

# RUTİN MİKOBAKTERİYOLOJİ LABORATUVARLARI İÇİN ÜÇ ADIMDA MIRU-VNTR

## THREE STEP MIRU-VNTR FOR ROUTINE MYCOBACTERIOLOGY LABORATORY PRACTICE

Nuran ESEN<sup>1</sup>, Aydan ÖZKÜTÜK<sup>1</sup>, Hüseyin ÇOBAN<sup>1</sup>, Emek ATLAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (nuranesen@deu.edu.tr)

### ÖZET

*Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının moleküler tiplendirmesinde pek çok yöntem kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçlarına göre, "Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-Variable Number Tandem Repeats (VNTR)" yönteminin ayırım gücü ve yinelenebilirliği yüksek bulunmuştur. Uygulama kolaylığına da sahip olan bu yöntem, otomatize edilebilir ve çok merkezli çalışmalara uygundur. Ülkemizde diğer moleküler yöntemlerde olduğu gibi MIRU-VNTR profilleri konusunda da yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında özellikle çapraz kontaminasyonları ve hastane kaynaklı enfeksiyonları saptayabilecek en iyi ve en az sayıda MIRU-VNTR kombinasyonlarını belirlemektir. Laboratuvarımızda Ağustos 2004-Temmuz 2006 tarihleri arasındaki iki yıllık dönemde ardışık olarak izole edilen 152 klinik şuşun moleküler tiplendirilmesi yapıldıktan sonra 12 primer kullanılarak elde edilen MIRU-VNTR verileri kendi yazdığımız bilgisayar programı ile geriye dönük incelenmiştir. Programda QBASIC 4,5 programlama dili ile kodlanılan bir yazılım kullanılmıştır. Bu program ile bütün primerler tek tek ve kombine olarak değerlendirilmiştir. Toplam 4095 olası sonuçtan kümeleri ve tek izolatları ayırt edebilecek en iyi kombinasyonlar belirlenmiştir. Çalışılan 152 hastanın sonuçları değerlendirildiğinde; çapraz kontaminasyonları ve hastane kaynaklı enfeksiyonları ortaya koyabilmek için birinci adımda 26, 40, 16, 10 ve 23; ikinci adımda 31, 27, 20 ve 2; üçüncü adımda ise 4, 24 ve 39 numaralı primerlerin kullanılmasının uygun olduğu görülmüştür. Rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarının gereksinimlerini karşılayabilecek olan bu yazılımın kullanımı kolay ve hızlıdır. Tiplendirme yönteminin ayırım gücü yanında hızlı ve maliyet-etkin olması da önem taşımaktadır. Sonuç olarak, gerektiğinde *M. tuberculosis*'in moleküler tiplendirmesi ve epidemiyolojik incelemelerin daha hızlı ve ekonomik yapılabilmesi için MIRU-VNTR yönteminin kademeli yapılması önerilmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*, moleküler tiplendirme, MIRU-VNTR.

### ABSTRACT

Several methods are available for the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. The results of the recent research demonstrated that Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-Variable Number Tandem Repeats (VNTR) method has high discriminatory power and reproducibility, is easy to perform, and available for multi-center studies and automation. However, there is insufficient data about the MIRU-VNTR profiles in Turkey. The aim of this study was to determine the most

appropriate MIRU-VNTR combinations to distinguish cross contaminations and nosocomial infections in routine mycobacteriology laboratory practice. Following molecular typing of 152 clinical isolates which were consecutively isolated from different patients in two years period (August 2004-July 2006) in our laboratory, a retrospective analysis of MIRU-VNTR data of 12 loci primers was performed by an "in-house" computer based programme. The programme was prepared by using Microsoft QuickBASIC programming language and all of the data were calculated by the help of this programme. The best combinations to differentiate the clusters and to identify the unique isolates were determined out of 4095 possible results of 12 different primer pairs. According to our 152 MIRU-VNTR results, to determine cross contaminations and nosocomial infections in routine mycobacteriology laboratory practice, we recommend to use primers 26, 40, 16, 10 and 23 in the first step; primers 31, 27, 20 and 2 in the second step, and primers 4, 24 and 39 in the third step. The created software is user friendly, fast and meets the requirements of routine clinical mycobacteriology laboratories. Besides its discriminatory power, the speed and cost-effectiveness of a typing method is also considerable. According to the results of this study it was suggested that for more rapid and economic molecular typing of *M.tuberculosis* and related epidemiological investigations, MIRU-VNTR should be performed in a stepwise manner.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, molecular typing, MIRU-VNTR.

