

TÜBERKÜLOZUN EPİDEMİYOLOJİK ARAŞTIRMALARINDA LABORATUVARIN YERİ

Prof. Dr. Rıza DURMAZ

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Malatya

GİRİŞ

Tüberküloz tarihin en eski hastalıklarından biri olmasına rağmen, halen önemli halk sağlığı sorunu olarak devam etmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ü *Mycobacterium tuberculosis* ile infektidir. Yılda yaklaşık 7-8.8 milyon yeni vaka oluşmakta ve her yıl 2.6 milyon kişi tüberkülozdan ölmektedir. World Health Organization (WHO) hesaplamalarına göre etkin kontrol önlemleri geliştirilmez ise 2020'ye gelindiğinde yeni infekte olmuş kişilerin sayısı yaklaşık bir milyarı bulacaktır. Bunda demografik faktörler, populasyon hareketleri, HIV epidemisi ve artan direncin rolü vardır. Gelişmekte olan ülkeleri etkileyen diğer bir çok hastalıktan farklı olarak, tüberküloz (TB) etkin önlemlerinin alınmasıyla kontrol altına alınabilir ve tedavi edilebilir. Vakaların kısa sürede bulunması ve tedavisi bulaşma riskini önemli ölçüde azaltmakla birlikte, tüberkülozun yayılmasını engelleyecek etkin kontrol önlemlerinin

alınabilmesi için, izolatlar arasındaki klonal ilişkinin bilinmesine gerek duyulmaktadır.

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. Salgınların araştırılmasında ve laboratuvar içi çapraz bulaşın tanımlanmasında büyük yararlar elde edilmektedir. Bu yöntemlerle belirli bir coğrafik alan içindeki bulaşın analizi yapılabilmekte, immune sistemi tam veya yetersiz hastalardaki ekzojen kaynaklı süperenfeksiyonlar belirlenebilmektedir. Rölapslı hastalarda farklı suşlarla enfeksiyon olduğu, ayrı tip suş çiftlerinin gösterilmesiyle ortaya konulmaktadır.

Moleküler tiplendirme yöntemleriyle çoğul ilaca dirençli (multi-drug rezistan= MDR) suşların kaynak ve yayılma yolları gösterilebilmektedir. *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesi, bir toplum ya da aile içindeki enfeksiyonun orijini, yayılması ve direnç kazanmış olan suşların erken saptanması gibi önemli epidemiyolojik soruların yanıtını verebilir.

Tiplendirme metodları, tüberkülozun yayılmasını etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılmasında, ilave araçlar olarak kullanılabilir. Risk faktörlerinin belirlenmesi ve bölgesel kontrol programlarının değerlendirilmesi, daha rasyonel ve etkili kontrol önlemlerinin alınabilmesine olanak sağlayabilir. Eğer toplumdaki tüberküloz olgularının önemli bir kısmı yeni oluşmuş bir bulaş sonucunda meydana gelmiş ise, bu durum o toplumda tüberkülozun önlenmesi için alınmış olan korunma tedbirlerinin yetersizliğini göstermektedir. Moleküler epidemiyoloji, daha virülan kabul edilen izolatların toplumdaki dağılımlarının izlenmesine yardımcı olmaktadır.

Bir tiplendirme yönteminden beklenen, suşa özel genetik profili ortaya koyabilmesidir. Bu profiller parmak izi "fingerprints" olarak adlandırılır. İki veya daha fazla suş aynı veya çok benzer profil oluşturuyor ise bunlar aynı grup (cluster) 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. Fakat bu yaklaşım her

zaman doğru olmayıp, grup (cluster), mutlaka yeni bulaş olduğunu ispatlamaz. Transmisyonun gösterilmesi popülasyonun uygun örneklemesine, tüberkülozun insidansına, çalışma popülasyonunun özelliklerine (yaş, popülasyon mobilitesi, ikamet süresi, immun durum gibi) bağlıdır. Genetik olarak grup içinde tanımlanan hastaların yalnızca %25-42'sinde grup içindeki diğer bireylerle epidemiyolojik ilişki saptanmaktadır.

TİPLEME METOTLARI

FENOTİPİK YÖNTEMLER

Tiplendirmede biyokimyasal testler, duyarlılık test sonuçları, faj tiplendirmeleri ve serolojik metodlar gibi konvansiyonel yöntemler uzun süre kullanılmış olmakla birlikte, bunların önemli yetersizlikleri bulunmaktadır. Tüberküloz basilleri genellikle benzer biyokimyasal özellik ve duyarlılık profili göstermektedir. Faj tiplendirmesi ise moleküler tekniklerden önce *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ayırımında en fazla kullanılan metottur. Ancak, kullanımı kolay olmayan, uzun zaman alan tekniktir. Sınırlı sayıda mikobakterium fajının olması nedeniyle duyarlılığı düşüktür. Fakat salgın suşları ve laboratuvar içi çapraz bulaş sonucu oluşan suşların ayırımında faydalı bilgiler sağlamıştır. Serolojik metodlar tanıda kullanılabilir, fakat farklı suşlar tarafından oluşturulmuş salgınların ayırımını yapamaz.

Bu zorluklar, araştırmacıları tüberkülozun epidemiyolojisinde kolayca kullanılabilecek, hızlı ve güvenilir sonuçlar

verebilen genotipleme yöntemlerini geliştirmeye yöneltmiştir.

GENOTİPLEME

M. tuberculosis genomunun tamamının dizi analizi çıkarılmıştır. Genom yaklaşık 4.4 mega baz çiftinden oluşmaktadır. Yaklaşık 4000 proteini kodladığı hesaplanmaktadır ve oldukça yüksek oranda guanin-sitozin içermektedir. Genomda sınırlı sayıda sessiz nükleotid değişimleri görülmektedir. Ancak ilaç direncinde oldukça fazla sayıda mutasyonlar oluşmaktadır. Farklı transpozonlar aracılığı ile sıkça rekombinasyon görülmektedir. En basit transpozonlar *insertion sequences* (ISs) (yerleşim dizilimleri) dir. Genom üzerinde 14'den fazla farklı IS elementi saptanmıştır. IS elementlerinin, genetik polimorfizmin oluşumunu sağladıkları kabul edilmektedir. Bu nedenle farklı suşlar arasındaki ayırmada sıklıkla kullanılmaktadırlar. Epidemiyolojik çalışmalarda en yaygın kullanılan IS, IS6110'dur.

