

70538

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)  
YÖNTEMİ KULLANILARAK  
*Mycobacterium tuberculosis*  
SUŞLARININ TIPLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Selami Günal**  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**Danışman**  
**Prof.Dr.Rıza DURMAZ**

**EYLÜL - 1997, MALATYA**

## TEŐEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleşmesinde büyük katkıları bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rıza Durmaz'a, yardımlarını esirgemeyen Sayın hocalarım Prof. Dr. Bengül Durmaz, Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil Özerol'a, çalışma arkadaşlarım Dr. Mehmet Köroėlu'na, Biyolog Barış Otlu'ya ayrıca Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü, Tüberküloz Araştırma ve Referans Laboratuvar Őefi Dr. Feyzullah Gmřl'ye ve eşim Serap'a teőekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

I - GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
II - GENEL BİLGİLER.....	3
III - MATERYAL VE YÖNTEM .....	18
IV - BULGULAR .....	23
V - TARTIŞMA .....	32
VI - SONUÇLAR .....	38
VII - ÖZET .....	39
VIII - KAYNAKLAR .....	40

## TABLULAR

	<b>Sayfa</b>
1. Tablo 1 Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden Alınan 160 <i>M. tuberculosis</i> Suşunun İllere Göre Dağılımı. ....	18
2. Tablo 2 Araştırmada Kullanılan 181 <i>M. tuberculosis</i> Suşlarının Tiplendirme Sonuçları.....	24-25
3. Tablo 3 Türkiye Genelinde En Fazla Görülen İlk 10 Genotip.....	26
4. Tablo 4 En Fazla Görülen 5 Genotip'in Antitüberküloz İlaçlara Dirençli ve Duyarlı Suşlar Arasındaki Dağılımı.....	27



## ŞEKİL ve RESİMLER

1. **Şekil 1** Amplifikasyonda kullanılan primerlerin  
baz dizisi ve lokalizasyonu .....22
2. **Resim 1** Aynı *M. tuberculosis* suşundan 10 ayrı  
zamanda yapılan tiplendirme sonucu.....29
3. **Resim 2** Aile içi infeksiyonu olan bireylerden alınan  
örneklerden yapılan tiplendirme sonuçları.....30
4. **Resim 3** Epidemiyolojik yönden birbiriyle ilişkileri olmayan  
bireylerden alınan örneklerle yapılan tiplendirme sonucu.....31



## GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlığın en eski sağlık sorunlarından birisi olan tüberküloz, tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen günümüzde de özellikle az gelişmiş ülkelerde olmak üzere bütün dünyada yaygın olarak görülmektedir (1-3).

Ülkemiz için de tüberküloz önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Özellikle son yıllarda tüberkülozlu hasta sayısı bütün yaş gruplarında hissedilir oranda artmaktadır (4 ). Yurdumuzdaki bu duruma yol açan faktörler; hastaların yeterli olarak izlenememesi, düzenli bir tedavinin uygulanamaması, erken tanı yöntemlerinin yetersizliği, hasta yakınlarının yeterli düzeyde kontrol edilememesi, koruyucu aşıların düzenli yapılmaması, sosyo-ekonomik olumsuz koşullar ve hekimlerin konuya yeterli ilgi göstermemesi şeklinde özetlenebilir (2,4).

Gelişmiş ülkelerde tüberküloz, AIDS gibi immun sistemin baskılandığı durumlarda daha sık görülmektedir. Bu sebeple HIV epidemisine paralel olarak tüberküloz olgularında dramatik bir artış söz konusudur . Bu ülkelerde görülen tüberküloz vakalarındaki artıştan daha önemlisi , sıklıkla çoğul direnç gösteren *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının etken olmasıdır. Çünkü bu suşlarla enfekte olan hastaların ölüme kadar geçen ortalama yaşam süreleri 4-16 hafta gibi kısadır. Bu tip hastaların tedavisi mümkün olmamakta, adeta çaresiz kalınmaktadır (5).

Tüberküloz basilinein üretilmesi, idantifikasyonu ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılan klasik yöntemlerin uzun zaman alması eskiden beri sorun oluşturmaktadır. Etkenin kısa sürede tanımlanması ve ilaç direncinin saptanması enfeksiyon kaynağının belirlenmesi ve etkin bir tedavi için büyük önem taşımaktadır ( 6-9).

Günümüzde tüberkülozun tanısında çok kısa sürede sonuç alınmasına imkan veren moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerle hastalığın kısa sürede tanımlanmasının yanında , etkenin ilaç direncinin saptanması ve alt tiplendirmesi yapılarak enfeksiyon kaynağının tesbit edilmesi hedeflenmektedir.

Bu çalışmada, moleküler yöntemlerden Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) tekniği kullanılarak ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen *M.tuberculosis* suşlarının epidemiyolojik açıdan birbirleriyle olan ilişkilerini ortaya koymak ve saptanan genotiplerle antitüberküloz ilaç direnci arasında bağlantı olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

Bin dokuz yüz seksen dört yılına kadar modern tıbbın tüberkülozu ortadan kaldırdığına inanılıyordu. Ancak 1985 yılından itibaren tüberkülozun halk sağlığını tehdit ettiğine dair sinyaller alınmıştır(2,4). Günümüzde tüberküloz geri dönmektedir. Eğer korunabilir bir hastalık olan tüberküloz hakkında halk eğitilmez ise enfeksiyon artmaya devam edecektir. Dünya nüfusunun 1/3'ü tüberküloz kompleksi bakterilerle (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum ve M. microti) enfektedir. Tedavi edilmeyen tüberkülozlu bir kişi yılda 10-15 kişiyi enfekte edecektir (3,4).

Yurdumuzda Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığının verilerine göre, enfekte olgu sayısı 1993 yılı itibariyle 10 milyon kişi olarak belirlenmiştir. Bu kişiler ülkemiz için büyük bir enfeksiyon havuzu oluşturmaktadırlar. Bu rakamın her yıl %1-3'ünün hasta olacağı düşünülürse sorunun boyutları ortaya çıkmaktadır (2 ).

Günümüzde gerek ülkeleri kıyaslamada gerekse bir ülkede verem savaşı çalışmalarının etkinliğini izlemede “yıllık enfeksiyon riski” adı verilen ve kişinin bir yıl içinde tüberküloz basili ile karşılaşma olasılığı anlamına gelen bir index kullanılmaktadır. Etkin tedavi yöntemlerinin gelişmesi, korunma ve kontrol önlemlerinin alınması ile “ yıllık enfeksiyon riski” gelişmiş ülkelerde her yıl azalarak düşük seviyelere inmiştir. Gelişmekte



olan ülkelerde ise bu risk ya hiç azalmamakta ya da çok az düşüş göstermektedir.

Tüberküloz uzmanlarına göre, korunma yöntemlerinin uygulanmadığı takdirde 1999 yılına kadar dünyada 90 milyon yeni tüberküloz vakası ve 30 milyon ölüm görüleceği tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre, çoğul ilaç direnci görülen tüberküloz vakalarında da artış vardır. ABD'deki yeni vakaların % 70'inden bu tip *M. tuberculosis* suşları izole edilmektedir (2).

Tüberküloz ırk, yaş ve gelir seviyesine bakılmaksızın her kesimi etkileyebilir, istisna olarak HLA BW15 geni taşıyan zenciler ile HLA DR2 geni taşıyan kıızılderililer hastalığa yatkın kişilerdir. Ancak bazı gruplarda risk daha yüksektir. Bu gruplar içinde HIV ile enfekte kişiler, tüberkülozlu hastalarla ilişkide olanlar, tıbbi bakımı kötü ya da ihmal edilen kişiler, yoksullar, yüksek tüberküloz insidansı olan ülkelere gelenler, mahkumlar, alkolikler, intravenöz ilaç kullananlar, kreşteki çocuklar, yaşlılar ve tüberkülozlu hastalarla teması olan hastabakıcıları sayılabilir (4).

Tüberküloz enfeksiyonu sağlık personeli arasında genellikle sessiz seyrederek. Aktif enfeksiyon riski % 10 dur. Diğer gruplarda bu risk daha yüksektir.

## **Bakterinin Genel Özellikleri**

Tüberkülozun etkeni olan bakteri 1882 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve funguslar gibi yavaş üremeleri nedeniyle *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir.

Basiller 0,2-0,5 mm eninde, 1-4 mm boyundadır. Tek tek küçük zincirler veya küçük demetler halinde bulunurlar. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz bakterilerdir.

Mikobakteri'lerin hücre duvar yapısı diğer bakterilerden farklıdır. Duvarın ana iskeleti peptidoglikan ve arabinogalaktan moleküllerinin fosfodiester bağları ile bağlanması ile meydana gelir. Ayrıca bu moleküllerin arasında yer alan uzun zincirli yağ asitlerinden mikolik asit duvar yapısının önemli bir bölümünü oluşturur. Hücre duvarında bulunan bu yüksek lipid miktarı bakterinin dış etkilere karşı direncinde, virulansında ve boyanma özelliğinde rol almaktadır.

