



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mycobacterium tuberculosis SUŞLARINDA ANTI-TÜBERKÜLO İLAÇLARA
DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Sezcan SAĞLAM

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2016



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mycobacterium tuberculosis SUŞLARINDA ANTI-TÜBERKÜLO İLAÇLARA
DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Sezcan SAĞLAM

Danışman: Prof. Dr. Cüneyt ÖZAKIN

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2016

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
İngilizce Özet	iii
Giriş	
I. <i>Mycobacterium</i> türlerinin morfolojik yapısı	3
II. <i>Mycobacterium</i> türlerinin sınıflandırılması	4
III. <i>Mycobacterium</i> türlerinin üreme özellikleri	6
IV. Epidemiyoloji	7
V. <i>Mycobacterium</i> türlerinin genetik özellikleri	9
VI. <i>Mycobacterium</i> türlerinin laboratuvar tanısı	9
VII. Antimikobakteriyel ilaçlar	16
VIII. Duyarlılık testleri	19
IX. İlaç direnci	26
Gereç ve Yöntem	
I. Çalışma suşları	31
II. Moleküler çalışma	32
Bulgular	36
Tartışma ve Sonuç	44
Kaynaklar	51
Teşekkür	56
Özgeçmiş	57

ÖZET

Tüberküloz modern tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerine rağmen tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir. Tanıda altın standart halen *M. tuberculosis* kültürüdür. *M. tuberculosis* kültürü, etkenin tanımlanması ve ilaç duyarlılığının çalışılması açısından önemlidir. Rifampin bakterilerde protein sentezini etkileyerek, etambutol ise arabinozil transferaz enzim inhibisyonu ile arabinogalaktan sentezini engelleyerek antimikobakteriyal etki gösteren ve tüberküloz tedavisinde kullanılan major antitüberküloz ilaçlardandır. Bu çalışmada fenotipik ilaç duyarlılık testi ile rifampin ve/veya etambutol direnci belirlenen izolatlarda, *rpoB* ve *embB* gen bölgelerindeki mutasyon varlığının ve mutasyon paternlerinin DNA dizi analizi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda rifampin dirençli 7, etambutol dirençli 15, hem rifampin hem de etambutol dirençli 6 olmak üzere toplam 28 suş incelenmiştir. Rifampin dirençli 13 suşun 11'inde (%84,6) *rpoB* geninde mutasyon, etambutol dirençli 21 suşun ise 14'ünde (%66,6) *embB* geninde mutasyon saptanmıştır. *RpoB* mutasyonu saptanan 11 suşun 10'unda 531. kodonda yer alan Ser531Leu (TCG-TTG) mutasyonu bulunmaktadır. Bir suшта ise His526Asn (CAC-AAC) mutasyonu saptanmıştır.

En sık saptanan *embB* mutasyonu 297. kodonda yer alan Ser297Ala (TCG-GCG) mutasyonudur ve 8 suшта saptanmıştır. Dört suшта ise 306. kodonda Met306Val (ATG-GTG) mutasyonu saptanmıştır. İkişer suшта Gly406Asp (GGC-GAC) ve Glu405Asp (GAG-GAC) mutasyonu 1 suшта ise Glu378Ala (GAG-GCG) saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, dizi analizi, *rpoB*, *embB*

SUMMARY

Investigation of Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Molecular Methods

Tuberculosis is an important public health problem in all over the world despite of modern diagnostic, treatment and control methods. The gold standard for diagnosis is still *M. tuberculosis* culture. *M. tuberculosis* culture is important for identification and drug susceptibility tests. Rifampin and ethambutol which have the antimycobacterial effects, are both of the major anti-tuberculosis drugs used in the treatment of tuberculosis, rifampin affects protein synthesis in bacteria and ethambutol also inhibits the synthesis arabinogalactan with arabinosyl transferase enzyme inhibition, respectively.

This study aimed to investigate the presence of mutations in the *embB* and *rpoB* gene regions and mutation patterns by DNA sequence analysis on isolates which have determined rifampicin and/or ethambutol resistance with phenotypic drug susceptibility test.

In this study, we examined the 28 stains which consist of 7 rifampin resistant strains, 15 ethambutol resistant strains, and 6 both rifampin and ethambutol resistant strains. It has been found that there have been mutations on *rpoB* gene regions of 11 of the 13 (84.6%) rifampin resistant strains and also on *embB* gene regions of 12 of 21 (66.6%) etambutol resistant strains. It was determined that the 10 of 11 strains identified in *rpoB* mutation have Ser531Leu (TCG-TTG) mutation which have located at codon 531 and the 1 of 11 strains has also His526Asn (CAC-AAC) mutation.

Ser297Ala (TCG-GCG) mutation is the most frequent *embB* mutation which was found at codon 297 and it was determined on 8 strains. It was also detected that the 4 strains have Met306Val (ATG-GTG) mutation which was

found at codon 306, 2 strains have Gly406Asp (GGC-GAC) and Glu405Asp (GAG-GAC) mutation and finally one strain have Glu378Ala (GAG-GCG) mutation.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, sequence analysis, *rpoB*, *embB*



GİRİŞ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) grubuna ait mikroorganizmaların yol açtığı kronik, granülomatöz ve nekrotizan bir hastalıktır. Bu hastalık insan vücudunda tipik olarak akciğeri etkilemekte ancak akciğer dışında da birçok sisteme yerleşip primer veya sekonder tüberküloz enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir. İnsanlık tarihi kadar eski olmakla birlikte günümüzde enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm sebepleri arasında *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)'den sonra ikinci sırada yer alan pulmoner tüberküloz, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığını tehdit eden major global sağlık problemlerinden birisi olma özelliğini hala sürdürmektedir. Dünya üzerinde her üç kişiden birisinin tüberküloz (TB) basili ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) "Küresel Tüberküloz 2015 Raporu'na göre 2014 yılında 9,6 milyon kişide tüberküloz geliştiği, 1,5 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle öldüğü ve tüberküloz nedenli ölümlerin 400.000'inin HIV ile enfekte kişilerde görüldüğü tahmin edilmektedir. DSÖ'ye 2014 yılında, 6 milyonu yeni vaka bildirilmiştir. Bu da, 2014 yılında geliştiği tahmin edilen 9,6 milyon tüberküloz vakasının yaklaşık %63'ünün saptanabildiğini ve sonuç olarak da vakaların %37'sine tanı konulamadığını ya da tanı konulmuş olsa da ulusal tüberküloz programına bildirilmediğini göstermektedir (1). Türkiye'de Verem Savaşı 2014 raporuna göre 2012 yılı itibariyle ülkemizde 14.691 kayıtlı tüberküloz olgusu bulunmaktadır. Bunların 13.535'i (%90,4) yeni olgudur (2).