Bakteriyel suşları mümkün olan en doğru biçimde tiplendirmek için kullanılabilecek en iyi yöntem, her bir suşa ait tüm genomun dizi analizini çıkarmaktır. Ancak bu yöntem zaman alıcı ve kost-efektif değildir. Bu yüzden nükleik asit bazlı tekniklerin kullanıldığı *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ayırımı, kromozomal DNA üzerindeki belirli DNA dizilimlerinin sıklığına ve suşa özgü farklılıklarına bağlıdır.

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Bakteri kromozomu, yüksek molekül ağırlıklı fragmentler oluşturan ve kesim alanları sınırlı olan restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleriyle (örneğin *EcoRI*) kesilmekte, özel koşullar altında, oluşan bantların ayrıştırılması yapılmaktadır. Bu yöntemin temel dezavantajı, sınırlı sayıda bant oluşması nedeniyle her zaman yeterli ayırım sağlayamayışıdır. Bu nedenle tüberkülozun epidemiyolojisi için uygun değildir.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Genomik DNA'nın spesifik bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi ve DNA segmentlerinin agarozda ayrıştırılmasıyla oluşturulan DNA profillerinin, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)*, analizine dayanır. Bu tip analizler teknik olarak mümkündür ve problemlerle hibridizasyon işlemini gerektirmez. Ancak, fazla sayıda bantlar kompleks pattern oluşturduğu için sonuçların yorumu zordur.

Hibridizasyonlu RFLP

DNA polimorfizmi, kesime uğratılmış nükleik asitlerin, genomik DNA veya özgül fragmentlerle hibridizasyonu ile gösterilebilir. Prob olarak total DNA kullanıldığında zeminde problem olmakta ve sonuçların yorumlanmasını etkilemektedir. Bu nedenle araştırmalarda genellikle *M. tuberculosis*' den klonlanmış tekrarlayan DNA dizilimleri prob olarak

kullanılmaktadır. Tekrarlayan elementlerin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için farklı suşlar arasında polimorfizm bulunmalıdır. Tablo 1’de tekrarlayan elementlerin örnekleri görülmektedir.

Tablo 1. *Mycobacterium tuberculosis* deki tekrarlayan DNA dizilimleri

Tekrarlanan dizilimler	Konak dağılımı	Kopya sayısı	Polimorfizm
<i>IS6110</i> (<i>IS986</i> , <i>IS987</i>)	<i>M. tuberculosis</i>	0-20	Yüksek
	<i>M. africanum</i>	0-20	Yüksek
	<i>M. bovis</i>	1-20	Yüksek
	<i>M. bovis-ECG</i>	1-2	Yok
<i>IS1081</i>	<i>M. tuberculosis</i>	5-6	Düşük
	<i>M. africanum</i>	5-6	Düşük
	<i>M. bovis</i>	5-6	Düşük
	<i>M. bovis-ECG</i>	5-6	Düşük
DR grup	<i>M. tuberculosis</i>	1	Yüksek
	<i>M. africanum</i>	1	Yüksek
	<i>M. bovis</i>	1	Yüksek
	<i>M. bovis-ECG</i>	1	Yok
MPTR	Tüberküloz kompleksi	±80	Düşük
PGRS	Tüberküloz kompleksi	26-30	Yüksek

Tekrarlayan elementlere (repetitive elements) bağlı metodlar: *M. tuberculosis* kompleksindeki genetik homojeniteye rağmen, kısa tekrarlayan DNA dizileri (*short repetitive DNA sequences*) ve yerleşim elementleri (*insertion elements*) gibi tekrarlayan dizilimlerle ilişkili olarak yüksek seviyede DNA polimorfizmi görülmektedir. Bu elementler, mikobakteri suşları arasındaki ayırım için hedef dizilimler olarak sıkça kullanılmaktadır.

M. tuberculosis kompleks suşlarının ayırımında faydalı olan beş tip kısa tekrarlayan DNA elementi vardır.

Bunlardan üç tanesi; polimorfik guanin ve sitozince zengin dizilim (*polymorphic GC-rich sequence= PGRS*), üçlü GTG’nin tekrarı (*a repeat of the triplet GTG*) ve major polimorfik sıralı tekrar (*major polymorphic tandem repeat=MPTR*) dır. Bunlar çoklu kromozomal lokuslarda bulunur. İlave olarak altı adet tam sıralı tekrar (*exact tandem repeat=ETR*) lokusları tanımlanmıştır. PGRS ve MPTR’lerin aksine, ETR lokusları aynı DNA dizilimlerinin sıralı tekrarlarını içermektedir. Her lokus 53-79 baz

çiftinden oluşmuş özgü bir tekrar dizilim içerir.

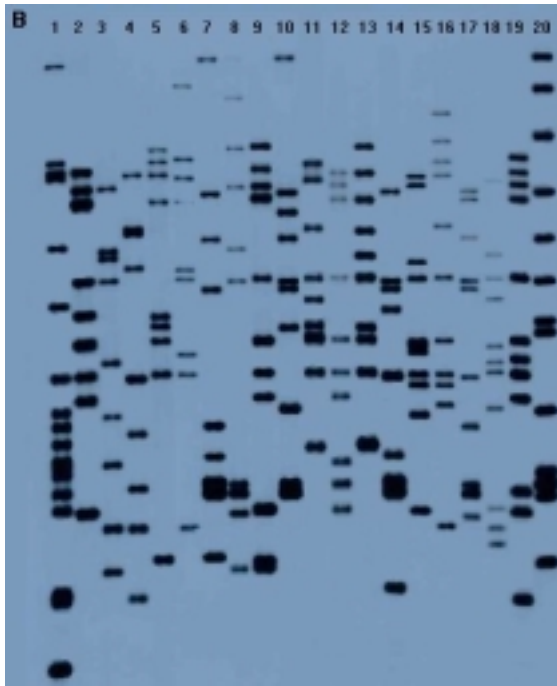
M. tuberculosis kompleks suşlarındaki ETR ve MPTR lokuslarının polimorfizmini saptamak amacıyla farklı sayıda sıralı tekrar (*variable number of tandem repeat= VNTR*) tiplene yöntemi tanımlanmıştır.