Mikobakteri'lerin boyanmasında en çok kullanılan yöntem Ziehl-Neelsen dir. Bu yöntemde kullanılan boya karbol fuksindir. Fuksin hücre duvarında bulunan mikolik asitle ısı yardımıyla birleşerek mikolat-fuksin kompleksini oluşturur. Bakteri alkol ve asit alkol ile yapılan dekolorasyona rağmen boyayı geri vermez. Bu özellikleri nedeniyle aside dirençli (ARB) veya aside ya da alkole dirençli (AARB) bakteri gibi isimlerle anılırlar. Bu yöntemle bakteri parlak kırmızı renkte boyanır (10).

## **Antijenik Yapıları**

Mikobakterilerin fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklılıklar gösteren çok sayıda antijenik yapısı mevcuttur. Bunlar, lipoproteinler, ısı şok proteinleri , sitoplazmik, membrana bağlı ve salgılanan proteinler olarak özetlenebilir.

- Old tüberkülin: Tüberkülin testinde kullanılan ısıya dirençli protein.
- Trehaloz glikolipidler (Kord faktör): Virulansla ilgilidir.
- Sulfolipidler: Kord faktöre sinerjik etki yapar.
- WaxD : Hücre duvarında bulunur geç tip hipersensitivite sorumludur.
- 65kDA Protein: Isı şok proteindir.
- Antijen 60: Sitoplazmik proteindir.
- Antijen 85: Salgısal bir proteindir. A60 proteininde olduğu gibi tanısal amaçla ELISA testlerinde kullanılmaktadırlar .

## **Üreme Özellikleri**

Zorunlu aerob bakterilerdir, ortamda % 5-10 CO<sub>2</sub> varlığında daha iyi ürerler. Optimal üreme ısıları 35-37<sup>0</sup> C dir. Mikobakteri kompleksi dışındaki bazı türler 24-42<sup>0</sup> C lerde de üreyebilmektedirler, bu da türlerin ayırımında kullanılan önemli bir kriterdir (1).

*M. tuberculosis*'i üretmek için semi-sentetik ve organik besiyerleri kullanılmaktadır. Genellikle Lowenstein-Jensen ve Middlebrook besiyerleri

kullanılmaktadır . Burada karbon kaynağı olarak gliserin, glikoz ve sitratlar, azot kaynağı olarak aminoasitler ve amonyum tuzları kullanırlar. Ayrıca üremeyi hızlandırmak için bir miktar potasyum, demir, mağnezyum tuzları sülfat ve fosfatlar gereklidir. Diğer bakterilerin üremesini engellemek için inhibitör madde olarak malaşit yeşili kullanılır. Tüberküloz basilleri diğer bakterilere oranla çok daha yavaş ürer. Generasyon süresi 16-20 saat kadardır. Bu nedenle kültür sonuçlarının alınabilmesi için 4-6 haftalık bir süreye gerek vardır (1).

### **Patogenez ve Patoloji**

Bakterinin salgıladığı özel bir toksini yoktur, virulansında birden fazla faktör etkilidir. Konağın direnci, bakterinin giriş yeri ve miktarı, kord faktör ve sulfatidler patogenezde rol oynayan önemli faktörlerdir (3).

*M. tuberculosis* aerop bir bakteri olduğundan PO<sub>2</sub> 140 mmHg olduğu ortamlarda iyi ürerler. Bu nedenle vücutta akciğerlerin apikal bölgelerine, böbreklere ve kemiklerin uç kısımlarına yerleşme eğilimleri vardır. Buna karşın zayıf PO<sub>2</sub> basıncının olduğu karaciğer, dalak gibi organlara yerleşmeleri , dissemine enfeksiyonlar dışında , pek mümkün değildir.

Tüberküloz basilleri genellikle solunum yoluyla bulaşmakla birlikte, duyarlı kişilere genitoüriner sistem, deri ve gastrointestinal yollardan da bulaşabilmektedir. Aktif tüberkülozlu kişinin konuşma, öksürme, aksırma ve balgamı ile etrafa saçılan basiller 1-10 mm'lik damlacıklar içinde

solunum yoluna girer ve çok küçük olduklarından alveollere kadar ulaşırlar. Alveolar makrofajlar tarafından tutulan mutant inokulum 1-3 organizmadan fazla değildir (1,2,4).

İnhale edilen bakterinin hastalık oluşturması hem basilin virulansına hem de makrofajların öldürme kapasitelerine bağlıdır. Eğer bakteriler bu safhada öldürülmez ise lenfohematojen yolla yayılma meydana gelerek bir çok doku ve organı tutarlar ve lezyonlar oluşur. Bunların bir çoğu iyileşir, bununla birlikte reaktivasyon meydana gelirse milyen tüberküloz ortaya çıkar. Enfeksiyondan 2-8 hafta sonra hücresel immünite ve hipersensitivite ortaya çıkar, tüberkülin testi pozitifleşir (4). Aktif tüberküloz geçiren bireylerde primer enfeksiyonun iyileşmesinden sonra immün süpresyon sonucu reaktivasyon gelişebilir. Bu genellikle basille karşılaşmadan sonraki 3 yıl içinde immün yetmezlikli hastalarda görülür. Hastalığın ilerlemesini sağlayan faktörler immün sistemin zayıflaması ile ilgili faktörlerdir. Bunlar içinde; tekrarlayan hastalıklar özellikle *diabetes mellitus*, primer immün yetmezliğe neden olan malign hastalıklar, toksik kemoterapi veya steroid tedavisi gerektiren hastalıklar, astım , kollojen vasküler hastalıklar, kötü beslenme , alkol ve ilaç bağımlılığı, ileri yaş, sigara içme ve HIV enfeksiyonları sayılabilir.

Tüberkülozun klinik belirtilerinin ortaya çıkmasındaki en önemli faktör tutunma yeridir. Akciğerlerde primer enfeksiyon oluşursa, ateş,

halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, gece terlemeleri, öksürük, balgam çıkarma ve göğüs ağrısı sıklıkla görülen semptomlardandır. ABD’de yapılan bir çalışmada HIV enfeksiyonu epidemisinden önce, yeni tesbit edilen tüberküloz olgularının % 85 ‘inde pulmoner tutulum , kalan % 15’inde ise ekstrapulmoner tutulum veya her iki yerde de görülürken, HIV ile enfekte kişilerde yapılan çalışmada pulmoner tutulum % 38, ekstrapulmoner tutulum % 30 ve her iki bölgedeki tutulum % 32 oranında bulunmuştur.

### **Laboratuvar Tanısı**

1. **Mikroskopik inceleme:**Tüberküloz basilinin en hızlı ve en ucuz tanı yöntemidir. Alınan materyalden doğrudan veya tercihen homojenizasyon işleminden sonra hazırlanan preparat, Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanarak incelenir. Fazla duyarlı bir yöntem olmamasına rağmen çabuk sonuç alınması nedeniyle laboratuvarlarda sıklıkla uygulanmaktadır ve tanı değeri yüksektir. Ayrıca pratikte fazla kullanılmamakla birlikte, floresan boyalarla boyanarak, U.V. mikroskopunda veya özel diyafram takılarak normal ışık mikroskopunda preparatlar incelenebilmektedir (10).

2. **Kültür:** Duyarlılığı, direkt preparata göre daha fazladır. Genellikle Lowenstein - Jensen ve Middlebrook besiyerleri kullanılmaktadır. Burada koloni oluşumu 3-4 hafta gibi uzun bir zaman almaktadır. Kültür negatif diyebilmek için mutlaka 6 hafta beklenilmesi gerekmektedir. Son yıllarda bakteri metabolizması sonucu oluşan radyoaktif CO<sub>2</sub> miktarını radyometrik

olarak ölçüp üremeyi daha kısa sürede gösterebilen ve aynı zamanda antimikobakteriyal duyarlılık testi yapmaya imkan sağlayan cihazlar geliştirilmiştir (4).

### 3. *Immunolojik tanı:*

a) **Serolojik tanı:** Bakterinin çeşitli antijenlerine karşı (özellikle A60 proteini ve Antijen 85 kompleksine) oluşan antikorların kompleman fiksasyonu, hemaglutinasyon ve Enzim Linked Immünosorbent Assay (ELISA) yöntemleriyle araştırılmasıyla yapılır. Çapraz reaksiyon vermeleri ve antijenik yapılarının değişkenlik göstermesi nedeniyle tanı değeri olmamakla birlikte, hastadan inceleme materyallerinin alınamadığı durumlarda nadiren kullanılmaktadır (11,12).

b) **Tüberkülin testi:** Bakteriye karşı oluşan geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonunu göstermeye yönelik bir deri testidir. Mantoux metodu ve Pürifiye protein derivesi (PPD) antijeni kullanılarak uygulanır.

### 4. *Moleküler Biyolojik Yöntemlerle tanı*

DNA hibridizasyonu ve nükleik asit çoğaltma (NAÇ) metodları gibi moleküler yöntemlerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanılmasından beri , bu testler tüberkülozun erken tanısında denenmiştir (13,14).

Bu testlerden DNA prob temeli olan hibridizasyon yöntemleri özellikle dokuda mikroorganizmanın lokalizasyonu ve dağılımını tesbit

etmek için kullanılırken, NAÇ metodunda; klinik örnekte olabilecek belirli bir mikroorganizmanın DNA veya RNA'sı, çoğaltıldıktan sonra çeşitli yöntemlerle sonuç görüntülenerek tanı konulmaktadır. NAÇ metodları arasında en çok kullanılan yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) dur.