Tüberküloz tedavisinin en önemli sorunu *M. tuberculosis*'in doğal ilaç direncidir. Bakterinin çok tabakalı hücre duvarı ve çok ilaca etkili dışa atım (efluks) pompaları, doğal direncin en önemli nedenleridir (3, 4). Ayrıca, uygun olmayan tedavi rejimleri ve tedaviye uyumsuzluklara bağlı olarak kromozomal genlerde oluşan çeşitli mutasyonlar nedeniyle edinsel ilaç direnci de oluşabilmekte ve bu da tüberküloz tedavisinde kullanılabilen az sayıda ilacın da kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (5).

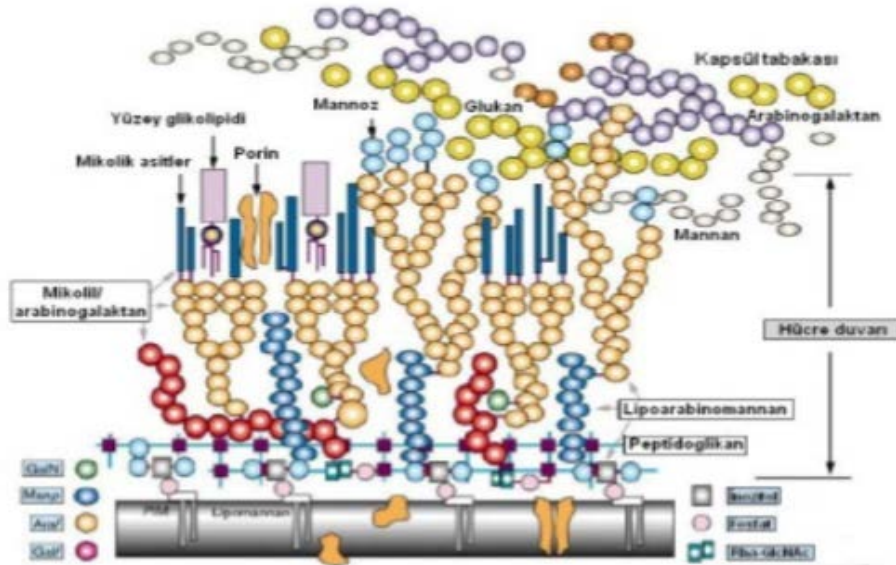
Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki grupta incelenebilir. Primer tüberküloz ilacı olarak isimlendirilenler; izoniazid (INH), rifampin (RIF), pirazinamid (PZA), etambutol (EMB), streptomisin (SM)'dir. Rifabutin, rifapentin, sikloserin, etiyonamid, amikasin, kanamisin, kapreomisin ve paraaminosalisilikasit, levofloksasin, moksifloksasin ve gatifloksasin gibi daha toksik ve daha zor tolere edilebilen ilaçlar ise sekonder tüberküloz ilaçları olarak adlandırılmaktadır (6). DSÖ ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tüberkülozun başlangıç tedavisinde primer ilaçların kombine olarak kullanılmasını önermektedir (7).

Mycobacterium tuberculosis'te oluşan kromozomal mutasyonlar tek basamaklı, rastgele ve spontan olup, genellikle tek ilaca karşı direnç oluşumuna neden olur. INH, RIF, SM ve EMB için spontan direnç oranları sırasıyla 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-5} ve 10^{-6} olarak belirlenmiştir. Direnç oluşumuna neden olabilen mutasyon bölgeleri birbirlerinden farklı olduğundan iki ilaca birden spontan direnç gelişmesi olasılıkların çarpımına eşittir. Bu şekilde birden fazla ilaca dirençli bakteriler ortaya çıkabilmektedir. En az INH ve RIF'a birlikte direnç olması durumu çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz olarak adlandırılmaktadır (8). Yaygın ilaca dirençli (YİD) tüberküloz ise ÇİD'e ek olarak florokinolon ve parenteral ikinci seçenek anti-TB ilaçlardan (kanamisin, amikasin, kapreomisin) birine direnç gelişmesi durumudur (8). Primer ilaç direnci en az 10 mutasyonla ilişkilidir; *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh* INH direnci için; *rpoB* RIF için; *embB* EMB için; *pncA* PZA için; *rpsL* ve *rrs* SM için gelişen dirençten sorumlu tutulabilir (9). Günümüzde direnç genlerinin belirlenmesinde farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır (10-12).

Çalışmamızda, laboratuvarımızda 2005-2014 yılları arasında klinik örneklerinden izole edilen ve BACTEC MGIT 960 (BectonDickinson, ABD) sistemiyle duyarlılıkları çalışılan ve aralarında rifampin ve etambutole dirençli saptanan MTK suşlarında *rpoB* ve *embB* direnç gen bölgelerindeki mutasyonların sekans analizi ile saptanması amaçlanmıştır.

I. *Mycobacterium* Türlerinin Morfolojik Yapısı

Mycobacterium türleri aerop, sporsuz, hareketsiz, 0.2-0.6 µm eninde, 2-10 boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Hücre duvarları diğer bakterilere göre daha kalın ve yüksek oranda lipit içerir. Hücre duvarlarının dış kısmında 60-90 karbonlu uzun ve dallı yağ asitlerinden oluşan ve bakteriyeye hidrofobik özellik kazandıran mikolik asit denen yapı bulunur (Şekil-1). Dıştan içe doğru mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşan bu sağlam yapı bakteriyeyi zırh gibi sarar. Bu kalın hücre duvarı mikroskopik inceleme amacıyla uygulanan birçok boyanın hücre içine geçişini engellemesi yanında mikobakterileri güçlü asit ve bazlara, birçok toksik kimyasallara, antibakteriyellere karşı da korur. Hücre duvarının yapısındaki mikolik asit karbol fuksini tutmakta ve asit alkol de karbol fuksini bırakmamaktadır. Bu nedenle bakteriyeye asido rezistan basil de denir. Asido dirençli boyanma özelliğinden duvar yapısındaki mikolik asit sorumludur (13). MTK üyeleri hücre duvarındaki trehaloz-6-6-dimikolat (kord faktörü) maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerinde uzun kordonlar oluşturur. Virulan olmayanlarda ve Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM)'lerde ise kord faktörü bulunmaz (13,14).