Bu güne kadar dört adet yerleşim elementi (insertion element=IS); IS6110, IS1081, IS1547 ve IS-like element tanımlanmıştır. IS6110 en yaygın kullanılan elementtir. IS1081, 1324 baz çifti uzunluğunda ve *M. tuberculosis* komplekste bulunan yerleşim elementidir. Çoğunlukla değişmeden her genomda 5-7 kopya halinde bulunmaktadır. Transpoziyonal aktivitesinin az olması ve kopya sayısı IS6110'dan daha düşük olması nedeniyle sınırlı DNA polimorfizmi oluşturur,

epidemiolojik çalışmalardaki kullanımını sınırlıdır. IS1547 ve IS-like element her genomda bir veya iki kopya halinde bulunmaktadır. IS6110 ile kıyaslandığında, IS1547-RFLP'nin ayırım gücü düşüktür.

IS6110-RFLP:

IS6110, enterobakteriyel IS3 ailesine ait bir yerleşim dizilimidir. *M. tuberculosis*'de IS6110 veya IS986, *M. bovis*-BCG'de IS987 olarak adlandırılır. Kromozomun değişik yerlerine lokalize olmuştur. Genomdaki sayısı tür ve suşa bağlı olarak değişmektedir. *M. tuberculosis* kompleksinde sayı 0 ve 25 arasında değişmekle birlikte, suşların çoğu 8-15 arasında kopya bulundurur (Şeki1).



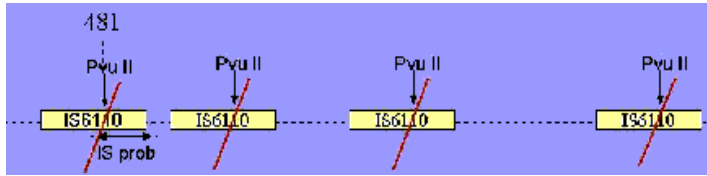
Şekil 1.IS6110 RFLP tiplene çalışmalarından alınan sonuçların temsili örnekleme

IS6110'un, bakteri kromozomuna integrasyonu için belirli sıcak noktalar (hotspots) olduğu ve dolayısıyla genomdaki lokalizasyonun tesadüf olmadığı bilinmektedir. DR bölgesi (*direct repeat*) bu sıcak noktalardan biridir. IS6110 için muhtemel integrasyon bölgelerinden üç tanesi; *ipl* lokus (*IS6110 preferential locus*), *dnaA-dnaN*

ayrıştırıldıktan sonra, naylon membrana aktarılmaktadır. Membrana aktarılan DNA bantlarının gösterilmesinde, kesim noktasının sağ tarafıyla bağlanabilen, kemiluminesan veren maddeyle işaretli IS6110 probu kullanılmaktadır. Yötem Van Embden ve arkadaşları tarafından standardize edilmiştir. Farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçların

interjenik bölge ve Rv1754c ve Rv1762c bölgeleridir.

IS6110 tipleme, moleküler epidemiyolojik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan metottur. Yöntemde öncelikle bakteri kromozomundaki IS6110 baz dizilimleri *PvuII* ile kesime uğratılmaktadır (Şekil 2). Oluşan DNA parçaları agaroz jel elektroforeziyle ulusal ve uluslararası çalışmalarda karşılaştırılabilmesine imkan sağlamaktadır. Yüksek seviyede ayırım gücünden dolayı, yeni geliştirilen polimeraz zincir reaksiyon (PZR) bazlı metotların doğrulanmasında kullanılan referans yöntemdir



Şekil 2. IS6110 lokalizasyonu ve *PvuII* ile kesimi.

M. tuberculosis genetik haritalaması

Genom uzunluğu: 4.411.529 baz çifti

IS6110 uzunluğu: 1361 baz çifti

IS6110 kopya sayısı: 0-25

Bu yöntemin majör dezavantajları kültüre gerek duyulması, yüksek kalite ve miktarlarda (5-10 µg) DNA gerektirmesi, yöntemin beş günde tamamlanabilmesi, özel laboratuvar aletleri ve eğitilmiş personel gerektirmesidir. Bu nedenlerden dolayı sonucun kısa sürede alınmasının önemli olduğu salgınların araştırılmasında problem

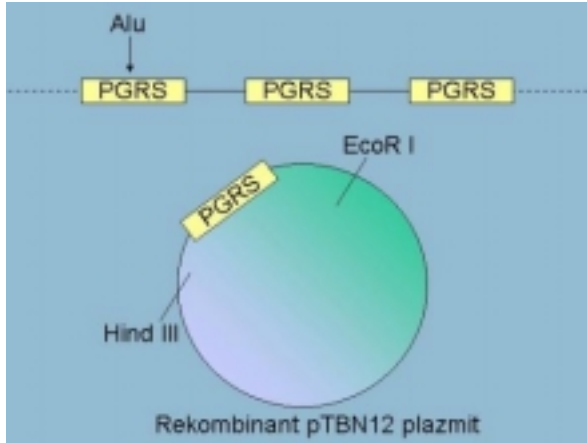
oluşturmaktadır. Bazı toplumlarda düşük kopya sayılı (<5) suşların oranı %25'e kadar çıkmaktadır. Bu suşların bant sayıları yeterli polimorfizmi sağlamadığından IS6110 tipleme yöntemi yetersiz kalmaktadır. İlave olarak bazı suşlarda IS6110 kopyası bulunmamakta ve tüberküloz dışındaki bazı mikobakteriler IS6110 probu

ile hibridizasyona giren fazla sayıda kopya bulundurabilmektedir. Bu nedenle tiplendirmeye geçmeden önce tür tanımlanmasının doğru yapıldığından emin olunmalıdır.