## **Tüberküloz Basillerinin İdentifikasyonunda ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler;**

### **A. Klasik Yöntemler**

Klasik yöntemlerle tiplendirmenin temelinde bakterinin biyokimyasal özelliklerinin araştırılması yatmaktadır. Bu yöntemler:

1. Üreme ısısı
2. Pigment oluşumu
3. Katalaz deneyi
4. Mac Conkey agarda üreme
5. Niacin deneyi
6. Pyrazinamidase deneyi
7. % 5'lik NaCl<sub>2</sub> ortamda üreme
8. Tellürit redüksiyonu
9. Tween 80 hidrolizi
10. Üreaz deneyi
11. Nitrat redüksiyon deneyi
12. Aryl sülfataz deneyi



13. Antimikobakteriyal ilaç duyarlılığının saptanması olarak sıralayabiliriz (10).

Yukarıda sözü edilen deneylerin büyük bir çoğunluğunda sekonder kültürler kullanıldığından sonuçların alınması uzun sürmektedir.

Serotip, biotip, bakteriyofaj duyarlılığı ve antimikrobial ajanlara karşı duyarlılık gibi fenotipik özelliklere dayanan tiplendirme yöntemlerinin tüberküloz basillerine uygulanmasında engeller vardır. *M. tuberculosis* suşları arasında biyokimyasal olarak bir çok benzer özelliklerin olması ve fenotipik bulguların kültür şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmesi nedenleriyle bu yöntemler, Mikobakteri'lerin tiplendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu tarz güçlüklerin üstesinden gelebilmek için tiplendirmede genetik yapının incelenmesi gündeme gelmiştir (15,16)

## **B. Moleküler Yöntemlerle Tiplendirme:**

### **I. DNA probları**

Prob; spesifik DNA baz çiftlerine bağlamak için kullanılan genel olarak 6-18 baz çifti uzunluğunda küçük bir (oligonükleotid) DNA parçasıdır. Oligonükleotidler, radyoaktif izotop veya bir boya ile etiketlenerek direkt olarak spesifik baz dizilerinin tesbit edilmesinde kullanılmaktadır. DNA probları ile özellikle klasik teknikler kullanılarak üretilen mikroorganizmaların hızlı tanımlanması ve NAÇ metodlarıyla birlikte kullanıldığında tiplendirilmede yapılabilmektedir (17,18).

Son yıllarda non-izotopik etiketleme sistemlerinin geliştirilmesi ile DNA prob teknolojisinin uygulama alanları genişlemiş, bir çok mikroorganizmanın tesbit ve tanımlanmasında rutin metodlara alternatif bir hale gelmiştir. Bununla birlikte, test süresinin uzun, işlemlerin kompleks olması, büyük miktarda nükleik asit bulunmasını gerektirmesi, yanlış negatif ve pozitif sonuç alınabilmesi dezavantajları arasındadır.

*Nükleik Asit Çoğaltma Metodları (NAC):*

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
2. Strand Displacement Amplification (SDA)
3. Ligase Chain Reaction (LCR)

*1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):* Bu metod farklı ısı derecelerinde uygulanan ve birbirini takip eden 3 işlemin belirli sayılarda tekrarlanması ile hedef nükleik asidin çoğaltılması esasına dayanır. Reaksiyon; bir tüp içerisine hedef nükleik asit, primerler, Taq DNA polimeraz, deoksitükleotid trifosfatlar (dNTPs),  $Mg^{++}$  tampon ve su konulduktan sonra çift sarmallı DNA'nın birbirinden ayrılması (denatürasyon), primerlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing) ve hedef DNA ile hibridizasyon yapan primerlerin 3' ucuna Taq DNA polimeraz enzimi yardımıyla nükleotitler eklenerek, primerlerin uzaması (extension) işlemlerinin tekrarlanması ile gerçekleşir(14,17).

Henüz yeni bir teknik olmasına rağmen oldukça geniş bir alanda kullanım imkanı bulmuştur. Özellikle in vitro koşullarda kültürü yapılamayan veya geç üreyen bakterilerin tanısında, birçok bakteriyel, viral, paraziter ve fungal enfeksiyonların tanısında, antimikrobiale direncin kısa zamanda belirlenmesinde (örn: tüberküloz basillerinde rifampisin direnci) ve mikroorganizmaların genotipik olarak tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (19-21). Kan, balgam, BOS, plevral mayii ve parafine gömülü doku gibi örneklerden hedef nükleik asit kolaylıkla izole edilebilmektedir(6,7,22).

2. Strand displacement amplification (SDA); Çift sarmallı DNA'nın denatürasyonundan sonra üç deoksinükleozid trifosfat ve deoksiadenozin 5 - (alfa-thio) trifosfat ile uygun primerler kullanılarak üzerinde “ restriction endonuclease site - specific nick” bölgeleri bulunan DNA'lar oluşturulmakta, sonra restriction enzimi ile DNA üzerinde kopmalar meydana getirilmektedir. Daha sonra DNA polimeraz enzimi kırılan zincirin kısa parçasının 3'ucundan başlayarak DNA sentezini yaparken, kopan DNA'ya ait uzun parçaların yer değiştirmesini sağlamaktadır. Yer değiştiren bu parçalar yeni reaksiyonların başlangıcında hedef DNA görevini üstlenmektedir. Kırılma, polimerizasyon, yer değiştirme işlemlerinden oluşan siklusun tekrarlanması ile amplifikasyon gerçekleşmektedir (14 ,23).

SDA yöntemi kompleks olmasına rağmen her reaksiyon basamağı aynı zamanda meydana gelir ve reaksiyonu başlatmak için ilave bir işlem

gerekmez. Başlangıçta 95<sup>0</sup> C’de denatürasyon yapma dışında SDA reaksiyonları izotermal koşullarda gerçekleşir. Otuz yedi santigrat derecelik ısı kontrol cihazı dışında özel laboratuvar donanımı gerektirmez. Enzimle katalizlenen tüm nükleik asit amplifikasyon işlemlerinde olduğu gibi, çözeltilerin ve örneklerin hedef DNA veya daha önceden amplifiye olan DNA ile kontamine olması önemli bir problem olmaktadır.

Son zamanlarda, SDA yöntemi klinik örneklerden *M. tuberculosis* DNA’sının amplifiye edilmesiyle tanıda, izolatların DNA sekanslarının belirlenmesi ile de tiplendirmede kullanılmaktadır.

### 3. Ligase Chain Reaction (LCR)

Bu metotta, iki küçük DNA primeri ve bu iki oligonükleotidi birbirinin ucuna bağlayan termo stabil ligaz enzimi kullanılır. Denatürasyon, annealing ve bağlama sikluslarından sonra DNA kopyası oluşur. Isı ile denatüre edilip kalıp DNA’dan oligonükleotidlerin ayrılması sağlanır. Daha sonraki siklуста birbirine bağlanan oligonükleotid çiftleri ve orjinal baz dizileri kalıp olarak kullanılır. Bu metotta kullanılan ilk primerler kalıp olarak kullanıldığı için, ikinci primerler birinci primerlere tamamen komplementerdir. İlk primerler amplifiye edilmezse ikinci primerlerde amplifiye edilememektedir. LCR’nin en önemli avantajları, yüksek derecede spesifik olması ve diğer amplifikasyon teknikleri ile birlikte kullanılabilmesidir. Her aşamada enzim

eklenmesi, nonspesifik ürünlerin oluşması ve kontaminasyon kontrol sistemlerinin olmaması dezavantajlarıdır ( 18).

## **II. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP):**

Genomik DNA'nın çok büyük bir molekül olması moleküler düzeyde incelenmesini zorlaştırır. Bu sorun "restriksiyon endonükleaz"ları adı verilen bir grup özel bakteriyel enzimin keşfinden sonra kısmen çözülmüştür. Bu enzimler çift sarmallı DNA yı daha küçük parçalara ayırırlar. Herhangi bir restriksiyon enzimi tarafından tanınan DNA dizisine restriksiyon bölgesi denir. Bu bölgeler DNA üzerinde rastgele yerlerde bulunurlar. Bu nedenle bu enzimler DNA'yı değişik büyüklükte parçalara böler. Nükleotid dizileri ve tanıma bölgelerinin uzunluğu açısından birbirinden farklı yüzlerce enzim vardır. Değişik kırma özgülükleri olan bu enzimler, analitik ayıraçlar halinde piyasada bulunmaktadır. Metodun uygulanması ortamda çok sayıda DNA bulunmasını gerektirdiğinden, sekonder kültür kullanılması ve bu işlemlerin uzun zaman alması dezavantaj olmasına rağmen epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan önemli bir yöntem olma özelliğini korumaktadır (24,25).

## **III. Baz dizi analizi:**

Sanger ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntemde, baz dizisi tayin edilecek, DNA'nın tek zincirinin komplementeri sentezlenerek kalıp DNA'nın baz dizisi tayin edilmektedir. Yöntemin kritik noktası sentezi

belirli noktalarda durdurmaktadır. Bunun için, her bazın bağı olduğu şekerin 2<sup>1</sup>, 3<sup>1</sup> dideoksi analogu sentezlenmiştir. Deney için dört tüp alınarak, her tüpe tek sarmallı DNA, DNA polimeraz 1 enzimi ve tampon konur. Her üç tüpe üç işaretli normal dNTP, bir adet ise ddNTP ilave edilmektedir. Önce normal dNTP'lar ile DNA polimeraz 1 enzimi varlığında kısa bir primer sentezlenir. Sonra sentez, kalıp DNA'daki timinin karşısına adenin gelinceye kadar devam eder. Bu noktadan sonra fosfodiester bağı yapılamadığı için zincir uzaması olmaz. Aynı deney her dNTP'tın dideoksi analogu yani ddTTP, ddGTP ve ddCTP kullanılarak ayrı ayrı tekrar edilir ve bu bazların komplementer DNA zincirine girdiği noktalar tespit edilir. Daha sonra bütün karışım akrilamid jel elektroforezine tabi tutularak sonuç gözlenir (26).