Şekil-1: *M. tuberculosis* hücre duvar yapısı

II. *Mycobacterium* Türlerinin Sınıflandırılması

Mycobacterium tuberculosis; Prokaryot aleminin, *Firmicutes* bölümünün, *Actinobacteria* sınıfının, *Actinomycetales* takımının, *Mycobacteriaceae* ailesinde tek cins olan *Mycobacterium* cinsine ait bir türdür. Bakteriyolojik özellik ve DNA benzerlikleri yönlerinden dolayı yakın ilişkili türlere 'kompleks' adı verilir ve *M. tuberculosis* kompleks *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* ve BCG suşu, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* ve son olarak da henüz tanımlanma aşamasında olan *M. orygis* alt türlerini kapsamaktadır. Konak tropizmlerinde, fenotipik özelliklerinde ve patojenitelerinde büyük farklılıklar olmasına karşın bu türler arasında çok yüksek düzeyde genetik homojenite bulunmaktadır. Bu grubun dışında kalan türler ise, Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM) olarak adlandırılmıştır (15). Tüberküloz Dışı Mikobakteriler için üreme özellikleri ve genetik yapılarına göre çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. İlk olarak katı besiyerinde üreme özelliklerine göre Runyon tarafından 4 grupta sınıflandırılmışlardır (Tablo-1) (16).

Tablo-1: Runyon Sınıflandırması

Yavaş Üreyen mikobakteriler	Pigmentasyon	Türler
Runyon I	Fotokromojen	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. simiae</i>
Runyon II	Skotokromojen	<i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
Runyon III	Kromojenik olmayan	<i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. terrae</i>
Hızlı Üreyen mikobakteriler	Pigmentasyon	Türler
Runyon IV	Kromojenik olmayan	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. thermoresistibile</i>

Woods ve Washington 1987'de bu sınıflandırmayı eksik bulmuş ve klinikle uyumlu, *M. tuberculosis* türünün de içinde olduğu bir sınıflama yapmışlardır (Tablo-2) (17).

Tablo-2: Woods ve Washington Sınıflandırması

Klinik önemi olan mikobakteriler	<i>M. tuberculosis complex</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis (M.bovis BCG)</i> <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare complex</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae complex</i> <i>M. scrofloceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i>		
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler	Yavaş üreyenler	Orta hızda Üreyenler	Hızlı üreyenler
	<i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale complex</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. thermoresistible</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. parafortuitum complex</i>

III. *Mycobacterium* Türlerinin Üreme Özellikleri

Mikobakteriler kültür ortamlarında diğer mikroorganizmalara kıyasla oldukça yavaş çoğalırlar. *M. lepra* gibi bazı türlerin ise kültür ortamında çoğaltılması bugüne kadar başarısızdır. Kültür ortamında çoğaldıklarında bazı mikobakteriler sarı, turuncu, kahverengi pigmentler

oluşturabilirler. *M. tuberculosis* aerob bir organizmadır. Oksijen yokluğunda üreyemez. Buna karşın ortamda oksijene ek olarak CO₂ bulunması, bakteriye karbon kaynağı sağlaması açısından üremeyi hızlandırır. Üreme için albuminden zengin yumurta veya serum temelli besiyerleri gerekir. *M. tuberculosis*, Löwenstein Jensen (LJ) besiyerinde tipik olarak pürüklü, sert koloniler oluştururken, *M. bovis*'in oluşturduğu koloniler ise pürüzsüzdür.

IV. Epidemiyoloji

Tüberküloz solunum yolu ile bulaşan bir hastalıktır ve dünya nüfusunun 1/3'ünün TB basili ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Özellikle düşük sosyoekonomik düzey ve yanlış sağlık politikalarının halk sağlığını kötü yönde etkilediği bölgelerde daha fazla görülmekte, çoğunlukla da genç erişkinleri etkilemektedir. Tüberküloz nedeniyle ölümlerin %95'i gelişmekte olan ülkelerdedir. DSÖ 2015 raporlarına göre tüberküloz prevalansının 13 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. 2014 yılında dünyada 9,6 milyon yeni tüberküloz vakası tespit edilmiştir ve 1,5 milyon hasta tüberküloz nedeniyle kaybedilmiştir. Tüberküloz ye bağlı ölümlerin 400.000'lik kısmını HIV ile enfekte hastalar oluşturmaktadır. Dünya üzerinde HIV ile enfekte kişilerin % 77'sinde tüberküloz bulunduğu ve Afrika bölgesindeki tüberkülozlu vakaların %50'den fazlasında HIV ile birliktelik olduğu DSÖ tarafından bildirilmiştir. 1990 larda başlatılan Doğrudan Gözetimli İlaç Tedavisi (DGİT) stratejisi ile tüberküloz enfeksiyonlarının yaygınlığında ve ölüm oranlarında önemli derecede azalma sağlanmıştır. DSÖ tarafından hazırlanan Milenyum Kalkınma Hedefleri arasında 2015 yılında hastalığın insidansını düşürmek ve 2050 yılında tüberkülozun bir halk sağlığı problemi olmaktan çıkmasını sağlamak bulunmaktadır. Ancak HIV ile enfekte kişi sayısında son zamanlarda meydana gelen artış ve tüberküloz enfeksiyonlarında meydana gelen antibiyotik direnci nedeniyle epideminin kontrol altına alınmasını giderek güçleştirmektedir (1,18).

Afrika gibi HIV epidemisinin ve tüberküloz vakalarına bağlı ölümlerin yoğun şekilde görüldüğü bölgelerde hastalığın tedavisinin oluşturduğu

maliyetin fazla olması sonucu uygulanan kısa süreli tedaviler ÇİD tüberküloz ve YİD tüberküloz vakalarının sayısında artışa neden olmaktadır. Dünyada 2014 yılında ortalama 480.000 yeni ÇİD tüberküloz vakası olduğu tahmin edilmektedir. Sistemik araştırmalar da göstermektedir ki tüberküloza bağlı ölümlerin büyük bir kısmını ÇİD tüberküloz vakaları oluşturmaktadır. Bu nedenle bu vakaların tanısının hızlı bir şekilde konulması ve tedavinin doğru bir şekilde uygulanması gerekmektedir. YİD tüberküloz vakaları 2014'in sonuna kadar dünya çapında 105 ülkede bildirilmiştir ve ÇİD tüberküloz vakaları arasında bu oran %9,7 olarak tahmin edilmektedir. Bu oran önceki yıllara göre az da olsa artış göstermektedir. ÇİD tüberkülozlar arasında florokinolonlara ve parenteral ikincil bir ilaca direnç durumu da sırasıyla %16,5 ve %22,7 olarak tahmin edilmektedir (1,18,19).