PGRS-RFLP: PGRS, tüberküloz kompleksinde en çok bulunan tekrarlanan elementtir. Çok sayıda, 96 baz çifti uzunluğunda GC'ce zengin uyum dizilimin birbiri arkasına sıralanmış tekrarlarını (*tandem repeats*) içerir. *M. tuberculosis* kompleksi ve diğer mikobakterilerde yaklaşık 30 kadar tekrarlanmaktadır. PGRS, rekombinant pTBN12 plazmiti içinde bulunur ve bunun prob olarak kullanıldığı tiplendirme yöntemi

(PGRS-RFLP), IS6110 kopyası olmayan veya düşük sayıda kopya (≤ 4) bulunduran *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirmesinde sekonder yöntem olarak kullanılmaktadır.

pTBN12 fingerprinting yönteminde; kromozomal DNA *AluI* enzimi ile kesildikten sonra, agaroz elektroforeziyle DNA parçalarının ayrıştırılması yapılmaktadır. Naylon membrana transfer edilen DNA fragmentlerinin gösterilmesinde, kemilüminesan veren madde ile işaretli, "insert" prob (pTBN12 probu) olarak kullanılmaktadır. pTBN12; *E. coli* DH α 'dan izole edilmekte, *EcoRI* ve *HindIII* ile kesildikten sonra "insert" saflaştırılmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. PGRS tekrarları ve pTBN12 probu

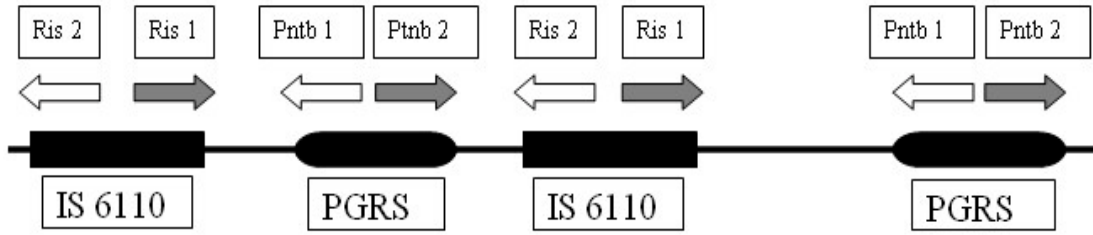
Bu yöntemin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulunmuştur. Ayırım gücü de yüksektir. IS6110-RFLP ile aynı dezavantajlara sahiptir. İlave olarak çok fazla sayıda bant elde edilmekte ve bunun sonucu olarak verilerin değerlendirilmesinde sıkıntı oluşturmaktadır.

Tekrarlayan elementleri kullanan diğer metotlar: *M. tuberculosis*

kompleksi üyelerinin genomunda diğer kısa dizilimler de tanımlanmıştır. IS6110 integrasyonunun sıcak noktası farklı sayıda 36 baz çiftlik direkt tekrar (*direct repeat*=DR) içerir. Bu moleküller, DR lokusu olarak adlandırılan tek bir genomik lokusta bulunurlar ve aralarında 35-41 baz çifti uzunluğunda özgü, aralık oluşturan dizilimler (*spacers*) bulunmaktadır. Hem DR'lerin kopya sayısı (50 ye kadar değişebilir) ve hem

de *spacer* dizilimlerin varlığı suştan suşa değişim gösterir. Bu durum, DR kümesindeki varyasyonların temeline dayalı suş tiplemesine (**spoligotyping**) imkan sağlar. DR'lerin arasında 94 farklı *spacer* tanımlanmıştır, ancak bunlardan 43 tanesi rutin çalışmalarda kullanılmaktadır. DR- ve PGRS-bazlı fingerprinting yöntemleri düşük IS6110 kopyalı suşların ayırımında faydalıdır. IS6110 ile grup içinde tanımlanan suşların aynı olup olmadıklarını doğrulamak amacıyla kullanılmaktadırlar.

Diğer tekrarlanan element, *major polimorfik sıralı tekrar* [**major polymorphic tandem repeat (MPTR)**] dir. Beş adet aralık oluşturan dizilim



(*spacer sequences*) ile ayrılmış 10 baz çiftlik bu tekrar, 80 kadar kopya bulundurur. MPTR, *M. tuberculosis* kompleks ile sınırlı olmayıp, konak dağılımı PGRS' ye benzer. Patojenik mikobakteri türleri için epidemiyolojik marker olarak kullanılmaktadır. Ancak sınırlı polimorfizme sahiptir.

Amplifikasyona dayalı metodlar

RFLP tiplerede, uygun DNA elde etmek için bolca üremiş kültüre gerek duyulmaktadır. Bu da salgın çalışmalarının analizinde uzun zaman geçmesine sebep olmaktadır. Böyle durumlar için daha hızlı teknikler geliştirilmiş ve bunların çoğu *M. tuberculosis*'deki IS6110'u içine alan

dizilimlerin amplifikasyonuna dayalı PZR-bazlı metodlardır. PZR-bazlı yöntemler, direkt klinik örnekten basilin tiplendirmesini yapabildiklerinden süreyi oldukça kısaltmaktadırlar. Canlı olmayan basille kullanılabilirler. Fakat, bu metodların bazıları tekrarlanabilirlikten yoksundur veya ayırım güçleri IS6110 RFLP'den daha düşüktür.

IS6110-bazlı amplifikasyon metodları. Bu metodlardan biri "*ampli-typing*" dir. Yöntemde IS6110'un uç kısımlarıyla hibridizasyona giren oligonükleotid primerleri kullanılmakta ve oluşturulan PZR reaksiyonu yerleşim diziliminden (IS) dışa doğru yönlendirilmiştir. Özgül olmayan

amplifikasyondan dolayı, tekrarlanabilirliği düşük olduğundan, *ampli-typing*, fazla sayıda suşların karşılaştırılması için uygun değildir. Fakat şüpheli bir salgının araştırılmasında kullanılabilir.

