

TÜBERKÜLOZ TANISI VE MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ÇALIŞMALARDA ELDE EDİLEN LABORATUVAR SONUÇLARINA YAKLAŞIMIMIZ NASIL OLMALI ?

Orhan Kaya KÖKSALAN

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Tüberküloz Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı,
Çapa, İSTANBUL
okkoksalan@hotmail.com

ÖZET

Son 10-20 yıl içinde moleküler epidemiyoloji konusunda yapılan çalışmalar, konvansiyonel epidemiyolojik yöntemlerle birlikte kullanıldığında, tüberküloz bulaş dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Sürekli gelişen yöntemler, yerel ve global tüberküloz epidemiyolojisinin daha ayrıntılı ve kesin anlaşılmasını olanaklı hale getirmiştir. Hangi yöntemleri ne zaman kullanacağımızı her bir merkezin ihtiyaçları ve amaçları bizzat belirleyecektir.

Anahtar sözcükler: DNA parmakizi, moleküler epidemiyoloji, tüberküloz

SUMMARY

The Approach to the Results of Molecular Epidemiological Typing Studies in Tuberculosis

Molecular epidemiologic studies over the past one to two decades, when combined with conventional epidemiological tools have yielded a better understanding of tuberculosis transmission dynamics. The ever developing methods has achieved a greater resolution and accuracy in describing the local and global epidemiology of tuberculosis. The decision when and which method to use is totally dependent on each research centre's own need and aims.

Keywords: DNA fingerprinting, molecular epidemiology, tuberculosis

Son yıllarda geliştirilen moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerin konvansiyonel epidemiyolojik araçlarla birlikte kullanımı, *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının daha kesin olarak birbirinden ayırdanmasını ve hastalığın toplum içinde bulaş ve yayılma dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır⁽²⁶⁾.

KLİNİK FAYDALAR

1. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri ile elde edilen sonuçlar tüberküloz laboratuvarlarındaki kros-kontaminasyonların varlığından şüphelenilmesi, saptanması ve zaten şüphelenilen hallerde onaylanmasını sağlayabilmektedir. Klinik tüberküloz laboratuvarlarında *M.tuberculosis* üretilen hastaların yaklaşık olarak % 3'ünde⁽³⁾, ki bu oran bazı yayınlarda % 16'ya kadar çıkmaktadır⁽⁷⁾, tüberküloz hastalığı gerçekte bulunmamaktadır. ARB yayması negatif ve sadece tek kültürde pozitifliğin sap-

tandığı olgularda kros-kontaminasyon olasılığı daha yüksektir. Klinik bulguların tüberkülozu düşündürmediği, yayma negatif tek kültür pozitif olgularda moleküler tiplendirme yöntemleri de kros-kontaminasyonu işaret ediyorsa, anti-tüberküloz tedaviye başlanmaz, eğer başlandıysa tedavi kesilir.

2. Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin bir diğer klinik faydası aynı hastadan izole edilen suşun değişik direnç paternleri göstermesi halinde ortaya çıkar;

a. Önceleri duyarlı olan bir suş zaman içinde "dirençli" sonuç veriyorsa, şu olasılıklar akla gelmelidir; ya hastalığın başından beri mevcut olan suş tedavi esnasında dirençli hale gelmiş veya hasta dirençli farklı bir suşla reinfekte olmuş veya hastanın kültürü laboratuvardaki ekim prosedürü esnasında dirençli bir diğer suşla kros-kontamine olmuştur. Hastadan izole edilen suşlarla, hastanın materyalinin işlendiği

gün laboratuvarında üreyen diğer suşların moleküler epidemiyolojik tiplendirilmesi (genotiplendirmesi) bu olasılıkların hangisinin söz konusu olduğunu ortaya çıkarır. Birinci olasılık söz konusu ise, yani duyarlı orijinal suş tedavi uyumsuzluğu, malabsorbsiyon veya ilaç etkileşmesi sonucu dirençli hale geldi ve ilk ve sonrasında ki kültürlerde üretilen suşların parmakizleri aynı (özdeş) ise, tedavi şemasında değişiklik yapılmalıdır. İkinci olasılık yani reinfeksiyon söz konusu ise yani ilk ve sonrasındaki kültürlerde üretilen suşların parmakizleri farklı ise tedavi şemasında yine değişiklik yapılmalı, bunun yanı sıra kaynak olgunun belirlenmesine çalışılmalıdır. Üçüncü olasılık, kros kontaminasyon söz konusu ise, tedavi şemasında bir değişiklik yapılmamalı, kültür tekrar edilmelidir.

b. Daha nadiren dirençli bir suş, reinfeksiyon veya laboratuvar kros-kontaminasyonuna bağlı olarak sonradan duyarlı sonuç verebilir. Hangi olasılığın incelenen özel durumda söz konusu olduğu yine genotiplendirme ile saptanır.