Ülkemizdeki tüberküloz verilerine baktığımızda 2005-2006 yıllarında Türkiye genelinde yaklaşık 21.000 tüberküloz vakası varken 2014 yılında kayıtlı toplam tüberküloz vaka sayısı 13.378'e gerilemiştir ve bu vakaların 12.253 tanesini yeni tanı almış hastalar oluşturmaktadır. Tüberküloz vakalarının % 69,8'i HIV yönünden araştırılmış ve 45 vakanın pozitif olduğu saptanmıştır. Ülkemizde 2014 yılında ilaç duyarlılık testi çalışılmış olan 5.472 suştan 253'ünde ÇİD tespit edilmiştir. Yeni tanı alan olgularda ÇİD tüberküloz oranı ortalama %2,5 iken öncesinde tedavi görmüş olgularda bu oran %21,1 olarak bulunmuştur (20).

Tüberkülozla ilgili en önemli tehlike hastaların ilaçlarını düzenli kullanmamaları veya tedavilerini yarım bırakmaları sonucunda gelişen ilaç direnci olarak görülmektedir. Birinci seçenek tüberküloz ilaçlarına dirençli olgularda tedavi ancak ikinci seçenek tüberküloz ilaçları ile mümkündür. Böylece tedavi maliyeti artmaktadır. Başarısızlık ile sonuçlanan tedaviler hasta kayıplarına neden olmakla birlikte dirençli suşların sıklığının artması gibi ciddi halk sağlığı problemlerine de yol açmaktadır.

V. *Mycobacterium* Türlerinin Genetik Özellikleri

Mycobacterium tuberculosis H37RV'nin genomu 4.411.532 baz çiftinden (bç) oluşmaktadır. Kromozom halka şeklindedir ve *Escherichia coli* genomuyla yaklaşık aynı büyüklüktedir. *M. tuberculosis*'in genomu *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen mikobakteri türlerinden daha kısadır. *M. tuberculosis* genomunun G+C içeriği %65,6'dır. Yüksek G+C içeriği bakterinin aerobik yaşam şekli ile ilişkilidir. Buna karşın, *M. tuberculosis* anaerobik ortamlara da uyum sağlayabilecek metabolik potansiyele sahiptir. *M. tuberculosis* genomunda yaklaşık her 1,1 kb başına bir gen düşer ve potansiyel kodlama kapasitesinin tamamına yakını (%91) kullanır. Son bilgilere göre basilin genomunda 3.993'ü protein, 50'si stabil RNA kodladığı düşünülen 4.043 adet gen tanımlanmıştır. Bakteriler arasında genlerin horizontal transferi fajlar, plazmidler ve transpozonlarla olmaktadır. Ancak *M. tuberculosis*'de virülans veya patojeniteden sorumlu olabilecek horizontal gen transferiyle alınmış genetik adalar gösterilememiştir. *M. tuberculosis*'de patojenite adalarının yanı sıra plazmid de bulunmamaktadır. Buna karşın *M. tuberculosis* genomunun yaklaşık %4'ü hareketli genetik elemanlar (IS) ve profajlardan oluşmaktadır. IS elemanın kopya sayısı *M. tuberculosis* H37Rv'de 16 iken farklı suşlarda 0 ile 25 arasında değişmektedir ve IS6110 temelli tiplendirme yöntemi moleküler epidemiyolojik çalışmalarda başarıyla kullanılmaktadır (21).

VI. *Mycobacterium* Türlerinin Laboratuvar Tanısı

Tüberkülozun kesin tanısı hastalardan alınan klinik örneklerde tüberküloz basilinin gösterilmesiyle konur. Tanıda altın standart *M. tuberculosis*'in kültürde üretilmesidir (22). Doğru tanı klinik örneğin uygun şekilde alınması, nakledilmesi ve işlenmesiyle mümkündür. *M. tuberculosis* tanısında akciğer tüberkülozlu hastadan uygun koşullarda alınan klinik materyal, akciğer dışı tüberküloz olgularında ise uygun materyal steril kaplarda oda ısısında 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örnekler

kalite yönünden makroskopik olarak incelenmeli ve koşullara uygun olmayan örnekler yeniden istenmelidir. Örnekler gerekli ise dekontaminasyon, homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerine tabi tutularak preparatlar hazırlanıp aside dirençli boyama yöntemleri ile boyanarak incelenmeli ve besiyerlerine ekimi yapılmalıdır. Tüberkülozun yayılımının önlenmesi, epidemiyolojisinin aydınlatılması, tedavinin doğru ve uygun zamanda yapılması ilaç direncinin araştırılması klasik laboratuvar tanı yöntemleri yanında hızlı, güvenilir, özgüllüğü-duyarlılığı yüksek yeni kültür ve moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir.

VI.A. Mikroskopi

Balgam yayması mikroskobisi basit, hızlı ve ucuz bir tanı yöntemidir. Erlich-Ziehl-Nielsen (EZN) ve Kinyoun boyama tekniklerinde TB basilleri mavi zeminde kırmızı basiller, floresan mikroskobide Auramine-Rhodamine boya kullanılması sonucunda basiller karanlık zeminde sarı floresan verir şekilde görünürler. Direkt boyalı preparatlarda, balgamda 5.000-10.000 basil/ml varlığında pozitif sonuç alınabildiği için duyarlılık düşüktür. Teksif işlemi ile duyarlılığı artırılabilir.

VI.B. Kültür

Kültür TB tanısı için altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Klinik materyalden basilin kültür ortamında üretilmesi gerek identifikasyon gerekse anti-tüberküloz ilaç duyarlılık testleri için önemlidir. Kullanılan besiyerlerinin besleyici olması ve klinik materyalde sıklıkla karışık flora bakterilerinin yer alması ve çapraz kontaminasyon riskinin yüksek olması sebebi ile gelişmiş biyogüvenlikli laboratuvar düzeneklerine duyulan ihtiyaç, rutin mikobakteri kültür uygulanmasını sınırlandırmaktadır.

Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan test yöntemleri katı bazlı yavaş ve sıvı bazlı otomatize hızlı sistemler olmak üzere iki başlık altında değerlendirilebilir. Katı besiyerleri arasında yumurta bazlı Löwenstein Jensen veya agar bazlı Middlebrook 7H10-7H11 besiyerleri bulunmaktadır (Tablo-3). Bu besiyerlerinde üreme 21. günde fark edilebilir hale gelmektedir. Yumurta bazlı besiyerleri; tam yumurta yada yumurta sarısı, patetes, gliserol, malaşit yeşili ve tuzların karışımından oluşmaktadır. Günümüzde en bilinen yumurta

bazlı besiyeri Löwenstein Jensen besiyeridir. Bu besiyerleri, mikobakterilerin üremesini zorlaştıran maddelerin etkisini bloke eden iyi bir tampon özelliğine ve uzun süreli raf ömrüne sahiptir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda LJ besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Yumurta bazlı besiyerleri opak görümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan agar bazlı besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkün olmaktadır (23). Bu besiyerleri kontaminantların üremesini bloke eder, ancak hazırlanmaları pahalı ve raf ömürlerinin (buzdolabında bir ay) kısa olması kullanımlarını kısıtlamaktadır (24). Sıvı bazlı Middlebrook 7H9 gibi besiyerlerinde 7-11 gün gibi daha erken sürelerde üreme tespit edilebilmektedir.

Tablo-3: Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri

Besiyeri	İçerik	İnhibitör Ajan
Löwenstein-Jensen	Tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili 0,025g/100ml
Petragnani	Tam yumurta, yumurta sarısı, süt, gliserol, patetes, patetes unu	Malasit yeşili 0,052 g/100 ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz	Malaşit yeşili 0,0025g/100ml
Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, % 0,1 kazein hidrolizat	Malaşit yeşili 0,0025g/100ml
American Thoracic Society Medium (ATSM)	Taze yumurta sarısı, gliserol, patetes unu	Malasit yeşili 0,02 g/100 ml

Bunun yanısıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, LJ

Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir (Şekil-2). Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birinin selektif olması önerilir.

Günümüzde birçok laboratuvarında, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaktadır. Bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı gibi parametreler florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmektedir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir (25,26).

Tam otomatize kültür yöntemleri:

- BACTEC 460 TB (BD) (Artık kullanılmıyor)
- BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube, BD)
- MB/Bact T (OrganonTeknika, Durham, NC)
- ESP II (Extra Sensing Power) (Trek Diagnostics, Inc. ,Westlake, Ohio)
- BACTEC 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD)

MGIT sisteminde radyoaktif madde kullanılmaması, tüm işlemlerin otomatik yapılıyor olması, tiplendirme ve duyarlık testlerine olanak sağlaması avantajdır.



Şekil-2: Lowenstein Jensen besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* kolonileri

BACTEC 460TB (Becton Dickinson, ABD): BACTEC TB vasatı, zenginleştirilmiş bir Middlebrook 7H12 sıvı besiyeridir . Bu sistemde, 10 ml kapasiteli özel BACTEC şişeleri içinde 4 ml besiyeri bulunur. 0.5 ml işlemden geçirilmiş örnek buraya eklenir ve 35⁰C'de inkübasyona bırakılır. Mikobakteriler bu besiyerinde bulunan ¹⁴C ile işaretlenmiş substratı (palmitik asit) kullanır ve BACTEC şişesi içindeki atmosfere ¹⁴CO₂ salınımı yaparlar. Sistemin esası, üreyen mikobakteriler tarafından ortama salınan ¹⁴CO₂ miktarının ölçümüne dayanır. BACTEC şişeleri içinde oluşan ¹⁴CO₂ miktarı, BACTEC 460 cihazı tarafından ölçülür ve radyoaktivite kantitatif olarak 0 ile 999 arasında bir değere çevrilerek numaralandırılır. Bu sayılara “Growth Index” (GI; büyüme endeksi) denir. Büyüme endeksindeki günlük artış ile besiyerindeki üremenin hızı ve miktarı doğru orantılıdır. Negatif örneklerde büyüme endeksi genellikle 5-6 civarında kalır. 10'un üzerindeki büyüme endeksi değeri pozitifliği gösterir. BACTEC cihazı, şişeler her test edildiğinde besiyerine %5'lik taze CO₂ verir ve bu sayede üreme hızlandırılır. BACTEC yöntemi ile çok küçük miktarlardaki ¹⁴CO₂ bile saptanabildiğinden, mikobakteriyel üreme çok kısa sürede görülebilmektedir. Bu sistemle *M. tuberculosis*'in ortalama saptanma süresi 7-12 gündür. Bu sistemin pahalı bir sistem olması, koloni morfolojisinin belirlenememesi ve radyoaktif atık birikmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (27).

7H12 sıvı besiyerine, kontaminasyonu önlemek amacıyla bir antibiyotik karışımı eklenebilir (PANTA: PolimiksinB, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim ve Azlosilin).

BACTEC sistemi kullanılarak MTK'i diğer mikobakterilerden ayırılarak tanımlanması mümkündür. Bu amaçla BACTEC 460 cihazında yapılan NAP testi kullanılır. NAP (ρ -nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofenon), kloramfenikol sentezinde bir ara üründür. MTK'e ait bakterilerin üremesini inhibe ettiği halde, diğer mikobakterilere karşı inhibitör bir etkisi yoktur. Üç gün süresince büyüme endeksinde artma olmaması veya azalma olması, bakterinin MTK 'ine ait olduğunu gösterir (28). Dezavantajları nedeniyle artık üretilmemektedir.

MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD): Bu sistemde kullanılan tüplerde, Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarda oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Klinik örnekler ekilmeden önce besiyerlerine OADC (Oleik asit, sığır Albumin, Dekstroz, Katalaz) ve PANTA ilave edilir. Daha sonra 0,5 ml klinik örnekten ilave edilir. Besiyerleri 37°C'de inkübe edilir. Klinik örneğin ekiminden sonraki gün başlayarak, sistem her gün üreme açısından değerlendirilir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen ultraviyole ışınına karşı floresans oluşmazken, mikobakteri veya başka mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucu ultraviyole ışığına karşı floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Tam otomatize bir sistem olmakla birlikte, homojen olmayan bir bulanıklık oluşumu da üremeyi makroskopik olarak değerlendirmeyi de mümkün kılmaktadır (29).

MB/BacT Sistemi (Organon Teknika, İrlanda): Mikobakterileri tespit etmek için geliştirilmiş otomatize bir sistemdir. Middlebrook 7H9 besiyeri içeren MB/Bac T şişeleri, vakumlu, CO₂, nitrojen, oksijen içeren bir atmosfer içerir. Şişenin içeriği, en sık rastlanan mikobakteri türleri için elverişli beslenme ve çevre koşullarını sağlar. PANTA ve özel büyüme faktörleri içeren bir karışım her ekimden önce ilave edilir. Besiyerinin dip kısmında üremeyi değerlendirmek için, CO₂ varlığında koyu yeşilden açık sarıya dönen kolorimetrik bir sensör vardır (30).