#### **IV. Diğer Moleküler Yöntemler**

Yukarıda bahsedilen yöntemler yanında insertion sequence (IS) primer setlerinin kullanıldığı yöntemler, rastgele seçilmiş bir primer kullanılarak yapılan arbitrarıy PZR ve çift primer setinin kullanıldığı yarı nested PZR yöntemleri de tiplendirmede kullanılmaktadır. Ayrıca katG geni ve rbo $\beta$  genine yönelik primerler kullanılarak izoniazid ve rifampisine dirençli suşlar tesbit edilebilmektedir (19,20,26-29).

## MATERYAL VE YÖNTEM

### A. Materyal:

**1. M. tuberculosis suşları:** Çalışmamızda Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Araştırma Enstitüsü, Tüberküloz laboratuvarına ülkemizin değişik bölgelerinden gönderilen ve katalaz, peroksidaz, niacin ve nitrat redüksiyon test sonuçlarına göre *M. tuberculosis* olarak tanımlanan 160 ve laboratuvarımızdan izole edilerek tanımlanan 21 suş ile tüberküloz hastalığı olan 4 aileye ait 13 kişiden alınan balgam numunelerinden hazırlanan DNA örnekleri kullanıldı. Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Araştırma Enstitüsünden alınan örneklerin illere göre dağılımı Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1:** Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden Alınan 160 *M. Tuberculosis* Suşunun İllere Göre Dağılımı

İLLER	SUŞ SAYISI
Ankara	27
Bursa	20
Eskişehir	10
İzmir	16
İzmit	22
Samsun	15
Sivas	21
Trabzon	29
TOPLAM	160

## 2. Çözeltiler:

a. TE tamponu : Önce 10 mM Tris-HCl içinde 1 mM EDTA hazırlanır. Bunun için; 315,12 mg Tris-HCL 200 ml distile suda iyice çözüldükten sonra çözeltiliye 74.45 mg EDTA eklenerek hazırlandı. Maddeler iyice çözüldükten sonra pH 8.0'a ayarlanıp sonra steril edilerek kullanıldı.

b. % 2'lik sodyum dodecyl sülfat (SDS): SDS 10 gr. 450 ml distile suda çözünür. İyice çözünmesi için 68<sup>0</sup> C su banyosunda bekletilir. Sonra toplam hacim 500 ml tamamlanır. pH 7.2'de kullanılır.

c. 1N NaOH: 20 gr. NaOH 500 ml distile suda çözünür ve otoklavda steril edildikten sonra kullanılır.

d. 1M HCL-1M Tris-HCL: 183 ml distile suya 17 ml konsantre hidroklorik asit (HCl) eklenerek 1M HCl hazırlanır. Bu çözeltinin üzerine 31.5 gr. Tris-HCl eklenerek iyice çözülür. Buzdolabında saklanır.

e. Doymuş Fenol: (Sigma P4557)

f. Kloroform :(Merk C2431)

g. Absolü Alkol: (Tekel)

h. De iyonize distile su: (Sigma, DNA RNA free)

i. Lizozim enzimi: (Sigma L6876)



## **B. Yöntem:**

**1. DNA Elde Edilmesi:** *M. tuberculosis* suşlarından DNA'nın izolasyonu için iki farklı metod kullanıldı. a) *Enzimatik yolla DNA izolasyonu*; b) *Isı ile DNA izolasyonu*. Birinci metodun işlemlerinin kompleks oluşu ve uzun zaman almasına rağmen oldukça hassas bir teknik olması nedeniyle uygulamada büyük önemi vardır.

### **a) Enzimatik Yolla DNA İzolasyonu:**

Mac Farland 1 eşeline göre hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve 80<sup>0</sup> C 'de 20 dk bekletilerek bakterilerin ölmesi sağlanır. Her örnek için 500 µl taze hazırlanmış ve içinde 20 mg/ml lizozim enzimi içeren TE (Tris-EDTA) tamponu eklenir. Otuzyedü santigrat derece de 2 saat su banyosunda bekletilir. İnkübasyon sonunda % 2'lik SDS (sodium dodecyl sülfat) ve 1N NaOH'in eşit karışımından 100 µl eklenir ve kaynar su banyosunda 5 dk. bekletilir. Oda ısısında soğuduktan sonra tüplere 50 µl 1M HCl-1M Tris-HCl ilave edilir, bu esnada karıştırılınca kaybolan presipitatın oluşumuna bakılır. Sonra oda ısısında 13.000 x g'de 5 dk. santrifüj edilir, üst kısım yeni bir tüpe alınarak üzerine 450 µl saturated fenol eklenir iyice karıştırıldıktan sonra 13.000 x g'de 3 dk santrifüj edilir. Bu işlem iki kez tekrar edilir. Süpernetan yeni bir tüpe alınır ve 450 µl kloroform ilave edilerek iyice karıştırılır. 13.000 x g'de 3 dk. santrifüj edilir. Yine süpernetan yeni bir tüpe alınır üzerine buzlukta

bekletilmiş 500 µl % 100'lük etanol eklenir, vorteks yapılır, oda ısısında 5 dk. bekletilir. Daha sonra 13.000 x g de 5dk. santrifüj edilir, alkol dikkatlice dökülür, pelletin üzerine bu defa % 70'lik alkolden 500 µl konarak 13.000 x g'de 5 dk santrifüj edilir alkol uzaklaştırılır, pelletin oda ısısında kuruması beklenir. Kuruyan pellet 20 µl çift deiyonize distile su ile sulandırılır ve -20<sup>0</sup> C'de kullanılıncaya kadar saklanır (30).

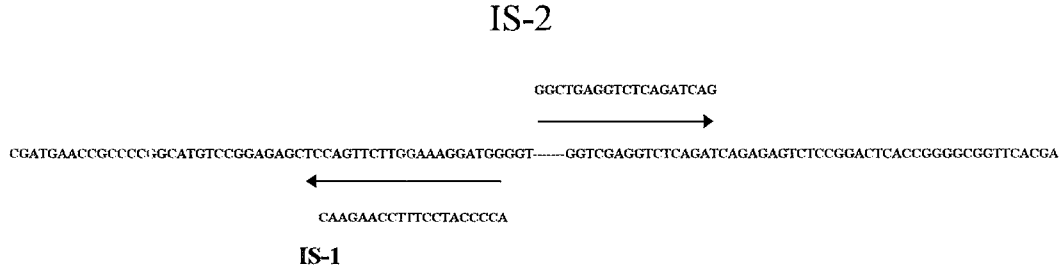
#### **b) Isı ile DNA İzolasyonu:**

Katı besiyerinde üretilmiş bakteri kolonilerinin kullanıldığı çalışmalarda başarıyla uygulanmaktadır. Mac Farland 1 eşeline göre hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 250 µl, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konur ve üzerine buzlukta bekletilmiş absolü etanoldan 583 µl ilave edilir. (etanolün final konsantrasyonu % 70 olmaktadır.) ve oda ısısında 1 saat bekletilir. İnkübasyon sonunda 13.000 x g'de 10 dk santrifüj edilir, alkol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra sediment üzerine 125 µl deiyonize su eklenir iyice karıştırıldıktan sonra kaynar su banyosunda 10 dk. bekletilir. Oda ısısında soğuduktan sonra 5000 x g'de 5 dk. santrifüj edilir, üst kısım amplifikasyonda kullanılır (31).

#### **2. PZR Amplifikasyonu:**

*M.tuberculosis* kompleksi genomunda 1359 baz çifti uzunluğundaki IS6110 gen bölgesinin uç kısımlarına özgül IS1 ve IS2 primerleriyle

amplifikasyon yapılmıştır. Primerlerin baz dizilimi ve IS6110 gen bölgesindeki lokalizasyonu Şekil 1’de görülmektedir (32).



*Şekil: 1: Amplifikasyonda kullanılan primerlerin baz dizisi ve lokalizasyonu*

Toplam 50 µl olan amplifikasyon tüpünün içeriği; 5 µl genomik DNA, 1µM primerler, 3mM Mg Cl<sub>2</sub>, 1,5 U Taq polimeraz (promega), 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP 200 µM dTTP, 1µM BSA (Bovins serum albumin), reaksiyon tamponu ve deiyonize sudan oluşmaktadır. Amplifikasyon otomatik thermal cycler (Ericomp USA) ile 94<sup>0</sup> C’de 3 dk denatürasyondan sonra, 94<sup>0</sup> C’de 1 dk, 68<sup>0</sup> C’de 1 dk ve 72<sup>0</sup> C’de 1 dk.’lık işlemler 35 kez tekrar edilerek tamamlanır (32).