## GİRİŞ

Tüberküloz, morbidite ve mortalitenin tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. Ülkemizde 2005 yılı verilerine göre tüberküloz insidansı 100.000'de 26; enfeksiyon prevalansı da %25 olarak bildirilmiştir<sup>1</sup>. Tüberküloz ile mücadelede gerekli stratejilerin belirlenmesi için, bulaş kaynaklarının ve salgınların ortaya çıkarılması gerekmektedir. Belirli bir *Mycobacterium tuberculosis* suşunun duyarlı bir popülasyonda yayılırken yakalanmasının çok zor olduğu bilinmektedir. Aktif tüberkülozlu bireylerden izole edilen suşların tiplendirilmesi; enfeksiyon kaynağı, yayılım dinamiği ve özelliklerinin ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin gelişmesi, klasik epidemiyolojik verilerin değerlendirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Türkiye'de tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalar daha çok IS6110 RFLP ve pTBN12 tiplendirme yöntemlerine dayalı olarak yapılmıştır<sup>2,3</sup>. Tiplendirme yöntemlerinin; uygulaması kolay, hızlı, yinelenebilir, ekonomik ve klinik örneğe direkt olarak uygulanabilir olması tercih edilmektedir. Ayrıca, yöntemin ayırım gücü ve stabilitesi de epidemiyolojik araştırmalarda önem taşımaktadır. Günümüzde kullanılan yöntemler bu ölçütlerin tümünü karşılayamamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre "Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)-Variable Number Tandem Repeats (VNTR)" yöntemi; ayırım gücü ile tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay, çok merkezli çalışmalara uygun ve otomatize edilebilir bir yöntemdir<sup>3,4</sup>. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı bu yöntemle aynı gün içerisinde sonuç verilebilmektedir. IS6110 RFLP ve spoligotiplleme ile kıyaslandığında, MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirme daha fazla ayırıcı profil oluşturmaktadır. Bu nedenle, kabul edilebilir uluslararası standart protokolün adaptasyonunu takiben MIRU-VNTR yöntemi, yakın gelecekte IS6110'u gölgede bırakacaktır<sup>4-7</sup>.

Ülkemizdeki MIRU-VNTR profillerine ait yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, bölgemizden izole edilen *M.tuberculosis* suşları MIRU-VNTR yöntemi ile tiplendirilmiş ve ilk kez QBasic programlama dili kullanarak yazdığımız bir program ile MIRU-VNTR so-

nuçlarının geriye dönük değerlendirilmesi yapılarak, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında MIRU-VNTR 12 primer setinin bir arada değil, aşamalı olarak uygulanması önerilmiştir. Böylece bu yöntem, laboratuvar çapraz kontaminasyonlarının belirlenmesinde ve reaktivasyon-reenfeksiyon ayırımında kullanılırken, zaman, emek ve gider yönünden tasarruf edilebilecektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarına Ağustos 2004-Temmuz 2006 tarihleri arasında başvuran aktif tüberküloz ön tanılı hasta örneklerinden izole edilen ve *M.tuberculosis* kompleks olarak tanımlanan ardışık 152 hastaya ait izolat ile kontrol olarak H37Rv suşu alındı. *M.tuberculosis* izolatları için kromozomal DNA izolasyonu, MIRU-VNTR gen bölgelerine göre tiplendirme; uluslararası, standardize edilmiş protokollerle yapıldı<sup>6,8</sup>.

