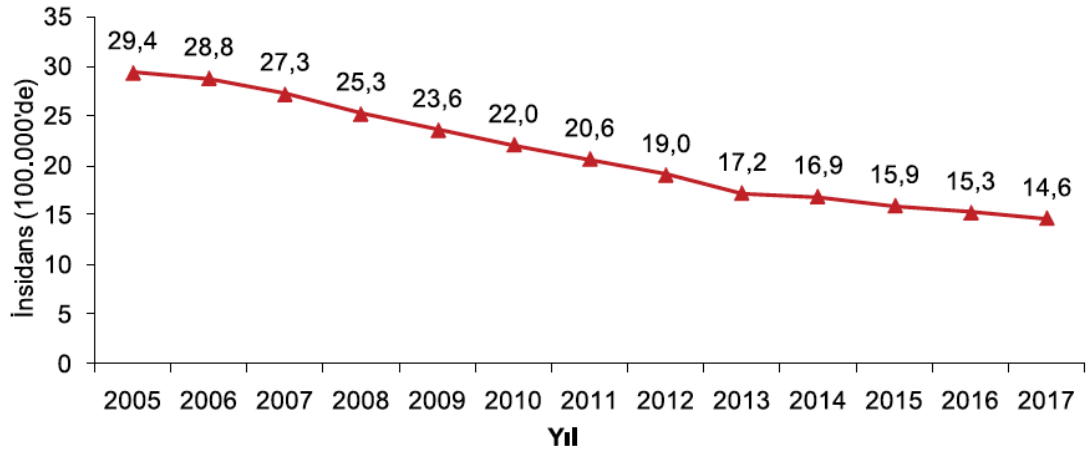
2.2.1. Türkiye’de Tüberküloz ve Göç

DSÖ 2019 Küresel Tüberküloz raporunda; ülkemizdeki tahmini TB hastalık insidansı: yüz binde 18 ve tahmini mortalite hızı da yüz binde 0,62 olarak verilmiştir (2).

TB Daire Başkanlığı verilerine dahilinde 2017 yılında TB tanısı alan toplam hasta sayısı 12.046 olmakla beraber bunların %92.2’sinin yeni vaka, %7,8’inin de önceden tedavi görmüş vakalar oldukları, tanı almış hastaların %42.3’ünün kadın, %57.7’sinin de erkek oldukları bildirilmiştir. Raporda vakaların %66.1’sı pulmoner tüberkülozlu %33.9’u ise akciğer dışı organ tutulumlu hastalar oldukları belirtilmiştir (10).

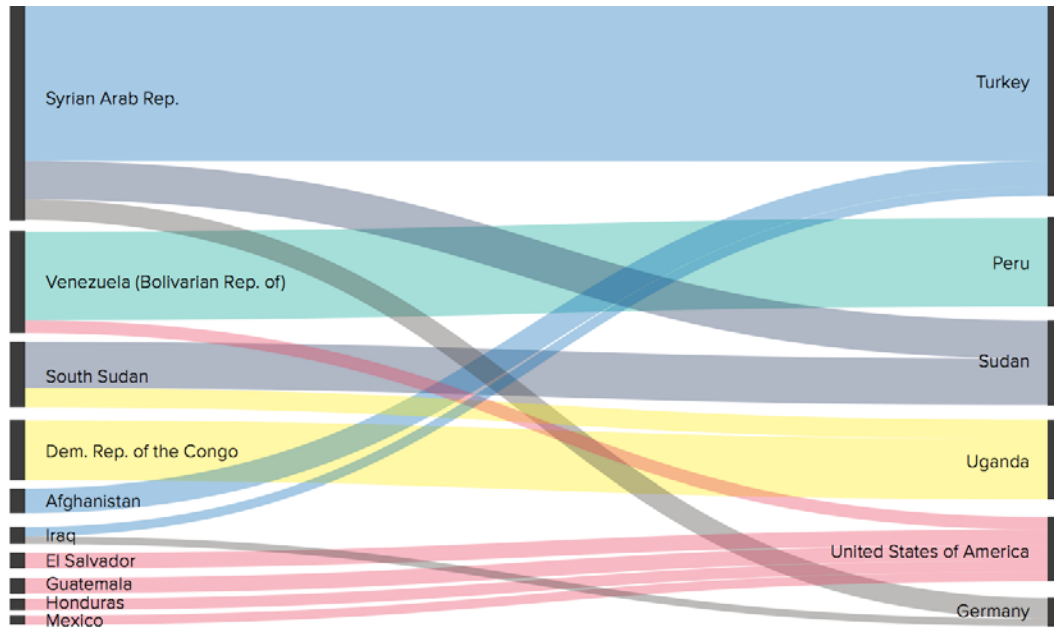
Diğer taraftan ülkemizdeki kontrol programlarının başarısını gösteren Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu raporuna göre de 2005 yılında toplam 20.535 (29.4/100.000) olan kayıtlı hasta sayısının 2018 yılında 11.786’ya (16/100.000) düştüğü bildirilmiştir. Bu sonuçlara ek olarak tanı konmuş TB hasta insidansımızın son 10 yıl içerisinde yıllık ortalama %5’lik bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2.2) (2, 4).

Bu raporlarda 2016 yılında tanı alıp tedaviye başlanan TB olgularının toplamda %85.4’inde tedavi başarısı gözlenirken, bu oran önceden tedavi görmüş vakalarda %67.2, yabancı ülke doğumlular da %76,4 olarak kaydedilmiştir. Ülkemiz genelinde 2017 yılında 191 hasta ÇİD-TB tanısı almıştır. DSÖ önerilerinin doğrultusunda ülkemiz de “End TB” Stratejisinin hedeflerini gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır (10).



Şekil 2.3. 2005-2017 Yılları Arasında Türkiye TB İnsidansı(10)

Ülkemiz 2013 yılından beri yoğun göç almakta ve iç karışıklıkların yaşandığı bölgeler olmak üzere sınırlarda tehdit hala devam etmektedir. ERCC-2017 verilerine göre Türkiye toplam 3.480.348 göçmene ev sahipliği yapmakta olup bu sayı 2018 yılında 3,7 milyon kişiye ulaşmıştır. Göç hala artarak devam etmektedir (22, 23). Birleşmiş Milletler Mülteciler Yüksek Ajansının (UNHCR) 2018 raporunda bildirdiği yeni kayıtlı mültecilerin ve sığınmacıların akış diyagramı Şekil 2.3.' te görülmekte olup bu diagram göre Türkiye 2018 yılında yarım milyondan fazla mülteciye ev sahipliği yapmıştır (21, 24).



Şekil 2.4. Birleşmiş Milletler Mülteciler Yüksek Ajansı Mülteci ve Sığınmacıların Akış Diyagramı(24)

Göç idaresi genel müdürlüğünün 2019 yılında yaptığı geçici koruma kapsamında bulunan Suriye uyruklu mülteci/göçmenlerin illere göre dağılımında 243.413 göçmen sayısı ile Adana ilk beşin içerisinde yer almaktadır. Komşu illerimizdeki benzer dağılımlar bölgemize yüksek oranda insan hareketi olduğunun bir göstergesidir (25).

Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Daire Başkanlığının yaptığı TB insidans prevalans çalışmaları, ülkemizde özellikle 2010'dan itibaren dramatik düşüş gösteren Türkiye doğumlu TB olgularının askine yabancı ülke doğumlularda bu oranın 8 kat arttığını göstermiştir. Verem savaşı dispanserlerinde 2016 yılında kayıt altına alınan 61 farklı ülke doğumlu yabancı uyruklu hasta sayısı 904 olup, bunların %56,2'si (508) Suriye doğumludur (10).

Ülkemizde klinik materyallerden tespit edilen MTB suşlarının anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının değerlendirildiği bir raporda; direnç testi yapılan 6.028 suşun 200'ünün (%3,3) çok ilaca dirençli (ÇİD-TB) olduğu bildirilmiştir. ÇİD-TB oranlarının yeni olgularda %2,1 iken (115 olgu), önceden tedavi görmüş olgularda %14,2 (85 olgu) olduğu belirtilmiştir. Bu raporda ÇİD-TB olgularından 9'unun YİD-TB olduğuda bildirilmiştir. İlginç olan YİD-TB olgularının sadece 1'i Türkiye doğumlu olup, 8'i yabancı ülke doğumludur (10).

2.3. Tüberküloz Tedavisi

Para amino salisilik asit (PAS) ve Streptomisin'in (STR) anti-tüberküloz aktivitesinin gösterilmesi ile 1940'lı yılların sonlarında başlayan Tüberküloz kemoterapisi daha sonra tedavisi daha sonra izoniyazid (INH), etambutol (EMB) ve rifampisin'in (RIF) anti-tüberküloz etkisinin gösterilmesi ile sürekli güncellenmiş, ilk iki ilaç ile 12-24 ay olan tedavi süresi önce 9 sonra 6 ve 4 aya kadar düşürülmüştür. Kullanılan ilaçların hasta tarafından iyi tolere edilememesi, hastanın klinik küre bakarak tedaviyi terk etmesi bu ilaçlara karşı direnç gelişimini provoke etmiştir (26).

M. tuberculosis kompleks suşlarda plazmidlere bağlı direnç tarif edilmemiştir. Tek nokta mutasyonları olarak belirtilen SNP'ler sonucu, rastgele ve spontan mutasyonlar ile direnç oluşmaktadır. Spontan direnç oranları RIF, INH, SM ve ETM için 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-6} olarak gerçekleşmektedir (27). Kromozomlar üzerinde direnç sebep olan gen bölgelerinin birbirleriyle bağlantılı olmamaları sebebi ile bakterinin spontan olarak iki ilaca birden direnç geliştirme oranı olasılıkların

birbirleriyle olan çarpımlarına eşittir. Tüberküloz tedavisinde kombine ilaç rejimi, mutasyonların düşük oranlarda görülmesi ve duyarlı bakterilere aktarılamaması prensibine dayanmaktadır. Bu sebeple kombine anti-tüberküloz ilaçların kullanımı, direnci önlemede önemli bir stratejidir (28, 29).

2.3.1. Anti-tüberküloz ilaçlar ve Direnç Mekanizmaları

2.3.1.1 Streptomisin (STR)

Streptomisin, *Streptomyces griseus* bakterisinden elde edilen bakterisidal (bakterisit) etkili bir aminoglikozittir. Diğer aminoglikozid grubu antibiyotikler gibi S12 proteini ve 16S rRNA'ya etki ederek protein yapımını inhibe eder. *M. tuberculosis* kompleksinde streptomisin direncinin yaklaşık %70'i iki tür mutasyon ile meydana gelmektedir. Bu iki mutasyonlardan ilki ribozomal protein S12'nin kodlanmasından sorumlu *rpsL* geninde (% 60), ikincisi ise 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* geninde (< %10) meydana gelmektedir. *rpsL* genindeki nokta mutasyonlar genellikle 88. kodonda, Lys 88 Arg (AAG-AGG) ve 43. kodonda Lys 43 Arg (AAG-AGG) amino asit değişimine sebep olup nadiren Lys 43 Thr (AAG-ACG) şeklinde görülmektedir (30).

STR direncinden sorumlu, diğer mutasyonlar *rrs* gen bölgesinde ilmeği iyi korunmuş 530. kıvrım ve bu kıvrımın yakın olduğu 915. bölgede bulunmaktadır. 530. kıvrımda C491T, C512T, C516T, A513T, A513C nükleotid değişimi, 915. bölgede ise C903G, C903A, A904G nükleotid değişimleri sıklıkla meydana gelmektedir (30).

Geri kalan dirençli suşlarda ise olası bir mekanizma ile hücre duvar geçirgenliğindeki değişiklik sonucu ilacın hücre içine alınmasında bir engel oluşturmalarıdır.

2.3.1.2. İzonyazid (INH)

İzonyazid, 1952 yılından beri MTBK dışında kalan diğer mikobakteriler ve prokaryotlar INH'a dirençli olduğundan, bu ilaç asıl olarak TB tedavisinde ve profilaksisinde kullanılmaktadır (28).

Sentetik yapıda ve çoğalan TB basili üzerine bakterisit etkisi bulunan izonyazid katalaz-peroksidaz enzimi ile aktive olan bir ön ilaçtır.

INH dirençli suşlarda, *katG* geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz aktivitesinde kayıp olduğu bilinmektedir. Katalaz-peroksidazın hücre içine aktif

difüzyon ile giren ilacı aktif şekline dönüştürerek etikili olduğu düşünülmektedir. INH dirençli *M. tuberculosis* suşlarında, *katG* geninde missense mutasyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar tespit edilmektedir. Bu gende sıklıkla 315. kodonda Ser315Thr (% 40) mutasyonu tespit edilirken, bazı suşlarda 463. kodonda katalaz-peroksidaz aktivitesini değiştirmeyen Arg463Leu mutasyonu görülmektedir. Bu mutasyonun polimorfizm olduğu, izoniyazide duyarlı suşlarda da varlığı gösterilmiştir (28, 31, 32).

Katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan *katG* genindeki mutasyonlar % 60-70 oranında izoniyazide karşı yüksek konsantrasyon direncinden sorumludur.

Mikobakterilerde hücre duvarına özellik kazandıran temel komponent olan mikolik asidin sentezinde iki gen rol oynar. Bu genlerden *inhA*, NADH'a bağımlı enoil acyl carrier protein (ACP) reduktaz enzimini kodlarken, *kasA* geni yağ asidi uzamasında önemli olan β -ketoacyl carrier protein (ACP) sentaz enzimini kodlamaktadır. INH direncinden bu genlerde meydana gelen mutasyonların sorumlu olduğu bilinmektedir.

Ancak *kasA* mutasyonu görülen suşlarda, *katG* veya *inhA* genlerinde de mutasyon bulunması sebebi ile de INH direnciyle ilişkisi şüphelidir. *oxyR* *M. tuberculosis* komplekse ait psödogendir. Oksidatif strese karşı hücresel cevaptan sorumlu alkil-hidroperoksid reduktaz enzimini kodlayan *ahpC* genindeki mutasyonların da dirençten sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak bu mutasyona da *katG* genindeki mutasyonların eşlik ettiği ve *ahpC* geninde meydana gelen mutasyonların INH tedavisi sırasında seçilen ve katalaz-peroksidaz aktivitesi azalmış *katG* mutantlarında sonradan kompensatuvar olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (33, 34).

2.3.3. Rifampisin (RIF)

Streptomyces mediterranei 'nin kültür filtratlarından elde edilen rifampisin yarı-sentetik bakterisidal etkili bir ilaçtır. Rifampisin hücre zarfından diffüze olarak, bakterinin RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesine bağlanıp transkripsiyonun başlamasını engelleyen DNA bağımlı bir RNA polimerazdır (35).

Rifampisin dirençli MTBK suşlarının %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533. kodonları arasındaki 81bp uzunluğundaki "rifampin resistance determining region (RRDR)" veya "hot spot" adı verilen bölgede "missense" mutasyonların, delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir (36-38).

Rifampisin dirençli *M. tuberculosis* suşlarının yaklaşık %4'ünde RRDR bölgesinde genetik değişiklik tespit edilmemiştir. Bu suşların bir bölümünde *rpoB* genin RRDR bölgesinin dışında kalan 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlarda mutasyonların olduğu gösterilirken çok küçük bir bölümünde ise direncin mekanizması açıklanamamaktadır (39).

Dirençli suşlarda mutasyonlar tek bir kodonda bir nükleotidin değişmesi şeklinde olabileceği gibi bir kodonda birden fazla nükleotidin değişmesiyle ya da birden fazla kodonu kapsayan ikili, üçlü hatta dörtlü kodon mutasyonları şeklinde de olabilmektedir. Yapılan çok sayıda çalışmada RIF dirençli suşların yaklaşık %34-57'sinde *rpoB* geninin 531. Kodonunda TCG→TTG mutasyonu (Ser531Leu) tespit edilmiş ve bunu 526. kodondaki mutasyonlar izlemektedir (40).

Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzey RIF direncine (MİK $\geq$ 64µg/ml) neden olurken 514 veya 533. kodonlarda görülen mutasyonlar genellikle düşük düzey RIF direncine yol açmaktadır. Rifampisine dirençli suşların tümünde rifapentine de çapraz direnç görülmekte ve her iki antibiyotik için de aynı MİK değerleri tespit edilmektedir (39).

rpoB geninde Leu511Pro, Asp516Tyr, Asp516Val, Ser522Leu ve Leu533Pro mutasyonu olan RIF dirençli *M.tuberculosis* suşların rifabutine duyarlı (MİK $\leq$ 0.5µg/ml) oldukları tespit edilmiştir (41).

Yapılan yeni çalışmalar ile RIF direncinde *rpoB* gen bölgesine ek olarak ponA1 olarak adlandırılan genin de etkisi olduğu düşünülmektedir.

Rifampisin anti-TB tedavisinde oldukça önemli bir ilaçtır. Hızlı çoğalan basillere karşı erken bakterisidal, yarı dormant basillere ise sterilizan etkilidir. Hücre içi ve hücre dışındaki mikobakterilere karşı ise bakterisidal etki gösterir (29).

2.3.4. Etambutol (EMB)

Etambutol, 1961'de bulunan sentetik, bakteriyostatik etkili bir ilaçtır. Etambutol arabinogalakattan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinozil transferaz enzimiyle etkileşerek MTBK' in hücre duvarı sentezini bozar (28). Arabinozil transferaz enzimini kodlayan embABC geninde meydana gelen mutasyonlar %70 oranında etambutol direncinden sorumludur. Etambutolün (EMB) bir arabinoz analogu olduğu düşünülmektedir. EMB arabinozil transferazın özgül hedefidir. İlaç arabinozun

arabinogalakattan ve lipoarbinomannana polimerize olmasına aracılık eden arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalakattan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellemektedir. Arabinogalakattan mikobakteriyel hücre duvarının en önemli polisakkarididir.

Arabinozil transferaz enzimini kodlayan üç gen *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kbp'lik bir operon (*embCAB*) oluşturacak şekilde organize olmuştur. *EmbCAB*'ın sekonder yapısal analizi ile bu proteinin 12 adet transmembran domaini içeren bir integral transmembran proteini olduğu gösterilmiştir. *EmbB* proteininin sitoplazmik lupunda EMB resistance determining region (ERDR)'nin yer aldığı ve bu bölgenin farklı mikobakteri türlerinde bulunan ve iyi korunan bir bölge olduğu öne sürülmektedir. Muhtemelen EMB bir arabinoz analogu *EmbB* ise bir arabinozil transferazdır (42).

Etambutol dirençli suşlarda *embB* geninde en sık rastlanan 306. kodondaki sessiz mutasyonlar ile Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630Ile diğer sık görülen mutasyonlardır. Met306Leu, Met306Val, Phe330Val ve Thr63Ile mutasyonlarını da genellikle yüksek EMB direncinden sorumludur ($MIC \geq 40\mu g/ml$). EMB dirençli MTBK'larda direncin %47-65'inden *embB* genindeki mutasyonlar sorumludur. EMB dirençli bazı suşlarda ise ERDR bölgesinde mutasyon tespit edilememiştir (27).

2.3.5. Pirazinamid (PZA)

PZA nikotinamidin yapısal analogudur. Antitüberküloz ajan olarak önemi 1952 yılında fark edilen ve 1980'li yıllarda kısa süreli tedavi protokollerinin yaratılmasında etkili olan PZA, asidik şartlarda makrofaj içindeki düşük metabolik aktivite gösteren semi-dorman durumdaki tüberküloz basillerine etkilidir (43). PZA ve INH nikotinamid türevi olmakla birlikte, etki mekanizmaları farklıdır. Ancak INH ve RIF ile güçlü sinerji yaratır. PZA bir ön ilaç olup, mikobakterilerin PZA'ya duyarlılığı spesifik Pirazinaminidazın varlığına bağlıdır. Bu enzim aktivitesine sahip olmayan diğer mikobakteriler mesela *M. bovis*, PZA'ya karşı intrinsik direnç gösterir. PZA'ya dirençli suşların % 72-94'ünde pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir (44). Mutasyonların çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması *pncA* dışındaki direnç genlerinde

görülmeleyen bir durumdur. Buna karşın mutasyonlar (3-17, 61-85 ve 132-142 kodonlar arasında *pncA* geninin üç bölgesinde) belli bir kümeleşme göstermektedir (44).

2.4. Mikobakterilerde Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Günümüzde giderek artan RD-TB, ÇİD-TB ve YİD-TB hasta sayıları ve bu tüberküloz hastalarının diğer bireyleri doğrudan dirençli basil ile enfekte etmeleri sebebi ile tüberkülozda direnç yalnızca TB kontrolünün değil aynı zamanda toplum sağlığını da tehdit eden bir problemdir. Hastaların tedavisinin doğru yönetilebilmesi ve akılcı antibiyotik kullanımı amacı ile daha hızlı, yüksek sensitivite ve spesifiteli duyarlılık testlerine olan ihtiyacı arttırmış ve sürdürülen anti-TB tedavi rejimlerini kısaltabilmek, dirençli tüberküloz ve latent tüberkülozlu olguların tedavi başarılarını arttıracığı düşünülmektedir.

Duyarlılık testlerinin prensibi, bir antimikrobiyal ajana klinik cevap ile in vitro test sonucu arasındaki korelasyona dayanır. İn-vivo şartlarda basillerin %1'inden fazlası ilaca dirençli ise anti-tüberküloz ilaç ile tedavi klinik olarak yararlı değildir. İyi bir metod belli bir ilaca karşı duyarlı ve dirençli basil oranını belirleyebilmelidir .

2.4.1.Konvansiyonel Yöntemler

Bu testlerde, ya klasik kültür yöntemleri veya hızlı kültür yöntemleri ile uygun bir besiyerinde çoğaltılan bakteri kolonileri kullanılır.

MTBK türlerin anti-tüberküloz ilaçlara direncini tespitite kullanılan besiyerlerinde, inokulum miktarında, ilacın minimum konsantrasyonunda, kullanılan direnç kriterlerinde farklılıklar mevcut olması sebebi ile European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST)'a göre duyarlılık testlerinin standardizasyonu şarttır.

Bu zorluklar mutlak konsantrasyon, direnç oranı ve proporsiyon yöntemleri gibi klasik kültüre; radyometrik (BACTEC), otomatize (MGIT) sistemler ve indikatör boya olarak alamar mavisi kullanılan kolorimetrik yöntemler olmak üzere de hızlı kültüre dayalı duyarlılık testleri ile aşılmaktadır (45).