### 3. Amplifikasyon Sonucunun Gözlenmesi:

Amplifikasyon ürünü içinde etidyum bromid bulunan % 2’lik agaroz jel’de elektroforeze tabi tutularak U.V. ışık altında DNA size marker (φx174 - Hae III) yardımıyla her bir suştan elde edilen farklı büyüklükteki bantların okunması yapılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan 181 mikobakteri suşunun makroskopik, mikroskopik ve biyokimyasal özelliklerine göre idantifikasyonu yapıldığında hepsi *M. tuberculosis* olarak bulunmuştur. Biyokimyasal özellikleri bakımından; niacin ve nitrat redüksiyon testleri bütün suşlarda pozitifdi. 25<sup>0</sup> C'da yapılan katalaz ve peroksidaz testlerinden peroksidazı negatif olan iki suş hariç diğerlerinden olumlu sonuç alınmıştır. Aynı deney 68<sup>0</sup> C'de yapıldığında katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin tüm suşlarda negatif olduğu tesbit edilmiştir.

Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edilen 160 *M.tuberculosis* suşunun antimikobakteriyel ilaç duyarlılıkları incelendiğinde 54 suşun (%33.7) değişik ilaçlara dirençli olduğu görülmüştür. Dirençli olan suşların 38 tanesi (% 70.3) iki ya da daha fazla ilaca dirençli iken, 16 suşun (% 29.7) tek bir ilaca dirençli olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca izoniazide dirençli olan 37 suşun % 68.5'inin rifampisine de dirençli olduğu kaydedilmiştir.

PZR yöntemi ile genotiplendirmesi yapılan 181 suş arasından 50 farklı genotip saptanmıştır. Bu tiplerde 1353-118 baz çifti uzunlukta 1 ila 7 farklı bant saptanmıştır. Genotiplerin coğrafik bölgelere göre dağılımında oldukça büyük heterojenlik görülmüştür. Saptanan bant tiplerinin illere göre dağılımı Tablo-2'de verilmiştir.



Bant Tipleri	B A N T																T i P L E R i									
	1078	900	603	700	603	450	125	550	550	550	1353	600	900	1353	900	310	1353	270	700	650	1200	350	120	1070	550	
ANKARA n=27	Sayı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BURSA n=20	Sayı	-	1	-	-	-	6	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	%	-	5	-	-	-	30	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
İZMİR n=16	Sayı	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	6.25	-	-	6.25	12.5	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	-	-	-	-	-	-
İZMİT n=22	Sayı	-	-	-	-	-	1	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	4.5	13.6	-	-	4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESKİŞEHİR n=10	Sayı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	10	10	-	-	-
MALATYA n=21	Sayı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAMSUN n=15	Sayı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SİVAS n=21	Sayı	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	%	-	-	-	-	-	14.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7	4.7
TRABZON n=29	Sayı	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	%	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM	Sayı	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	4	1	3	1	2	1	1	1
	%	0.5	0.5	1.1	0.5	0.5	7.1	0.5	0.5	0.5	1.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.2	0.5	1.6	0.5	1.1	0.5	0.5	0.5

**Tablo 3:** Türkiye Genelinde En Fazla Görülen İlk 10 Genotip

	310	550	550,234	550,310	550,194	550,310,234	310,194	550,234,194	194	310,234
ANKARA	5	4	-	2	1	-	1	3	2	-
BURSA	5	3	6	1	-	-	-	-	-	1
İZMİR	1	1	1	-	-	-	1	-	-	-
İZMİT	5	6	3	-	-	4	-	-	-	2
ESKİŞEHİR	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-
MALATYA	4	4	-	3	-	-	3	2	2	2
SAMSUN	5	4	-	-	-	-	-	-	-	1
SİVAS	2	1	3	2	3	-	1	-	1	-
TRABZON	4	4	-	2	4	2	1	2	2	-
TOPLAM	31	27	13	10	9	8	7	7	7	6
(YÜZDE) %	17.1	14.9	7.1	5.5	4.9	4.4	3.8	3.8	3.8	3.3

**Tablo 4:**En Fazla Görülen 5 Genotip'in Antitüberkuloz İlaçlara Dirençli ve Duyarlı Suşlar Arasındaki Dağılım

Genotipler		310	550	550,234	550,310	550,194
Toplam		n=28	n=24	n=11	n=8	n=9
INH	Duyarlı	15	13	5	2	8
	Dirençli	13	11	6	6	1
RIF	Duyarlı	15	13	5	3	8
	Dirençli	13	11	6	5	1
INF-RIF	Duyarlı	15	13	5	2	8
	Dirençli	13	11	6	5	1
INF-RIF-SM	Duyarlı	12	11	4	2	1
	Dirençli	8	2	2	3	8



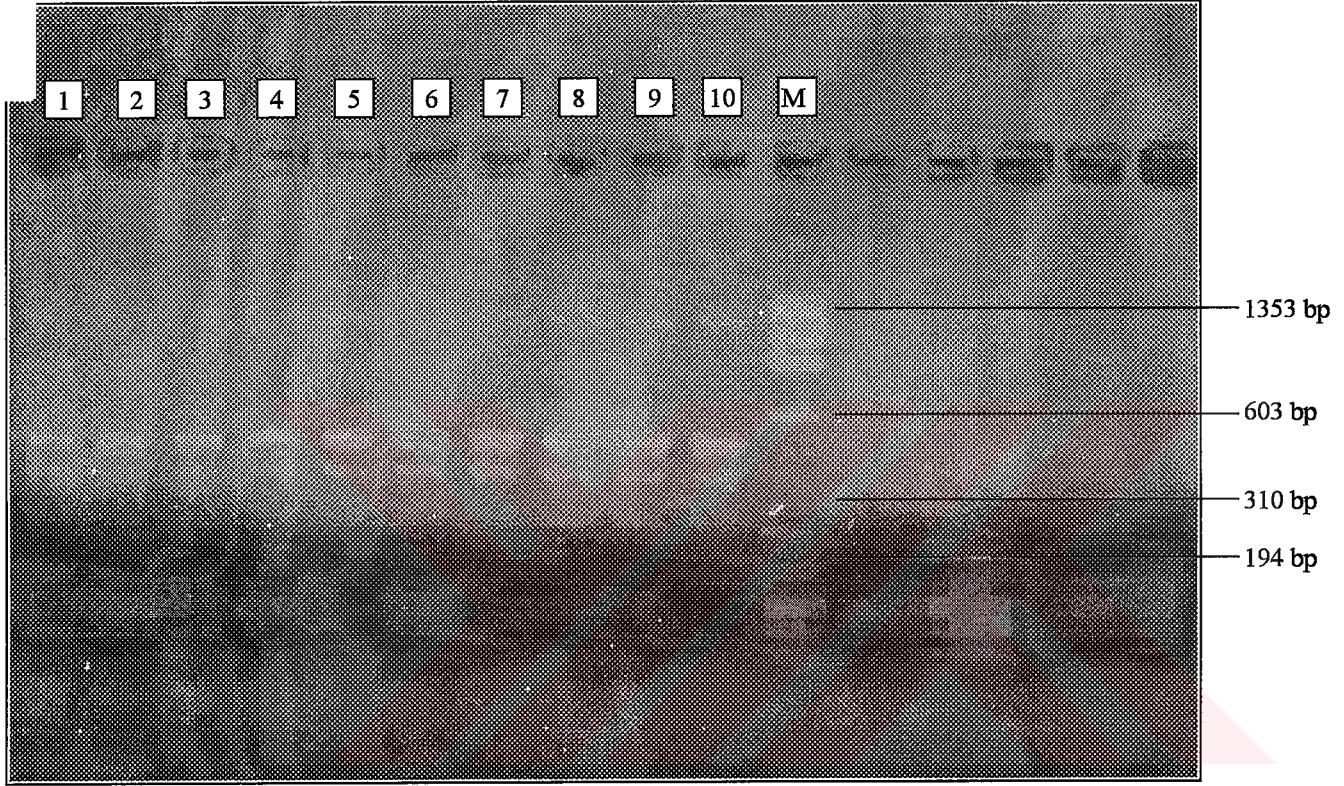
Türkiye genelinde izole edilen suşlarda; en fazla 310 ve 550 baz çifti uzunluğundaki DNA bant profili gösteren tipler görülmüştür. İncelemeye alınan suşlarda en fazla saptanan bantlara göre belirlenen ilk 10 genotipin dağılımı Tablo-3’de gösterilmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testleri yapılan 160 örneğin bant tiplerinin analizi yapıldığında, dirençli olan suşlarda direnci açıklayacak spesifik bir bant tipi tesbit edilememiştir. Antitüberküloz ilaçlara direnci olan suşlarda sıklıkla saptanan bant tipleri Tablo-4’de verilmektedir.

Kullanılan genotiplendirme yönteminin tekrarlanabilirliğini ortaya koymak üzere, aynı suştan farklı zamanlarda yaptığımız 10 ayrı amplifikasyonda, hep aynı bantlar elde edilmiştir, (Resim 1).

