

TÜBERKÜLOZDA MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Orhan Kaya KÖKSALAN

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

ÖZET

Son 10 yıl içinde moleküler epidemiyoloji konusunda yapılan çalışmalar, konvansiyonel epidemiyolojik yöntemlerle birlikte kullanıldığında, tüberküloz bulaş dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Sürekli gelişen yöntemler, sadece yerel ve global tüberküloz epidemiyolojisinin daha ayrıntılı ve kesin anlaşılmasını sağlamakla kalmamış, aynı zamanda suş ailelerinin epidemiyolojik önemi olabilecek özelliklerini belirleyerek populasyon genetik yaklaşımlara da katkıda bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: DNA parmakizi, moleküler epidemiyoloji, tüberküloz

SUMMARY

Molecular Epidemiological Typing Methods in Tuberculosis

Molecular epidemiologic studies over the past 10 years, when combined with conventional epidemiological tools, have yielded a better understanding of tuberculosis transmission dynamics. The ever developing methods has not only achieved a greater resolution and accuracy in describing the local and global epidemiology of tuberculosis, but also have contributed further to population genetic approaches which have suggested epidemiologically relevant characteristics specific to strain families as well.

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 ayırılmasını ve hastalığın toplum içinde bulaş ve yayılma dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır⁽⁹⁾.

Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanımıyla birlikte;

- 1) epidemiyolojik olarak şüpheli bulaşların onaylanması,
- 2) epidemiyolojik olarak şüphelenilmeyen bulaşların saptanması,
- 3) laboratuvarlardaki (besiyerlerindeki) kros-kontaminasyonların saptanması,
- 4) kaynak olgunun belirlenmesi,
- 5) tekrarlayan tüberküloz olgularının reaktivasyona mı yoksa re-infeksiyona mı bağlı olduğunun saptanması,
- 6) tüberkülozun küresel ve yerel yayılımının

ayrıntılarının anlaşılabilmesi mümkün olmuştur.

Tüberküloz suşlarının genomlarının unique (tek kopya) bölgeleri yüksek düzeyde homojenlik gösterdiklerinden, suşlarını birbirinden ayırılmasında tekrarlayıcı elemanlardan faydalanır⁽⁹⁾; çünkü tekrarlayıcı elemanlar her tüberküloz suşunun genomunda farklı yerlerde yerleşir ve/veya farklı sayıda bulunurlar. Bugüne kadar onlarca farklı tekrarlayıcı eleman saptanmış olmasına rağmen, bugün için en çok kabul gören ve en sık kullanılan tekrarlayıcı elemanlar IS6110, DR ve MIRU'dur.

İdeal bir moleküler epidemiyolojik tiplendirme yönteminin:

- kolay, ucuz ve hızlı,
- ayırd etme gücü ve tekrarlanabilirliğinin yüksek,
- değerlendirme/yorumlanmasının kolay,
- üretilen verilerin saklanması ve paylaşımının kolay olması istenir⁽⁹⁾.

Ancak tüberküloz suşlarının moleküler epidemiyolojik tiplendirmesinde şu anda kullanılmakta olan yöntemlerin hiçbiri yukarıda sayılan bütün bu özelliklerin hepsini birden tam olarak yerine getirememektedir.

Tüm dünyadaki suşlarının dağılım farklılıklarının/benzerliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla standard tek bir yöntemin kullanılmasına 1993 yılında başlanmıştır⁽¹⁴⁾. Bu çalışmada önerilen yöntem IS6110-RFLP olup, 2007 yılına kadar ayırım gücü en yüksek yöntem olarak kalmıştır. Ancak bu üstünlüğüne karşın IS6110 yöntemi emek yoğun bir yöntem olup, fazla sayıda suşun tiplendirmesinin söz konusu olduğu durumlarda yetersiz kalmaktadır. Geniş örnek sayısı ile çalışmanın gerektiği toplum bazlı çalışmalarda, özellikle yüksek insidans ülkelerinde, IS6110 yönteminin bir diğer dezavantajı, parmakizlerinin karşılaştırılması ve kümelenmeye karar verilebilmesi için sofistike bilgisayar programlarına ve çok iyi derecede standardize deney koşullarına ihtiyaç duymasındır⁽¹⁴⁾.

Buna karşılık PCR bazlı iki yöntem olan spoligotyping⁽²⁾ ve 12-loci MIRU-VNTR PCR^(4,12) analizi IS6110-RFLP yöntemine göre çok daha hızlı sonuç verdiği için, fazla sayıda suş ile çalışılması gereken durumlarda iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Her iki yöntem de IS6110-RFLP yöntemine kıyasla daha düşük ayırım gücüne sahip olduğundan, kombine edilerek birlikte kullanılmakta ve bu şekilde ayırım gücü IS6110-RFLP yöntemine yaklaşmaktadır. Diğer iki yönteme (spoligotyping ve 12-loci MIRU-VNTR) göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olması dolayısıyla, IS6110 altın standard yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak yavaş ve emek yoğun olması araştırmacıları hızlı ve aynı zamanda ayırd etme gücü daha yüksek bir yöntem arayışına sevk etmiş ve bu çabalar sonucunda tüberküloz suşlarını daha iyi ayırd eden yeni VNTR gen lokusları belirlenmiştir^(1,3,6-8,10,13). Yakın zaman içinde, 15-24 çok değişken gen lokusu içeren yeni bir MIRU-VNTR yönteminin, IS6110-RFLP'den daha yüksek ayırd etme gücüne sahip olduğu bildirilmiş, standard bir yöntem olarak kullanımı önerilmiştir^(5,11).

Son 10 yıl içindeki moleküler epidemiyolojik çalışmalar sonucu geliştirilen yöntemler konvansiyonel tüberküloz epidemiyolojisiyle birleştirildiğinde, tüberküloz bulaş dinamiklerini daha iyi anlamamızı sağlamış, klinik faydalar yanında yerel ve global tüberküloz epidemiyolojisi, suş ailelerinin varlığı, dağılımı ve hastalığın yayılımındaki olası etkilerini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Oelemann MC, Diel R, Vatin V et al: Assessment of an optimized Mycobacterial 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 (Epub ahead of print).
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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).
10. Smittipat N, Billamas P, Palittapongarnpim M et al: Polymorphism of variable-number tandem repeats at

- multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5034-43.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S et al: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4498-510.
 12. 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(10):3563-71.
 13. Surikova OV, Voitech DS, Kuzmicheva G et al: Efficient differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci, *Eur J Epidemiol* 2005;20(1):963-74.
 14. van Embden JD, Cave MD Crawford JT et al: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology, *J Clin Microbiol* 1993;31(2):406-9.