2.4.2. Moleküler Yöntemler ile Direnç Analizi

DSÖ tarafından da tavsiye edilen Xpert MTB / RIF (Xpert), Line Prob Assay (LPA) ve DNA dizi analizi yöntemleri hem pulmoner hem de akciğer dışı örneklerde MTBK türler ve ilaç duyarlılıklarını eşzamanlı olarak tespit etmeğe imkanı sağlamaktadır (46, 47).

2.4.2.1. GeneXpert MTB/RIF

GeneXpert Testi (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD), rifampisin direncine sebep olan mutasyonlarla birlikte MTBK'yi tespit etmek için *rpoB* geninin 81-bp'lik rifampicin resistance determining region (RRDR) bölgesini hedefleyen beş overlapping moleküler işaret prob (A-E) kullanan kartuş temelli, otomatik semi-nested gerçek zamanlı PCR sistemidir (Şekil 2.5) (38).

Problar, *rpoB* geninin RRDR dizisine hibridize olmaktadır. A (kodonlar 507-511), B (kodonlar 512-518), C (kodonlar 518-523), D (kodonlar 523-529) ve E (kodonlar 529-533). Sonuçlar beş probdan en az ikisinin bir çevrim eşiği ($C_t \leq 38$) gösterdiğinde MTBK pozitif olarak değerlendirilken, ilk ve son C_t değerleri arasındaki fark 3.5'tan fazla ise RR-TB olarak kabul edilir (46, 48).



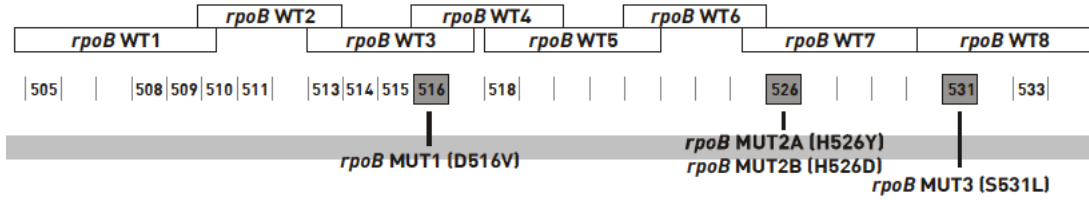
Şekil 2.5. GeneXpert overlapping prob dizileri

2.4.2.2. Genotip MTBDRplus

Genotip MTBDRplus (LPA; Hain Life Sciences, Almanya), MTBK tanımlanması ve eşzamanlı olarak pulmoner ARB pozitif veya negatif klinik ve kültür örneklerinden RIF ve INH direnci ile ilişkili mutasyonların hızlı tespiti amacı ile kullanılan multipleks PCR amplifikasyon basamağı bulunan ters hibridizasyon temeline dayalı bir DNA Line Probe teknolojisidir (47).

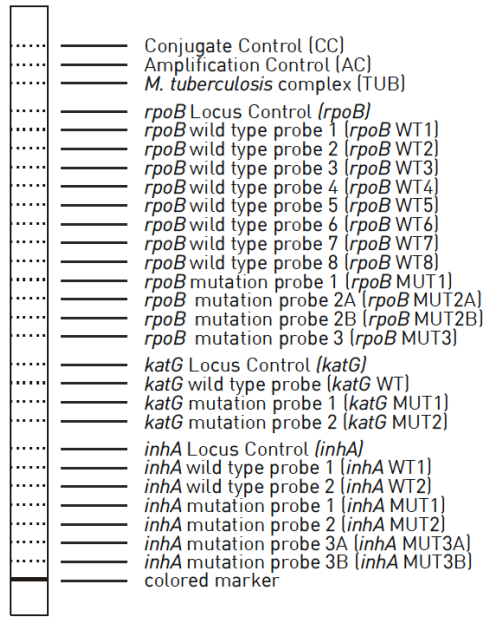
RIF direncinin tespitinde, RNA polimerazın β -altbirimini kodlayan *rpoB* geni ile ilişkili, INH direncin de ise, katalaz peroksidaz kodlayan *katG* geni ve NADH enoil ACP redüktazı kodlayan *inhA* geninin promotor bölgesi incelenir (49).

Ters hibridizasyonun gerçekleştirilerek mutasyon varlığını araştırmak amacı ile strip üzerinde *rpoB* geninin RRDR bölgesine overlapping sekiz duyarlı (wild type-WT) prob ve dört mutasyona uğramış prob (MUT) bulunur (Şekil2.6) (47).



Şekil 2.6. Genotip MTBDRplus *rpoB* gen bölgesi için kullanılan prob çeşitleri

Direnç varlığı analiz edilirken, WT problemlerinde hibridizasyon olmamasına karşın MUT problemlerinin hibridizasyonu RIF ve / veya INH direncinin temelidir (Şekil 2.7) (50).



Şekil 2.7. Genotip MTBDRplus strip görüntüsü(47)

2.4.2.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi mutasyonları belirlemek için kolay ve güvenilir bir yöntemdir. INH direnci gibi mutasyonların dağınık ve büyük segmentler halinde olduğu durumlarda her izolat için birden fazla sayıda dizi analizi gerekebileceğinden kolay uygulanabilir bir yöntem olmasa da *rpoB* gibi yoğun ve çok kısa segmentte sınırlı olan

direnç genlerinin tespit edilmesinde DNA dizi analizi uygun bir tekniktir. Günümüzde DNA dizi analizi amacıyla Sanger'in zincir sonlandırma temeline dayanan dideoksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. Zincir sonlandırma yöntemi manuel ve otomatize sistem olarak kullanılabilir. Son yıllarda otomatize sistemlerin kullanıma girmesi DNA dizi analizinin çok geniş çaplı kullanım alanı bulmasına imkân sağlamıştır (51). Otomatize DNA dizi analizi şu aşamalardan oluşmaktadır: Özgül oligonükleotid primerin nükleotid dizisi belirlenmek istenen DNA kalıbına tutunması, Taq DNA polimeraz, floresan boyalı ddNTP ve dNTP'lerin karışıma ilave edilerek yeni DNA zincirinin sentezi, yeni sentezlenen DNA'nın sekans-spesifik olarak sonlanması, oluşan ürünlerin kapiller elektroforezde yürütülmesi. Zincir sonlandırma yöntemine dayanan otomatize DNA dizi analizinde PCR ile çoğaltılan hedef DNA ve bu DNA kalıbına tutunacak yaklaşık 20 bp'lik bir primer kullanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi bu karışıma eklendiğinde primerin tutunduğu kalıp deoksinükleotid trifosfat (dNTP) varlığında sentez reaksiyonunu başlatır. Reaksiyon tüpünde ayrıca herbiri farklı floresan boylarla işaretlenmiş 2'-3'- dideoksinükleotid trifosfatlar (ddATP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP) bulunmaktadır. Yapısal olarak dNTP'lere benzeyen ddNTP'lerin 3' hidroksil grupları bulunmamaktadır. Dideoksinükleotid trifosfatlar DNA polimeraz etkisiyle uzayan DNA zincirine katılırlar fakat 3' uçlarında hidroksil grubu bulunmadığından kendilerinden sonra 5'- 3' fosfat bağlanmasını engelleyerek zinciri sonlandırırlar. Böylece DNA zincirinin daha fazla uzamasına izin vermezler. Sekans spesifik olarak sonlandırılan DNA dizileri kapiller elektroforez ile yürütülür. Bu işlem sırasında sonlanan her bir dizide bulunan ddNTP'lerin yaydığı farklı dalga boyundaki floresanslar sistemde bulunan belirleyici tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrilir (52).

2.4.2.4. TB-SPRINT

Mikroboncuk tabanlı DNAçip sistemleri flow sitometrisini veya floresan görüntüleme kullanan, teorik olarak aynı tüp içinde 500 markere kadar hedefleme sağlayan bir teknolojidir. Bu teknolojiler doku tiplmesi ve immünoloji için geniş kabul görmüştür. Bulaşıcı hastalık kontrolü için kullanımları, düşük kaynak kullanan ülkelerde bile genişlemektedir. Paralel olarak, CRISPR bölgelerini hedef alan genotipleme teknikleri ise yeni bakteri modelleri için umut vericidir (8).

Daha önce ayrı olarak geliştirilen boncuk temelli Spoligotipleme ve RIF/INH direncinin, manyetik veya polistren boncuk kullanılarak şarja bağlı cihaz (CCD) görüntüleyiciyle, 532 nm'lik bir rapor ve 635 nm'lik bir sınıflandırma kanalına sahip Luminex200 ve Magpix cihazları ile aynı platformda birleştirilerek belirlendiği bir yöntemdir (53).

Spesifik olarak, spoligotipleme için 43 spacer bölgenin ve RIF direncinde 531'de TTG, kodon 531'de TGG, kodon 526'da GAC, kodon 526'da TAC ve kodon 516'da GTC gibi sık görülen SNP'lere ek olarak diğer mutasyonların ve INH direncinin de belirlenmesi amacı ile her bir primer çiftin bir tanesi biyotin ile işaretli olup oligonükleotid kaplı boncukların her birini tek tek tanımlayabilen mikroboncuk bazlı süspansiyon testlerini yapabilen bir cihazda (Luminex 200 veya MagPix sistem) bir PCR amplifikasyonundan sonra hibridizasyon işlemi gerçekleştirilir ve biyotinle işaretli PCR ürünleri Streptavidin-Phycoerythrin ile görüntülenerek tespit araştırılır (54). Elde edilen kantitatif akışkanlık indeksi (MFI) değerlerini kalitatif değerler, pozitif değerler, negatif değerler veya belirsiz değerler olarak yorumlamak amacı ile farklı cutoff değerleri kullanılarak mutasyon tespiti yapılmaktadır (53, 55).

DNA örneklerinde fenotipik İDT'ne göre *rpoB* için; %100 sensitivite ve spesifitede, isoniazid direnci içinde %100 spesifite, %90 sensitivite de sonuçlar elde edildiğini gösterilmiş ve bu yöntem ile elde edilen sonuçlar tam genom analizi ile valide edilmiştir (54).

2.5. *M. tuberculosis* kompleksinin Genotiplemesinde Kullanılan Moleküler Epidemiyolojik Yöntemler

Son yıllarda, moleküler tiplendirme yaklaşımları ile TB hastaları arasındaki olası epidemiyolojik bağlantıları belirlemek ve şüpheli salgınların erken tespiti için TB epidemiyolojisinin anlaşılmasında büyük bir önem arz etmektedir.

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin fenotipe dayalı yöntemlerle birlikte kullanımı; suşların birbirinden kesin olarak ayrılmasının yanı sıra, mikobakterilerin toplum içinde bulaş ve yayılma nedenlerinin ayrıntılarının daha iyi anlaşılması, kaynak olguların belirlenmesi, laboratuarlardaki kros-kontaminasyonlar ile reaktivasyon ve reinfeksiyon arasındaki farkın tespiti gibi epidemiyolojik yönden son derece değerli olan bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır (56).

Risk faktörlerinin belirlenmesi ve bölgesel kontrol programlarının değerlendirilmesi, daha rasyonel ve etkili kontrol önlemlerinin alınabilmesine olanak sağlayabilir (57). Eğer bir toplumdaki tüberküloz vakalarının önemli bir kısmı yeni oluşmuş bir bulaş sonucunda meydana gelmiş ise, bu durum o toplumda tüberkülozun önlenmesi için alınmış olan korunma tedbirlerinin yetersizliğini göstermektedir. Bir tiplendirme yönteminden beklenen, suşa özel genetik profili ortaya koyabilmesidir. Bu profiller parmak izi “fingerprint” olarak adlandırılır. İki veya daha fazla suş aynı veya çok benzer profil oluşturuyor ise bunlar aynı küme (cluster) içinde olarak adlandırılır. Farklı hastalardan izole edilen fakat aynı genetik profili gösteren izolatlar, büyük olasılıkla epidemiyolojik olarak ilişkilidir. Bu durum genellikle hastalar arasındaki yeni bulaşmayı yansıtmaktadır (58). Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, *M. tuberculosis*’in filogenetik özellikleri ve yayılma dinamikleri daha iyi anlaşılabilir hale gelmiştir. Moleküler tiplendirme ile tüberkülozun rekürrensi, sekonder enfeksiyonun reenfeksiyon veya reaktivasyon olup olmadığı ve bir hastada aynı anda iki veya daha fazla suş ile enfeksiyonun varlığı ortaya konulabilmektedir. Böylece tüberküloz kontrol ve tedavi protokollerinin etkinliği araştırılabilmektedir.

Mikobakterilerin genomu homojen ve stabildir. Genomunda çok az sayıda sessiz mutasyon meydana gelmekte ve genetik rekombinasyonlar genellikle transpozonlar gibi mobil elementler yoluyla veya tekrarlayan dizilerin polimorfizmi ile gerçekleşmektedir .

2.5.1. IS6110-RFLP

M. tuberculosis genomunda kopya sayıları 0 ile 25 arasında değişen tekrarlayan mobil yerleşim dizileri (IS) bulunur. *M. tuberculosis* suşlarında IS6110, IS8110, IS1547 gibi tanımlanmış farklı yerleşim dizilimleri bulunur. Bu dizilerden IS6110 filogenetik analizlerde en yaygın kullanılanıdır. Genotip tayininde IS6110-RFLP altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem ile *M. tuberculosis* DNA’sında bulunan IS6110 bölgeleri PvuII restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilir daha sonra DNA fragmentlerinin büyüklüklerine göre seperasyonları elektrikli ortamda jel üzerinde gerçekleştirilir (59, 60). Elektroforez işlemi sonrasında jelde bulunan DNA fragmentleri southern blotting tekniği, SB, ile naylon membrana kopyalanır. DNA membrana hibridize olduktan sonra işaretli IS6110 prob ve kemilüminesan kit aracılığı ile

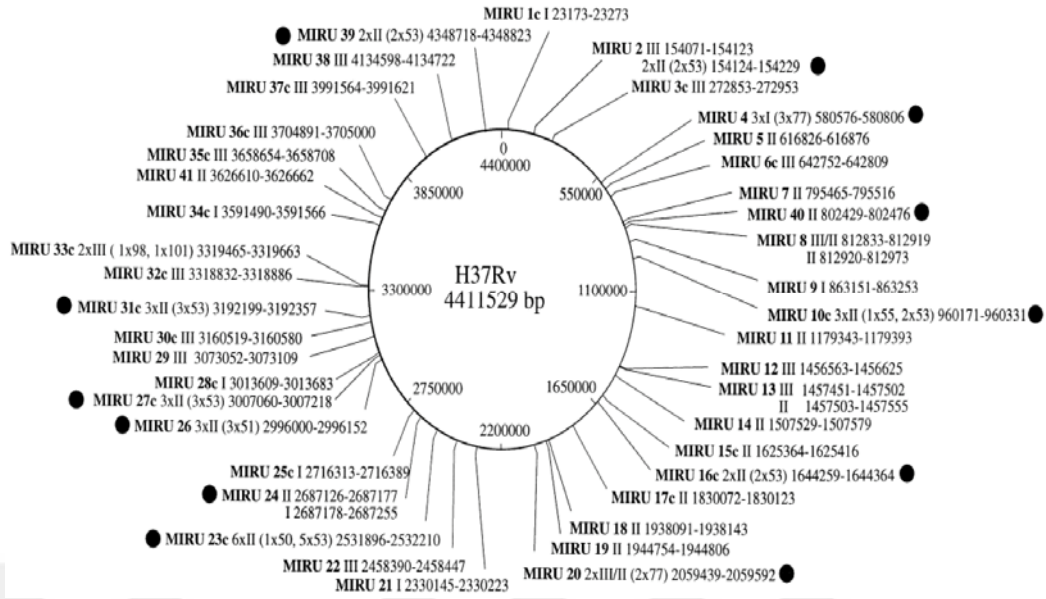
membrana kopyalanan bandlar yani DNA fragmentleri görülür hale getirilir. Meydana gelen ışıma XR film üzerine aktarılıp yorumlanır (59).

Bu yöntem yüksek ayırım gücüne sahip olmasına karşılık, yoğun miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, işlemlerin uzun ve zaman alıcı olması, yoğun iş gücüne ihtiyaç duyulması ve kopya sayısı 5 ve altında olan suşlarda ayırım gücünün yetersiz olması gibi sebeplerden dolayı RFLP yaygın kullanım imkanı bulamamıştır (60, 61). Ancak tecrübeli merkezlerde bu yöntemin spoligotipleme, MIRU-VNTR ve SNP yöntemleri ile kombine edilerek kullanılmasıyla yüksek ayırım gücüne sahip sonuçlar üretilebilir (62).

2.5.2. MIRU-VNTR

MIRU-VNTR yöntemi MTBK genomundaki değişken sayıda tekrarlayan dizilerin (VNTR) analizini esas alır. *M. tuberculosis* tiplendirmesi için etkili, sensitivite ve spesivitesi yüksek bir yöntem olup, laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliğinden dolayı standardize edilmiş hızlı bir yöntemdir. *M. tuberculosis* genomunda 41 farklı değişken sıralı tekrarlar VNTR dizileri tanımlanmış ve bu dizilere mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) adı verilmiştir (Şekil 2.8) (63). Bu lokusları içine alan komşu bölgeleri tanıyan primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen band büyüklüklerinden hareketle tekrarlayan dizi sayısı ile her iki yanında yerleşmiş olan DNA segmentlerinin büyüklükleri tespit edilir (64, 65).

Bu yöntem ile MTBK izolatlarının tiplendirilmesinde önceleri 12 lokus MIRU-VNTR metodu kullanılmış ve daha sonra lokus sayısı sırası ile 15 ve 24'e çıkarılarak standart MIRU-VNTR yöntemi geliştirilmiştir. MTBK için duyarlı ve özgül olan bu yöntem IS6110-RFLP ve spoligotipleme ile karşılaştırıldığında, ayırım gücünün daha yüksek olduğu görülmüştür (63, 64, 66, 67).



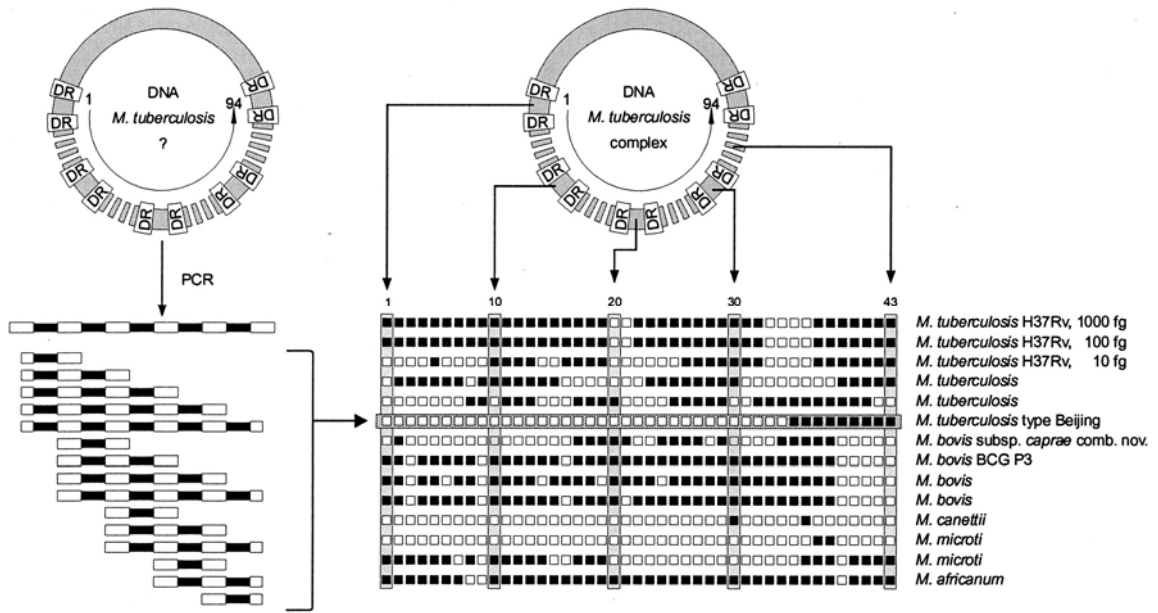
Şekil 2.8. 41 MIRU lokusunun *M. tuberculosis* genomu üzerindeki konumu (63)

2.5.3. Spoligotipleme

Spacer Oligotyping (Spoligotyping), ilk kez 1997'de tanımlanmış, yaygın kullanılan PCR bazlı reverse dot blot hibridizasyon metodu olup hızlı, basit, tekrarlanabilir bir yöntemdir (68).

Bu yöntem, klinik örneklerde *M. tuberculosis* kompleks suşlarının eşzamanlı olarak tanımlanmasına ve tiplendirilmesine imkan sağlayan ilk genotiplendirme yöntemidir. Spoligotipleme hızlı ve güvenilir bir yöntem olması sebebi ile dünya genelinde *M. tuberculosis* kompleks suşlarının genotiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir .

M. tuberculosis kompleksi genomunda farklı sayıda 36 baz çiftlik DR lokusu bulunur. DR lokusu CRISPR, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, düzenli kümelenmiş spacer arası kısa palindromik tekrarlar, ailesi üyesidir. Genomda DR lokuslarının aralarında 35-41 baz çifti uzunluğunda aralık oluşturan spacer olarak adlandırılan diziler bulunmaktadır. DR'lerin kopya sayıları ve spacer dizilerin varlığı suşlar arası farklılıklar gösterir. Yöntem DR lokuslarının genomda oluşturduğu bu multiple direct variable repeat'lerin (DVR) fragmentlerinin polimorfizmin tespiti esasına. Her DVR, 36 baz çifti içeren DR lokusu ve DR bölgelerinin arasında bulunan tekrarlanmayan kısa diziler olan spacer bölgelerinden oluşur (59, 68).



Şekil 2.9. Spoligotipleme DR lokusları ve türlere özgü spacer bölgeler

DR'leri hedef alan biotin ile işaretli primerler kullanılarak bu lokusların arasındaki farklı spacerlar amplifiye edilmektedir (68).