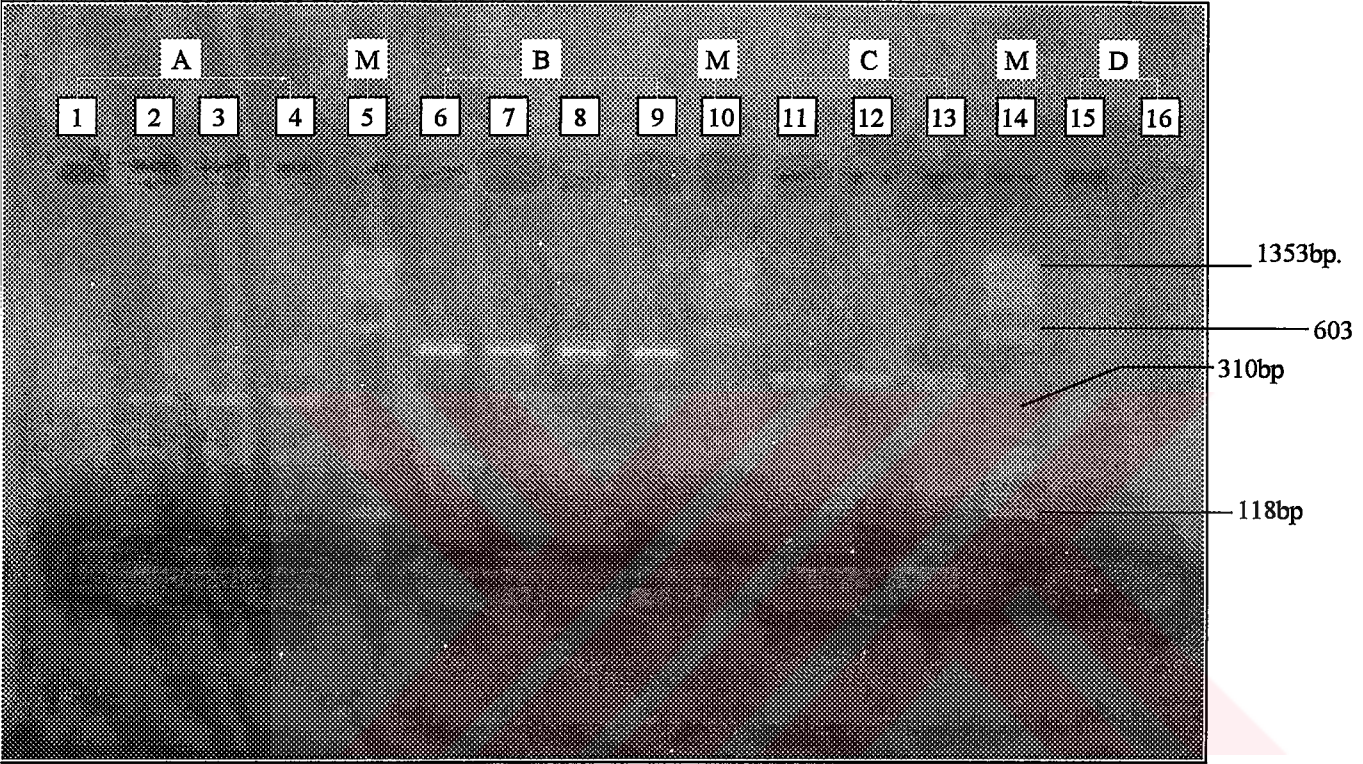
Yöntemin epidemiyolojik yönden birbirleriyle ilişkisi olan bireylerden izole edilen suşları ayırt edebilme potansiyelini ortaya koymak amacıyla, aktif tüberkülozu olan 4 farklı aileye ait 13 kişiden alınan balgam örnekleri incelendi. Hazırlanan DNA süspansiyonları ile yapılan çalışmada aynı aileye ait bireylerde ortak bantlar elde edilmiştir (Resim 2).

Buna karşın, epidemiyolojik yönden ilişkisi olmayan farklı bireylerden alınan örneklerde değişik bantlar görüldü (Resim 3).

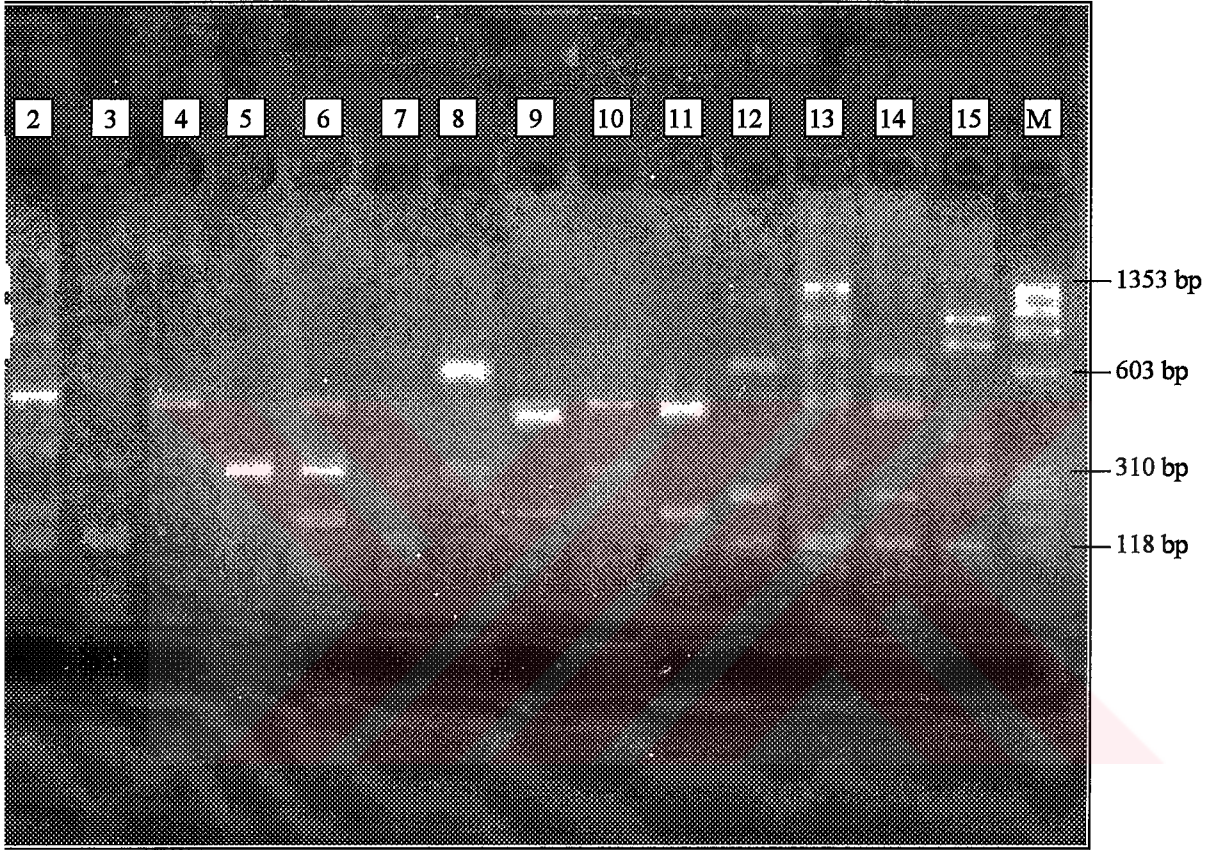


Resim 1: Aynı *M. tuberculosis* suşundan 10 ayrı zamanda yapılan tiplendirme sonucu

M.Marker,  $\phi$  x 174 Hae III Stratagene.



**Resim 2: Aile içi infeksiyonu olan bireylerden alınan örneklerden yapılan tiplendirme sonuçları (A, B, C ve D harflerinin herbiri birer aileyi göstermektedir.) M: Marker  $\phi$  x174 Hae III Stratagene.**



**Resim 3: Epidemiyolojik yönden birbirleriyle ilişkileri olmayan bireylerden alınan örneklerle yapılan tiplendirme sonucu (1-15) M:Marker  $\phi$  x174 III Stratagene**

## TARTIŞMA

Günümüzde birçok antibiyotiğin kullanımında olmasına rağmen tüberkülozun tanı ve tedavisinde problemleri çözmek için yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunda rol oynayan faktörlerin başında hiç şüphesiz tanı, idantifikasyon ve duyarlılık testlerinin uzun zaman alması, hatta bazen hastalığın tanısının konulamaması önemli rol oynamaktadır. Tüm infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi tüberkülozdan korunmada da infekte kişilerin kısa sürede bulunması yanında, hastalığın yayılmasında kaynak rolünü üstlenenlerin de belirlenmesi gerekmektedir. Böylece infeksiyon zincirini kırmada başarılı olunabilir. Kaynağın belirlenmesi hastalardan izole edilen suşların tiplendirilmesiyle mümkün olmaktadır.

Birçok bakterinin tiplendirilmesinde kullanılan serotip, biyotip ve faj tiplendirme yöntemlerini tüberküloz basillerine uygulamada bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Antijenik yapının kompleks olmasından dolayı serotiplendirme çalışmaları mikobakterileri tiplendirmede yetersiz kalmaktadır. *M. tuberculosis*'lerin faj tiplendirme çalışmaları vardır, ancak bu çalışmalar epidemiyolojik açıdan yetersizdir .

Bu zorluklar araştırmacıları basit, güvenilir ve kolayca uygulanabilir yeni tiplendirme yöntemlerini araştırmaya yöneltmiştir. Bugün birçok moleküler yöntemlerle tiplendirme denemeleri yapılmaktadır. Bunlardan birisi de polimeraz zincir reaksiyonudur (14).