*M.tuberculosis* izolatına ait kültürden koloniler 1 ml serum fizyolojik içerisine alınarak 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Çökelti üzerine 250 µl 1XTE tamponu eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Tekrar 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra çökelti üzerine 250 µl 1XTE tamponu eklenerek, 95°C'de 10 dakika inkübe edildi. Santrifüj işlemi tekrarlandı ve süpernatant kısım DNA ekstraktı olarak -20°C'de saklandı.

*M.tuberculosis* izolatlarına ait kromozomal DNA'dan MIRU-VNTR gen bölgeleri PCR ile çoğaltılarak elde edildi. Mikobakteriyel genomik DNA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, dH<sub>2</sub>O, 2 mM dNTP, 10X PCR tamponu, %10 DMSO, Hot start Taq DNA polimeraz ve primerlerin bulunduğu bir karışım hazırlandı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo I'de gösterildi.

Hazırlanan karışım, termal döngü cihazına (Techne TC-412) yerleştirilerek 95°C'de 15 dakika ilk denatürasyon gerçekleştirildi. Ardından; 94°C'de 60 saniye, 59°C'de 60 saniye ve 72°C'de 90 saniye olmak üzere 40 döngü uygulandı ve 72°C'de 10 dakika son uzatma yapıldı. Reaksiyon 4°C'de durdurularak amplifikasyon ürünleri jel elektroforezde gösterildi. İlk ve son kuyucuğa moleküler büyüklük göstergesi olarak 100 baz çift (bc)'lik DNA belirteci; diğer kuyucuklara ise her primer için PCR ürünleri yüklendi. Kırk beş dakika 130 voltta elektroforez yapıldıktan sonra UV transilüminatör üzerinde jel görüntüledi.

## BULGULAR

Çalışmamızda, agar jel elektroforez görüntülerine göre her izolat ve her primer için elde edilen bantlar moleküler büyüklük göstergesi ile ayrı ayrı karşılaştırılıp değerlendirilmiştir. Tablo II'de belirtilen MIRU gen bölgeleri için belirlenmiş olan tekrarların büyüklükleri sayesinde tekrar sayıları hesaplanmıştır.

Hasta izolatları (n= 152) ve H37Rv suşu ile elde edilen sonuçlara göre, 12 farklı primer setinin hem tek başlarına hem de diğer primerlerle birlikte kullanıldıkları tüm kombinasyonların ayırım gücü QBASIC 4,5 programlama dili ile kodladığımız yazılım kullanılarak hesaplanmıştır. Primer setleri tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen grup sayıları, tanımlanamayan izolat sayısı ve tek izolattan ibaret grup sayıları Tablo III'te, diğer primerlerle birlikte kullanıldıklarında elde edilen sonuçlar Tablo IV'te gösterilmiştir.

**Tablo I. Çalışmada Yer Alan MIRU-VNTR Primer Dizileri**

Primer	Dizi	
2	İleri	5'-TGG ACT TGC AGC AAT GGA CCA ACT-3'
	Geri	5'-TAC TCG GAC GCC GGC TCA AAA T-3'
4	İleri	5'-GCG CGA GAG CCC GAA CTG C-3'
	Geri	5'-GCG CAG CAG AAA CGC CAG C-3'
10	İleri	5'-GTT CTT GAC CAA CTG CAG TCG TCC-3'
	Geri	5'-GCC ACC TTG GTG ATC AGC TAC CT-3'
16	İleri	5'-TCG GTG ATC GGG TCC AGT CCA AGT A-3'
	Geri	5'-CCC GTC GTG CAG CCC TGG TAC-3'
20	İleri	5'-TCG GAG AGA TGC CCT TCG AGT TAG-3'
	Geri	5'-GGA GAC CGC GAC CAG GTA CTT GTA-3'
23	İleri	5'-CTG TCG ATG GCC GCA ACA AAA CG-3'
	Geri	5'-AGC TCA ACG GGT TCG CCC TTT TGT C-3'
24	İleri	5'-CGA CCA AGA TGT GCA GGA ATA CAT-3'
	Geri	5'-GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA-3'
26	İleri	5'-TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3'
	Geri	5'-CAT AGG CGA CCA GGC GAA TAG-3'
27	İleri	5'-TCG AAA GCC TCT GCG TGC CAG TAA-3'
	Geri	5'-GCG ATG TGA GCG TGC CAC TCA A-3'
31	İleri	5'-ACT GAT TGG CTT CAT ACG GCT TTA-3'
	Geri	5'-GTG CCG ACG TGG TCT TGA T-3'
39	İleri	5'-CGC ATC GAC AAA CTG GAG CCA AAC-3'
	Geri	5'-CGG AAA CGT CTA CGC CCC ACA CAT-3'
40	İleri	5'-GGG TTG CTG GAT GAC AAC GTG T-3'
	Geri	5'-GGG TGA TCT CGG CGA AAT CAG ATA-3'