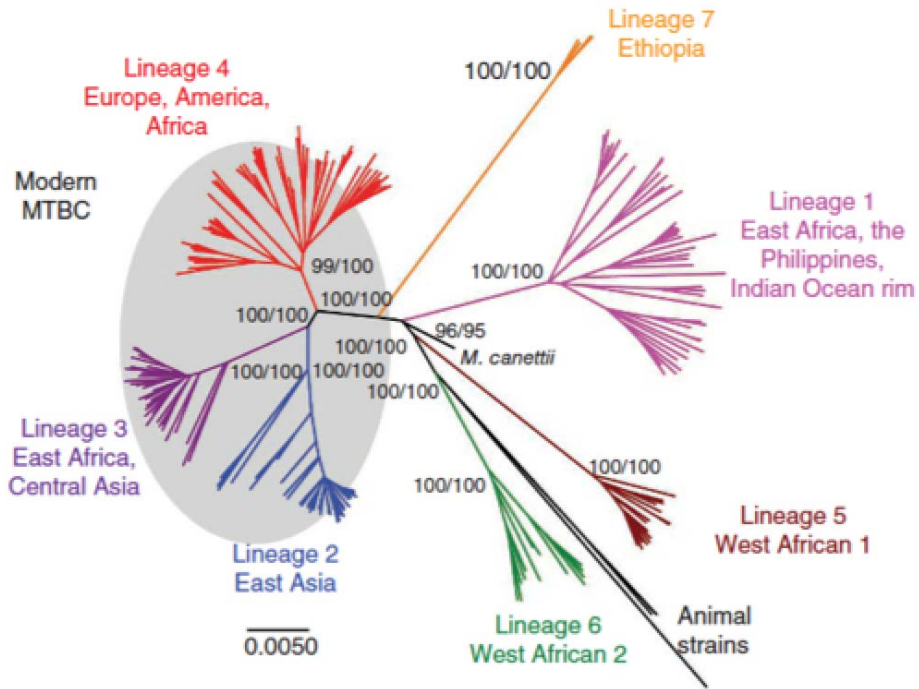
Bu güne kadar ki yapılan çalışmalardan toplanan spoligotip verileri, sınıflandırma, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmaların standardize edilmesi ve bir veri bankasında toplanması için, fourth international spoligotyping database (SpolDB4) isimli veritabanında birleştirilmiştir. Bu veritabanı, MTBK'nın küresel filogenetik ilişkisinin inşasında büyük rol oynamakta ve sporadik suşlarda dahil salgın suşlarının kaynak ve yayılım yolları ile toplum içerisindeki hareketlerinin takibi hakkında bilgi edinmek amacı ile kullanılmaktadır.

Mikobakterilerin evrimi ile ilgili ilk hipotezlere göre Afrika boynuzunda büyükbaş hayvanları evcilleştiren insanoğlu *M. bovis*'i sığırlardan almıştır. Daha sonra *M. bovis*'ten, SNP'ler ve delesyonlar sonucu *M. caprae*, *M. pinnipedii* gibi diğer hayvan mikobakterilerinin ortaya çıkışına benzer şekilde insan mikobakterisi yani *M. tuberculosis*'in evrimleşerek geliştiği ileri sürülmüştü (69). Ancak MTBK suşlarının günümüzde yapılan filogenetik analizleri sonucunda, Neolitik Demografik Geçiş'ten önce hayvan tüberküloz türleri olan mikobakterilerin *M. prototuberculosis* yani atasal tüberküloz türünden delesyonel mutasyonlar sonucu farklılaşarak ayrıldığı gösterilmiştir (70). Nitekim *M. tuberculosis* suşunun genomu yaklaşık olarak 4.4. mDa iken *M. bovis* genomunun ise 4.3 mDa oluşu delesyonel mutasyonun *M. tuberculosis*'den *M. bovis*'e

doğru olduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca, insanla ilişkili MTBK içerisinde yer alan türlerin bilinen hayvan veya çevresel rezervuarı olmayan zorunlu insan patojenleri oldukları, insan demografisindeki değişikliklerin MTBK'nin evrimini etkilediği düşünülmektedir (71).

MTBK'nın küresel çeşitliliğini temsil eden 186 suşa ile Beijing ailesine ait 39 suşun genom sekans çalışmaları sonucunda, tekrarlayan ve mobil elementler hariç suşlar arasındaki filogenetik ilişkileri oluşturmak için belirleyici olan 34.167 tek nokta mutasyonu belirlenmiştir. Bu genom temelli filogeni çalışması sonucunda 7 ana soy (L1-L7) belirlenmiştir .

Bu soyları günümüze kadar; üç “atasal”, yani *Mycobacterium* prototüberculosis veya Most Recent Common Ancestor'dan (MRCA) sonra hızla sapma gösteren; L1: East-African Indian (EAI), iki *M. africanum* suşunu içeren L5 ve L6, ayrıca “modern” olarak adlandırılan L2, L3 ve L4 soylarına ek olarak Etiyopya'dan köken alan ve bir ara soy olan L7 oluşturmaktadır (Şekil 2.10) (69, 71).



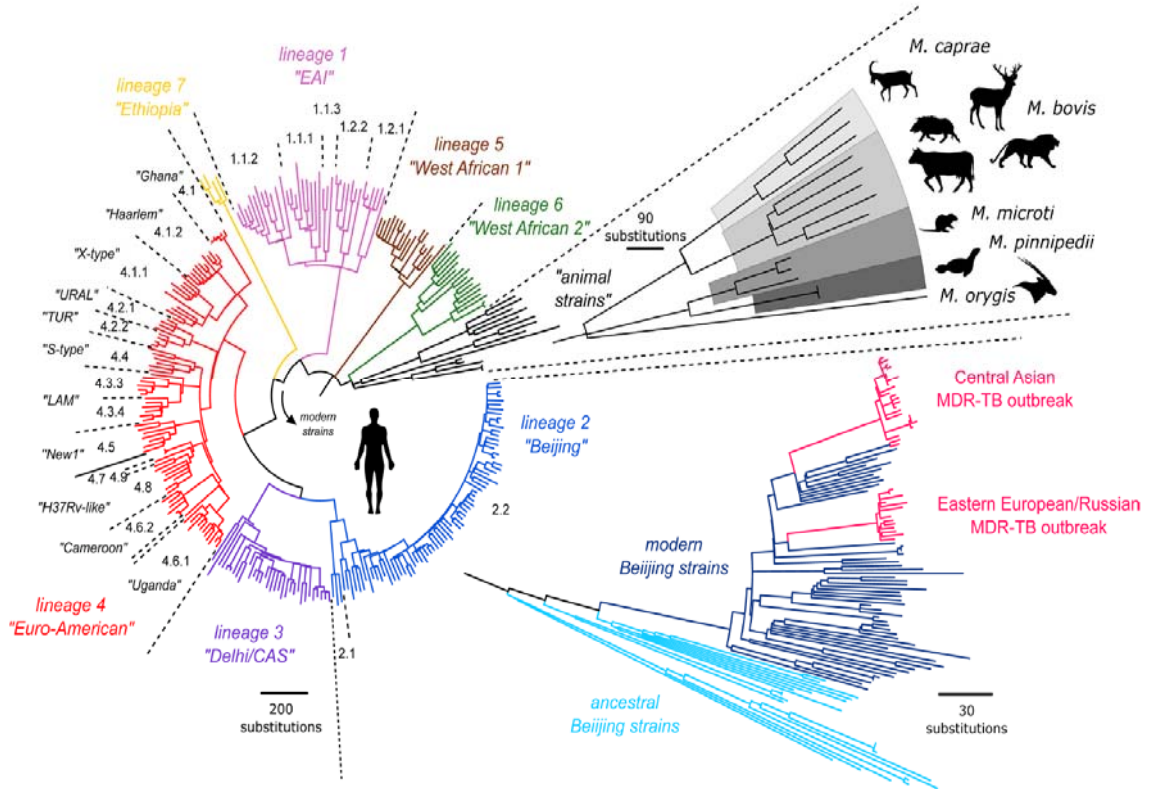
Şekil 2.10. MTBK suşlarının tüm genom temelli filogenetik sınıflandırılması (69)

MTBK'ya ait türler, kromozomlarında bulunan polimorfizmlerin kombinasyonuna dayanarak, üç ana genetik grup (PGG) içerisinde sınıflandırılmış ve *M. tuberculosis* kompleks suşları spoligotip paternlerine göre bu üç gruba dağıldıkları

görülmüştür. İlk grubu (PGG1); EAI, Beijing ve Central Asian Strain (CAS)/ Delhi, ikinci grubu; (PGG2), Haarlem (H), Latin American ve Mediterranean (LAM) ve X suşları oluşturmaktadır. T suşu ve henüz iyi karakterize edilmemiş diğer suşlar ise üçüncü grupta (PGG3) sınıflandırılmıştır (62, 72).

Beijing, LAM, Haarlem, T ve X aileleri, MTBK genomundaki TbD1 sekansının delesyonunun görüldüğü “modern” soy, EAI ailesi ise TbD1+ olan “atasal” soy içerisinde sınıflandırılır (71).

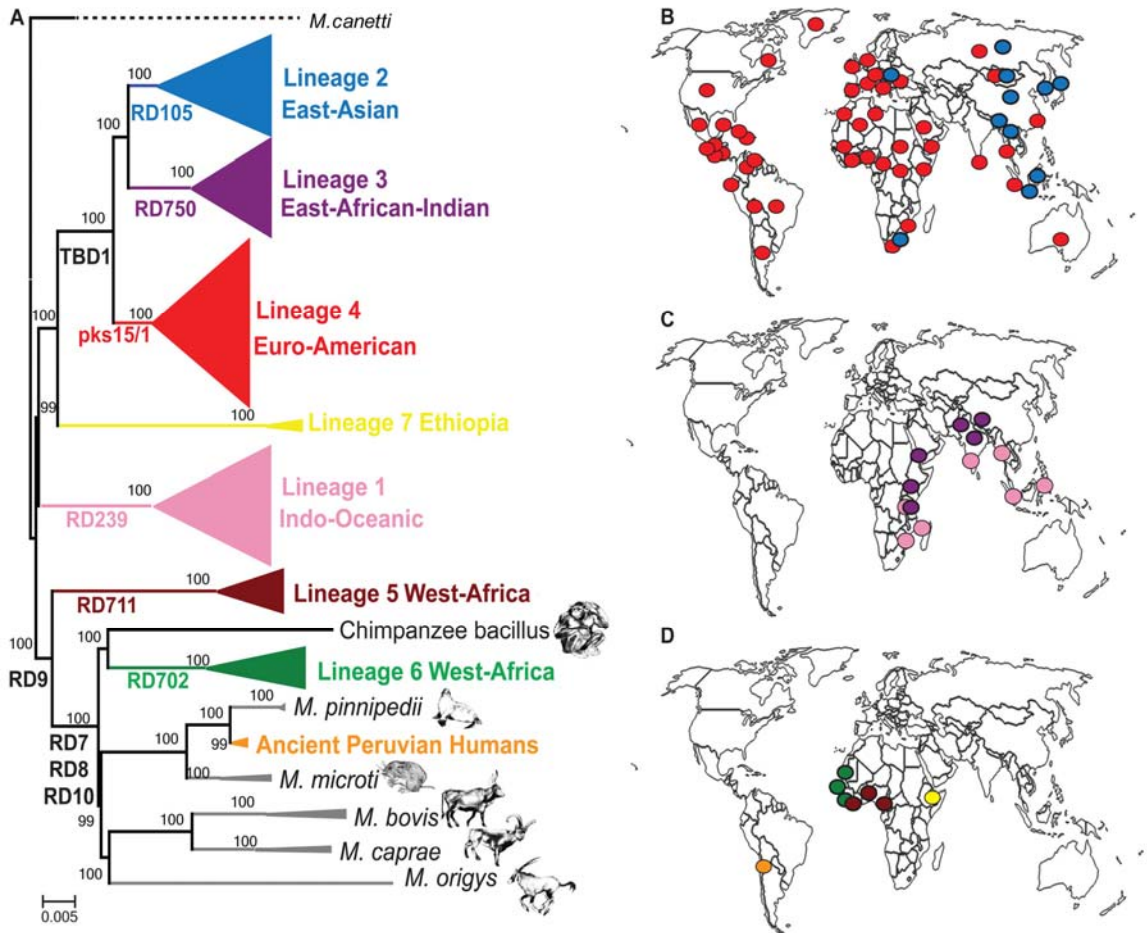
L2 ailesinde olan Beijing suşunun hala modern ve atasal olarak alttürleri olduğu ve ÇİD-TB’nin modern Beijing suşları ile ilişkili olduğu ayrıca L4 ailesinin ise en büyük genetik çeşitliliğe sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.11) (73).



Şekil 2.11. *M. tuberculosis* kompleks suşlarının küresel filogenetik yapısı (73)

Her ailenin belirli bir coğrafi kıtadaki yaygınlık ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.12) (74). Örneğin Beijing suşu Uzak Doğu Asya'da bulunan suşların yaklaşık % 50'sini temsil etmekte iken, CAS esas olarak Orta Doğu veya Güney Asya'da ve Hindistan'da; EAI, Orta, Güney-Doğu, Uzak Doğu-Asya, Orta Doğu ve Okyanusya'da yaygındır. Haarlem suşunun Avrupa'da olduğu kadar Orta Amerika /

Karayıpler'de de görülüyor olması, tarihi Avrupa sömürgeciliği ile ilişkili olduğunu düşündürürken, LAM, Güney Amerika'da, Akdeniz ve Karayip kıyı bölgelerinde görülmektedir. Kuzey Amerika ve Orta Amerika'daki X ailesi, Anglo-Sakson soyuyla ilişkilendirilmiş, ancak şu anda Afrikalı-Amerikalılarla ilişkilendirilmiş, T ailesi ise tüm kıtalara yayılmıştır (75). İlk olarak ülkemizde tanımlanmış TUR (Turkish) alt ailesi bölgeye bağlı olarak tüm klinik izolatların %10 ile 30'unu temsil ettiği gözlemlenmiş ve 2005 yılında "LAM7-Tur" olarak alt ailesi adlandırılmıştır (76). LAM alt ailelerin filogenetik ilişkisinde bulunan LigB sinonim mutasyonu olan C1212G'nin yokluğu, LAM7-Tur alt ailesinin "TUR" olarak yeniden adlandırılmasına yol açmıştır (77, 78). TUR ailesi Bulgaristan gibi birçok komşu ülkede tespit edilmiş ve son zamanlarda SITVITWEB tarafından oluşturulan SIT41 haritasının da gösterdiği gibi Orta Doğu ve Avrupa ülkelerine de yayıldığı gözlemlenmiştir (79).



Şekil 2.12. MTBK suşlarının global dağılımı (74)

2.5.3.1. Membran Temelli Spoligotipleme

DR lokuslarını hedef alan primerler ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmesini takiben denatüre edilen aplikonlar, membranda bağlı bulunan ve DR'ler arasında yerleşmiş olan farklı spacer bölgelere komplementer 43 çeşit oligonükleotit proba hibridize edilmektedir (80). Spacerların varlığı veya yokluğu dijital ortamda gösterilir. Meydana gelen görüntü membranın üst yüzeyinde kareler halindedir. Spacerlar suşlar arasında farklılık gösterir ve spoligotipleme patternleri sayesinde ayırt edilmektedir. Basit, hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bu yöntem, IS6110'dan sonra en yaygın olarak kullanılan metottur. IS6110'a göre avantajı düşük kopya sayılı suşlarda ayırım gücünün yüksek olmasıdır .

Spoligotip sonuçlarının yorumlanması aşamasında spacer oligonükleotidlerin kovalent bağlandığı membranla PCR ürünü hibridizasyonu sonucu, oluşan blotlanmalar dikkate alınarak spacer bölgelerinin varlığı değerlendirilir. Sonuçlar tablo..’de belirtilen Oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan “Oktal kod” formatına çevrildi. Elde edilen veriler SITVIT2 veritabanı kullanılarak kümeler ve familyalar (clade) belirlendi. Database adres:

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

Tablo 2.1. Spoligotipleme sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan Oktal kod anahtarı

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

2.5.3.2. Mikro Boncuk Temelli Hibridizasyon (TB-SPOL)

Mikro boncuk tabanlı DNA çip sistemleri flow sitometrisini veya floresan görüntüleme kullanan, teorik olarak aynı tüp içinde 500 markere kadar hedefleme sağlayan bir teknolojidir. Bu teknolojiler doku tiplmesi ve immünoloji için geniş kabul görmüştür. Bulaşıcı hastalık kontrolü için kullanımları, düşük kaynak kullanan ülkelerde bile genişlemektedir. Paralel olarak, CRISPR bölgelerini hedef alan genotipleme teknikleri ise yeni bakteri modelleri için umut vericidir(81).

Çalışmamızda DPO (Dual-Priming Oligonucleotide) yöntemi; CRISPR ile *rpoB* hotspot, *katG* ve *inhA* genlerini birlikte amplifikasyonunu yapabilen bir 4-Plex multipleks polymerase chain reaction (PCR) geliştirmek için kullandık. Halihazırda bu

yöntemin maksimal versiyonu ile 68 dan fazla marker'ı tespit etmek mümkün olup bunlardan 59'u tek step (Lumineks 200) veya iki stepli metodlarda (magPix) rutin olarak kullanılmıştır (82). Daha önce ayrı olarak geliştirilen boncuk temelli Spoligotipleme, manyetik veya polistren boncuk kullanılarak şarj bağlı cihaz (CCD) görüntüleyiciyle, 532 nm'lik bir rapor ve 635 nm'lik bir sınıflandırma kanalına sahip Luminex200 ve Magpix cihazları ile aynı platformda birleştirilerek belirlendiği bir yöntemdir (55).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Örneklerin Toplanması

Toplumda tüberküloz salgınları yönünden risk oluşturabilme potansiyeline sahip olan kontrolsüz insan hareketlerinin, ki son yıllarda ülkemizde ama yoğunlukla bölgemizde yaşanan sınır aşan göç hareketlerini, bölgemizdeki tüberküloz insidansına ve tür çeşitliliğine katkısını tespit amacı ile planlanan çalışmamızda; Ocak 2016 – Ocak 2019 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde bulunan Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına sorumluluk alanına giren; Adana, Hatay, Kilis, Osmaniye, Kahramanmaraş, Mersin, Gaziantep ve Adıyaman illerinden tanı amacı ile gönderilen pulmoner tüberküloz şüpheli hastalara ait 33.450 klinik materyalden, MGIT 960 ve LJ besiyerleri kullanılarak izole edilen ve MPT64 kart testi ile MTBK'e ait oldukları doğrulanan 3680 (%11) kültür pozitif suş içerisinde illerden gelen örnek sayıları, illerin pozitiflik ve direnç oranları dikkate alınarak seçilen 59 Türk ve 41 yabancı uyruklu hastaya ait 46'sı non-MDR, 47 MDR, 5 mono-RIF ve 2 INH dirençli olmak üzere toplam 100 izolatı çalışmaya dahil ettik. Çalışmaya dahil edilen bu izolatları TB-SPRINT ile Luminex®200 sisteminde değerlendirdik. Elde edilen sonuçları SITVITWEB ve TBminer veritabanlarında analiz ettik.

3.2. Moleküler Yöntemler için Genomik DNA Ekstraksiyonu

Spoligotipleme ve MIRU-VNTR genotiplendirme yöntemlerinde kullanılmak üzere 100 *M. tuberculosis* kompleks izolatının DNA'sını elde etmek amacı ile MGIT sıvı besiyerinden Mickle cihazı kullanılarak mekanik ekstraksiyon aşağıdaki protokole göre gerçekleştirdik.

1. Çalışmaya dahil edilen örnekler 500µl mikrosantrifüj tüpüne aldık.
2. 95° C'de 20 dakika inkübe edilerek bakteriler inaktive ettik.
3. 15000xG'de 15 dakika çevrildi, üst sıvıyı attık.
4. 500µl 1xTE buffer ilave ettik.
5. 15000xG'de 15 dakika çevrildi, üst sıvıyı attık.
6. 250µl 1xTE buffer ilave ettik.

7. Tüpe 100µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ilave ettik.
8. 3 dakika Mickle (Mickle tissue disintegrator) cihazında mekanik hücre parçalama işlemine tabi tuttuk.
9. 15000xG'de 10 dakika çevrip, üst sıvıyı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aldık.
10. Ekstraktları -20°C'de sakladık.

3.3. Ekstrakte edilen DNA'ların MIRU-VNTR ve Spoligotiplemeleri

3.3.1. MIRU-VNTR

Bu çalışmada 24 lokus MIRU-VNTR yöntemini kullandık. Hedeflenen MIRU lokusları için literatürde belirtilen primer çiftleri sentezletildi ve her bir suşa özgü MIRU lokusunun VNTR sayısının belirlenmesinde primer çiftlerinin farklı karışımlarda birleştirildiği multipleks PCR yöntemini kullandık. Multipleks PCR için uygun olmayan primerleri tek olarak değerlendirdik.

3.3.1.1. Multipleks PCR Primer Setleri ve Amplifikasyon Aşamaları

PCR amplifikasyon ve analiz aşamalarında, malzeme tüketimini azaltmak ve zaman kaybını önlemek amacı ile kullanılan primerleri (Tablo 3.1.), beklenen bantların uzunluğuna bağlı olarak farklı setler halinde Tablo 3.2.'de gösterilen şekilde gruplandırıldık.