ESP II Kültür Sistemi (Trek Diagnostic Systems, ABD): Besiyeri şişeleri, modifiye Middlebrook 7H9, kaziton, gliserol ve selüloz sünger içerir. Süngerler, mikobakterilere akciğerlere benzer bir üreme alanı sağlar. Örneklerin ekimi yapılmadan önce Polimiksin B, Vankomisin, Nalidiksik asit ve Amfoterisin B (PVNA) içeren antibiyotik karışımı besiyerine ilave edilir. Her kültür şişesinde, mikroorganizmaların metabolik aktivitesine bağlı oluşacak gaz basıncındaki değişiklikler sürekli olarak bilgisayarda izlenir (30).

BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, ABD): Bu sistemde modifiye bir Middlebrook 7H9 besiyeri olan MYCO/F kullanılır. Ekimden önce besiyerine PANTA ilave edilir. Üreyen mikroorganizmaların tükettiği oksijen,

besiyeri ortamındaki floresan artışı ile tespit edilir. BACTEC 9000 MB sisteminde, bilgisayar destekli olarak floresan seviyesi ve üreme takip edilir (31).

VI.C. Fenotipik Testler

Mycobacterium tuberculosis kompleksi içinde yer alan türleri üreme hızları, koloni morfolojileri ve bazı biyokimyasal testlerle ayırt etmek mümkündür. Ancak her zaman kesin tür tanımlanması yapılamamaktadır. Ayırım için koloni morfolojileri, oksijen kullanımı, niasin birikimi, nitrat redüktaz aktivitesi, katalaz aktivitesi, üreme hızı, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) direnci ve pirazinamidaz üretimine bakılır (Tablo-4). 1980'lerde hücre duvarındaki mikolik asitlerin incelenmesi prensibi ile çalışan yüksek performanslı likid kromatografi ile mikobakterilerin identifikasyon metodu kullanılmaya başlanmıştır (23,32)

Tablo-4. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türlerinin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri

Testler	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. canettii</i>
Morfoloji	R	R	R	R	R	S
Pirazimidaz	+	-	-	+	+	+
Niasin	+	-	-	+/-	+	-
Nitrat kullanımı	+	-	-	+/-	-	+
Üreaz	+/-	-	+	+/-	+/-	+
TCH duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Oksijen	Aerobik	Mikro-aerofilik	Aerobik	Mikroaerofilik	Mikroaerofilik	Bilinmiyor
Piruvat kullanması	-	+	+	-	-	-

TCH: Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid

VI.D. Moleküler Testler

Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yaklaşım, klinik örneklerden doğrudan hazırlanan materyallerin ARB boyamasından sonra direkt olarak mikroskopik incelenmesi veya sıvı-katı besiyerlerinde ekimde

üreyen basillerin tanımlanması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemlerden ARB boyama hızlı, ucuz, pratik bir tanı yöntemi olmasına rağmen duyarlılığı azdır. Diğer bir klasik yöntem olan kültür yöntemi altın standart kabul edilmesine rağmen bu yöntemde basilin üreme süresinin 4-8 haftalık uzun bir periyot gerektirmesi nedeniyle; tanı için daha duyarlı, spesifik, güvenilir ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi gereği duyulmuştur (33).

Bu amaçla yapılan çalışmalarda geliştirilmiş olan moleküler yöntemler, günümüzde tüberküloz tanısında rutin kullanımda yer almaya başlamıştır (34). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) uygulamalarında sıkça gözlenebilen kontaminasyon riskini ortadan kaldırabilmek, duyarlılık ve özgüllüğü arttırabilmek için birçok yeni yöntem bulunmaktadır. Bu amaçla günümüzde, hasta örneklerinden direkt olarak *M. tuberculosis* varlığını araştırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon esaslı sistemler geliştirilmiştir. Kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya tüberküloz ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamaya yönelik; DNA prob hibridizasyonu esaslı ürünler, DNA sekans analiz kitleri ve moleküler biyoloji ve bilgisayar teknolojisini birleştiren DNA mikroarray teknolojisi ürünleri geliştirilmiştir (35). Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı sistemler, IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA ve 23S rRNA'yı hedef alır. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında genellikle 16S rRNA, *hps65*, *rpoB* ve daha pek çok gen bölgesi hedef olarak seçilir.

VII. Antimikobakteriyel İlaçlar

Mikobakteriler, lipitden zengin hücre duvarlarının geçirgen olmayan yapısı nedeniyle birçok antimikrobiyal ilaca doğal olarak dirençlidir. Tüberküloz tedavisinde etkin antibiyoterapi streptomisin keşfi ile başlamıştır. Antitüberküloz ilaç tedavisinin kullanılması mevcut basillerinin büyük çoğunluğunun ölmesine neden olmakta ve klinikte hızlı bir düzelmeyi sağlamaktaydı. Ancak tekli antibiyoterapide kullanılan ajana karşı kavern içerisinde direnç geliştirmiş basiller bulunabilmekte ve hastalık nüks

etmekteydi. Bunu önlemek etkin bakterisidal aktiviteye sahip çoklu antibiyoterapi ile mümkün olmuştur (7).

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek ve ikinci seçenek ilaçlar olarak iki grup altında incelenebilir. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçlar izoniazid (INH), rifampin (RIF), streptomisin (SM), etambutol (EMB) ve pirazinamid'den (PZA) oluşmaktadır. Bu ilaçların toksisiteleri düşüktür ve kombine kullanılmaları durumunda oldukça etkililerdirler. Basiller duyarlı olduğu sürece tüberküloz tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır. Ancak ÇİD tüberküloz vakalarında tedaviye ikinci seçenek ilaçlar eklenmektedir. İkinci seçenek ilaçlar arasında da Para-amino salisilik asit (PAS), kanamisin, amikasin, kapreomisin, ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, etiyonamid, tiyoasetazon ve sikloserin gibi ilaçlar yer almaktadır (7).