**Tablo II. MIRU Gen Bölgeleri İçin Belirlenmiş Olan Tekrarların Büyüklükleri\***

	Primer											
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
Bölge**	236	182	272	419	292	131	365	291	321	160	238	276
Tekrar**	53	77	53	53	77	53	54	51	53	53	53	54
H37Rv**	342	413	431	525	446	449	419	444	480	319	344	330

\* 9 no'lu kaynaktan alınmıştır.

\*\* Bölge: MIRU gen bölgelerinin tekrarlar olmadan büyüklüğü; Tekrar: MIRU gen bölgelerinde bir tekrarın büyüklüğü; H37Rv: H37Rv suşunun MIRU gen bölgelerinin tekrarlarıyla birlikte büyüklüğü.

**Tablo III.** Primer Setleri Tek Başlarına Kullanıldıklarında Elde Edilen Küme Sayısı, Tek İzolat Sayısı ve Tanımlanamayan İzolat Sayısı

Primerler	Küme sayısı	Tek izolat sayısı	Tanımlanamayan izolat sayısı
26	7	1	4
27	6	3	3
40	6	0	4
31	5	2	1
24	5	2	3
16	5	1	5
23	5	1	8
10	5	0	10
4	4	0	2
20	4	2	4
2	4	1	7
39	1	0	5

**Tablo IV.** Ayrım Gücü En Yüksek Olan Primer Seti ve Sırasıyla Ayrım Gücünü Artıran Primer Setleri ile Kombinasyon Sonucu Elde Edilen Küme Sayısı, Tek İzolat Sayısı ve Tanımlanamayan İzolat Sayısı

Primerler	Küme sayısı	Tek izolat sayısı	Tanımlanamayan izolat sayısı
26	7	1	4
26, 40	24	7	5
26, 40, 16	47	25	8
26, 40, 16, 10	67	39	13
26, 40, 16, 10, 23	80	56	13
26, 40, 16, 10, 23, 31	89	64	9
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27	98	74	6
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20	103	82	7
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2	108	88	8
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2, 4	110	89	8
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2, 4, 24	111	89	8
26, 40, 16, 10, 23, 31, 27, 20, 2, 4, 24, 39	111	89	8

## TARTIŞMA

Tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, tüberküloz önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. *M.tuberculosis*'in hızlı ve doğru laboratuvar tanısı tüberkülozlu hastaların tedavisinde ve hastalığın kontrolünde çok önemlidir. Tüberkülozla etkin bir mücadele için hızlı ve duyarlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi kadar, epidemiyolojik verilerin alınacağı çalışmalara da ihtiyaç vardır. Bu nedenle son 20 yılda moleküler epidemiyoloji, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur<sup>10,11</sup>. Bu çalışmalar ile farklı coğrafi bölgelerden izole edilen suşlar ve hasta gruplarının özelliklerini içeren veri tabanları oluşturulmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, tıp, moleküler biyoloji, epidemiyoloji ve biyoistatistik gibi birden fazla disiplini ilgilendirmektedir.