Tablo 3.1. MIRU-VNTR PCR amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri

Primerler	Primer Dizileri (5'-3')	Primerler	Primer Dizileri (5'-3')
ETR A	ATTTCGATCGGGATGTTGAT TCGGTCCCATCACCTCTTA	MIRU27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
ETR B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	MIRU39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
ETR C	GACTTCAATGCGTTGTTGGA GTCTTGACCTCCACGAGTGC	MIRU40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
ETR D/ MIRU04	GCGCGAGAGCCCCGAACGTC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	Mtub 04	GTCCAGGTTGCAAGAGATGG GGCATCCTCAACAACGGTAG
ETR E/ MIRU31	CTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	Mtub 21	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA
MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAT	Mtub 29	AACCCATGTCAGCCAGGTTA ATGATGGCACACCGAAGAAC
MIRU10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	Mtub 30	AGTCACCTTTCCTACCCTCGTAAC ATTAGTAGGGCACTAGCACCTCAAG
MIRU16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	Mtub 34	GCAGATAACCCGCGAGGAATA GGAGAGGATACGTGGATTGAG
MIRU20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	Mtub 39	AATCACGGTAACCTGGGTTGTTT GATGCATGTTCCGACCCGTAG
MIRU23	CAGCGAAACGAACTGTGCTATCAC CGTGTCCGAGCAGAAAAGGGTAT	Qub 4156	CTGGTCGCTACGCATCGTG TGGTGGTCGACTTGCCGTCGTTGG
MIRU24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	Qub 11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGTGGCAT
MIRU26	CCCGCCTTCGAAACGTCGCT TGGACATAGGCGACCAGGCGAATA	Qub 26	GGCCAGGTCTTCCCGAT AACGCTCAGCTGTCGGAT

Tablo 3.2. MIRU-VNTR metodu için kullanılan primer çift grupları

Set Numarası	Primer*	Reaksiyondaki Hacim (µL)
1	ETR A	3 µL
	Miru 39	2 µL
2	ETR B	2 µL
	Qub 26	3 µL
3	ETR C	2 µL
	Miru 20	2 µL
4	ETR D	2 µL
	Miru 10	2 µL
5	Miru 2	2 µL
	Miru 27	2 µL
6	Miru16	1,5 µL
	Qub 11b	3 µL
7	Miru 23	2 µL
	Mtub 30	2 µL
8	ETR E	2 µL
	Miru 24	2 µL
9	Miru 26	2 µL
	Mtub 29	3 µL
10	Miru 40	2 µL
	Mtub 34	3 µL
11	Mtub 04	2 µL
	Qub 4156	3 µL
12	Mtub 21	2 µL
	Mtub 39	3 µL

*PCR reaksiyonunda kullanılan primer konsantrasyonu: 5µM

PCR tepkimesinde kullanılan reaksiyon karışımı tablo 3.3'e göre hazırladık ve amplifikasyonu gerçekleştirecek olan lokusa ait primerlerden Tablo 3.2.' de belirtilen hacimlerde karışıma ekledik.

Tablo 3.3. MIRU-VNTR PCR aşamasında kullanılacak malzemeler ve miktarları

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

* Seçilen primer miktarına göre toplam hacim dH₂O ile ayarlandı.

Hazırlanan reaksiyon karışımlarını thermal cycler cihazında Tablo 3.4. belirtilen sıcaklık, süre ve döngü sayıları kullanılarak amplifiye ettik.

Tablo 3.4. VNTR bölgelerine spesifik Primer çiftleri için kullanılan Amplifikasyon aşamaları

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

*MIRU 24, Mtub 04, Mtub 39, QUB primerleri için bağlanma basamağı 55°C'de 30sn

**QUB 26 primeri için uzama basamağı 70°C'de 1dak 30sn

3.3.1.2. PCR Ürününün Agaroz Jele Yüklenmesi, Elektroforezi ve Yorumlanması

Amplikonlar 300 Volta, 150 dakika, etidyum bromürlü % 2 lik agaroz (SIGMA) jel elektroforezinde yürüttük. Elektroforez sonrası jel görüntüleme sistemi (QUANTUM-ST4 3020-WL/BLUE/20M) ile gerçekleştirilerek, bant büyüklüğünün tespitinde 50-100 bp lik marker (Thermo Scientific) kullanıldı. Bant büyüklüklerine dayanarak 24 lokus MIRU-VNTR tiplendirme sonucunda her bir MIRU lokusunda bulunan allel tekrar sayılarını belirledik (Tablo 3.5.). Küme analizlerini, Neighbor-joining (NJ) algoritması ve Minimum Spanning Tree (MST) yöntemleri ile karakterize

edilen bakteriyel popülasyon yapısı kullanılarak, filogenetik ağacın oluşturulduğu MIRU-VNTRplus veritabanı ile değerlendirdik (www.miruvntrplus.org). Her iki analiz de spoligotiplerle ilişkili MIRU-VNTR 24-loci ve Klonal Kompleks (CC) gruplarının oluşumuna dayanmaktaydı.

Tablo 3.5. MIRU lokuslarının MIRU-VNTR tekrar sayıları ve ampikon boyutları

Lokuslar	0 Kopya	1 Kopya	2 Kopya	3 Kopya	4 Kopya	5 Kopya	6 Kopya	7 Kopya	8 Kopya	9 Kopya	10 Kopya
ETRA	-	247	322	397	472	547	622	697	772	847	922
ETRB	-	178	235	292	349	406	463	520	577	634	691
ETRC	-	172	230	288	346	404	462	520	578	636	684
MIRU02	-	455	508	561	614	667	720	773	826	879	932
MIRU04 -ETRD	-	253	330	407	484	561	638	715	792	869	-
MIRU10	-	535	590	643	696	749	802	855	908	961	1013
MIRU16	-	618	671	724	777	829	882	935	988	1041	-
MIRU20	-	514	591	668	745	822	899	976	-	-	-
MIRU23	-	607	661	714	767	820	873	926	979	-	-
MIRU24	-	447	500	553	606	659	712	765	818	871	924
MIRU26	-	511	562	613	664	715	766	817	868	919	-
MIRU27	-	551	604	657	709	762	815	868	921	-	-
MIRU31 -ETRE	-	545	598	651	704	757	810	863	916	-	-
MIRU39	-	593	646	699	752	805	858	911	964	-	-
MIRU40	-	407	461	55	569	623	677	731	785	839	893
Mtub04	177	218	269	320	371	422	473	524	575	626	-
Mtub21	-	149	206	263	320	377	434	491	548	605	662
Mtub29	-	19	236	293	350	407	464	521	578	635	692
Mtub30	-	261	319	377	435	493	551	609	667	725	783
Mtub34	-	171	225	279	333	387	441	495	549	603	657
Mtub39	225	283	341	399	457	515	573	631	689	747	-
Qub11b	-	136	205	274	343	412	481	550	619	688	757
Qub26	-	264	375	486	597	708	819	930	1041	1152	1263
Qub4156	563	622	681	740	799	858	917	-	-	-	-

3.3.2. Spoligotiplleme

Spoligotiplleme tekniğini, daha önce önerilen tüm numuneler için ticari kit kullanılarak ve daha önce yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar ile gerçekleştirdik (81).

3.3.2.1. PCR Amplifikasyonu

Spoligotiplleme, *Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution* (IGEPE) laboratuvarı Université Paris Sud, Orsay, Fransa işbirliği ile gerçekleştirdik. Spoligotiplleme için 43 spacer, genotipik direnç analizi için ise *rpoB*, *katG* ve *inhA*

bölgelerini çoğaltma amacı ile bu bölgelerin hedef primer karışımları ile multiplex PCR şeklinde gerçekleştirdik. Pozitif kontrol olarak, H37Rv ve *M. bovis* BCG (Isogen, Bioscience, Hollanda), negatif kontrol olarak ise ultra saf Milli-Q su (Merck Millipore, Burlington, ABD) kullandık.

3.3.2.2. PCR Ürünlerinin Mikro Boncuklara Multipleks Hibridizasyonu

PCR ürünlerini, daha önce önerilen protokollerde (54, 81) yaptığımız birkaç modifikasyon sonrası hibridize ettik. Hibridizasyon aşaması için 33µl (31.5 µl) karışımı hazırladık. TMAC 1.5X ve problara bağlanmış 24 mikrokürenin 1.5 ul karışımı) 96 kuyucuklu PCR plateine dağıttık.

Daha sonra her bir kuyuya 2µl PCR ürünü ve 15µl Tris-EDTA (TE) pH 8 ilave ederek, dikkatlice homojenleştirdik. Termosiklerdeki hibridizasyon programı (DNA Motoru, Meksika için Bio-Rad Alfa Ünitesi Blok Tertibatı): 10 dakika için 95°C ve 20 dakika için 52°C idi.

1. Kaplanmış Mikroboncukları yaklaşık 20sn vorteksleyiniz ardından 20sn sonikasyon işlemi ile resüspanse ettik.
2. Her bir hedef bölge için 1mL TMAC 1,5X hibridizasyon solusyonu içerisinde konsantrasyonu 55 ile 75 mikrobuncuk/ µL olacak şekilde Mikroküre Çalışma Karışımı hazırladık.
3. Mikroboncuk çalışma karışımını yaklaşık 20sn vorteks ve 20sn sonikasyon kullanarak karıştırdık.
4. Her bir örnek ve kontrol kuyucuğuna Mikroboncuk çalışma karışımından 33 µL ekledik.
5. Her bir örnek kuyucuğuna biyotinlenmiş PCR** ürününden ekleyindi ve toplam hacim 17 µl (**2µl PCR ürünü ve 15µl TE**) olacak şekilde TE (pH=8) ile tamamladık. Negatif kontrol kuyucuğuna PCR ürünü yerine aynı miktarda TE ekledik.
6. Kuyucuklar birkaç kez pipetaj yaparak yavaşça karıştırdık.
7. Buharlaşmayı önlemek için 96-kuyucuklu plate üzeri kapattık ve biyotinlenmiş amplifiye DNA ürünlerinin denatürasyonu için 95-100°C’de 10dk, bunu takiben 52°C’de 20 dk boyunca inkübe ettik.

3.3.2.3. Hibridizasyon Sonrası Örneklerin Luminex Cihazına Yüklenmesi

Hibridizasyon tespiti için Luminex sitometrisine (Luminex 200TM) dayalı yüksek performanslı sistem ekipmanı kullanıldı. Bu amaçla hibridiazsyon sonrasında aşağıdaki aşamalar ile gerçekleştirdik.

1. Plate'i manyetik ayırıcıya yerleştirdik ve süpernatantı uzaklaştırdık.
2. Boncukları uzaklaştırılan süpernatant kadar TMAC(25-35µl TMAC 1x) ile resüspanse ettik.
3. 996-998µL TMAC 1X hibridizasyon solüsyonu içerisine 2-4µL Streptavidin-R-phycoerythrin ekleyerek yeni bir karışım (Reporter Mix) hazırladık.
4. Yeni hazırladığınız SA-PE karışımından (Reporter Mix) 25µL her kuyucuğa ekledik ve pipetaj yaparak yavaşça karıştırdık.
5. 96-kuyucuklu reaksiyon plate'ini 52°C'de 5dk analiz cihazının içinde inkübe ettik.
6. Örnekler Luminex 200/BioPlex cihazında 52°C'de analiz edildi.

3.3.2.4. Hibridizasyon Sonuçlarının Analizi

SNP yazma verilerinin analizi için veriler, Microsoft Office Excel programında daha sonra okumak ve verileri düzenlemek amacıyla Luminex® 200™ ekipmanı xPONENT® programından “.csv” dosya biçiminde dışa aktardık. İzolatların Spoligotyping, MIRU-VNTR ve ortak analizlerinde her iki yöntem için korelasyon katsayısına dayanan Bionumerics 6.0 programı (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) ile analiz ettik.

3.3.2.5. Spoligotip Kümelerinin Değerlendirilmesi

Moleküler Teknikler Arasında Karşılaştırma Spoligotyping ve MIRU-VNTR tiplerleri ile gruplama modelleri, genotipleme yöntemleri Hunter-Gaston ve Simpson İndeksi (HGI) (Hunter ve Gaston, 1988) kullanılarak lokuslar arasındaki farklar karşılaştırıldı. Bionumerics 7.6 programında filogenetik ağaçlar ürettik.

3.4. *rpoB*, *katG* ve *inhA* Gen Bölgelerinde Mutasyon Varlığının Araştırılması

3.4.1. DNA Dizi Analizi Yöntemi

Otomatize dizi analizi yöntemleri DNA'nın daha kısa sürede analiz edilebilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntemlerde reaksiyonlar herbiri farklı dalgaboylarında ışıma yapan boyalar ile işaretlenmiş dört ddNTP'yi de içeren tek bir tüp içerisinde gerçekleştirildi (dye-terminator dizileme) ve lazer ile okuma sağlandı.

3.4.1.1. Mutasyon Araştırılacak Gen Bölgelerinin PCR Amplifikasyonu

3.4.1.1.1. *rpoB* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

rpoB gen bölgesinde mutasyon varlığının araştırılması

5'-GGTCGCTATAAGGTCAACAAGAAG-3'

5'-GTACACGATCTCGTCGCTAACC-3' primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımlarını thermal cycler cihazında Tablo 3.6.'da belirtilen sıcaklık, süre ve döngü sayıları kullanılarak amplifiye ettik.

Tablo 3.6. *rpoB* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyon aşamaları

Amplifikasyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	5 dak	1
Denatürasyon	94°C	1 dak	35
Bağlanma	56°C	1 dak	
Uzama	72°C	1 dak	
Son Uzama	72 °C	10 dak	1

3.4.1.1.2. *katG* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

katG gen bölgesinde mutasyon varlığının araştırılması amacı ile

5'-GATGAGGTCTATTGGGGCAAG-3'

5'-GTCTCGGTGGATCAGCTTGTA-3' primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımlarını thermal cycler cihazında Tablo 3.7.'da belirtilen sıcaklık, süre ve döngü sayıları kullanılarak amplifiye ettik.

Tablo 3.7. *katG* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyon aşamaları

Amplifikasyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	5 dak	1
Denatürasyon	94°C	1 dak	35
Bağlanma	56°C	1 dak	
Uzama	72°C	1 dak	
Son Uzama	72 °C	10 dak	1

3.4.1.1.3. *inhA* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

katG gen bölgesinde mutasyon varlığının araştırılması amacı ile

5'-ATGCGCTCTTCCCAGACTT-3'

5'-TCACATTTCGACGCCAAACAG-3' primerleri ile hazırlanan reaksiyon karışımlarını thermal cycler cihazında Tablo 3.7.'da belirtilen sıcaklık, süre ve döngü sayıları kullanılarak amplifiye ettik.

Tablo 3.8. *inhA* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyon aşamaları

Amplifikasyon Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	10 dak	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Bağlanma	60°C	40 sn	
Uzama	72°C	1 dak	
Son Uzama	72 °C	10 dak	1

3.4.1.2. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Elde edilen PCR ürünleri “ExoSAP-IT” kiti kullanılarak, firmanın talimatları doğrultusunda 5 µl PCR ürününe 2 µl enzim eklenerek 37°C’de 15 dakika inkübasyonu sonrasında 85°C’de 15 dakika bekletilerek saflaştırdık.

3.4.1.3. Cycle Sekans PCR Amplifikasyonu

Saflaştırılmış PCR ürünlerinin tek zincirli amplifikasyon işlemini, forward primeri kullanılarak dNTP ve ddNTP reaksiyon karışımı içeren BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ile Tablo 3.9.'da belirtilen hacimler kullanılarak gerçekleştirdik.

Tablo 3.9. Cycle Sekans PCR Amplifikasyonu için kullanılan bileşenler ve hacimleri

PCR Amplifikasyon bileşenleri	Hacim
Ready Reaxion Mix (RR-100) 5x	2µl
Sequencing Buffer 5x	2µl
Primer*-F	2µl
dH2O	2µl
Saf PCR ürünü	2µl
Toplam hacim	10 µl

* Sekansı Gerçekleştirilecek Gen Bölgesine ait Forward primer

Cycle sekans için hazırlanan örneklerin amplifikasyonunu thermal cycler cihazında aşağıdaki ısı döngülerinde gerçekleştirdik.

Tablo 3.10. Cycle Sekans Amplifikasyon Aşamaları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
96°C	10 sn	25
94°C	5 sn	
56°C	4 dak	
4 °C	∞	

3.4.1.4. Cycle Sekans PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi Cihazına Yüklenmesi

Cycle Sequence ürünleri, sekans cihazına yüklenmeden önce sephadex spin kolon yöntemini kullanarak tekrar saflaştırdık. Saflaştırma işlemi sephadex kimyasalının 1gr'na 14ml su eklenerek elde edilen karışım ile oluşturulan kolonlara amplikonların yüklenmesini ile aşağıdaki protokole göre gerçekleştirdik.

1. Boş spin kolonları 1.5ml'lik toplama tüplerine yerleştirdik.
2. Her bir kolona 750 ul sephadex karışımı ekledik.
3. 4500 rpm'de 2 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirdik.
4. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak oluşan sephadex kolonuna zarar vermeden amplikonları yükldik.
5. 4500 rpm'de 3 dk. santrifüj işleminden sonra toplama kabında elde edilen saf cycle sequencing ürünü ABI Prism 3730 sekans cihazına yüklendi ve cihaz kullanım prosedürlerine uygun bir şekilde çalıştık.

Elde edilen sonuçlar ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems) cihazında bulunan Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems) programında analiz ettik.

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.



4. BULGULAR

Ülkemiz ve sınır komşularımızda son 7 yıldır yaşanan siyasi gelişmeler bölgede büyük ölçüde insan hareketlerinin yaşanmasına sebep olmuş ve bölgemize yeni ve genetiği farklı mikroorganizmaların girişinin önünü açmıştır. Bu bağlamda bölgemiz için alışılmışın dışında bir çok viral, paraziter ve bakteriyel patojen gibi farklı genotip ve direnç paterni gösteren MTBK suşlarında ülkemize girmiş olabileceği düşünülmektedir. Tüberkülozun önlenmesi amacı ile oluşturulan kontrol programlarının başarısında MTBK klinik izolatları ve epidemi suşlarının genetik varyasyonları ile genotipik varyantlar ile direnç paternleri arasındaki ilişkinin bilinmesi hem etkili tedavi protokollerinin oluşturulması hemde epidemiyolojik sürveyans açısından son derece önemlidir. Bu çalışmada, Bölge Tüberküloz laboratuvarına göç olaylarının yoğun yaşandığı bölge illerinden tüberküloz ön tanı ve/veya şüpheli temas öyküsü olan Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı hastalar ile mülteci durumunda olan yabancı uyruklu hastalara ait klinik örneklerden izole ettiğimiz toplam 100 izolatı Tuberculosis-Spoligo-Rifampin-Isoniazid Typing (TB-SPRINT) ve MIRU-VNTR yöntemleri ile genotipik çeşitlilik ve klonal ilişkiler yönünden değerlendirdik. Test izolatları aynı zamanda anti tüberküloz ilaç duyarlılıkları ve dirençli suşların iller bazında kümelerdeki evrimleşmelerini de irdeledik ve literatür verileri ile karşılaştırdık.

Çalışmada analiz ettiğimiz 100 MTBK izolatının 98'inde genotipik identifikasyon yönünden yorumlanabilir sonuçlar aldık. Antakya ve Osmaniye'ye ait 2 izolatı düşük DNA konsantrasyonu ve/veya aşırı DNA kirliliğinden kaynaklandığını düşündüğümüz sebeplerden yorumlayamadık ve bu suşları çalışmadan çıkarttık.

Çalışmaya dahil ettiğimiz MTBK üyesi test izolatlarımızın izole edildiği hasta uyruğuna ve ikamet edilen illere göre dağılımda, genel örnek popülasyonu tahminlerini dikkate alarak yaptığımız sayısal seçim ile, Türk vatandaşları arasında örneklerin Adana'da Suriye uyruklu vatandaşlarda ise Gaziantep ilinde yoğunlaştıklarını gördük. En düşük örnek sayısının bir Türk hasta izolatı ile Adıyaman'a ait olduğunu belirledik (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. TC vatandaşı ve yabancı uyruklu hastalara ait izolatların illere göre dağılımları

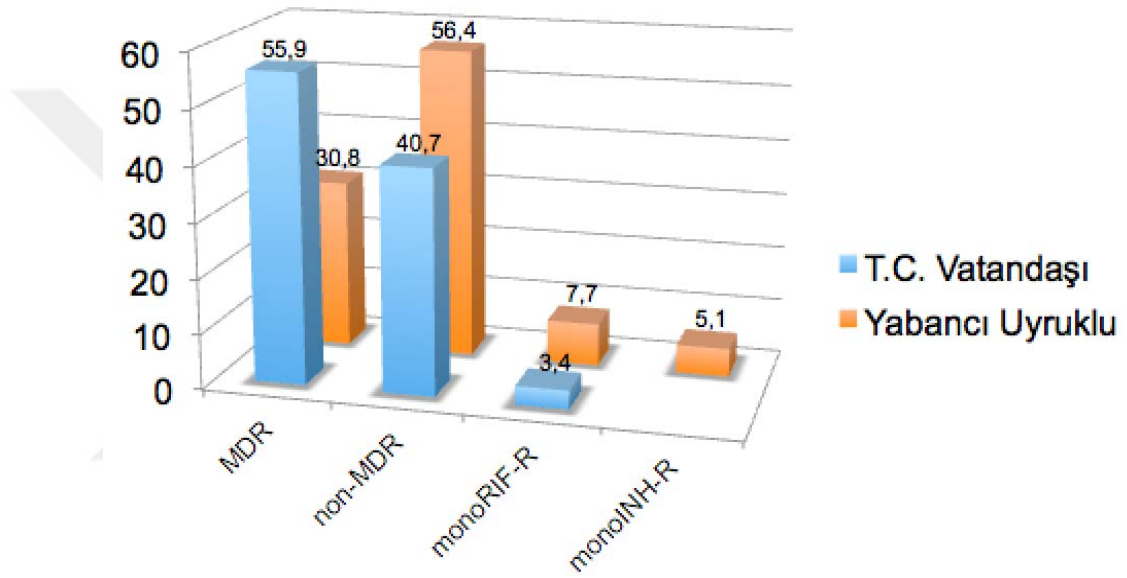
İl/ Uyruk	T.C. Vatandaşı		Yabancı Uyruklu		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Adana	23	71.9	9	28.1	32	100
Gaziantep	19	63.3	11	36.7	30	100
Antakya	8	50	8	50	16	100
Mersin	5	71.4	2	28.6	7	100
Osmaniye	1	20	4	80	5	100
Kahramanmaraş	1	25	3	75	4	100
Kilis	1	33.3	2	66.7	3	100
Adıyaman	1	100	-	-	1	100
Toplam	59	60.2	39	39.8	98	100

Çalışmaya dahil ettiğimiz izolatların MGIT 960 ile yaptığımız duyarlılık testi sonucunda; 33 (%55.9)'u Türk, 12 (%30.8)'i yabancı uyruklu hasta örneklerinden olmak üzere toplam 45 (%45.9) izolatın MDR tanımına uygun direnç paterni sergilediğini, monoInh direncinin sadece Suriye uyruklu 2 (%5.1) hastaya ait izolatta, monoRif direncinde 2'si Türk uyruklu 5 hasta izolatında görüldüğünü tespit ettik. Böylece en az bir anti-tüberküloz ajana karşı dirençli suş sayımız 52 (%53.1) oldu (Tablo 4.2.-Şekil 4.1.).