İzoniazid (INH): Kullanıma girmesinin üzerinden 40 yıldan fazla bir zaman geçmesine karşın tüberküloz basiline karşı en etkili tek ilaç olarak kalmıştır. Dormant bakteriler üzerinde bakteriostatik, hızlı üreyen bakteriler üzerinde bakterisid etkilidir. Ayrıca makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, iyi absorbe edilmesi, kolay alınması ve ucuz olması bu ilacı en önemli antitüberküloz ilaç yapmaktadır. Katalaz peroksidazı, nikotinamid adeninin dinükleotidi ve peroksidazları içeren bir mekanizma ile izoniazid basilin içine alınır ve aktif ara ürünlerine parçalanır. Sonuçta hücrede hidrojen peroksit yıkımı yapılamaz ve bu madde toksik etkisiyle hücre harabiyetine neden olur. INH, ayrıca basilin hücre duvarının önemli bir yapı taşı olan mikolik asit sentezini de bozar. INH dar spektrumludur, *M. tuberculosis*'den başka bakterilere etki etmez. Karaciğerde metabolize olur. Vitamin B6 (piridoksin) bileşiklerinin biyolojik fonksiyonlarını etkiler. Bunun sonucu, periferik nöropati ve anemiye yol açabilir. Bu nedenle beraberinde günde 6-10 mg vitamin B6 verilir (36, 37).

Rifampin (RIF): *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifamisin B'nin semisentetik bir derivativesidir. Tüberküloz tedavisinde INH'den sonra ikinci önemli ilaçtır. Hem hızlı çoğalan, hem de dormant bakterilere etkilidir. RNA'ya bağımlı DNA polimeraz enzimine bağlanarak, DNA'nın RNA

transkripsiyonuna engel olur. RIF kavite içi ve kazeöz odakta hücre içi yavaş üreyen basillere etkilidir. RIF karaciğer mikrozomal enzimlerini güçlü bir şekilde indükler ve pek çok ilacın yıkımını artırır, etkisini azaltır. En önemli yan etkisi hepatotoksitedir. Antirifampin antikor geliştirmesi nedeniyle alerjik trombositopeniye neden olabilir. İdrar, ter, gözyaşı ve lensleri portakal rengi kırmızıya boyar (37).

Etambutol (EMB): Sentetik olarak elde edilen bakteriyostatik etkili bir ilaçtır. Etkinliği INH ve RIF'e göre düşük olup, ilaca karşı daha düşük düzeyde direnç gelişir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, EMB'nin arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek, arabinogalaktan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellediği bilinmektedir. Çoğalma dönemindeki bakteriler üzerine etkilidir. Yan etkileri oldukça azdır. Nadiren, retrobulber nörit, hiperürisemi ve gut artriti yapabilir (37).

Streptomisin (SM): Aminoglikozid grubundadır, ribozomların 30S alt grubunu etkileyerek ribozom fonksiyonlarını ve dolayısıyla protein sentezini bozar. SM, in vitro olarak küçük konsantrasyonlarda mikobakteriler üzerine bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonlarda bakterisid etki yapar. Biyolojik zarları ve hücre duvarını geçemez. Hücre içindeki basillere etkisiz olup, kaviteler içine ve kazeöz odaklara nüfuz edebilir. Ciddi yan etkileri nedeniyle klinik kullanımı kısıtlıdır. Nefrotoksik ve ototoksiktir. Anafilaksi, nöromusküler blokaj, agranülositoz, hemolitik anemi diğer yan etkileridir (37).

Pirazinamid (PZA): Nikotinamidin sentetik bir analogudur. PZA hücre içi bir nikotinamidaz yardımı ile pirazinoik asite dönüşerek etki eder. Hem dormant, hem çoğalan bakteriler üzerine etkili, bakterisidal bir ilaçtır. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde etkili tüberkülosiddir. INH ve RIF'e ilave olarak PZA'nın kullanılması akciğer tüberkülozunun altı ayda tedavisini mümkün kılmaktadır. Karaciğerde metabolize olup, böbreklerle atılır. PZA'nın hepatotoksik etki yapma potansiyeli vardır. Ürik asit retansiyonu, fotosensitivite ve döküntü de yapabilir (37).

VIII. Duyarlılık Testleri

Antitüberküloz ilaç direncinin sürveyansı, tüberküloz kontrol programlarının başarısını değerlendirmede önemli bir yöntemdir. Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı ve antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimi riskini arttırmaktadır. DSÖ, tüberküloz tedavi programlarının etkilerinin takip edilebilmesi için, standart tedavi rejimlerine ilaveten ilaç duyarlılık testlerinin de sürveyansını önermektedir.

VIII.A. Klasik Kültür Yöntemleri

Mutlak Konsantrasyon Yöntemi: Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, 2×10^3 - 1×10^4 koloni oluşturan birim/mililitre (cfu/ml) civarında mikobakteri içeren ekim yapılır. İlaçlı besiyerinde 20 koloniden fazla olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Ekim örneğinin bu kadar hassas bir şekilde hazırlanması zordur ve hata oranını arttırmaktadır (38).

Direnç Oranı Yöntemi: İlaçlı besiyeri içeren tüplerin bir sırasına da antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H37Rv inokule edilir. Bu yöntemde 10^5 cfu/ml'lik bir inokulum kullanılır. Farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) saptanabilmektedir. Test edilen suşun MİK değeri, *M. tuberculosis* H37Rv'nin MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Değerlendirilmesi zor, hata oranı yüksek bir yöntemdir (38).

Proporsiyon Yöntemi: Antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, yapılan çalışmalar sonucu %1 olarak kabul edilir. Direncin %1 oranını tayin etmek için kontrol besiyerinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı besiyerindekinden 100 kat daha azdır. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu test için koagülasyondan önce ilaç eklenmiş Lowenstein-Jensen besiyeri ve Middlebrook 7H10 kullanılabilir. İlaçsız kontrol besiyerinde 200-

300 koloni oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun olanıdır. Bu yoğunlukta basil içeren örneğin elde edilebilmesi için önce kültürde üretilmiş bakteriden 1 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanır. Hazırlanmış homojen süspansiyondan 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} veya 10^{-2} , 10^{-4} 'lük dilüsyonlar hazırlanmaktadır. Bu dilüsyonlardan ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaçlı besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılmış tüpler 3-4 hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Test edilen suş belli bir antibiyotiğe karşı %1 veya daha yüksek oranda dirençli ise sonuç duyarlı olarak yorumlanır. Bu yöntemle birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaç duyarlılıkları test edilebilir. Uzun yıllar boyunca kullanılmış, uluslararası komitelerce onaylanmış referans bir yöntemdir (38).