Moleküler epidemiyoloji; bir hastalığın yayılımı, patogenezi ve etiyolojisini araştıran bilim olarak tanımlanmaktadır. Bu özelliğe dayanarak moleküler epidemiyolojik çalışmalar; hastalığın yayılımı ile oluşan risk faktörlerinin ortaya çıkarılması, salgınların araştırılması, yayılım gösteren suşların araştırılması, reaktivasyon veya reenfeksiyon olgularının saptanması, patojenlerin dünyadaki yayılımlarının saptanması, farklı suşlarda virulans ve direnç mekanizmalarının anlaşılması, enfeksiyon hastalıklarının yayılım dinamiklerinin ve yayılım yollarının ortaya konması, tedavi ve korunma stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır<sup>3</sup>.

Ülkemiz, bir tarafta Batı Avrupa gibi düşük tüberküloz insidansına sahip ülkelerle komşuyken, diğer taraftan da Eski Sovyetler Birliği ve Asya ülkeleri gibi yüksek insidansa sahip komşuların bulunduğu bir coğrafyada yer almaktadır<sup>12</sup>. Hızlı nüfus artışı ve kırsal alandan büyük şehirlere göçün devam ettiği ülkemizde, tüberkülozla etkin bir mücadele için izole edilen suşların moleküler epidemiyolojik bilgilerinin çıkarılması kaçınılmazdır. IS6110 RFLP referans yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, benzer paternlere sahip veya düşük kopya sayılı izolatların ayırımında yeterli olmamaktadır<sup>13</sup>. Bu nedenle, ek yöntemlerin kullanılması ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Bu yöntemler arasında; spoligotiplendirme, pTBN12, MIRU-VNTR, DRE-PCR, RAPD-PCR bulunmaktadır<sup>4,13,14</sup>.

Son yıllarda, yeni moleküler yöntemlerin tanımlanması, tüberküloz epidemiyolojisi ve filogenetik analizlere önemli katkılarda bulunmuştur. 1997 yılında Supply ve arkadaşları<sup>15</sup> tarafından geliştirilen MIRU-VNTR yöntemi sonraki yıllarda uygulaması daha pratik hale getirilmiştir. 2002 yılı içerisinde bildirilen bir çalışmada, Güney Afrika'da altı yıl içinde toplam 56 hastadan alınmış 123 izolat IS6110 ve MIRU-VNTR yöntemleri kullanılarak kümeler oluşturulmuştur. Altı yıllık süre içinde MIRU-VNTR yönteminin tekrarlanabilirliği oldukça yüksek bulunmuş, 56 hastanın 55 (%98.2)'inde karşılaştırılan izolatlar yıllar içinde aynı genetik profili göstermiştir. IS6110 yöntemiyle ise 56 hasta izolatından sadece 45 (%80.3)'ünde yıllar içinde aynı genetik profil gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar MIRU-VNTR yönteminin kolay uygulanabilir ve hızlı olmasının yanında tekrarlanabilirliği yönünden de IS6110 yöntemine göre daha iyi performans gösterdiği sonucunda birleşmişlerdir<sup>5</sup>.

Spoligotiplendirme ve MIRU yöntemlerinin birlikte uygulandığı bir çalışmada, 11 farklı coğrafi bölgeden alınmış 116 *M.tuberculosis* klinik izolatı genetik profil yönünden değerlendirilmiştir. Ayırt edici gücün Hunter-Gaston İndeksi (HGI) ile saptandığı bu çalış-

mada, spoligotipleme ve MIRU değerleri sırasıyla 0.956 ve 0.988 olarak saptanmış, sonuç olarak MIRU yönteminin ayırım gücü daha yüksek bulunmuştur<sup>4</sup>. Supply ve arkadaşlarının<sup>6</sup> 2001 yılındaki çalışmalarında; 38 ayrı ülkeden, DNA dizi analiziyle 90 farklı *M.tuberculosis* izolatı olduğu belirlenen suşlara MIRU-VNTR yöntemi uygulanmış ve bu yöntemin diğer moleküler tiplendirme yöntemlerinden daha fazla ayırım gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, geliştirilen web sitesiyle MIRU-VNTR genotiplerinin internet yoluyla analizinin mümkün olduğu vurgulanmış, bunun da *M.tuberculosis*'in epidemiyolojik çalışmalarına evrensellik katacağı ve bu patojenin evriminin daha iyi izleneceği belirtilmiştir<sup>6</sup>.