En az bir anti-tüberküloz ajana karşı dirençli izolatların dağılımını hastaların tabiyeti açısından değerlendirdiğimizde Türk uyruklu hastalar aleyhine istatistiksel olarak anlamlı fark tespit ettik ($p=0.014$). Benzer şekilde Türk uyruklu hastaların Suriye uyruklu hastalara göre MDR-TB ile enfeksiyon riskinin de 3 kat fazla olduğunu (OR: 2,788, $p=0.021$) tespit ettik.

Tablo 4.2. İzolatların Hastaların uyruklarına göre direnç profillerinin dağılımları

Uyruk/Direnç Profili	MDR		non-MDR		monoRif-R		monoInh-R		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
T.C. Vatandaşı	33	55.9	24	40.7	2	3.4	-	-	59	100
Yabancı Uyruklu	12	30.8	22	56.4	3	7.7	2	5.1	39	100
Toplam	45	45.9	46	46.9	5	5.1	2	2.1	98	100

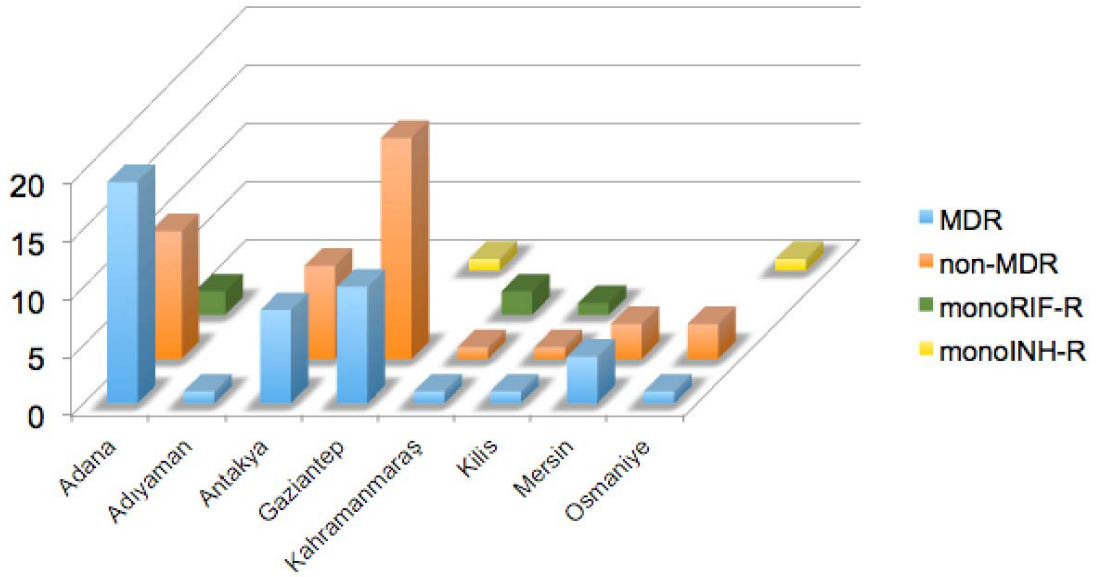


Şekil 4.1. İzolatların direnç profillerinin hasta uyruklarına göre dağılım yüzdeleri

Çalışmaya dahil edilen izolatların direnç paternlerinin illere göre dağılımlarını incelediğimizde; MDR-TB izolatlarının Adana ve Mersin’de sırasıyla, 19 (%59.4) ve 4 (%57.1) olmak üzere diğer duyarlılık profillerden daha yüksek prevalans da olduğunu gördük (Tablo 4.3 ve Şekil 4.2).

Tablo 4.3. İzolatların Direnç Profillerinin illere göre dağılımları

İl/ Direnç Profili	MDR		non-MDR		monoRif-R		monoInh-R		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Adana	19	59.4	11	34.4	2	6.2	-	-	32	100
Gaziantep	10	3.3	19	63.3	-	-	1	33.3	30	100
Antakya	8	50	8	50	-	-	-	-	16	100
Mersin	4	57.1	3	42.9	-	-	-	-	7	100
Osmaniye	1	20	3	60	-	-	1	20	5	100
Kahramanmaraş	1	25	1	25	2	50	-	-	4	100
Kilis	1	33.3	1	33.3	1	33.3	-	-	3	100
Adıyaman	1	100	-	-	-	-	-	-	1	100
Toplam	33	55.9	24	40.7	2	3.4	-	-	59	100

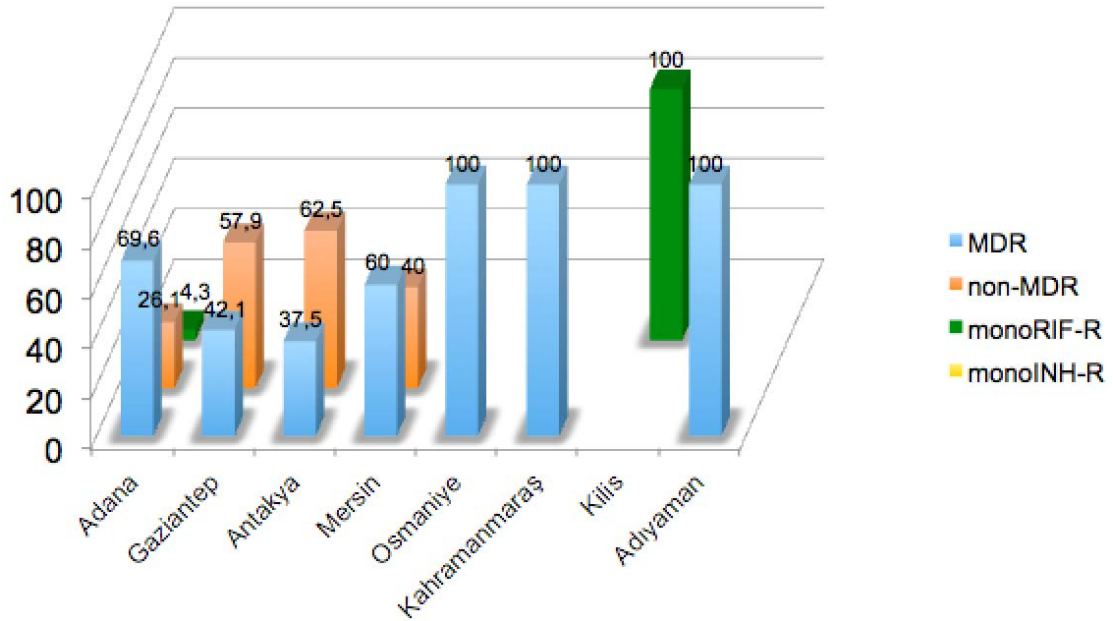


Şekil 4.2. İzolatların Direnç Profillerinin illere göre dağılımları

Türk vatandaşlarına ait izolatların illere göre duyarlılık profillerini irdelediğimizde MDR-TB suşların %69 (16/23) izolat ile Adana suşlarında en yüksek oranda olduğunu gördük, buna karşılık il bazında en yüksek duyarlılık oranının %57.9 (11/19) oranı ile Gaziantep suşları arasında olduğunu gördük (Tablo 4.4 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.4. T.C. vatandaşı hastalarına ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılımları

İl/ Direnç Profili	MDR		non-MDR		monoRif-R		monoInh-R		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Adana	16	69.6	6	26.1	1	4.3	-	-	23	100
Gaziantep	8	42.1	11	57.9	-	-	-	-	19	100
Antakya	3	37.5	5	62.5	-	-	-	-	8	100
Mersin	3	60	2	40	-	-	-	-	5	100
Osmaniye	1	100	-	-	-	-	-	-	1	100
Kahramanmaraş	1	100	-	-	-	-	-	-	1	100
Kilis	-	-	-	-	1	100	-	-	1	100
Adıyaman	1	100	-	-	-	-	-	-	1	100
Toplam	33	55.9	24	40.7	2	3.4	-	-	59	100

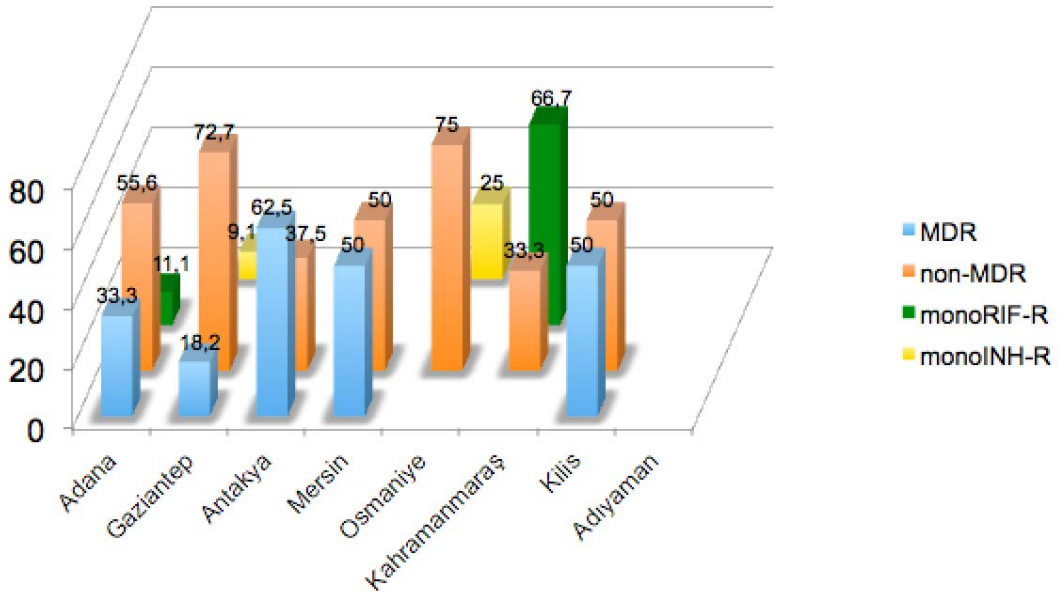


Şekil 4.3. T.C. vatandaşı hastalarına ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılım yüzdeleri

Yabancı uyruklu hastalara ait izolatların duyarlılık kalıplarının illere göre dağılımlarında ise MDR-TB izolatlarının %62.5 oranı ile Antakya’da yoğun olduğu, buna karşılık duyarlı suşların oranının en yüksek olduğu ilin ise %72.7(8/11) oranı ile Gaziantep olduğunu tespit ettik (Tablo 4.5 ve Şekil 4.4).

Tablo 4.5. Yabancı uyruklu hastalara ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılımları

İl/ Direnç Profili	MDR		non-MDR		monoRif-R		monoInh-R		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Adana	3	33.3	5	55.6	1	11.1	-	-	9	100
Gaziantep	2	18.2	8	72.7	-	-	1	9.1	11	100
Antakya	5	62.5	3	37.5	-	-	-	-	8	100
Mersin	1	50	1	50	-	-	-	-	2	100
Osmaniye	-	-	3	75	-	-	1	25	4	100
Kahramanmaraş	-	-	1	33.3	2	66.7	-	-	3	100
Kilis	1	50	1	50	-	-	-	-	2	100
Adıyaman	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	12	30.8	22	56.4	3	7.7	2	5.1	39	100



Şekil 4.4. Yabancı uyruklu hastalara ait suşların direnç profillerinin illere göre dağılım yüzdeleri

Fenotipik yöntemler ile RIF ve INH dirençli izolatlarımızda direncin moleküler mekanizmasını TB-SPRINT ile değerlendirip PCR ve sekans bazlı yöntemler ile konfirme ettik. Test izolatlarından 95/98 suşun fenotipik direncinin bilinen bir genotipik mekanizma ile izah edilebşldiğini gördük. Dirençli suşlarda 29 (%58) izolatda rifampisin direncinden *rpoB* genin 531. gen bölgesinde TCG/TTG mutasyonunun,

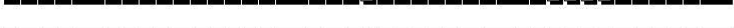
izoniyazid direncinde ise 23 (%51.1) izolatda *katG*315 gen bölgesindeki AGC/ACC mutasyonunun, 16 (%35.5) izolat da ise *inhA* gen bölgesinin -15 pozisyonunda C/T mutasyonlarının dirençten sorumlu yaygın mutasyonlar olduğunu tespit ettik (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Dirençli izolatlarına ait mutasyonlar ve dağılımları

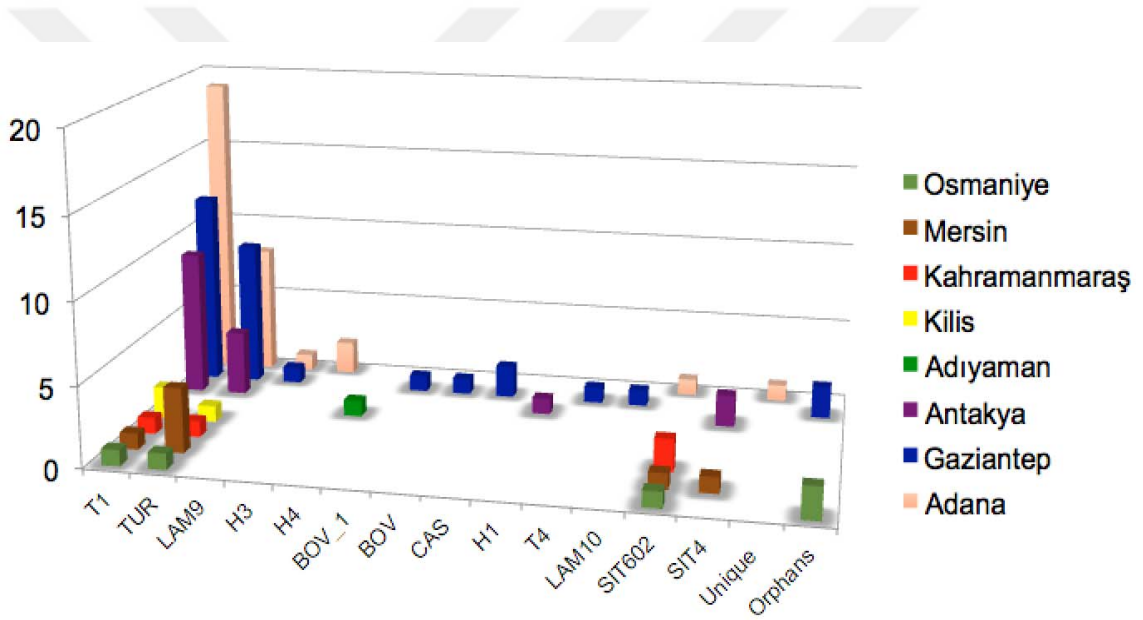
Gene	Kodon	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	İzolat sayısı	
				n	%
<i>rpoB</i>	516	GAC/GTC	Asp 516 Val	4	%8
	526	CAC/GAC	His 526 Asp	6	%12
	526	CAC/TAC	His 526 Tyr	1	%2
	531	TCG/TTG	Ser 531 Leu	29	%58
	531	TCG/TGG	Ser 531 Trp	1	%2
	Diğer			6	%12
<i>katG</i>	315	AGC/ACC	Ser 315 Thr	23	%51.1
	315	AGC/AAC	Ser 315 Asn	2	%4.4
<i>inhA</i>	-15	C/T	C15T	16	%35.5
	- 8	T/A	T8A	1	%2.2

Çalışmaya dahil ettiğimiz MTB kompleksi izolatlarımızın genotipik özelliklerini tespit amacı ile yaptığımız TB-SPRINT analizi sonunda; suşların 32 farklı spoligotipe dağıldıklarını gördük. İzolatlarımızın 74'ün 8 spoligotipinde kümelenirken 24 izolatın tek üyeli unique profil oluşturduklarını tespit ettik. TB-SPRINT verilerimize göre en çok üyeye sahip ailelerin 45 (%45.9) üyeli T1 ve 28 (%28.6) üyeli TUR aileleri olduğunu gördük. Suşlarımız arasında en yaygın spoligotiplerin ise 27 (%27.5) izolat ile TUR ailesi içerisinde yer alan SIT41 ve 25 (%25.5) izolat ile T1 ailesi içerisinde yer alan SIT53 olduğunu belirledik (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. İzolatların Spoligotip Profil ve Genotip Dağılımları

Spoligotip Profilleri	SIT	Lineage	Sayı	%
	41	TUR	27	27,55
	53	T1	25	25,51
	284	T1	8	8,16
	602		5	5,10
	4		3	3,06
	Orphan		2	2,04
	42	LAM9	2	2,04
	Orphan		2	2,04
	65	T1	1	1,02
	2026	T1	1	1,02
	748	H3	1	1,02
	463	H3	1	1,02
	353	T1	1	1,02
	47	H1	1	1,02
	61	CAM	1	1,02
	86	T1	1	1,02
	3193	T1	1	1,02
	40	T4	1	1,02
	281	T1	1	1,02
	367	TUR	1	1,02
	Orphan		1	1,02
	926	T1	1	1,02
	205	T1	1	1,02
	Orphan	T1	1	1,02
	203	CAS	1	1,02
	2682	CAS	1	1,02
	1118	BOV_1	1	1,02
	685	BOV	1	1,02
	127	H4	1	1,02
	1936	T1	1	1,02
	7	T1	1	1,02
	Orphan	T1	1	1,02
Toplam			98	100,00

En yüksek oranda tespit ettiğimiz T1 ailesi üyelerinin Adıyaman ili hariç diğer bütün illerde görüldüğünü, bunun yanı sıra Mersin ve Kahramanmaraş izolatları hariç diğer bütün il izolatları arasında en sık tanımlanan aile olduğunu gördük. Buna karşılık TUR ailesinin Mersin izolatları arasında, SIT602 ailesinin de Kahramanmaraş ilinden gönderilen örnek izolatları arasında en fazla üyesi olan en büyük aile olduğunu tespit ettik. TUR ailesine ait genotipler Adana, Gaziantep ve Hatay izolatları arasında T1'den sonra en sık tanımlanan genotiplerdi. H1 spoligo ailesini sadece Adıyaman'dan izole edittiğimiz suşlarda görülmesiydi. Benzer şekilde H3, CAS, LAM10, H4, BOV ve BOV1 spoligo aileleride sadece her biri farklı illerden olmak üzere birer ile ait izolatlar arasında yer almasıydı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Spoligotip Ailelerinin İllere Göre Dağılımları

Anti-tüberküloz ajanlara karşı, en az bir ajana dirençli bulunan suşu dirençli suş olarak tanımlayarak, test suşlarımızı genotipik özellikleri yani spoligotipleri, gönderildikleri il, izole edildikleri hasta uyruğu ile muhtemel ilişkisini tespit amacı ile yaptığımız değerlendirmede; dirençli olarak tanımladığımız suşların 24 izolat ile T1 (%53.3) ve 14 izolat ilede TUR (%31) ailesinde yoğunlaştıklarını gördük. Buna karşılık duyarlı suşlarında en çok üyesi olan bu iki ailede yoğunlaştığını, bu oranların T1 ve TUR aileleri için sırası ile (%39.6) ve (%32.1) olarak gerçekleştiğini gördük (Tablo 4.8). Ancak T1 ve TUR aileleri içerisinde en az bir anti-tüberküloz ilaca karşı dirençli

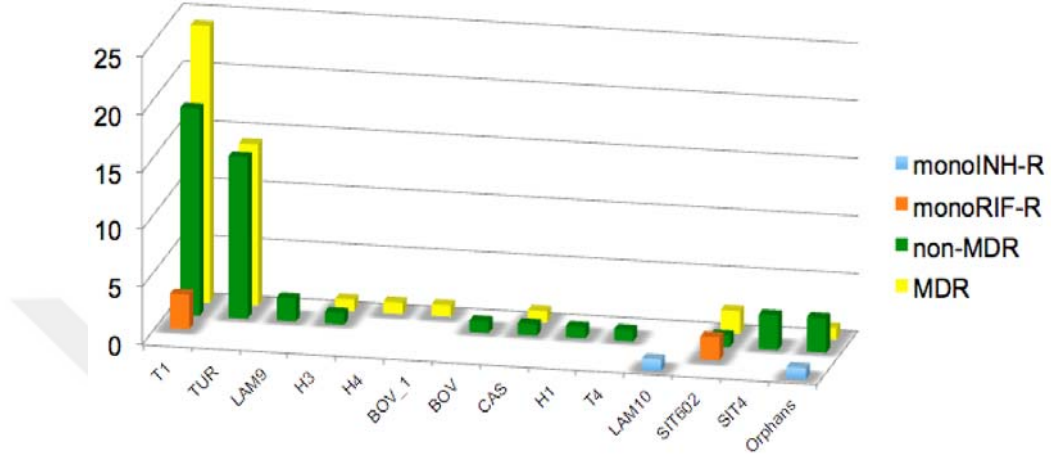
üye oranlarının duyarlı tüberküloz izolatlarına oranlarına göre oransal yönden anlamlı bir fark tespit ettik.

Tablo 4.8. Spoligotip Ailelerinin Direnç Profillerine Göre Dağılımları

Spoligotip Aile	Dirençli-TB	Duyarlı-TB	Total
T1	24	21	45
TUR	14	14	28
LAM9	-	2	2
H3	1	1	2
H4	1	-	1
BOV-1	1	-	1
BOV	-	1	1
CAS	1	1	2
H1	-	1	1
T4	-	1	1
LAM10-CAM	-	1	1
U	2	3	5
SIT4	-	3	3
Orphans	1	4	5
Total	45	53	98

Ancak tek ilaca dirençli suşları MDR-TB'den ayrı değerlendirdiğimizde; sadece monoRif tespit ettiğimiz 5 izolattan 3 (%60)'ünün T1 suşu, 2 (%40)'sinde SIT602 ailesine ait olduğunu, monoInh direncine sahip 2 suştan birisinin ise diğer direnç profillerinde görülmeyen, LAM10 ailesine ait olduğunu bir diğerinde tek üyeli orphan aile üyesi olduğunu gördük (Şekil 4.6). Genel olarak örnek sayımız ve bağlı olarak bazı ailelerdeki üye sayılarımızın azlığı sebebi ile bütün aileleri kıyaslayabilmemizin istatistiki açıdan anlamlı olmayacağı düşüncesiyle spoligotip profillerini anlamlı sonuçlar üretebilmek için; T1, TUR ve diğer aileler olmak üzere üç grup içerisinde değerlendirerek fenotipik yöntemler ile aynı anti-tüberküloz ilaca karşı direnç gösteren ancak farklı ailelere dağılmış izolatlarımızdaki dirence sebep olan nokta mutasyonlarının polimorfizmini sorguladık. İlginç bir bulgu olarak *katG* geninin 315. kodonunda meydana gelen AGC/ACC mutasyonu oranlarının oluşturduğumuz 3 grup

için istatistiki yönden anlamlı şekilde farklılık gösterdiğini tespit ettik($p=0.023$). Yine bu grupların rifampisin direncinden sorumlu *rpoB* geninin 516. kodonunda meydana gelen GAC/GTC mutasyonu açısından karşılaştırılması sonucunda da anlamlı fark vardı ($p=0.005$).