Rekürren tüberküloz olgularında, eğer her iki episoda neden olan suşun da genotiplendirmesi yapıldıysa, ikinci episodun relaps mı yoksa yeni bir suşla reinfeksiyona mı bağlı olarak geliştiği saptanabilir. Relaps söz konusu ise tedavi başarısızlığına hükmedilir.

EPİDEMİYOLOJİK FAYDALAR

Moleküler epidemiyolojik yöntemler, küçük ölçekte değerlendirildiğinde bulaşları saptayarak epidemiyolojik veri oluşturma yanısıra, global düzeyde tüberküloz hastalığının dünyanın değişik bölgelerinde dağılım dinamiklerinin saptanmasına yardımcı olur. Ancak bu iki farklı amaç için kullanılan yöntemler de farklıdır. Yerel epidemiyolojik çalışmalar için tekrarlayıcı DNA elemanlarını temel alan spoligotyping, MIRU-VNTR, IS6110-RFLP gibi yöntemler kullanılırken^(14,15,17,18,22-25,30), dünya bazında tüberküloz hastalığının yayılımı, filogenetik ve filocoğrafik çalışmalar söz konusu olduğunda, tüm genom düzeyinde genetik varyasyonların saptanmasını temel alan, "Large Sequence Polymorphisms (LSPs)" ve "Single Nucleotide Polymorphism (SNP)"lerden faydalanılır.

maktadır. Mikobakterilerdeki büyük dizi polimorfizmleri (LSPs), tüm genom karşılaştırmalı hibridizasyonu temelli DNA microarray teknolojisi kullanılarak saptanır^(4,16,19-21,28,29). SNP'ler ise tüm genomu deşifre edilmiş *M.tuberculosis* suşlarının dizilerinin bilgisayar ortamında "in-silico" karşılaştırılması ile saptanır^(1,5,6,8,11-13).

Küçük ölçekte, başka bir deyişle yerel epidemiyolojik çalışmaların bir parçası olarak moleküler yöntemler kullanıldığında, ki bunlar yukarıda da bahsedildiği gibi, tekrarlayıcı DNA elemanlarını temel alan spoligotyping, MIRU-VNTR, IS6110-RFLP gibi yöntemlerdir,

- a. Bulaş zinciri içinde yer alan hastalar, bu zincirin kaynak ve endeks olguları saptanabilir. Bulaşın karakteristiği tespit edilip, bulaştırıcı hastalar tedavi edildiğinden bulaş durdurulabilir.
- b. Bölgesel önemi olan tüberküloz genotipleri belirlenebilir. Bunların hastalık formları, antitüberküloz ilaçlarla ilişkileri saptanabilir. Bir coğrafi bölgeye spesifik olup aynı zamanda yaygın olarak bulunabilen genoailer saptanabilir. Bir tüberküloz klonunun devamı olan bir popülasyonun bölgeye özgün yapısal özellikler kazanması, fenotipik ve genotipik yeni ve farklı *M.tuberculosis* popülasyonlarının ortaya çıkmasına neden olabilir ki, belki de *Mycobacterium bovis* BCG aşılamalarına yanıtın bölgesel farklılıklar göstermesi, dünyanın bazı bölgelerinde ekstrapulmoner tüberküloza yatkınlığın fazla olması, en azından kısmi olarak, farklı bölgelerdeki farklılaşmış *M.tuberculosis* popülasyonlarının varlığına bağlıdır⁽²⁾.

Tüberküloz suşlarının global dağılımı, değişik bölgelerdeki tüberküloz suşlarının birbirleriyle ilişkisi, kökenlerinin araştırılması da moleküler epidemiyolojik yöntemlerle mümkün olmuştur. Ancak tekrarlayıcı DNA elemanlarına dayanan standard moleküler epidemiyolojik yöntemler, görece hızlı değişime uğrayıp, yavaş (konverjan) mikroevolesyonlar geçirdiğinden, çok farklı kökenlerden gelen suşlar aynı parmakizi paternleri (homoplazi) gösterir ve geçmişe yönelik derin filogenetik izler saptana-