Bu çalışmada, 152 hasta izolatı ve H37Rv suşu ile elde edilen MIRU-VNTR sonuçları incelenmiştir. On iki farklı primer setinin hem tek başlarına hem de diğer primerlerle birlikte kullanıldıkları tüm kombinasyonların ayırım gücü QBASIC 4,5 programlama dili ile kodlanılan bir yazılım kullanılarak hesaplanmıştır. Bu program ile bütün primerler tek tek ve kombine halde sırasıyla değerlendirilmiştir. Sıralama, öncelikle ortaya çıkan küme sayısına göre yapılmıştır. Ortaya çıkan küme sayısı ne kadar fazla ise o primer kombinasyonunun önceliğe sahip olduğu kabul edilmiştir. Küme sayısından sonra, sıralamayı, tanımlanamayan izolat sayısının ne kadar az olduğu belirlemiştir. Bu programla son olarak tek izolat sayısına önem verilmiştir. Küme sayısının ve tanımlanamayan izolat sayısının eşit olduğu durumlarda, tek izolat sayısı fazla olan kombinasyon daha iyi ayırım gücüne sahip olarak kabul edilmiştir. Literatürdeki diğer MIRU-VNTR çalışmalarından farklı olarak, bu çalışmada kullanılan QBASIC 4,5 programlama dili ile kodlanılan bir yazılım kullanılmıştır. Sola ve arkadaşlarının<sup>4</sup> çalışmasında, bu çalışma ile aynı primerler kullanılmış, her birinin ayırım gücü ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu çalışmada ise hem primerlerin ayırım gücü tek tek hesaplanmış hem de tüm kombinasyonların ayırım güçleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre primer setleri tek başlarına değerlendirildiklerinde en yüksek ayırım gücü primer 26 ile saptanırken, en düşük ayırım primer 39 ile elde edilmiştir (Tablo IV).

Primer setleri tek başlarına değerlendirildiklerinde; primer 26'nın hemen altında ikinci sırada ayırım gücüne sahip olduğu saptanan primer 27'nin, primer setleri birlikte değerlendirildiğinde ayırım gücünün yedinci sıraya gerilediği saptanmıştır. Bu sonuç, ikinci sırada yer alan primer 27 ile elde edilen kopya sayılarının birinci sırada yer alan primer 26 ile elde edilen kopya sayılarına paralel olması nedeniyle ortaya çıktığını düşündürmektedir. Tek başına değerlendirildiğinde ayırım gücü yüksek bulunsa da, sonuçları primer 26 ile paralellik gösterdiği için kombinasyonda ayırım gücüne katkısı azalmaktadır. Primer 31 ve primer 24 için de benzer sonuçlar elde edilirken, primer 40, primer 16 ve primer 23 ise aksine tek başlarına değerlendirildiklerinde daha alt sıralarda yer alırken, kombinasyonlarda ayırım gücüne daha fazla katkı sağladıkları saptanmıştır (Tablo II ve IV). On iki bölgeye ait primer setlerinin hepsi kullanıldığında, primer 4'ün küme sayısını iki, primer 24'ün sadece bir artırdığı, primer 39'un ise küme sayısına etkisinin olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında bizim toplumumuzdan elde edilen suşlarda moleküler çalışmalarda 4, 24 ve 39 bölgelerine ait primerleri kullanmanın önemli katkısı olamayacağı söylenebilir.

Bu çalışmada, bilgisayar programı ile elde edilen kombinasyonlarda en yüksek ayrımı sağlayan primerler olarak tespit edilen 26, 40, 16, 10 ve 31 arasından, primer 16 dışındaki kalanların ayırım gücü Sola ve arkadaşlarının<sup>4</sup> çalışmasında da çok yüksek düzeyde bulunmuştur. Daha sonraki sıralamalarda ise ayırım güçlerinde farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılıklar, toplumlar arasındaki farklılardan kaynaklanabileceği gibi, bu çalışmada kullanılan bilgisayar programına da bağlı olabilir. Aynı çalışmada primerlerin ayırım gücü tek tek değerlendirilirken, bu çalışmada kopya sayılarındaki paralellik nedeniyle birbirlerine benzer şekilde ayırma neden olan primerlerin, elde edilen kombinasyonlardaki öncelik sırasını değiştirdiği düşünülebilir.