Şekil 4.6. Spoligotip Ailelerinin Direnç Profillerine Göre Oranları

Tablo 4.9. T.C. vatandaşı ve yabancı uyruklu hastalara ait izolatların spoligotip profilleri

Spoligotip profili/ Uyruk	T.C. Vatandaşı		Yabancı Uyruklu		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
T1	28	62.2	17	37.8	45	100
TUR	17	60.7	11	39.3	28	100
LAM9	-	-	2	100	2	100
H3	1	50	1	50	2	100
H4	1	100	-	-	1	100
BOV_1	1	100	-	-	1	100
BOV	1	100	-	-	1	100
CAS	2	100	-	-	2	100
H1	1	100	-	-	1	100
T4	-	-	1	100	1	100
LAM10-CAM	-	-	1	100	1	100
SIT602	2	40	3	60	5	100
SIT4	3	100	-	-	3	100
Orphans	2	40	3	60	5	100
Toplam	59	60.2	39	39.8	98	100

Çalışmada genotipik özellikleri değerlendirilen suşların izole edildiği hastaların uyruklarına göre dağılımını incelediğimizde T.C. vatandaşı ve Suriye uyruklu hastalarda sırasıyla 28 (%62.2) ve 17 (%37.8) izolat ile majör spoligotipin T1 ailesi olduğunu her iki demografik grupta TUR ailesinin 17 (%60.7) ve 11 (%39.3) üye sayısı ile T1 ailesini izlediğini tespit ettik.

Çalışmaya dahil ettiğimiz klinik materyallerde tespit ettiğimiz H4, BOV, BOV-1, CAS, H1 ve SIT4 spoligotip ailelerinin yalnızca TC vatandaşlarına ait olduğunu buna karşılık LAM9, T4 ve LAM10-CAM spoligotip ailelerinin Suriye uyruklu hastalara ait olduğunu gördük.

TB-SPRINT ile belirlediğimiz 38229, 37497, 54818, 49232, 54634, 54460 ve 43885 numaralı izolatların yer aldığı 7 orphan spoligotipinin, 38229, 37497, 54634 ve 43885 olmak üzere 4'ünün TC vatandaşlarına, diğer 3'ünün ise Suriye uyruklu hasta izolatları olduğunu tespit ettik. Bu suşların MIRU-VNTR'a göre 6 farklı patern sergilediklerini gördük. Bu izolatlar arasında TC vatandaşlarından izole edilen spoligotiplemeye göre orphan olarak tanımlana 4 suşundan 38229 ve 37497'nin, SIT numarası almamış olmalarına rağmen T1 ailesi içerisinde gruplandırılan izolatlarla eş olduklarını, 43885'in spoligotiplemeye göre veritabanında yer almadığını ancak TUR ailesine spesifik spacerlar içerdiğini ve MIRU-VNTR profiline göre sadece TUR ailesinden oluşmuş bir kümenin içerisinde yer aldığını, 54634'ün ise Suriye uyruklu hastalara ait örneklerden izole edilen toplam 3 orphan suşundan 54460 ile aynı spoligopaternaline sahip olduğunu, bu suşun veritabanlarında Taiwan'dan izole edilmiş bir suş ile aynı spoligopaternaline sahip olduğunu belirledik (Tablo 4.9). Bu iki suş Gaziantep'den gönderilen hasta örneklerinden izole edilmişti.

Suriye uyruklu hastalara ait olan diğer 2 orphan suşunun ise Osmaniye'den laboratuvarımıza gönderilen klinik materyallerden izole edilen biri monoInh dirençli, biri de tamamen duyarlı olmak üzere ve veritabanlarında yer almayan aynı spoligopaterne sahip olduklarını belirledik.

İstatistiksel analizlerin güvenilir sonuç vermesi adına, izolatları anlamlı ölçüde analiz edilebilmemize imkan sağlayacak örnek sayılarına sahip; T1, TUR ve diğer aileler olmak üzere üç gruba ayırdık. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların uyruklarına göre, majör olarak belirlediğimiz T1 ve TUR ailelerinin dağılımlarını incelediğimizde, TC vatandaşları ve Suriye uyruklu hastalardan izole edilen suşlarda sırası ile 28/59

(%47.5) ve 17/39 (%43.6) suş olmak üzere T1 olduğunu bunu yine sırası ile 17/59 (%28.8) ve 11/39 (%28.2) TUR ailesinin izlediğini gördük (Tablo 4.10).

Hastaların uyrukları ile spoligotip aileleri arasında yaptığımız değerlendirmede, istatistiki yönden anlamlı bir fark bulamadık ($p>0.05$).

Tablo 4.10. T1 ve TUR ailelerinin Hastaların uyruklarına göre dağılımları

Uyruk/Direnç Profili	T1		TUR		Diğer		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
T.C. Vatandaşı	28	47.5	17	28.8	14	23.7	59	100
Suriye uyruklu	17	43.6	11	28.2	11	28.2	39	100
Toplam	45	45.9	28	28.6	25	25.5	98	100

Suriye vatandaşlarına özgü spoligotip paternlerinin içerisinde dirençli izolat bulunmamışken TC vatandaşlarına ait örneklerde tespit ettiğimiz H4, BOV-1 ve CAS ailelerinde yer alan suşların içerisinde dirençli suşların bulunduğunu tespit ettik (Şekil 4.10).

Tablo 4.11. T.C. vatandaşı ve yabancı uyruklu hastalara ait MDR izolatların spoligotip profilleri

Spoligotip profili/ Uyruk	T.C. Vatandaşı		Suriye uyruklu		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
T1	18	75	6	25	24	100
TUR	10	71.4	4	28.6	14	100
LAM9	-	-	-	-	-	100
H3	-	-	1	100	1	100
H4	1	100	-	-	1	100
BOV-1	1	100	-	-	1	100
BOV	-	-	-	-	-	100
CAS	1	100	-	-	1	100
H1	-	-	-	-	-	100
T4	-	-	-	-	-	-
LAM10-CAM	-	-	-	-	-	-
SIT602	1	50	1	50	2	100
SIT4	-	-	-	-	-	
Orphans	1	100	-	-	1	100
Toplam	33	73.3	12	26.7	45	100

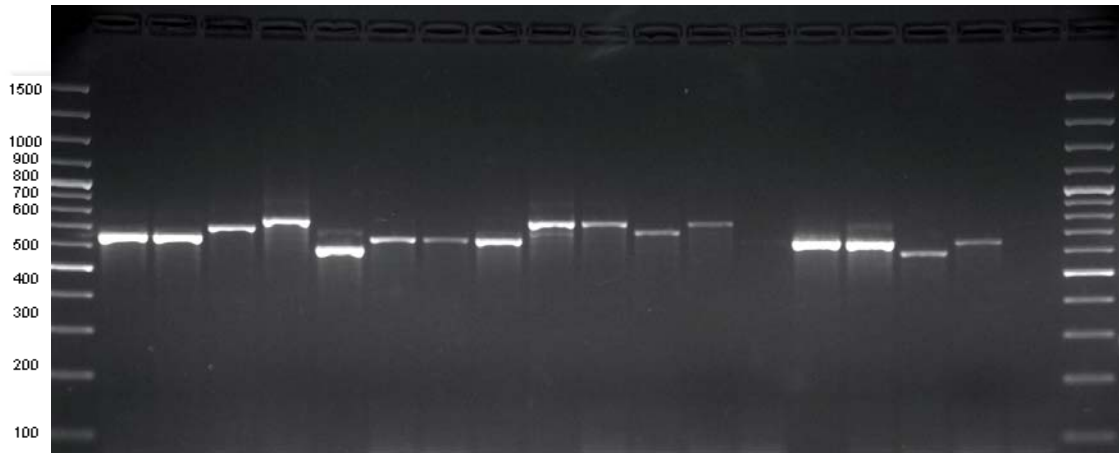
Çalışmamıza dahil ettiğimiz en az bir ilaca dirençli suşların izole edildikleri hastaların uyruklarına majör spoligo aileleri olan T1 ve TUR dağılımlarını incelediğimizde, TC vatandaşları ve Suriye uyruklu hastalardan izole edilen suşların sırası ile 20/35 (%57.1) ve 7/17 (%41.2) olmak üzere T1 ailesi olduğunu bunu yine sırası ile 10/35 (%28.6) ve 4/17 (%23.5) TUR ailesinin izlediğini gördük (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. T1 ve TUR ailelerinin en az bir ilaca dirençli Hasta izolatlarının uyruklarına göre dağılımları

Uyruk/Direnç Profili	T1		TUR		Diğer		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
T.C. Vatandaşı	20*	57.1	10	28.6	5	14.3	35	100
Suriye uyruklu	7**	41.2	4	23.5	6	35.3	17	100
Toplam	27	51.9	14	26.9	11	21.2	52	100

* MDR izolatlara ek olarak iki monoRif-R suş içermektedir.

** MDR izolatlara ek olarak bir monoRif-R suş içermektedir.



Şekil 4.7. MIRU-VNTR ile tiplendirme ve filogenetik ilişki oluşturmak amacı ile PCR'ı gerçekleştirilen DNA ekstraktlarının jel görüntüleri. (Şekil 4.7).

Diğer taraftan spoligotipleme yöntemi ile ailelere dağılan suşlar arasındaki klonal ilişkiyi göstererek ayırım gücü daha yüksek sonuçlar üretmek amacı ile yaptığımız MIRU-VNTR analizi sonucunda 98 test izolatımızın 61' tek üyeli olmak üzere toplam 71 farklı kümeye dağıldıklarını gördük (Şekil4.7). Yorumlanabilir sonuçlar üretebilmek için Bionumerics 7.6 programı kullanarak tespit ettiğimiz MIRU-VNTR paternleri ile birlikte spoligo-ailelerimizden filogenetik ağaç oluşturduk (Şekil 4.8).

Filogenetik ağaçtan faydalananak izolatlarımızın demografik ve coğrafik karakteristiklerini filogenetik özellikleri ile tekrar değerlendirdik. Genel olarak birden çok üyeli kümelerin farklı illerden gelen Türk ve Suriye uyruklu hastalara ait karışık izolatlardan oluştuğunu gördük. Filogenetik ağacın gösterdiği bazı ilginç tespitlerimiz oldu. İlki iki üyeli MIRU-VNTR kümelerinden birisinde yer alan izolatların aynı

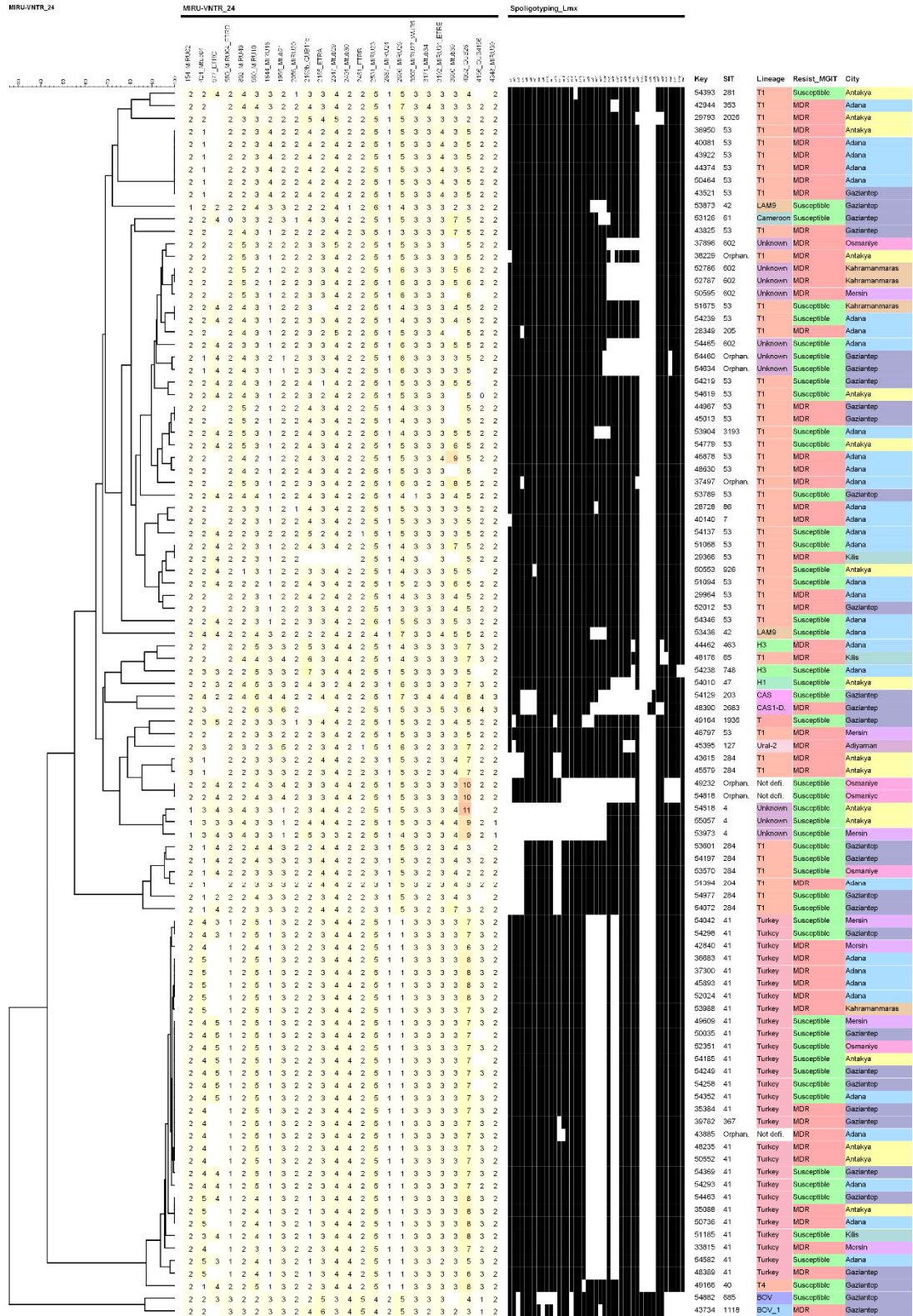
soyadına sahip Kahramanmaraş'ta ikamet eden Suriye uyruklu iki hastaya ait olduklarını ve her iki izolatta moleküler mekanizmaları da aynı olmak üzere monoRif-R direncine sahip olduklarını gördük. Yani aynı klon aynı soyadına sahip iki kişiyi enfekte etmişti. İkincisi de Osmaniye'de ikamet eden Suriye uyruklu iki hastaya ait klinik materyallerden izole ettiğimiz iki suşun spoligotip paternlerinin veritabanlarında yer almaması, ancak bu iki suşun MIRU-VNTR paternlerine göre filogenetik ağaçta bir küme oluşturmalarıydı. Bir diğer ilginç tespitimizde ise aynı hastadan farklı zamanlarda alınan iki klinik örnekten izole edilen 2 suşun farklı direnç profiline sahip, farklı spoligotip ailesi ve kümede yer alan suşlar olmasıydı.

Biri Türk, diğeri Suriye uyruklu olmak üzere Gaziantep ilinde ikamet eden iki hastaya ait klinik materyallerde tespit Taiwan'da izole edilmiş ve spoligotip profiline göre orphan suşu olarak veritabanına işlenmiş suş ile aynı spoligotip paternine sahip orphan suşlarının MIRU-VNTR paternlerine göre aynı küme içerisinde yer alması da %98 benzerlik gösterdiğini belirledik.

MIRU-VNTR analiz sonuçlarına göre tamamı TC vatandaşlarından oluşan 4 ayrı kümeden ikisinin yalnızca MDR-TB suşlarından oluştuğunu ve birinin T1 ailesi, ikincisinin ise TUR ailesi olarak kümelendiğini gördük. Diğer iki kümenin ise yine TUR ailesine ait farklı direnç paternlerine sahip, farklı illerde ikamet eden hastalardan izole edilen suşlardan oluştuğunu belirledik.

Aynı MIRU-VNTR profiline sahip farklı illerde yaşayan çoğunluğunu Suriye uyruklu hastalara ait izolatların oluşturduğu 13 üyeli bir küme içerisinde, 12 suşun TUR spoligo ailesi mensubu olduğunu bir suşun da veritabanında yer almayan orphan spoligo paternine sahip izolat olduğunu tespit ettik.

Gaziantep ilinde ikamet eden iki hastadan izole edilen *Mycobacterium bovis* suşlarının farklı spoligotip ailelerinde yer almasına rağmen MIRU-VNTR yöntemi ile filogenetik ilişkilendirilmesinde %90 benzerlik gösterdiklerini gördük.



Şekil 4.8. İzolatların filogenetik ağaç ile ilişkilendirilmesi

Biz klonal ilişki tespitinde ayırım gücünü artırmak için 24 lokus MIRU-VNTR kullanmıştık. Bizim test suşlarımızda Simpson indeksine göre 6 lokusun ayırım gücünün 0.61 ile 0.76 arasında değiştiğini yani diğer lokuslara göre daha yüksek olduğunu gördük(Tablo 4.13).

Tablo 4. 13. Simpson İndeksine Göre yüksek Ayırım Gücüne sahip MIRU-VNTR lokusları

MIRU-VNTR lokusu	Allele varyasyonu	Simpson İndeksi
4052_QUB26	10	0,76
424_Mtub04	5	0,73
2163b_QUB11b	7	0,73
2696_MIRU26	6	0,72
960_MIRU10	5	0,70
1955_Mtub21	6	0,61

5.TARTIŞMA

Zorunlu göçe tabi tutulan mülteciler genellikle kabul edildikleri ülkede, ülke şartlarına uyum sağlayana kadar düşük hayat standartlarında, ekonomik sıkıntı ve barınma güçlükleri içerisinde toplu bir arada yaşamak zorunda kalırlar. Sıklıkla kontrolsüz gerçekleşen mültecilik olaylarında göçerler ülkelerindeki sağlık networkü dışına çıktıkları için göç esnasında yanlarında; kültürel tercihler, gelenekler, davranış kalıpları, teknolojilerinin yanı sıra, vücudun içindeki veya üzerindeki floralarını, vektörlerini, patojenlerini, geçirilmiş enfeksiyonların immünolojik sekellerini, bulaşıcı hastalıklara karşı zafiyetlerini taşırlar. DSÖ bulaşıcı hastalıklar bağlamında Tüberkülozun önemine dikkat çekmiş, yüksek riskli bölgelerden düşük riskli beölgelere göçün, gerek kontrolsüz aktif tüberküloz gerekse latent tüberkülozlu vakalardaki olumsuz şartlara bağılı akut alevlenmelerin, kabul eden toplumlarda yaratacağı sağlık ve ekonomik yüke vurgu yapmıştır. Bu sebeplede 1995-2006 için başlattığı “STOP-TB” programının hedeflerini 2050 yılına revize etmek zorunda kalmıştır. Düşük prevalanslı refah toplumlarında yeni tüberküloz vakalarının çoğunun göçmen ailelere ait çocuklar arasında görüldüğüne dikkat çekilen benzer çalışmalarda en azından ilk beş yılın önemine değinilmiştir. Yüksek gelirli 34 ülkenin üyesi olduğı Ekonomik İşbirliğı ve Kalkınma Örgütü OECD ülkelerinde 2003 -2015 yılları arasında yerli doğumlularda yıllık olarak % 4.7 oranında gerileyerek % 3'lere kadar düşen TB oranının aynı süre içerisinde yabancı uyruklu doğumlar arasında marjinal bir artış kaydedildiğı 2013 yılında tespit edilen TB vakalarının yarısının yabancı uyruklu hastalardan oluştuğı bildirilmiştir. Avrupa Birliğı (AB) ve Avrupa Ekonomik Alanı ülkelerinde 2015 yılında bildirilen TBC vakalarının yaklaşık % 26.8'i yabancı kökenlidir. 2017 ERCC verilerine göre göçmenlerde TB sıklığı Almanya'da 5 kat, Fransa'da 8 kat, İtalya'da 15 kat, İngiltere'de 20 kat arttığı bildirilmiştir. Göçmenler ile ilgili bir başka problem bu popölasyondaki TB tanısının sadece MTBK türleri tanımlayarak anti tüberküloz ilaç duyarlılık kalıplarının testipiti ile sınırlı kalınmasıdır. Oysa aktif TB kadar laten TB yönünden de göçmenlerin taranması ve daha da önemlisi karşılıklı etkileşimi gösterebilmek amacı ile genotip düzeyinde yüksek ayırım gücüne sahip yöntemler kullanılarak aktif sürveyans yapılmasının kontrol programlarının etkinliğı açısından daha doğru olacağı vurgulanmıştır. Suriye'de siyasi sebepler ile başlayan krizin göç

hareketlerini hızlandırdığı 2013 yılında BM verilerine göre tüm dünyada yaklaşık olarak 232 milyon kişi göçe maruz kalmış ve göçmenler göç için yakın inanç ve adet toplumlarını tercih etmiştir. Biz gerek ülke gerekse bölge olarak bu zaman diliminde başlayan Suriye krizinden en çok etkilenen ülke oldu. Biz bu çalışma ile Suriye’de başlayan göç hareketlerinin bölgemizdeki

Ülkemizde moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanıldığı genotip düzeyinde Türk vatandaşlarına ait izolatlar ile Suriye uyruklu mültecilerden alınan klinik örneklerden izole edilen MTBK suşlarının karşılaştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Ancak genel anlamda Türk vatandaşları ile, Suriye uyruklu vatandaşlarda dahil olmak üzere, bütün yabancı uyruklu göçmenlerde TB insidansı ve direnç paternleri ile ilgili olarak Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığının yaptığı, tanı ve tedavi sonuçları da dahil, epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına ait periyodik olarak yayınlanan raporlar bulunmaktadır. Ancak bu raporlarda gruplar arasında etkileşim, bulaş riski ve bölgeye gelmiş olması muhtemel yeni genotipler hakkında bir veri bulunmamaktadır. Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Daire Başkanlığının yaptığı TB insidans prevalans çalışmaları, ülkemizde özellikle 2010’dan itibaren dramatik düşüş gösteren Türkiye doğumlu TB olgularının askine yabancı ülke doğumlularda bu oranın 8 kat arttığını göstermiştir. Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Daire Başkanlığının 2018 Verem Savaş raporuna göre ülkemiz genelinde tespit edilen yeni TB olgularının %11’i Suriye uyruklu hastalar olup, bu hastalardan izole edilen suşlar içerisinde MDR-TB oranı ülke genelindeki tanımlanmış MDR-TB içerisinde %5’lik bir paya sahiptir. Suriye uyruklu hasta izolatlarında XDR suş tespit edilmemiştir(10). Bizim çalışmamızın farkı ve öncelikli amacı TB insidans veya prevalans oranlarını belirlemek değil, göçle ilişkilendirilebilecek geçişe dair deliller aramaktır. Bizim çalışmanın kurgulanması ve uygulamadaki ikinci farkımız yöntem seçimidir. Ülkemizde ve bölgemizde Türkiye Cumhuriyeti uyruklu yerli popülasyonda görülen MTBK türlerinin klonal ilişkilerinin araştırıldığı, ayırım gücünü artırmak amacı ile IS6110-PCR-RFLP, spoligotipleme ve MIRU-VNTR’ın farklı kombinasyonlarla birlikte kullanıldığı farklı bölgelerde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Ancak biz çalışmamızda spoligotipleme için membran bazlı değil mikrobuncukların kullanıldığı ve genotipleme ile eş zamanlı olarak direnç tayinide yapan TB-SPRINT yöntemini ülkemizde ilk defa kullandık.