*M. tuberculosis*'in PZR yöntemi ile moleküler tiplendirilmesinin temelinde; insertion sequences IS6110 ve IS1081, “major polymorphic tandem repeats (MPTRs)”, “polymorphic GC-rich repetitive sequences (PGRSSs)” ve “direct repeat sequence (DR)” gibi bakteriyel genom üzerinde yer yer tekrarlayan elementlerin araştırılması yatmaktadır. Her ne kadar IS ve diğer mobil genetik elemanların transpozisyon riski söz konusu ise de, IS6110 bu yönden göreceli olarak stabil sayılmaktadır (11,33-36) İn vitro kültürlerde ve farelerde yapılan bir deneyde IS6110'da herhangi bir transpozisyon gösterilememiştir (16).

Bu çalışmada kullanılan PZR yöntemi, ilk defa 1993 yılında Ross ve Dwyer tarafından kullanılmıştır (32). Yöntem; *M. tuberculosis* kompleksi genomunun çoğunlukla belirli bölgesinde 1-19 arasında farklı sayılarda bulunan ve izolatlar arasında değişik yerlerde lokalize olabilen “insertion element IS6110” adı verilen spesifik bantların toplandığı DNA bölgesinin amplifiye edilmesi ve oluşan farklı DNA bantlarının elektroforezde gösterdiği heterojenlik profilinin izlenmesi esasına dayanmaktadır.

*M. tuberculosis*'in IS6110 bölgesinin uçlarına uygun ( $3^1-5^1$ ) IS1 ve IS2 primerlerinin kullanıldığı bu teknik; epidemiyolojik çalışmalar için hızlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntem, hastalığın kökeninin belirlenmesi ve yayılmasının izlenmesinde, etkin korunma ve çapraz kontaminasyonun açığa çıkarılmasında önemli bilgiler vermektedir (23,37-40). Southern blot

hibridizasyon, RFLP, DNA baz dizilimi gibi diğer moleküler yöntemler komplike cihazlar gerektirmesi, pahalı olması, uzun zaman alması ve uzman kişi gerektirmesi ile kullanım alanları sınırlı laboratuvarlar içerisinde kalmıştır. Oysa bu çalışmada kullanılan PZR ile tiplendirme basit ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle birçok laboratuvarında kolayca uygulanabilir.

Ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinden (Ankara, Bursa, Eskişehir, İzmir, İzmit, Malatya, Samsun, Sivas, Trabzon) izole edilen 181 *M. tuberculosis* suşunun incelenmesi neticesinde 1353-118 baz çifti uzunlukta 1 ila 7 değişik bant içeren 50 farklı tip saptanmıştır. Bu sonuçlar göstermektedir ki; çalışma kapsamına alınan suşlardan bir tanesi en az üç kişiyi enfekte etmiştir. Konunun daha ayrıntılı incelemesi yapıldığında; 310 baz çiftinden oluşan tek bantlı genotipin 31 (% 17.1) suшта, 550 baz çiftinden oluşan genotip 27 (% 14.9) suшта saptanmıştır. Bu durum ülkemizdeki bazı genotiplerin yaygınlığını göstermesi yanında, gerekli koruyucu önlemlerin alınmaması halinde tek bir kişinin ne kadar fazla insanı enfekte edebileceğini gösteren çarpıcı bir sonuçtur.

Suşlar arasında tek bantlı genotipler yanında, oldukça farklı bantlar içeren tipler de saptanmıştır. Bant sayılarına göre 8 örnekte tek, 14 örnekte çift, 9 örnekte üç, 9 örnekte dört, 5 örnekte beş, 4 örnekte altı, ve 1 örnekte yedi bant görülmüştür (Tablo 2). Birçok araştırmacı kullandıkları suşlar arasında en fazla görülen ortak bantlara göre gruplama yoluna gitmiştir (16).

Ancak çalışmamızda bu yola gidilmemiştir. Bunu yapmamızdaki amacımız; suşlarda saptanan her bir farklı bantın antitüberküloz ilaçlara direnç bakımından bir ip ucu olabileceği varsayımdır. Bant sayısının fazla olması durumunda, özellikle bazı suşlarda birbirine yakın ve nisbeten zayıf olan bantların okunmasındaki zorluk, bu yöntemin başlıca dezavantajı gibi görünmektedir. Çalışmamızda bireysel gözlemden kaynaklanan hatalı yorumlardan kaçınmak için silik bantlar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Elektroforezdeki DNA bantlarının okunması birbirinden bağımsız iki kişi tarafından yaptırılmış ve bu kişilerin saptamış oldukları ortak bantlar o suşa ait genotipik profil olarak kaydedilmiştir. Böylece mümkün olduğunca sonuçların okunmasından kaynaklanan hatalar elimine edilmiştir.

Diğer bir çok araştırmacı tarafından gerçekleştirilen moleküler tiplendirme yöntemleriyle de oldukça fazla sayıda genotipler saptanmıştır. Araştırmada kullanılan yöntemi ilk kez uygulayan Ross ve Dwyer (32) bu yöntemi southern blot hibridizasyon ile karşılaştırmak amacıyla 9 farklı suş incelenmiş; bütün suşların farklı bantlar gösterdiğini ve ayrıca suşları ayırt etmede her iki yöntemin birbirine benzer sonuçlar verdiğini kaydetmişlerdir. Patel ve ark.'ı heminested PZR ile 204 örnek üzerinde yaptıkları çalışmada; 1-11 farklı bant içeren 136 ayrı tip belirlemişlerdir (27). Ayrıca Friedman ve ark. IS6110'nu kapsayan RFLP metodu ile 46 klinik izolatdan 25 farklı tip ayırt etmişlerdir (35). Fransız "Polynesia"da *M.tuberculosis*'in



RFLP analizi yapılmış, araştırmada kullanılan 64 suştan 38 farklı tip belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu çok sayıdaki tipleri, ortak olan 3 bantı esas alarak yaptıkları grupta, 11 genotip tespit etmişlerdir (16).

Saptanan genotiplerin ülkemizin farklı bölgelerindeki illere göre dağılımı incelendiğinde 310 baz çiftlik genotip ile 550 baz çiftlik genotipin Eskişehir hariç, bütün illerde yaygın olduğu görülmektedir (Tablo 3). Hemen bütün illerde ortak genotipik özellik gösteren suşlar bulunmuştur. Ancak bu suşların izole edildiği hastalara ait elimizdeki bilgilerin yetersizliği nedeniyle hastaların birbiriyle teması, yaşam alanları ve akrabalık gibi epidemiyolojik bağlantıları belirlenememiştir. Benzer genotipik özellik gösteren suşların, epidemiyolojik yönden birbiriyle, bağlantılarını kesin olarak ortaya koymak amacıyla, incelemeye alınan aile içi enfeksiyonlu bireylerde, aynı genotipler saptanmıştır (Resim 2). Bir aileden iki, birinden üç ve ikisinde dört bireyin bulunduğu, farklı ailelerin bireylerinde saptanan bu sonuç, aile içi enfeksiyonu gösteren oldukça anlamlı bir bulgudur.

Diğer taraftan epidemiyolojik yönden farklı olduğu bilinen suşlar tamamıyla farklı bant profili göstermiştir (Resim 3). Bu durum kullanılan yöntemin epidemiyolojik tiplendirilmede güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

Ross ve Dwyer (32)'de aynı yöntemle epidemiyolojik olarak birbiriyle aynı ve farklı olan suşlarda yaptıkları çalışmada bulgularımıza paralel

sonuçlar almışlardır. Bu noktadan hareketle; ilk defa bu araştırmacıların ortaya koyduğu yöntemle laboratuvarımız koşullarındaki standardizasyon çalışmalarının başarılı olduğu söylenebilir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğü yanında, hiç kuşkusuz tekrar edilebilirliği de oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullanılan yöntemin tekrarlanabilirliği, bir suşa ait DNA örneği üzerinde on farklı zamanda yapılan çalışmadan, tamamiyle aynı sonuç alınması ile gösterilmiştir (Resim 1).

İncelemeye alınan suşlar arasında antitüberküloz ilaçlara direnç gösterenlerde direnç için özel herhangi bir DNA bantı saptanamamıştır. Dirençli suşlar epidemiyolojik açıdan birbirleriyle ilişkili olabileceği gibi tamamiyle farklı da olabilir. Epidemiyolojik yönden birbirleriyle yakın ilişkisi olan bireylerde saptanan genotiplerin belki antitüberküloz ilaçlara direnç hakkında bazı ipuçları verebilir. Şöyle ki, aile içinde enfeksiyona ilk yakalanan kişiden izole edilen suşa ait antibiyogram sonucu, ondan enfekte olan ve aynı genotipik profil gösteren suşu taşıyan hastanın tedavisinde antibiyotik seçimine yardımcı olabilir. Ancak bu konu tamamıyla bir varsayımdır. Kesin olarak doğrulanabilmesi için genotipik olarak tamamiyle aynı olan çok sayıda suşun, duyarlılık testlerinin incelenmesi gerekmektedir.