maz. Bu amaçla yukarıda bahsedilen LSP ve SNP analizleri çok daha iyi yol göstericidir. Bu sayede değişik araştırmacılar tüberküloz suşlarının 4-6 ana kökenden yayıldığını saptamışlardır^(2,5,9,12,27). Farklılaşmış, genetik varyasyonlar gösteren *M.tuberculosis* popülasyonlarının varlığı bazı tanı testlerinin bazı tüberküloz suşlarında negatif sonuç vermesine yol açabilir. Genetik varyasyonlar sonucunda, bazı coğrafyalarda daha sık bulunan tüberküloz soylarının antitüberküloz ilaçlara karşı doğal direnç sağlayan polimorfizmlere sahip olma olasılığı mevcuttur⁽¹⁰⁾.

Moleküler yöntemlerin tüberküloz alanına girmesi tüberkülozun yerel ve yaygın epidemiyolojisine önemli katkıda bulunmuştur. Yukarıda sayılan değişik faydaların hepsi moleküler epidemiyolojik tüberküloz yöntemleri uygulanarak sağlanabilir. Bu testlerin uygulanmasına ve sonuçlarına yaklaşımımızı her bir araştırma merkezinin kendi amaçları belirleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Alland D, Whittam TS, Murray MB et al: Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: application to Mycobacterium tuberculosis evolution and pathogenesis, J Bacteriol 2003;185(11):3392-9.
2. Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniewski F: Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for Mycobacterium tuberculosis, Emerg Infect Dis 2004;10(9):1568-77.
3. Barnes PF, Cave MD: Molecular epidemiology of tuberculosis, N Engl J Med 2003;349(12):1149-56.
4. Behr MA, Wilson MA, Gill WP et al: Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray, Science 1999;284(5419):1520-3.
5. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al: Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence, Nature 1998;393(6685):537-44.
6. Filliol I, Motiwalla AS, Cavatore M et al: Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP Set, J Bacteriol 2006;188(2):759-72.
7. Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL: An outbreak of tuberculosis caused by multi-drug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection, Ann Intern Med 1992;117(3):177-83.
8. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA et al: Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains, J Bacteriol 2002;184(19):5479-90.
9. Gagneux S, DeRiemer K, Van T et al: Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis, Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(8):2869-73.
10. Gagneux S, Small PM: Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development, Lancet Infect Dis 2007;7(5):328-37.
11. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC et al: The complete genome sequence of Mycobacterium bovis, Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(13):7877-82.
12. Gutacker MM, Mathema B, Soini H et al: Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis strains from 4 geographic sites, J Infect Dis 2006;193(1):121-8.
13. Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CA et al: Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains, Genetics 2002;162(4):1533-43.
14. Kam KM, Yip CW, Tse LW et al: Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating Mycobacterium tuberculosis strains in the Beijing family, FEMS Microbiol Lett 2006;256(2):258-65.
15. 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(4):907-14.
16. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR et al: Comparing genomes within the species Mycobacterium tuberculosis, Genome Res 2001;11(4):547-54.
17. Kremer K, Au BK, Yip PC et al: Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping, J Clin Microbiol 2005;43(1):314-20.
18. 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(4):1901-6.
19. Mostowy S, Cousins D, Behr MA: Genomic interrogation of the *Mycobacterium tuberculosis* complex reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *J Bacteriol* 2004;186(1):104-9.
 20. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA: Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *J Infect Dis* 2002;186(1):74-80.
 21. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S et al: Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*, *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3594-9.
 22. Oelemann MC, Diel R, Vatin V et al: Assessment of an optimized *Mycobacterium tuberculosis* interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis, *J Clin Microbiol* 2006;45(3):691-7.
 23. Roring S, Scott A, Brittain D et al: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping, *J Clin Microbiol* 2002;40(6):2126-33.
 24. Roring S, Scott AN, Hewinson RG, Neill SD, Skuce RA: Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland, *Vet Microbiol* 2004;101(1):65-73.
 25. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF et al: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets, *Microbiology* 2002;148(Pt 2):519-28.
 26. Small PM, van Embden JDA: Molecular epidemiology of tuberculosis, "Bloom BR (ed): *Tuberculosis Pathogenesis, Protection, and Control*" kitabında s.569-82, ASM Press, Washington, DC (1994).
 27. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE et al: Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(18):9869-74.
 28. Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS et al: Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3185-91.
 29. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K et al: Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(14):4865-70.
 30. Zhang L, Chen J, Shen X et al: Highly polymorphic variable-number tandem repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China, *FEMS Microbiol Lett* 2008;282(1):22-31.