Biz Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen ve MGIT 960 ile MTBK üyesi olduğunu tespit ettiğimiz 59'u Türk uyruklu 41'i Suriye Uyruklu hasta izolatu olmak üzere anti-tüberküloz ajanlara duyarlı ve dirençlilikleri her iki popülasyona eşit dağılım gösteren toplam 100 suşu genotip ve klonal ilişki yönünden değerlendirdik. Ancak 2 izolatu kontaminasyondan kurtarılamaması sebebi ile çalışmaya dahil ettiğimiz test suşu sayısı 98 oldu.

Biz TB-SPRINT yöntemi ile Türk ve Suriyeli hasta klinik izolatlarında baskın spoligo ailesinin sırası ile 28/59 (%47.5) ve 17/39 (%43.6) üyeli T1 olduğunu bunu yine her iki popülasyonda da sırası ile 17/59(%28.8) ve 11/39(%28.2) üyeli TUR ailesinin izlediğini gördük (Tablo 4.10). T1 ve TUR ailesinin üye sayıları arasında da her iki popülasyon arasında oran yönünden bir fark yoktu. Dolayısı ile bölgemizde baskın spoligotip ailelerinin T1 ve TUR olduğunu her iki popülasyonda da dağılımın bulaş için bir toplumu işaret etmediğini gördük. Ayrıca tartışmada yerli hastalar ile yapılmış sonuçlara ait aile dağılım sırası ve üye sayısı oranlarımız aynı zamanda bizim yerli hastalar ile benzer sonuç veren Suriyeli hastalarımız içinde geçerli olacaktır.

Daha önce bölgemizde Zeytinli ve arkadaşlarının (2012) yaptığı ve 467 Türk uyruklu hastaya ait klinik izolatu genotipik özellikleri yönünden spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile değerlendirdikleri çalışmalarının sonunda T1 spoligo ailesinin 239/467 (% 51.2) izolatu ile en büyük aile olduğunu ikinci büyük spoligo ailesinin de 54/467 (%11.5) üyeli TUR ailesi olduğunu rapor etmişlerdir. Baskın aile sıralamaları oran anlamında istatistiki yönden anlamlı bir fark oluşturmamakla beraber bizim sıralamamız gibidir. Bu grubun T1 ailesi için tespit ettiği %51.2'lik kümelenme oranı bizim yerli popülasyona ait % 47.5'lik kümelenme oranımızdan yüksek olmakla beraber istatistiki yönden fark yaratmamaktadır. Bizim çalışmamızda da tespit ettiğimiz 2. büyük aile % 28.8'lik oran ile TUR olup Zeytinli ve arkadaşlarının %11.5'lik bulgusundan istatistiki yönden anlamlı şekilde yüksektir. Bu fark iki çalışma arasında geçen süre içerisindeki değişen yerel popülasyon ile izah edilebilir.

Taşbakan ve arkadaşlarının (2018) İzmir'de 165 hastaya ait 171 ekstrapulmoner örnekten izole ettikleri MTBK türü izolatlar ile yaptıkları çalışmalarında, 149 klinik izolatta tespit ettikleri majör spoligotiplerin, %41.6 (62/149) oranı ile T1 olduğunu bunu % 7.4 (11/149) oranı ile LAM7-TUR ailesinin izlediğini rapor etmişlerdir (57). Bu grubun verilerindeki sıralama ve T1 ailesine ait üye sayısı oranları bizim %47.5'lik

oranimız ile çok benzer ancak TUR ailesine ait oranları hem bizim %28.8'lik hem de Zeytinli Ü ve arkadaşlarının %11.5'lik oranlarından daha düşüktür.

Çavuşoğlu ve arkadaşlarının (2017) Ege Bölgesi'ndeki genotipler ile vakaların demografik verileri, klinik görünüşleri ve antimikrobiyal duyarlılık paternleri arasındaki muhtemel ilişkileri değerlendirdikleri ve suşların genotip dağılımındaki varyasyonları belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarına, 1996-2014 yılları arasında izole ettikleri toplam 470 MTBK suşunu dahil etmişlerdir. Sonuç olarak daha önceki çalışmalarda olduğu gibi baskın aile sıralamasının ülkemizde yapılan çalışmalara benzer olarak tespit ettikleri T1 ve TUR baskın spoligo ailelerinin %30.9 ve %8.1'lik oranları bizim çalışmamızdan düşük bulunmuştur (83).

Farklı yöntemler kullanmakla beraber aynı amaca yönelik olarak Karşılıgil ve arkadaşlarının (2016) Gaziantep bölgesinde Üniversite hastanesine gelen örneklerden izole ettikleri MTBK türü suşların genotipik özelliklerini RFLP ve spoligotipleme yöntemleri ile araştırmışlardır. Bu çalışmada da baskın ailenin 32 (% 64) izolatlı T1 ailesi olduğu ve 9 (% 18) izolatlı LAM7 TUR ailesinin ikinci büyük aile olarak kaydedildiği bildirilmiştir (84).

Bölge Tüberküloz Laboratuvarı interlandı içerisinde yer alan Hatay ilinde 2010-2011 yıllarında izole ettikleri 19 MTBK suşu spoligotipleme ile genotipik yönden değerlendiren Yula ve arkadaşları çalışmaları sonunda, T1 ve LAM7-TUR ailelerinin sırası ile 7 (%36.8) ve 5 (%26.3) suşa sahip baskın spoligotip aileleri olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada rapor edilen sıra ve oranlarda bizim oranlarımız ile benzerdir (85).

Otlu ve arkadaşlarının (2009) Malatya ilinde tüberküloz hastalarına ait klinik materyallerden izole edilen 220 *M. tuberculosis* kompleks suşlarında Beijining ailesinin varlığını ve majör filogenetik aileleri spoligotipleme ve IS6110-RFLP yöntemleri ile irdeledikleri çalışmalarında, majör spoligotip ailelerinin 81 üyeli T1 (%36.8) ve 26 üyeli TUR (%11.8) aileleri olarak bildirmişlerdi. Bu aile sıralaması ve üyelerin sayısal oranları bizim aynı aileler için tespit ettiğimiz %47.5 ve %28.8'lik oranlardan düşüktür. Ancak daha önce benzer çalışmayı bölgemiz hasta izolatları ile gerçekleştiren Zeytinli Ü ve arkadaşlarının % 11.8'lik TUR oranlarına oldukça benzerdir. Bu grup ile bizim hem coğrafi ve demografik özellikler, hemde toplandığı zaman dilimi yönünden

farklılıklarımız bulunmaktadır. Diğer taraftan da daha sonra tartışacağımız çalışmaya dahil edilen dirençli suş oranlarımız yönünden farklılık bulunmaktadır (86).

Aktaş ve arkadaşlarının (2007) Zonguldak'taki *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının moleküler epidemiyolojisini ve biyolojik çeşitliliğini spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile araştırmayı amaçladıkları çalışmalarına, 2003-2005 yıllarına ait toplam 128 MTBK izolatını dahil etmişlerdir. Spoligotipleme sonuçlarını analiz ettiklerinde, majör spoligotip ailelerinin T1 (%21.8) ve TUR (%18) olduğunu belirlemişlerdir (87). Bu grubun majör spoligoailelerine ilişkin tespitleri bizim tespitlerimiz ile aynı ancak her iki majör aile için verdikleri oranlar bizim oranlarımızdan daha düşüktür.

Durmaz ve arkadaşları da (2007) Malatya'da 5 yıllık periyotta pulmoner TB hastalarından izole ettikleri 145 MTBK türü suş üzerinde spoligotipleme, IS6110-RFLP ve 12 lokus MIRU-VNTR yöntemlerini yaptıkları çalışmalarında spoligotipleme sonucunda T1 ailesinin 58 (%40) üye ile en büyük aile olduğunu bunu 39 (%26.9) üye ile TUR ailesinin izlediğini bildirmişlerdir. Bu grubun baskın aile sıralaması ve ailelerdeki üye sayısı oranları özellikle TUR ailesinin oransal büyüklüğü bizim %28.8'lik oranlarımıza oldukça benzerdir (62).

Durmaz ve arkadaşları aynı yıl Malatya, İzmir, Adana ve İstanbul illerinden topladıkları 200 izolatı benzer yöntemler ile genotipik yönden değerlendirdiklerini bildirdikleri bir başka çalışmalarında ise spoligotipleme sonucunda sırası ile TUR ve T1 ailelerinin %35 ve %19.5 oranları ile en baskın aileler olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu sıralama ülkemizde yapılan diğer benzer çalışmalardan ve 144 Malatya izolatına ait T1 ve TUR ailelerinin sırası ile %40 ve %26.9'luk kümelenme oranlarından farklıdır. Aynı yıl aynı yöntemler kullanılarak aynı laboratuvar ve personel katılımı ile elde edilen bu büyük fark bölgeler arasında baskın suşların dağılımında farklılıklar olabileceğinin bir ispatı sayılabilir. Bu sebeple aktif süveyans önemlidir (88).

Benzer şekilde Kısa ve arkadaşlarının 2007 yılında Ankara'da yaptığı membran temelli spoligotipleme çalışmasında 114 izolat değerlendirmişler ve baskın spoligo ailelerinin sırası ile %27.2 ve %7.9 oranlarına sahip T1 ve TUR olduğunu bildirmişlerdir (80). Aynı grup çalışmalarını 2012 yılında benzer yöntemler kullanarak 95 izolat ile tekrarlamışlar ve baskın spoligoailelerinin sırası ile %20 ve %15.8'lik

oranlar ile TUR ve T1 aileleri olduğunu rapor etmişlerdir (58). Durmaz ve arkadaşlarının aynı yıl farklı illerden ürettikleri spoligo aileleri sonuçlarına benzer sıralama da değişim farkını Kısa ve arkadaşları aynı ile ancak farklı yıl örneklerinden bildirmişlerdir. Bu sonuç da yine aktif sürveyansın önemini işaret etmektedir.

Sürücüoğlu ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınladıkları toplam 87 MTBK türü suşu IS6110-RFLP ve spoligotipleme yöntemleri ile analiz etmişler ve en baskın spoligoailelerinin sırası ile 31(%35.6) ve 24 (%27.6) izolat ile TUR ve T1 ailesi olduğunu bildirmişlerdir (56). İlk iki baskın tip aynı olmakla beraber bu grubun bildirdiği sıralama ve oran büyüklüğü bizden farklıdır. Ancak İzmir'den Taşbakan ve arkadaşlarının 2018 yılında, Çavuşoğlu ve arkadaşlarının 2017 yılında aynı amaç ve yöntemleri kullanarak elde ettikleri sıra ve oranlarda bu grubun verdiği sıra ve oranlardan farklı, oran bağlamında istatistiki yönden önem arz etmeyen küçük farklılıklar ile birlikte sıralama olarak bizim sıralamamız ile aynıdır. Yine aynı ilden farklı zaman dilimlerinde toplanan örneklerde görülen bu sıra ve oran farkı moleküler sürveyansın önemini göstermektedir.

Biz TB-SPRINT ile yaptığımız spoligotiplemede değerlendirdiğimiz 98 klinik izolatın majör spoligoaileleri olarak tespit ettiğimiz T1 ve TUR aileleri farklı çalışmalarda farklı oranlara sahip büyük kümeler oluşturmalarına karşılık ülkemizin baskın spoligo aileleri oldukları bütün çalışmalarda ortak bulgu olarak rapor edilmiştir. Bu iki majör ailede görülen ilk iki sıradaki yer ve ailedeki izolat oranlarının farklılıklarının yanı sıra minör spoligo aileleri ve orphan ve unique suşların sayı ve özelliklerindeki değişim belkide bölgedeki yeni veya farklı MTBK genotiplerinin hareketlerini izleme yönünden daha anlamlı sonuçlar yaratabilecektir. Biz çalışmaya dahil ettiğimiz 98 MTBK izolatımızın genotipik özelliklerini tespit amacı ile yaptığımız TB-SPRINT analizi sonunda; suşlarımızın 32 farklı spoligotip parterni gösterdiğini tespit ettik. Toplamda 11 spoligotip ailesi tespit ettiğimiz 98 MTBK izolatımızın, 74 (%75.5)'ünün 8 spoligotip kümesi içinde yoğunlaştı. Kalan 24 (%24.5) izolat ise tek üyeli unique profiller oluşturdu (Tablo 4.7). TB-SPRINT ile bir spoligoailesi içerisinde yer alan 74 izolatımızın spoligoailelerine dağılımlarının izole edilen hasta uyruğu ile korelasyonu sonucunda Türk uyruklu yerli hasta izolatların 10, Suriye uyruklu hasta izolatlarının ise 7 farklı spoligotip ailesine dağıldığını gördük. Türk uyruklu yerli hastalara ait 42 (%71.2) izolatın birden çok üyesi olan 5 kümede, Suriye uyruklu

hastalardan izole edilen suşlarında 30 (%76.9)'unun yine birden çok üyesi olan 6 spoligo kümesinde yoğunlaştıklarını tespit ettik (Tablo 4.9).

TB-SPRINT sonuçlarımıza göre orphan olarak tanımlanan 7 (%7.1) izolattan 4 (%4.1)'ü Türk uyruklu yerli hasta izolatlarına, 3 (%3.1) ise Suriye uyruklu hasta izolatlarına aitti. Türk uyruklu yerli hasta izolatlarından orphan tanımına giren 2'sinin SIT numarası almamış olmalarına rağmen T1 ailesi içerisinde gruplandırılan izolatlarla gruplandırıldıklarını, orphan tanımına giren bir diğer izolatta yine spoligotiplemeye göre veritabanında yer almayan ancak TUR ailesine spesifik spacerlar içeren bir izolat olduğunu tespit ettik. Türk uyruklu hasta izolatlarında belirlediğimiz 4. orphan suşunun, Suriye uyruklu hastalara ait örneklerden izole ettiğimiz bir orphan suş ile aynı spoligopaternine sahip olduğunu, bu 2 orphan suşun SITVIT2 veritabanında Taiwan'dan izole edilen orphan suş ile aynı spoligopaternine sahip olduğunu gördük. Suriye uyruklu hasta grubuna ait olan kalan 2 orphan suşunun ise veritabanlarında yer almayan aynı spoligopaterne sahip olduklarını belirledik. Yani biz yerli ve göçmen hasta izolatları arasında Zeytinli ve Arkadaşlarının tespit ettikleri Beijing suşuna rastlamadık, ancak uzak doğu kökenli olup SITVIT2 veritabanına Taiwan suşu olarak kaydedilen suşla aynı spoligopaternine sahip biri Türk diğer Suriye uyruklu hastalara ait olmak üzere 2 izolat tespit ettik. Bu bulgu Türkiye'deki Taiwan suşlarına ait ilk bulgudur.

Bölgemizde Zeytinli ve arkadaşlarının (2012) spoligotiplendirme yöntemi sonucunda 21 spoligotip ailesi belirledikleri çalışmada, 467 izolatın 443 (%94.9)'ünün 21 küme içerisine dağıldığını, 24 (%5.1)'ünün ise SpolDB4 veri bankasındaki bilinen hiçbir kümeye uymayan (orphan) suşlar olduğu belirlemişlerdir (9). Taşbakan ve arkadaşları da (2018) İzmir' yaptıkları çalışmalarında izolatlarının %82.5'inin 10 spoligoailesi içerisine dağıldığını % 9.4'ünün ise spoligopaternali tanımlanmamış orphan suşlar olduğunu bildirmişlerdir (57). Yine İzmir izolatlarını değerlendiren Çavuşoğlu ve arkadaşları (2017) bildirdikleri spoligo kümelenme oranlarını %81.7, orphan suş oranlarını da % 11.5 olarak bildirmişlerdir (83). Karşılığil ve arkadaşları ise (2016) yaptıkları çalışmalarında spoligotipleme ile tanımlanmış paterne sahip ailelere dağılım oranlarının % 98.2 olduğunu sadece bir izolatın orphan tanımına uyduğunu yayınlamışlardır (80). Yula ve arkadaşlarının 19 MTBK suşuna ait sonuçlarını yayınladıkları çalışmalarında izolatların tamamının spoligopaternlerinin tanımlı olduğu

orphan izolatlarının bulunmadığı bildirilmişti (81). Otlu ve arkadaşlarının (2009) Malatya izolatları ile yaptıkları çalışmalarında kümelenme, unique suş ve orphan suş oranları sırası ile % 82.7, %17.3 ve %10.9 olarak verilmiştir.(82).

Malatya’da 5 yıllık periyoda ait 145 MTBK izolatını dahil ettikleri çalışmalarında, Durmaz ve arkadaşları (2007) izolatlarının %82.8’inin kümелendiğini %17.2 sinin de unique paterne sahip olduklarını belirttikleri çalışmalarında orphan suş oranlarının %4.1 olduğunu belirtmişlerdir (62). Bu grup aynı yıl farklı 4 ilden topladıkları örnekleri spoligopaternlerini tespit için yaptıkları değerlendirmede suşların %76’sının spoligotipler içerisinde kümелendiklerini %24’ünün unique patern sergilerken %4.5’inin orphan olarak tanımlanan izolatlar olduğunu rapor etmişlerdi (88). Kısa ve arkadaşlarının Ankara’da 2007 ve 2012 yıllarında yaptıkları ve sonuçlarını yayınladıkları iki farklı çalışmalarında spoligo aile sayıları, kümelenme oranları unique izolat oranları ve orphan suş oranları sırası ile ilk çalışma için; 12, %85, % 14.9 ve %7, ikinci çalışmada ise aile sayı ve oranlar; 9, %79, %21 ve % 5.3 olarak bildirilmiştir (46,54). Aktaş ve arkadaşlarının (2007) Zonguldak’daki çalışmalarında izolatların %73.4’ünün 13 spoligotip içerisinde kümlendikleri, %26.6’sının da unique profil verdiklerinin gördüklerini bildirmişlerdir (87). Nihayet İzmir’de Sürücüoğlu ve arkadaşlarının (2012) 87 MTBK suşunu SpolDB4 veritabanı kullanarak değerlendirdikleri çalışmalarında, 27 farklı spoligotip peterni belirlediklerini, 65 (%74.7) suşun 11 küme içerisinde yoğunlaştığını spoligotipleme analizleri sonucunda belirlenen 13 aileye ek olarak suşların % 7’sinin orphan olduğunu göstermişlerdir (56). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz 11 aile, %75.5’lik kümelenme %24.5’lik unique patern oranı ve %7.1’lik orphan suş oranımız istatistiki yönden anlam ifade etmeyen oransal farklılıklarla literatürde bulduğumuz ülkemizde yapılan çalışmalara ait sonuçlar içerisinde yer almaktadır. T1 ve TUR gibi bütün çalışmalarda majör spoligoaileleri olarak belirlenen ancak kümelenen izolat oranları aynı il ve yıllara göre bile değişiklik gösterebildiği literatür ile tespit edilen çalışmalardaki genotip bulguları ile ilgili yapılabilecek en doğru genelleme, “moleküler surveyansın sürekli olarak yapılarak toplum içerisindeki genotip tür hareketliliğinin sebep ve kaynaklarının doğru tespiti için veri oluşturmaya devam edilmelidir” olacaktır.

Çalışma çıktılarını değerlendirirken anti-tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık paternlerinin spoligoaileleri ile hasta uyruğu arasındaki korelasyonunu da değerlendirdik.

Bu bağlamda en az bir antitüberküloz ajana karşı dirençli suşları dirençli MTBK suşları olarak değerlendirdik. Bizim test izolatlarımızın yer aldığı majör spoligo aileleri içerisinde yer alan en az bir ilaca dirençli Türk uyruklu yerli hasta izolatlarımızın T1 ve TUR içindeki oranlarının sırası ile 20/35 (%57.1) ve 10/35 (%28.6) olduğunu Suriyeli hasta izolatları içinde bu oranların yine sırası ile 7/17 (%41.2) ve 4/17 (%23.5) olduğunu gördük. Bu veriler her iki hasta popülasyonunda da T1 ailesindeki dirençli izolat oranının TUR ailesi içerisindeki dirençli izolat oranından istatistiki yönden anlamlı şekilde farklı olduğu, her iki spoligo ailesinde de Türk uyruklu yerli hasta izolatlarının suriye uyruklu hasta izolatlarından istatistiki yönden anlam ifade etmeyen oransal yükseklik gösterdiklerini belirledik. Yani genel olarak T1 ailesi üyeleri özellikle de ve Türk uyruklu hasta izolatları ilaç direnci yönünden daha yüksek prevalans oranına sahipti (Tablo 4.12).