## SONUÇLAR

1. Türkiye genelinde incelenen 181 *M. tuberculosis* suşunda 50 farklı genotip saptanmıştır.
2. Genotipleri belirlenen suşlarda en az 1 en fazla 7 bant elde edilmiştir.
3. Türkiye genelinde en yaygın olan genotip 310 (% 17.1) ve 550 (% 14.9) baz çiftlik bant ihtiva eden genotiplerdir.
4. Türkiye'deki illere özgü herhangi bir genotip saptanamamıştır.
5. Epidemiyolojik yönden birbiriyle ilişkili olan ailelere ait örneklerden benzer genotipler saptanmıştır. Diğer taraftan ilişkisi olmayanlarda farklı genotipler bulunmuştur.
6. Aynı suştan elde edilen DNA örneği üzerinde 10 farklı zamanda yapılan genotiplendirme çalışmalarında hep aynı sonuçlar elde edilmiştir.
7. Antitüberküloz ilaçlara dirençli olan suşlar için, karakteristik olan herhangi bir genotip saptanamamıştır.

## ÖZET

Farklı hastalardan izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının epidemiyolojik açıdan ilişkilerini ortaya koyabilmek amacıyla, polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemi kullanılarak moleküler tiplendirme yapılmıştır. Araştırmada, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Araştırma Enstitüsü, Tüberküloz laboratuvarına ülkemizin değişik bölgelerinden gönderilen 160 ve laboratuvarımızdan izole edilen 21 suş ile, tüberküloz hastalığı olan dört aileye ait 13 kişiden alınan balgamlardan hazırlanan DNA örnekleri üzerinde yapıldı. İncelenen 181 suş arasından 50 farklı tip saptanmıştır. Bu tiplerde 1353 ila 118 baz çifti uzunlukta 1 ila 7 farklı band bulunmuştur. En fazla 310 ve 550 baz çifti uzunlukta bantlar gözlenmiştir. Farklı coğrafik bölgelere özgü herhangi bir tip bulunamamıştır. Aynı aileden olan tüberküloz hastalarından benzer genotipler saptanmıştır. Bir hastaya ait örnekten, farklı zamanlarda yapılan 10 ayrı PZR uygulamasından, hep aynı sonuç alınmıştır. Epidemiyolojik yönden ilişkili olmayan hastalardan izole edilen suşlar, farklı genotipte bulunmuştur. Antitüberküloz ilaçlara dirençli olan suşlara özgü herhangi bir genotip bulunamamıştır. Bulgular, Ross ve Dwyer tarafından geliştirilen bu PZR yönteminin, ülkemizdeki tüberküloz basillerinin tiplendirilmesinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Bilgehan, H. 1996. Klinik Mikrobiyoloji. sayfa: 330-358 Barış Yayınları İzmir
2. Kocabaş, A. 1996. Akciğer tüberkülozu Topçu, A.W., Doğanay, M. İnfeksiyon Hastalıkları Kitabında sayfa: 396-428 Nobel Tıp Kitabevi Bursa.
3. Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg E.A., Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N., Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 1995. Mycobacteria p. 263-272. 20 th. ed. Prentice-Hall International Inc. Printed in the United States of America
4. Kılıçturgay, K. 1994. Klinik Mikrobiyoloji. Sayfa: 65-75 Güneş Yayınları Bursa.
5. Small, P.M., Shafer, R.W., Hopewell, P.C., Singh, S.P., Murphy, M.J., Desmond, E., Sierra, M.F., and Schollnik, G.K. 1993. Exogenous reinfection with multidrug-resistant M. tuberculosis in patients with advanced HIV infection N. Engl. J. Med. 328: 1137-1144
6. Moore, D.F., and Curry, J.I. 1995. Defection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by amplicor PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 2686-2691

7. Beige, J., Lokies, J., Schaberg, T., Finckh, U., Fischer, M., Mauch, H., Lode, H., Köhler, B., and Rolfs A. 1995. Clinical evaluation of a Mycobacterium tuberculosis PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33: 90-95
8. Cartuyvels, R., Ridder, C.De., Jonckheere, S., Verbist, L., and Eldere, J.V. 1996. Prospective clinical evaluation of amplicor Mycobacterium tuberculosis PCR test as a screening method in a low-prevalence population. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2001-2003
9. Bennedsen, J., Thomsen, V.O., Pfyffer, G.E., Funke, G., Feldmann, K., Beneke, A., Jenkins, P.A., Hegginbotham, M., Fahr, A., Hengstler, M., Cleator, G., Klapper, P., and E. Wilkins, G.L. 1996. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1407-1411
10. Bilgehan, H. 1992. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Sayfa: 525-531 Barış Yayınları İzmir.
11. Pezzo, A.M., Lamberti, M., Faraone, C.S. and Covellr, I. 1994. Elisa method for evaluation of anti-A60 IgG in patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Microbiologica.* 17: 37-44
12. Zou, Y.L., Zhang, J.D., Chen, M.H., Shi, G.Q., Prignot, J., and Cocito, C. 1994. Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme-linked immunosorbent assays for anti-A60 immunoglobulins. *Clin. Infect. Dis.* 19: 1084-91

13. Torrea, G., Offredo, C., Simonet, M., Gicquel, B., Berche, P., and Pierre, A.C. 1996. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 34:1043-1049
14. Durmaz, R. 1995. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi ve Mikrobiyolojide kullanımı *Türkiye Microbiol Bült.* 29:304-311
15. Brender, E., Jantzen A., Huttunen, R. 1992. Characterization of a distinct group of slowly growing *Mycobacteria* by biochemical tests and lipid analyses. *J. Clin Microbiol.* 30: 1972-1975
16. Torrea, G., Lavee, G., Grimont, P., Martin, C., Chanteau, S., and Gicquel, B. 1995. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1899-1904
17. Eisenstein, I.B. 1990. The polymerase chain reaction. *N. Engl J. Med.* 322: 178-182.
18. Iovannisci, D.M., Winn-Deen, E.S. 1993. Ligation amplification and fluorescence detection of *M. tuberculosis* DNA. *Mol Cell Probes*; 31: 729-731
19. Felmlee, T.A., Liu, Q., Whelen, C., Williams, D., Sommer, S.S., and Persing, D.H. 1995. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis*

rifampin resistance: comparison of single-strand confirmation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J. Clin. microbiol.* 33: 1617-1623

20. Goyal, M., Young, D., Zhang, Y., Jenkins, P.A., and Shaw, R.J. 1994. PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Clin. Microbiol.* 32: 3070-3071

21. Rullan, J.V., Herrera, M.D.D., Cano, M.D.R., Moreno, V., Goday, M.D.P., Peiro, M.D.E.F., Castell, M.D.J., Ibanez, M.D.C., Ortega, M.D.A., Agudo, M.D.L.S., and Pozo, M.D.F. 1996. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2(2): 125-129

22. Rolfs, A., Beige, J., Finckh, U., Köhler, B., Schaberg, T., Lokies, J., and Lode, H. 1995. amplification of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3312-3314

23. Dey, M.J., Down, A., Howard, D. et al. Strand displacement amplification (SDA) of *M. tuberculosis* DNA from clinical isolates, Abstr. 93<sup>rd</sup> Gen. Meet. Am Soc Microbiol 1993. American Society for Microbiology, Washington DC 1993: 176.

24. Frothingham, R. 1995. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BC G. *J. Clin. Microbiol.* 33: 840-844



25. Palittapongarnpim, P., Chomyc, S., Fanning, A., and Kunimoto, D. 1993. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 8: 167-975
26. Gözükar, M.E. 1990. *Biyokimya*. Sayfa: 341-344, Ofset Repromat Ltd. Ankara.
27. Patel, S., Wall, S., and Saunders, N. A. 1996. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1686-1690
28. Abed, Y., Regli, A.D., Bollet, C., and Micco, P. 1995. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 165-235 spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1418-1420
29. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18: 6531-6535
30. Persing DH: In vitro nucleic acid amplification techniques, p. 51-87. In Persing DH. 1993. Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. 1993, American Society For Microbiology, Washington D.C

31. Williams, D.L., Limbers, C.W., Spring, L., Jayachandra, S., and Gillis, T.P. 1996. PCR- heteroduplex detection of rifampin-resistant *M. tuberculosis* P. 122-125. In, Persingi, D.H. (ed) PCR Protocols for Emerging Infection Diseases. ASM Press Washington D.C.
32. Ross, B.C., and Dwyer, B. 1993. Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. *J.Clin. Microbiol.* 31: 329-334
33. Soolingen, D.V., Hermans, P.W.M, Haas, P.E.W., Soll, D.R and Embden, J. D.A. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin Microbiol.* 29: 2578-2586
34. Wiid, I.J.F., Werely, C., Beyers, N., Donald, P., and Helden, P.D. 1994. Oligonucleotide (GTG)<sub>n</sub> as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1318-1321
35. Friedman, C.R., Stoeckle, M.Y., Johnson, W.D., and Riley, L.W. 1995. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1383-1384
36. Otal, I., Samper, S., Asensio, M.P., Vitoria, M.A., Rubio, M.C., Gomez-Lus, R., and C. Martin. 1997. Use of a PCR method based on

IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 35: 273-277

37. Dellagi, D.C., Abderrahmn, A., Haltiti, R. Koubaji, Gicoquel, B. and Dellagi, K. 1993. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2446-2450

38. Sechi, L.A., Zanetti, S., Delogv, G., Montinaro, B., Sanna, A., and Fadd, G. 1996. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from different regions of Italy and Pakistan. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1825-1828

39. Small, P.M., Mc Clenny, N.B., Singh, S.P. Schoolnik, G.K., Tompkins, L.S., and Mickelsen, P.A. 1993. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1677-1682

40. Lieban a, E., Aranaz, A., Francis, B., and Cousins, D. 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation with in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 34: 933-938