Diğer metod, *unilateral nested PZR* ve hibridizasyon analizi ile IS6110 ve MPTR arasındaki mesafe farklılığını araştırmaya dayalıdır. Yöntemin eksikliği PZR ürünlerinin sınırlı sayı ve büyüklükte olmasıdır .

Mikst bağlayıcı PZR (Mixt linker-PCR): IS6110 element polimorfizmine dayalı bir amplifikasyon yöntemidir. İlk işlem olarak HhaI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak DNA kesilmektedir. Oluşan bütün fragmentler 3' çıkıntılı uca

sahiptir ve böylece komplementer 5' çıkıntılı uca sahip "linker" ile bağlanabilmektedir (ligation). Çift zincirli linker, bir primer bağlanma yeri içermektedir. Bu özel zincir timidin yerine urasil içerdiğinden "mixed linker" adını almaktadır. PZR'da kullanılan primerlerden biri IS6110'a, diğeri ise linker'a bağlanmaktadır. Urasil baz çiftleri, urasil N glikozilaz ile uzaklaştırıldığı için, PZR'nun ilk siklusunda linker primeri bağlanamaz. IS6110'un 3' ucuna özgü diğeri primer ise yalnızca bir zincirin amplifikasyonunu gerçekleştirmektedir. İlk siklustan sonra, linker primer bağlanma yeri yeniden oluşturulmaktadır ve polimeraz zincir reaksiyonu yalnızca IS6110-3' fragmentlerinin amplifikasyonu için devam edecektir. Amplikonlar agaroz elektroforezinde yürütülerek fragmentlerin ayrıştırılması gerçekleştirilmektedir. Yöntem

IS6110-RFLP'den daha hızlı, fakat diğeri PZR bazlı tekniklerden yavaştır.

Direkt tekrarlanan element-PZR (Direct repetitive element-PCR): Bu **Şekil 4**-DRE-PZR'nin şematik görüntüsü .

Kısmi nested ters PZR (Hemi-nested inverse PCR): IS6110 diziliminin bir parçası ve onun yanındaki dizilimin birlikte amplifikasyonu yapılmaktadır. Metot, teknik olarak basit ve standart RFLP ile kıyaslandığında mükemmel ayırım gücüne sahiptir.

Yeni bir metod olarak, basit DNA ekstraksiyon protokolunu takiben IS6110'nun ters tekrar dizilimini (inverted repeat sequence of IS6110) hedefleyen

yöntemde iki tekrarlanan element olan IS6110 ve PGRS'nin arasında kalan DNA segmentlerinin amplifikasyonu yapılmaktadır. Elementlerin arasındaki mesafeye ve elementlerin tekrar sayısına bağlı olarak geliştirilen bant polimorfizmi tiplende kullanılmaktadır. Yöntem, %96'lık prediktif değere sahiptir ve DNA paternleri epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek yeterli stabilitede görülmektedir. İki tekrarlanan element arasındaki segmentlerin amplifikasyonu için dört adet primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir çifti (Ris1 ve Ris 2) IS6110, diğeri çift (Pntb 1 ve Pntb2) PGRS'nin uç kısımları için özgüdür. Primerler, tekrarlanan elementlerin her iki ucundan dışa bakacak şekilde dizayn edilmiştir (Şekil 4). Böylece tekrar elementlerinin arasında kalan DNA dizilimlerinin amplifikasyonu mümkün olmaktadır. Yöntemin tekrarlanabilirliği düşük (%58), fakat ayırım gücü yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, primer tipleme metotlarıyla grup (cluster) içinde bulunan suşların doğrulanması amacıyla kullanılabilir.

tek primerin kullanıldığı PZR önerilmiştir. Metot yaklaşık aynı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerinin ayırımını yapamamaktadır ve bu yüzden standart RFLP ile karşılaştırılabilir sonuçların alınabilmesi için ilave bir restriksiyon aşaması gerekmektedir.

16S- ve 23S rRNA-bazlı metotlar. 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin arasındaki ayırıcı bölgenin (*spacer region*) amplifikasyonu ve amplikonların restriksiyon enzimleriyle

kesilmesi, *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesinde kullanılmıştır. *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) analizinin kullanılmasıyla ayırım gücü artırılmıştır. Ancak RAPD bazılı metodun tekrarlanabilirliği ve son ayırım gücü sınırlı bulunmuştur.

DR bölgesine dayalı PZR metotları (direct variable repeat PCR). Yöntem, DR bölgesi içindeki IS6110'un dışa doğru amplifikasyonuna (outward amplification) dayanır. Oluşturulan suş spesifik amplifikasyon bantları, DR probu ile hibridizasyona sokulmaktadır. Sınırlı sayıda suş test edildiğinde iyi ayırım gücüne sahiptir. Fakat DR bölgesinin stabilitesi IS6110'unkinden daha yüksek olduğundan, IS6110-RFLP ile farklı bulunan suşlar, bunda aynı görülebilmektedir.

Spoligotyping (Spacer oligonucleotide typing). Bu yöntem, kromozomal DR lokusundaki polimorfizmi göstermeye dayanır. DR dizilimini hedef alan primerler kullanılarak DR'lerin arasındaki farklı ayırıcılar (spacers) amplifiye edilmektedir. Sonra, amplifikasyon ürünü, membrana bağlanmış olan ve DR'ler arasında lokalize olan farklı ayırıcı (spacer) bölgelere komplementer olan 43 farklı oligonükleotit proba hibridizasyona sokulmaktadır. Ayırıcı dizilimlerin varlığı veya yokluğu dijital olarak gözlenmektedir. Benzer veya farklı olan suşlar kendilerinin spoligotipleme patternleri ile ayrılmaktadır. Ayırıcı (spacer) dizilimler suşlar arasında değişim göstermektedir ve hibridizasyon membranının sabitleşme yüzeyinde leke şeklinde görülmektedir.