Hasta profilleri, epidemiyolojik amaçlı olarak 24 lokus MIRU-VNTR ve TB-SPRINT yönteminin kullanıldığı bizim çalışmamıza benzer, en azından yerli hastalardan izole edilen MTBK suşlarının direnç ve spoligotip dağılımlarının korole edildiği bir çalışmaya rastlamadık. Ancak İzmir’de 2007 ve 2017 yılında yılında Çavuşoğlu ve arkadaşlarının MIRU-VNTR ve IS6110-RFLP gibi farklı yöntemler kullanarak yaptıkları rifampine dirençli ve MDR suşların klonal dağılımlarını tespit çalışmaları amaç ve sonuç olarak bizim çalışmamız ile kıyaslanabilir kriterler taşımamaktadır. Bu sebep ile sonuçlarımız tartışılabilir özellik göstermemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölge genelinde Türkiye Cumhuriyeti ve Suriye uyruklu hastalardan izole ettiğimiz anti tüberküloz ajanlara karşı duyarlı ve dirençli *M.tuberculosis* kompleks suşlarının Spoligotipleme ve MIRU-VNTR yöntemleri ile muhtemel klonal ilişkilerinin belirlenmesi ve suşların toplum içindeki hareketinin izlenmesi planladığımız çalışmamızda;

1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin farklı illerden toplanmasına karşın en yüksek izolat oranının Adana ilinde yoğunlaştığını ve bunu Gaziantep'in izlediğini (Tablo 4.1),
2. MDR-TB izolatları hasta uyruklarına göre değerlendirildiğinde, T.C. vatandaşlarının %55.9'unun ve yabancı uyruklu vatandaşların ise %30.8'inin çoklu ilaç dirençli tüberküloz hastası olduğunu (Tablo 4.2),
3. Direnç profilleri illere göre incelendiğinde Adana'nın en yüksek dirençli örnek sayısına sahip il olduğunu (Tablo 4.3),
4. Genotipik direnç testleri sonucunda, mutasyonların sıklıkla rifampisin direnci için *rpoB* geninin 531. kodonunda, izoniyazid direnci için ise *katG* geninin 315. Kodonunda gerçekleştiğini (Tablo 4.6),
5. İzolatlarımızın tamamının birden fazla suşlu 8 küme ve 24 unique profil olmak üzere toplamda 32 farklı spoligotip profili verdiğini (Tablo 4.7),
6. Çalışmamızda majör spoligotip ailelerinin T1 ve TUR olduğunu (Tablo 4.8),
7. MDR-TB hastalarından izole edilen suşlarda belirlenen majör spoligotipinde çalışma genelindeki T1 ailesi ile benzer olduğunu (Şekil 4.6),
8. Türk ve yabancı hastalara özgü spoligotip ailelerinin belirlendiği ancak yabancı hastalarda bu spoligotiplerin MDR-TB izolatları ile ilişkili olmadığını (Tablo 4.9),
9. Gruplandırılmayan ve/veya veritabanlarında bulunmayan orphan suşlarının çoğunlukla yabancı uyruklu hastalara ait klinik materyallerden izole edildiğini (Tablo 4.9),

10. Çalışmaya dahil edilen izolatların MIRU-VNTR yöntemi ile birden fazla suş içeren 10 küme ye dağıldığını, yani MIRU-VNTR'ın spoligotyping yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu,
11. MIRU-VNTR yöntemi ile farklı hastalardan izole edilen MDR ve/veya duyarlı suşların klonal olarak benzerlik gösterdiği, bu sebeple etkin süveyans ve kontrol programlarının önemli olduğunu,
12. Çalışmamızda majör aileler olarak belirlenen T1 ve TUR spoligotiplerinden MDR-TB suşlarının oluşturduğu kümeler olduğunu, bu sebeple dirençli suşların bulaşında moleküler epidemiyolojik yöntemlerin önemli olduğunu,
13. Aynı hastaya ait farklı zamanlarda alınan örneklerden izole edilen suşların farklı spoligotip ve MIRU-VNTR profili gösterdiği, bu sebeple tüberküloz rekürrensinde hasta yönetiminde reinfeksiyon reaktivasyon ayırımında moleküler epidemiyolojik yöntemlerin önemli olduğunu,
14. Aynı hastaya ait olan iki farklı izolatın farklı kümeler içinde yer aldığı ve farklı spoligotip ailelerine mensup olduğunu bu sebeple tüberküloz reinfeksiyonu olduğunu,
15. Aynı soyisimli hastaların bir küme oluşturması bulaşın hasta portörden aile içi yakın temas ile gerçekleştiğini,
16. Çiftçiliğin yaygın olduğu bölgemizde, izolatlarımız arasında hayvan kökenli *Mycobacterium bovis* suşlarının bulunduğunu tespit ettik.

Her ne kadar filogenetik ağaç oluşturken kullandığımız yöntem yeni ve son derece güvenilir tüm genom sekanslama ile valide edilmiş sonuç üretme yeteneğinde olsada, vaka sayımızın istatistiki yönden daha güvenilir ve kullanılabilir sonuçlar üretmek için yeterli olmadığına ancak kullandığımız yöntemlerin sadece filogenetik veya klonal ilişkiyi ortaya koyan epidemiyolojik süveyansa değil, bilindiği üzere reinfeksiyon reaktivasyon ayırımına da katkı sağladığına, dirence sebep olan mutasyonlar arasında bazılarının istatistiki yönden anlamlı farklara sahip olmakla beraber bu sayıların ve orphan suşların sağlıklı yoruma imkan verecek kadar çok olmamasına rağmen, bulgularımıza dayanarak Suriye'li hastalardan bölgemize taşınan veya yerli hastalardan Suriyeli göçmenlere bulaştırılan MTBK genotiplerinin varlığı ve

oranı için ileride yapılacak çalışmalara indeks olma özelliğinde sonuçlar ürettiğimize, bu sebeple benzer çalışmanın periyodik olarak tekrarlanarak MTBK genotiplerinin izlenmesinin gerekli olduğuna getirilmiştir.



KAYNAKLAR

1. **Organization WH.** WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. World Health Organization; **2016**.
2. Organization WH. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization;. 2019.
3. **Klotoe BJ, Kurepina N, Zholdibayeva E, Panaiotov S, Kreiswirth BN, Anthony R, Sola C, Refregier G.** NTF-RINT, a new method for the epidemiological surveillance of MDR Mycobacterium tuberculosis L2/Beijing strains. *Tuberculosis (Edinb)*, **2020**; 120: 101894.
4. **Chen W, Xia Y, Huang F.** Global Tuberculosis Surveillance. Handbook of Global Tuberculosis Control: Springer; **2017**. p. 451-470.
5. **Sezen F, Albayrak N, Özkara Ş, Karagöz A, Alp A, Ağca FD, Süer AI, Müderris T, Ceyhan I, Durmaz R.** Ulusal Tüberküloz Laboratuvar Sürveyansına İlk Adım; Ankara, 2011. *Mikrobiyol Bul*, **2015**; 49: 143-155.
6. **Mariandyshev A, Eliseev P.** Drug-resistant tuberculosis threatens WHO's End-TB strategy. *Lancet Infect Dis*, **2017**; 17: 674-675.
7. **Huber FD, Sanchez A, Gomes HM, Vasconcellos S, Massari V, Barreto A, Cesconi V, de Almeida Machado SM, Gomgnimbou MK, Sola C, Larouze B, Suffys PN, Saad MH.** Insights into the population structure of Mycobacterium tuberculosis using spoligotyping and RDRio in a southeastern Brazilian prison unit. *Infect Genet Evol*, **2014**; 26: 194-202.
8. **Sola C, Edgar Abadia SLH, Weill Fo-X.** Clustured regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) genetic diversity studies as a mean to reconstruct the evolution of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Tuberculosis (Edinb)*, **2015**; 95: S159-S166.
9. **Zeytinli ÜO, Köksal F.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen Mycobacterium tuberculosis Suşlarının Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, **2012**; 46: 202-210.
10. **Yayın SBASB.** Türkiye'de Verem Savaşı 2018 Raporu. **2018**.
11. **Brennan PJ.** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, **2003**; 83: 91-97.

12. **Köksal F, Yaman A.** Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı. *21 Yüz yılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu*, **2003**: 35-42.
13. **Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S, Eiglmeier K, Gas S, Barry C.** Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, **1998**; 393: 537-544.
14. **Jagielski T, Minias A, van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Zaczek A, Dziadek J.** Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, **2016**; 29: 239-290.
15. **Timpe A, Runyon EH.** The relationship of “atypical” acid-fast bacteria to human disease: a preliminary report. *The Journal of Laboratory Clinical Medicine*, **1954**; 44: 202-209.
16. **Woods GL, Washington JA.** Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis*, **1987**; 9: 275-294.
17. **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K.** A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**; 99: 3684-3689.
18. **Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL.** PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41: 1637-1650.
19. **Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A.** Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*, **2014**; 97: 5-19.
20. **Zhang L, Chen J, Shen X, Gui X, Mei J, Deriemer K, Gao Q.** Highly polymorphic variable-number tandem repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of Mycobacterium tuberculosis in Shanghai, China. *FEMS Microbiol Lett*, **2008**; 282: 22-31.
21. **Duncan H, Popp I.** World Migration Report 2018. **2017**.
22. <https://www.iom.int/turkey-iom-newsletter-march-2020>.
23. **Commision E.** European civil protection and humanitarian aid operations. **2017**.
24. **Agency UR.** Global Trends: Forced Displacement in 2018. **2019**.

25. <https://www.goc.gov.tr/gecici-koruma5638>.
26. **Petrini B, Hoffner S.** Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **1999**; 13: 93-97.
27. **Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, Van Helden PD, Victor TC.** Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current issues in Molecular Biology*, **2006**; 8: 97-112.
28. **Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S.** The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Genetics*, **2013**; 29: 160-169.
29. **Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S.** Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. *Drugs*, **2014**; 74: 1063-1072.
30. **Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM.** Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrobial agents chemotherapy*, **1996**; 40: 1024-1026.
31. **Papaventsis D, Casali N, Kontsevaya I, Drobniewski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V.** Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*, **2017**; 23: 61-68.
32. **Sun L, Zhang L, Wang T, Jiao W, Li Q, Yin Q, Li J, Qi H, Xu F, Shen C.** Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* induced by anti-tuberculosis treatment result in metabolism changes and elevation of ethambutol resistance. *Infection, Genetics Evolution*, **2019**; 72: 151-158.
33. **Suthum K, Samosornsuk W, Samosornsuk S.** Characterization of *katG*, *inhA*, *rpoB* and *pncA* in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from MDR-TB risk patients in Thailand. *J Infect Dev Ctries*, **2020**; 14: 268-276.
34. **Gupta R, Amrathlal RS, Prakash R, Jain S, Tiwari PK.** Spoligotyping, phenotypic and genotypic characterization of *katG*, *rpoB* gene of *M. tuberculosis* isolates from Sahariya tribe of Madhya Pradesh India. *J Infect Public Health*, **2019**; 12: 395-402.
35. **Margalith P, Beretta G.** Rifomycin. XI. taxonomic study on *streptomyces mediterranei* nov. sp. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, **1960**; 13: 321-330.
36. **Click ES, Kurbatova EV, Alexander H, Dalton TL, Chen MP, Posey JE, Ershova J, Cegielski JP.** Isoniazid and Rifampin-Resistance Mutations Associated With Resistance to Second-Line Drugs and With Sputum Culture Conversion. *The Journal of Infectious Diseases*, **2020**.

37. **Nakata N, Kai M, Makino M.** Mutation analysis of mycobacterial rpoB genes and rifampin resistance using recombinant Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**; 56: 2008-2013.
38. **Uddin MKM, Rahman A, Ather MF, Ahmed T, Rahman SMM, Ahmed S, Banu S.** Distribution and Frequency of rpoB Mutations Detected by Xpert MTB/RIF Assay Among Beijing and Non-Beijing Rifampicin Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Bangladesh. *Infect Drug Resist*, **2020**; 13: 789-797.
39. **Walker TM, Ip CLC, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TEA.** Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, **2013**; 13: 137-146.
40. **Klotoe BJ, Kacimi S, Costa-Conceicao E, Gomes HM, Barcellos RB, Panaiotov S, Haj Slimene D, Sikhayeva N, Sengstake S, Schuitema AR, Akhalaia M, Alenova A, Zholdybayeva E, Tarlykov P, Anthony R, Refregier G, Sola C.** Genomic characterization of MDR/XDR-TB in Kazakhstan by a combination of high-throughput methods predominantly shows the ongoing transmission of L2/Beijing 94-32 central Asian/Russian clusters. *BMC Infect Dis*, **2019**; 19: 553.
41. **Li Q, Wang Y, Li Y, Gao H, Zhang Z, Feng F, Dai E.** Characterisation of drug resistance-associated mutations among clinical multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Hebei Province, China. *J Glob Antimicrob Resist*, **2019**; 18: 168-176.
42. **Sun Q, Xiao T-y, Liu H-c, Zhao X-q, Liu Z-g, Li Y-n, Zeng H, Zhao L-l, Wan K-l.** Mutations within embCAB are associated with variable level of ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother*, **2018**; 62: 1279-1317.
43. **Lohrasbi V, Talebi M, Bialvaei AZ, Fattorini L, Drancourt M, Heidary M, Darban-Sarokhalil D.** Trends in the discovery of new drugs for Mycobacterium tuberculosis therapy with a glance at resistance. *Tuberculosis*, **2018**; 109: 17-27.
44. **Ismail S, Al Amry K, Aggor G, El Naggat H, Selim S.** Spoligotyping with pncA sequencing strategy conferring the transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Egypt. *Int J Mycobacteriol*, **2019**; 8: 211-217.
45. **Heifets L.** Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Multidrug-resistant tuberculosis: Springer; **2000**. p. 133-143.

46. **Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, Banada PP, Deshpande S, Shenai S, Gall A.** The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *MBio*, **2017**; 8: 812-817.
47. **Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E.** Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45: 2635-2640.
48. **Kouassi Kg, Riccardo A, Christian CD, André G, Férilaha C, Hortense S-A, Jean-Marc A, Maria CD, Mireille D.** Genotyping of mutations detected with GeneXpert. *International Journal of Mycobacteriology*, **2016**; 5: 142-147.
49. **Chetty S, Ramesh M, Singh-Pillay A, Soliman ME.** Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorg Med Chem Lett*, **2017**; 27: 370-386.
50. **Rahman A, Sahrin M, Afrin S, Earley K, Ahmed S, Rahman SM, Banu S.** Comparison of Xpert MTB/RIF assay and GenoType MTBDRplus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, **2016**; 11.
51. **Schuster SC.** Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*, **2008**; 5: 16-18.
52. **Guo J, Xu N, Li Z, Zhang S, Wu J, Kim DH, Marma MS, Meng Q, Cao H, Li X.** Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2008**; 105: 9145-9150.
53. **Ocheretina O, Merveille YM, Mabou MM, Escuyer VE, Dunbar SA, Johnson WD, Pape JW, Fitzgerald DW.** Use of Luminex MagPlex magnetic microspheres for high-throughput spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Port-au-Prince, Haiti. *J Clin Microbiol*, **2013**; 51: 2232-2237.
54. **Gomgnimbou MK, Klotoe BJ, Molina B, Dominguez J, Refrégier G, Sola C.** An "all-in-one" solution for simultaneous spoligotyping and drug resistance gene analysis of *Mycobacterium tuberculosis*: TB-SPRINT and TB-SPRINTplus. *International Journal of Mycobacteriology*, **2015**; 4: 13-14.
55. **Gomgnimbou MK, Abadia E, Zhang J, Refregier G, Panaiotov S, Bachiyska E, Sola C.** "Spoligorifotyping," a dual-priming-oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multianalyte microbead-based hybridization system. *J Clin Microbiol*, **2012**; 50: 3172-3179.

56. **Surucuoglu S, Gunal S, Ozkutuk N, Bicmen C, Ozsoz A, Gazi H, Durmaz R.** Molecular diversity of drug resistant mycobacterium tuberculosis strains in Western Turkey. *Balkan Med J*, **2012**; 29: 160-165.
57. **Tasbakan MS, Akdag D, Kahraman H, Akyol D, Tasbakan M, Cavusoglu C.** Culture proven extra pulmonary tuberculosis: drug susceptibility and genetic profile analysis. *Tuberk Toraks*, **2018**; 66: 234-238.
58. **Kisa O, Tarhan G, Gunal S, Albay A, Durmaz R, Saribas Z, Zozio T, Alp A, Ceyhan I, Tombak A, Rastogi N.** Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates in Ankara, Turkey. *PLoS One*, **2012**; 7: e30331.
59. **Van Embden J, Cave MD, Crawford JT, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick T.** Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, **1993**; 31: 406-409.
60. **Das S, Paramasivan C, Lowrie D, Prabhakar R, Narayanan P.** IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, south India. *Tuber Lung Dis*, **1995**; 76: 550-554.
61. **Radhakrishnan I, Manju Y, Kumar RA, Mundayoor S.** Implications of Low Frequency of IS 6110 in Fingerprinting Field Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Kerala, India. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39: 1683-1683.
62. **Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Fauville-Dufaux M, Rastogi N.** Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45: 4027-4035.
63. **Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C.** Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. *Mol Microbiol*, **2000**; 36: 762-771.
64. **Mazars E, Lesjean S, Banuls A-L, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P.** High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**; 98: 1901-1906.
65. **Supply P.** Multilocus variable number tandem repeat genotyping of Mycobacterium tuberculosis. *Technical Guide*, **2005**; 6: 1-74.
66. **Frothingham R, Meeker-O'Connell WA.** Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol*, **1998**; 144: 1189-1196.

67. **Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D.** Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44: 4498-4510.
68. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*, **1997**; 35: 907-914.
69. **Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S.** Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*, **2013**; 45: 1176-1182.
70. **Diamond JM.** Guns, germs and steel: a short history of everybody for the last 13,000 years. Random House; **1998**.
71. **Brites D, Gagneux S.** Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunological Reviews*, **2015**; 264: 6-24.
72. **Rastogi N, Sola C.** Molecular evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Tuberculosis*, **2007**; 53-91.
73. **Niemann S, Merker M, Kohl T, Supply P.** Impact of Genetic Diversity on the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Microbiol Spectr*, **2016**; 4.
74. **Coscolla M, Gagneux S.** Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*, **2014**; 26: 431-444.
75. **Merza MA, Farnia P, Salih AM, Masjedi MR, Velayati AA.** The most predominant spoligopatterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates among Iranian, Afghan-immigrant, Pakistani and Turkish tuberculosis patients: a comparative analysis. *Chemotherapy*, **2010**; 56: 248-257.
76. **Gencer B, Shinnick TM.** Molecular genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Am J Infect Dis*, **2005**; 1: 5-11.

77. **Abadia E, Zhang J, dos Vultos T, Ritacco V, Kremer K, Aktas E, Matsumoto T, Refregier G, van Soolingen D, Gicquel B.** Resolving lineage assignation on Mycobacterium tuberculosis clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infect Genet Evol*, **2010**; 10: 1066-1074.
78. **Dos Vultos T, Mestre O, Rauzier J, Golec M, Rastogi N, Rasolofo V, Tonjum T, Sola C, Matic I, Gicquel B.** Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of Mycobacterium tuberculosis. *PloS one*, **2008**; 3.
79. **Refregier G, Abadia E, Matsumoto T, Ano H, Takashima T, Tsuyuguchi I, Aktas E, Comert F, Gomgnimbou MK, Panaiotov S, Phelan J, Coll F, McNERNEY R, Pain A, Clark TG, Sola C.** Turkish and Japanese Mycobacterium tuberculosis sublineages share a remote common ancestor. *Infect Genet Evol*, **2016**; 45: 461-473.
80. **Kisa O, Albay A, Baylan O, Tozkoparan E, Acikel CH, Doganci L.** Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates at the Military Medical Academy in Ankara, Turkey. *Res Microbiol*, **2007**; 158: 318-323.
81. **Gomgnimbou MK, Hernandez-Neuta I, Panaiotov S, Bachiyska E, Palomino JC, Martin A, del Portillo P, Refregier G, Sola C.** Tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing: an all-in-one assay technique for surveillance and control of multidrug-resistant tuberculosis on Luminex devices. *J Clin Microbiol*, **2013**; 51: 3527-3534.
82. **Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK.** Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res*, **2007**; 35: e40.
83. **Cavusoglu C, Yilmaz FF, Durusoy Onmus IR, Bozdemir T, Tasli H, Hosgor Limoncu M.** Genotype distribution of Mycobacterium tuberculosis in the Aegean Region and associated demographic factors. *Turk J Med Sci*, **2017**; 47: 1593-1601.
84. **Karsligil T, Bayram A, Eksi F.** Determination of genotypic varieties and genotyping of multiple drug-resistant tuberculosis by the RFLP and spoligotyping methods. *Turk J Med Sci*, **2016**; 46: 1502-1511.
85. **Yula E, İnci M.** Hatay İlinde İzole Edilen Mycobacterium Tuberculosis İzolatlarının Spoligotyping Yöntemi İle Genotiplendirilmesi. *Medical Science*, **2012**; 7: 38-43.
86. **Otlu B, Durmaz R, Gunal S, Sola C, Zozio T, Rastogi N.** Beijing/W and major spoligotype families of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from tuberculosis patients in Eastern Turkey. **2009**.

87. **Aktaş E, Zozio T, Cömert F, Külah C, Aydın O, Rastogi N, Sola C.** A first insight into the genetic diversity and population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Zonguldak, Turkey. *Clin Microbiol Infect*, **2008**; 14: 55-59.
88. **Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Yaman A, Cavusoglu C, Guney C, Sola C, Rastogi N.** Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. *Infect Genet Evol*, **2007**; 7: 513-519.



ÖZGEÇMİŞ

25.07.1990 tarihinde Adana’ da doğdu. İlkokula İsmet İnönü İlköğretim okulunda başlayıp, ilkokul ve ortaokulu Adana Gündoğdu Kolejin’i bitirdi. 2007 yılında Özel Gündoğdu Fen Lisesi’nden mezun oldu. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı. 2013 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamlamasını takiben Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitime başladı.