Bir tiplendirme yönteminin ayırımı güçlü bir şekilde yapmasının yanında hızlı sonuç vermesi ve maliyetinin düşük olması da önemlidir. *M.tuberculosis*'in moleküler olarak tiplendirilmesinin gerektiği durumlarda ve epidemiyolojik çalışmalarda MIRU-VNTR primerlerini kademeli bir şekilde kullanarak yöntemin daha hızlı sonuç vermesi ve ekonomik olması sağlanabilir. Primer setleri birlikte kullanıldıklarında ayırım güçlerine göre gruplara ayrılabilir. Birinci adımda kullanılması önerilen primer setleri olan 26, 40, 16, 10 ve 23 ile gerekli ayırım sağlanamıyorsa ikinci adıma geçilmelidir. İkinci adımda ise 31, 27, 20 ve 2 numaralı primer setleri önerilmektedir. Bu çalışmada 152 izolattan 150 tanesine katkısı olmadığı saptanan 4, 24 ve 39 numaralı primer setleri ise üçüncü adımda yer almaktadır. Bu analizlerin daha fazla sayıda hastaya ait verilerle yapılması, sonuçların daha fazla değer kazanması açısından önemlidir. Primer setlerinin kademeli bir biçimde kullanılmasının zaman ve ekonomik yönden fayda sağlayacağı açıktır.

Sonuç olarak, moleküler yöntemler geliştirilmeden önce, tüberküloz epidemiyolojisinde çözümlenmemiş birçok sorun mevcutken, aktif yayılımın ortaya çıkarılması amacıyla moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanılmaya başlaması, geleneksel yöntemler ile ayırt edilemeyen izolatların tanımlanmasını sağlamıştır. Bu çalışmalar, epidemiyolojik verilerle birleştirildiğinde ilişkili olgular ortaya çıkarılabilmektedir. Nüfusunun büyük çoğunluğu şehirlerde yaşayan geniş bir coğrafyaya sahip ülkemizde, tüberküloz ciddi bir tehdit unsuru olmaya devam etmektedir. Birçok kurumun ortak çalışmasıyla standart yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Arzu edilen, ülkemizdeki tüberküloz hastalarının tüm klasik epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve buna dayalı olarak yapılacak moleküler tiplendirme yöntemlerinin sonuçlarından da yararlanılarak daha etkin korunma ve kontrol önlemlerinin geliştirilmesidir. Ayrıca ülkemizde tüberkülozun yayılımı, tüberküloz hastaları arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya çıkarılması ve farklı coğrafi bölgelerdeki hastalardan izole edilen *M.tuberculosis* suşlarının genotipik özelliklerinin belirlenmesi için çok merkezli çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı. Türkiye'de Verem Savaşı, 2007 Raporu. Ankara, 2007.
2. Durmaz, R, Gunal S, Yang Z, Ozerol IH, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 873-7.
3. Durmaz R. Tüberkülozun moleküler epidemiyolojisinde yeni gelişmeler. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 9-12 Aralık 2004, İzmir. Sempozyum Kitabı, s: 41-6.



4. Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 125-33.
5. Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, et al. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4561-6.
6. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3563-71.
7. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 691-7.
8. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1901-6.
9. Kwara A, Schiro R, Cowan LS, et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 4: 2683-5.
10. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 141-7.
11. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 418-28.
12. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye’de tüberküloz epidemiyolojisi ve kontrolü, s: 821-33. Uzun Ö, Ünal S (eds), Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları. 2002, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
13. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2607-18.
14. Singh HB, Chauhan DS, Singh D, et al. Rapid discrimination of Indian isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis-A preliminary report. *Indian J Med Microbiol* 2002; 20: 69-71.
15. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 1997; 26: 991-1003.