Bu metod IS6110'nun arkasından, tüberkülozun epidemiyolojisinde en yaygın olarak kullanılan metottur. Basit, hızlı ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Yüksek kopya sayılı suşlar analiz edildiğinde spoligotiplemenin ayırım gücü IS6110 tipten daha düşüktür, fakat düşük kopyalı suşların değerlendirilmesinde üstündür. Ayırım gücü düşük veya orta seviyede olması nedeniyle, ikinci bir yöntem olarak kullanılmaktadır. *M. tuberculosis* ve *M. bovis* ayırımı yapabilmektedir.

Aralık oluşturan dizilimler (spacers) delesyonla kaybedilebilmekte ve bir hastada aynı anda iki farklı spoligotipleme saptanabilmektedir. Bunlardan biri orijinal suşa ait, diğer ise aynı suşun delesyon oluşmuş formuna ait olabilir. Delesyon, hasta suşu taşıdığı zaman periyodu içinde oluşabilmektedir. Fakat bu tip delesyon oldukça nadirdir.

Minisatellite-based methods.

Değişik sayıda sıralı tekrarlar [variable numbers of tandem repeats (VNTRs)] içeren küçük uydulara (minisatellites) dayalı metotların, *M. tuberculosis* tiplemesi için efektif ve uygulanabilir oldukları gösterilmiştir. *M. tuberculosis* genomunda böyle 41 farklı değişebilen sıralı tekrarlar (variable tandem repeats) tanımlanmış ve bunlara *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs) adı verilmiştir. Bu lokuslar PZR-bazlı tipleme metodunun temelini oluşturur. İki tip sıralı tekrar (tandem repeat) tanımlanmıştır: *major polymorphic tandem repeat* (MPTR) lokusları ve *exact tandem repeat* (ETR) lokusları. Sıralı tekrar

lokuslarından (*tandem repeat loci*) elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi yapılarak, sıralı tekrarların sayısı ve bunların (*tandem repeats*) her iki yanında lokalize olmuş DNA segmentlerinin büyüklüğü belirlenmektedir.

Bu metod otomatize edilebilir, tekrarlanabilir, *M. tuberculosis* kompleks izolatları için duyarlı ve özgüdür. Tüberkülozun global epidemiyolojik sürveyansı için uygundur. Otomatik bir dizi analiz cihazı olan laboratuvarlar için metodu kurmak oldukça kolaydır. PZR bazlı yöntemler gibi aynı gün içerisinde sonuç verebilmektedir. Ancak altyapı gereksinimleri bu metodu büyük referans ve araştırma merkezleriyle sınırlı hale getirmektedir. *IS6110* RFLP ve Spoligotyping ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR tipleme daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. European Union Concerted Action Meeting görüşüne göre tüberkülozun kontrolü ve epidemiyolojisi için yeni genetik marker ve teknikler, MIRU-bazlı tipleme metotlarıdır. Bu metotlar, kabul edilebilir uluslar arası standart protokolün adaptasyonunu takiben, yakın gelecekte

IS6110'u gölgede bırakacaklardır. Amplifikasyon bazlı yöntemlerinin örnekleri Tablo 2'de görülmektedir.

TİPLEME METOTLARININ ÖZEL UYGULAMASI

Moleküler tipleme metotlarının uygulamaları iki farklı strateji içinde gruplandırılabilir. 1) Görülen salgının doğrulanması, yeni bulaş özü zincirinin belirlenmesi. Bu tip bulaş; kurumlarda, toplumdaki komşular arasında ve laboratuvardaki örnekler arasında oluşabilmektedir. 2) Geniş toplumlardaki tüberküloz basillerinin transmisyon dinamiklerini analiz etmek için popülasyon seviyesindeki *M. tuberculosis* tipleme verilerinin yorumlanması. Bu analiz, hastalığın patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olmak ve yayılmayı önlemek için bireysel hastalara da uygulanabilir. Sekonder tüberkülozun ekzojen reinfeksiyon mu yoksa endojen reaktivasyon mu olduğunun belirlenmesinde kullanılabilir.

Tablo 2. *M.tuberculosis*'in tiplendirilmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

Metot	Hedef dizi	IS6110 RFLP'ye kıyasla ayırım	Sınırlamalar	Tekrarlanabilirlik
RFLP (PvuII)	IS6110		Düşük kopyalı suşlar	100
RFLP (Alu I)	PGRS	Benzer	Fazla bant oluşumu	100
Amplotyping	IS6110	Benzer	Tekrarlanabilirliği düşük	
IS6110-ampliprinting	IS6110/MPTR	Benzer	Küçük PZR ürünleri	39
RAPD analizi	16S-23S spacer	Yüksek	Tekrarlanabilirliği düşük	
RAPD analizi	ISs	Benzer	Tekrarlanabilirliği düşük	
Mixed-linker PCR	IS6110/linker	Yüksek	Tekrarlanabilirlik ve Uygulanabilirlik ?	100
Direct variable repeat	IS6110/DR	Benzer	Kompleks PZR	
Double repetitive element PCR	IS6110/PGRS	Benzer	Yok	58
Spoligotyping	DR/spacers	Düşük	IS6110 kopya sayısı fazla olanlarda ayırım gücü düşük	94
MIRU-VNTR	MIRU	Değişken	Yok	100

Geniş ulusal ve uluslararası çalışmalar:

IS6110-RFLP, tüberkülozun uluslar arası epidemiyolojisinin çalışılması için standart metot olarak kabul edilmektedir. PGRS tipleme, IS6110 ile aynı grup içinde tanımlanan suşlar arasındaki benzerliği doğrulamak veya düşük kopyalı suşları tiplendirmek için önerilmektedir. Bu yöntemle üretilen bantların fazla sayıda olması agaroz jeldeki görüntünün yorumlanmasında zorluk oluşturduğundan, bunun bir primer tipleme tekniği olarak uygulamalarını sınırlamaktadır. Özel bir suşun veya organizma grubunun [örneğin Beijing suşu; 35-43 spoligotype *spacers*

içeren *M. tuberculosis* izolatları. transmisyonu çalışılacağı durumlarda, izolatlar MIRU-VNTR veya spoligotyping gibi amplifikasyon bazlı yöntemlerle taranabilir ve sonra IS6110- RFLP ile suşların aynı olup olmadıkları doğrulanır.

Lokal salgın araştırılması

Genotipleme, hapishane, okul, huzurevi, fabrika, bar gibi bir sosyal kuruluşun içindeki veya hastahanelerdeki salgınla ilişkili suşların karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Salgını doğrulamada ve gelişen çoğul direncin (multi-drug rezistans=MDR) izlenmesinde yararlı olmaktadır. Bu tip salgınların çoğunda iki ortak özellik vardır: İlki, izolatlar sıklıkla kolayca tanımlanabilen bir fenotipik

karakter (ilaç duyarlılık profili gibi) bakımından birlikte gruplandırılmaktadırlar. İkincisi, salgınlar genellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. Bu durumlar yok ise, nozokomiyal veya diğer kurumsal bulaş elimine edilebilir.

IS6110 sıklıkla büyük merkezler için kullanılmaktadır ve analizlerde önemli gecikmeye yol açmaktadır. Salgınların kısa sürede değerlendirilmesinde daha hızlı metotlar faydalı olabilir. İlk PZR-bazlı tipleme teknikleri yetersiz tekrarlanabilirlik göstermekte veya spoligotiplemede olduğu gibi ayırım güçleri düşük olmaktadır. Fakat, MIRU-VNTR, bu problemlerin üstesinden gelmiş gibi görülmektedir. Bu metotlar, bir hastahane kliniğindeki salgın şüphesinde kullanılacak hızlı tipleme için uygundur.

Laboratuvar içi çapraz bulaşın değerlendirilmesi:

Laboratuvar içi çapraz bulaş, tüberkülozdaki süregelen problemlerden birisidir. Çapraz bulaş oranları %0.1-65 arasında değişmektedir. En iyi organize edilmiş laboratuvarlarda oran <1% olmalıdır. Moleküler tipleme teknikleri çapraz bulaşmayı göstererek, gereksiz tedavinin önüne geçmektedir.

PZR-bazlı amplifikasyon metotları, basit ve hızlı olmaları nedeniyle bu uygulama için çok önemlidir. Muhtemel çapraz bulaş IS6110-RFLP gibi belirleyici bir yöntemle doğrulanabilir. Bu gibi durumlarda; PZR'nin hızı ile IS6110'un ayırım gücünü almış olan spoligotipleme veya MIRU-VNTR daha uygun görülmektedir.

Araştırmacıya düşen çok sayıda moleküler tipleme yöntemi arasından amacına en uygun olanı seçmektir. Bu seçimi yapmada, Kanduma ve arkadaşları tarafından hazırlanmış olan diyagram yararlı olabilir (Şekil 5).

Sonuç:

M. tuberculosis suşlarının moleküler tiplemesi, epidemiyolojik durum hakkında bilgi verebilir ve tüberküloz pandemisinin karakterizasyonunda kullanılabilir. Ancak moleküler tipleme her zaman geleneksel epidemiyoloji ile korelasyonlu olarak düşünülmelidir. Günümüzde *M.*

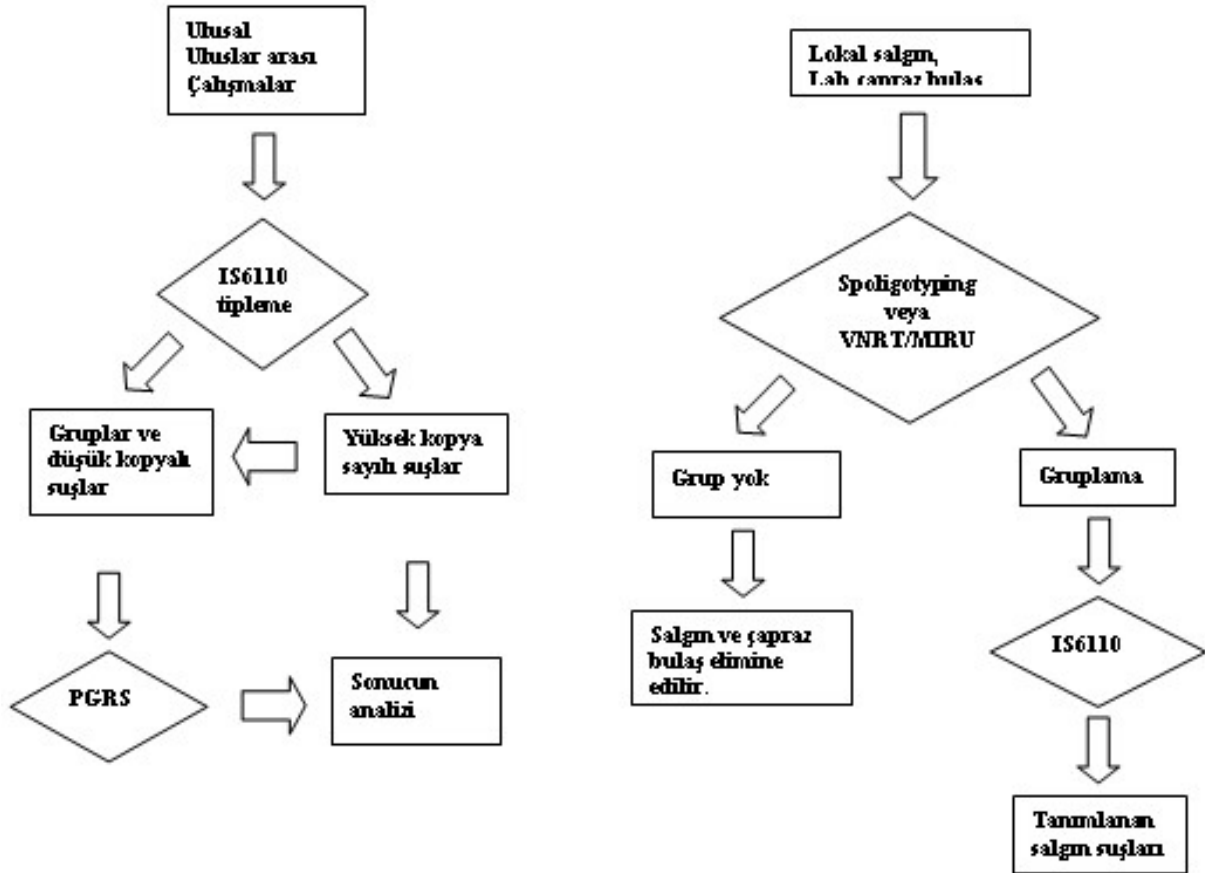
tuberculosis suşlarının tiplendirilmesinde referans standart metot IS6110 RFLP'dir. Bu, ayırt ediciliği en yüksek olan metot olarak değerlendirilir. Ancak uzun zaman almakta, deneyimli personel ve gelişmiş alt yapı gerektirmektedir. Bu nedenle alternatif olarak PZR bazlı yeni metotlar geliştirilmiştir. Ne yazık ki bu yeni metotların hiç biri tek başına IS6110 RFLP ile aynı ayırt etme yeteneğini gösterememiştir. Daha yüksek ayırt etme özelliği elde etmek için yukarıda tanımlanan PZR metotların ikisi yada daha fazlası kombine edilebilir. Birinci metot ile grup oluşturan suşlar belirlenir, ikinci metot ile grup içindeki suşların doğrulaması yapılır. Güvenirliğin yüksek olması için iki metodun tercihen farklı genetik pleomorfizmi kullanması gerekir. En az iki bağımsız markerla uyumlu sonuçlar alınıyorsa, bakteri popülasyonunun klonal ilişkisi belirlenebilir.

Tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi ile ilişkili çalışmalar henüz temel disiplinlerde devam etmektedir. Moleküler teknikler hızlı, basit, güvenilir ve

maliyeti uygun, tüm dünyada ulaşılabilir haline getirildiğinde, klinisyen için gerçekten etkin olacaktır.

Tüberkülozu global olarak azaltmak için ve son hedef olan hastalığın eradikasyonu için, mevcut bütün tanısal ve terapötik araçlar kullanılmalıdır. Bu metotların yalnız endüstriyel ülkelerde değil, gelişmekte olan ülkelere de uygulanması için gerekenler yapılmalıdır. Bu bağlamda,

moleküler biyolojide çok sayıda insanın eğitimi ve bilgilendirilmesi önemlidir.



Şekil 5-Araştırma amacına uygun olarak tiplene yöntemlerinin akış diyagramı.

KAYNAKLAR

- 1-Abed Y, Bolted C, Mica P. Identification and strain differentiation of *Mycobacterium* species on the basis of DNA 16S— 23 S spacer region polymorphism. *Research Microbiol* 1995;146: 405— 413.
- 2-Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 1997;175:1446-1452.
- 3-Collins TA, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: does it help in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Rev Med Microbiol* 2002; 13 (3):119-127.
- 4-Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT. Variable-number tandem repeat typing of mycobacterium tuberculosis isolates with low copy numbers of *IS6110* by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1592-1602.
- 5-Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının genotiplendirmesi: IS6110 ve pTBN12 fingerprinting. In Durmaz R (ed). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti. 2001:181-200.
- 6-Durmaz R, Gunal S, Yang Z, Ozerol IH, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Press in CMI* 2003; 9:000-000.
- 7-Ellis BA, Crawford JT, Braden CR, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1197-1209,
- 8-Fletcher HA. Molecular epidemiology of tuberculosis: recent developments and applications. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7:154-159.
- 9-Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 2001;153:1135-1141.
- 10-Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson JR, Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for sub-typing *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995;33:1383-1384.
- 11-Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28; 2051-2058.
- 12-Jasmer RM, Hahn JA, Small PM, et al. A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med* 1999;130:971-978.
- 13-Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35: 907—914.
- 14-Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strains typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 781-791.
- 15-Kochi A. Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. *Immunobiol* 1994;191: 325-336.
- 16-Kremer K, van den Brandt A, Kurepina NE, Glynn J, Bifani PJ, van Soolingen D. Definition of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *European Union Concerted Action meeting* 'New genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis', Cascais, Portugal. 2002.
- 17-Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: inter-laboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2607-2618.

- 18-Lockman S, Sheppard JD, Braden CR, et al. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. J Clin Microbiol 2001;39:1042-1047.
- 19-Maguire H, Dale JW, McHugh TD, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995 to 1997 demonstrating low rate of active transmission. Thorax 2002;57: 617—622.
- 20-McHugh TD, Dickens A, Gillespie SH . False molecular clusters due to non-random association of *IS6110* with *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000;38:2081-2086.
- 21-McHugh TD, Newport LE, Gillespie SH. *IS6110* homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis. J Clin Microbiol 1997;35:1769-1771.
- 22-Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rostogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. CMI (2002);8: 694-704.
- 23- Raviglione MC, Jr. Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995;273: 220-226.
- 24-Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 1994;330:1703-1709.
- 25-Small PM, Mc Clenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tompkins LS, Mickelsen PA. 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 1993;31:1677-1682.
- 26-Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Molecular Microbiol 2000;36: 762—771.
- 27-van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardised methodology. J Clin Microbiol 1993;31: 406-409.
- 28-Van Soolingen D, De Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol 1993;31:1987-1995.
- 29-Van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA. 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 1991; 29; 2578-2586.
- 30-Yang Z, Chaves F, Barnes PF, et al. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiological study of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34:3044-3048.
- 31-Yates DM, Drobniewski AF, Wilson SM. Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002;40: 712-714.
- 32-Yuen KY, Chan CM, Chan KS, Yam WC, Ho PL, Chau PY. *IS6110* based amplotyping assay and RFLP fingerprinting of clinical isolates of *M. tuberculosis*. J Clin Pathol 1995;48:924-928.