VIII.B. Hızlı Duyarlılık Testleri

Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460TB)(BD): Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri içeren şişelere ekilen klinik örnekler, periyodik olarak $^{14}\text{CO}_2$ varlığı yönünden tetkik edilir. Oluşan $^{14}\text{CO}_2$ miktarı üreme indeksi (GI) olarak cihaz tarafından saptanır. GI: 500-800 arasına geldiğinde, duyarlılık testi yapılır. Birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlarla duyarlılık testi yapılabilir. Test edilecek ilaçları içeren Middlebrook 7H12 besiyerlerine 0,1 ml üreyen suşun bulunduğu şişeden ekim yapılır. İlaç içermeyen bir besiyerine de diğer besiyerlerindeki 100'de biri oranında ekim yapılır. Yüzde bir oranında basil içeren kontrol şişesi ve antibiyotik içeren diğer besiyeri şişelerinin günlük üreme indeksi (GI) ölçülür. Dünya Sağlık Örgütü'nün standart olarak önerdiği bir sistemdir. Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıklarının fazla olması dezavantajdır. Geleneksel yöntemlerle ortalama 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktaydı (38). Dezavantajları nedeniyle artık üretilmemektedir.

Floresan Kültür Sistemi (BACTEC MGIT 960)(BD): Middlebrook 7H9 içeren, dip kısmı rutenyum kompleksi bulunan silikon tabaka ile kaplı tüplere ekim yapıldıktan sonra, bakterilerin üremesi nedeniyle azalan oksijen yoğunluğuna bağlı olarak, tüp dibine gönderilen ultraviyole ışınının floresan vermesiyle üremenin tespit edildiği bir sistemdir. Saptanan floresan miktarı,

üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir (38, 39).

Duyarlılık testi için ilaçlı ve ilaçsız tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve saptama zamanı BACTEC 460 ile aynıdır. Sürekli monitorizasyon ile 960 tüpün aynı anda takibini sağlaması ve bilgisayar tabanlı veri toplaması iş yükünü azaltmaktadır. Kontaminasyon oranları yüksektir (38, 39).

Kolorimetrik Kültür Sistemi

MB/BacT/ALERT MB (Organon Teknika, İrlanda): Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur. Etambutol duyarlılık testi açısından sistemin düşüktür (38).

Alamar Blue Oxidation-Reduction Indicator (Accumed, ABD): Alamar mavisi, bakteri üremesi sonucunda rengi pembeye dönüşen üreme indikatörü olarak kullanılan bir oksidasyon-redüksiyon boyasıdır. Middlebrook 7H9 besiyerinde üretilen *M. tuberculosis* suşundan, 1 McFarland'a göre bir süspansiyon hazırlanır ve buyyon ile 1:5 oranında sulandırılır. Test edilecek antitüberküloz ilaçların da sıvı besiyerinde çift kat sulandırılmaları yapılır. Dilüe edilmiş ilaç içeren tüplere, dilüe edilmiş kültür süspansiyonlarından eklenir. Tüplerdeki son bakteri konsantrasyonu 6x10⁵ cfu/ml'dir. Bu esnada ilaç içermeyen üç kontrol tüpüne de ekim yapılır ve tüm tüpler 35°C'de inkübe edilir. Kontrol tüpleri 7-10-14. günlerde test edilir. Test için kontrol tüpüne 0,02 ml Alamar mavisi solüsyonu ile 0,05 ml %5 Tween 20 ve Tween 80 eklenir ve iki saat 50°C'de inkübe edilir. Sürenin sonunda tüpün rengi maviden pembeye dönerse, ilaçlı besiyerlerine de aynı işlemler yapılır. Renk değişimini önleyen ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak alınır. Bu yöntem, kantitatif, radyometrik olmayan bir yöntem olup, yedi ile on gün arasında sonuç verir. Sonuçları, proporsiyon yöntemiyle %97 uyumludur (40).

Karbondiyoksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture System II (Accumed, ABD): Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik bilgisayar destekli bir sistemdir. İlaç duyarlılık testi için, antibiyotik içeren şişelere ve bir kontrol şişesine aynı oranda ekim yapılır. Şişeler cihaza yerleştirilip, periyodik aralıklarla üreme açısından değerlendirilir. Kontrol şişesinde pozitif sinyalin görüldüğü tespit zamanı hesaplanır. Kontrol şişesinde pozitiflik görüldükten sonra ilaçlı şişeler en az üç gün daha takip edilir. İlaç içeren şişede hiç üreme olmazsa veya ilaçlı şişedeki tespit zamanı kontrol şişesinden 3 gün daha uzunsa suş duyarlı kabul edilir. İlaçlı şişedeki tespit zamanı ile kontrol şişesindeki tespit zamanı arasında 3 günden az fark varsa suş dirençli kabul edilir (38, 41).

Gradyent Testi: Gittikçe artan konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plastik şeritler kullanılarak antibiyotiğin agar yüzeyine taşınması prensibine dayanan bir duyarlılık test yöntemidir. Primer antitüberküloz ilaçlara karşı MİK değerlerini belirlemek için kolay uygulanan bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkat edilmesi gerekmektedir (38).

Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler:

Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi (LRP): Bu yöntemde, ateş böceğinin lusiferaz genini taşıyan bir mikobakteri fajı kullanılmaktadır. Mikobakterilerin varlığında mikobakteriyi enfekte eden faj sayesinde bol miktarda lusiferaz üretilir ve ortama verilir. Ortama lusiferaz enziminin substratı olan lusiferin eklendiğinde, enzim lusiferini oksilusiferine dönüştürür ve ışık oluşur. Oluşan ışık miktarı, ortamdaki canlı mikobakteri sayısına bağlıdır. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı bakteriler ışık oluşturmaz iken, dirençli olanlar ışık oluşturmaya devam eder (40).

Biyoluminesans Yöntemi ile Hücresel ATP Ölçümü: İlaçlı tüplere bulanıklığı 0,5 McFarland'a ayarlanmış süspansiyondan ekim yapılır. İlaç içermeyen kontrol tüpleri ile birlikte 10 gün 35°C'de inkübe edilir. Sürenin sonunda, kültürlerden alınan bir miktar sıvı 0,1 µL TRİS tamponu ve EDTA içeren cam tüplerde beş dakika kaynatılarak hücreler parçalanır, oda ısısında

soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra, ATP'nin ışımmasını sağlayan bir madde eklenerek luminometre ile incelenir. Oluşan ışık miktarı, hücresel ATP ile doğru orantılıdır. Ortamda ne kadar çok bakteri varsa ışık üretimi o kadar fazladır. Anti-tüberkülo ilaca duyarlı olan suşların bulunduğu tüplerde ışık üretimi olmaz. ATP aktivitesinin kontrole göre %40 veya daha da az olması, o ilaca karşı duyarlılığı gösterir (40).

Flow Sitometri Yöntemi: Flow sitometri, bir sıvı akımı içinde tek tek geçmekte olan hücreler veya biyolojik partiküllerin, fizik ve kimyasal özelliklerini sensörler aracılığıyla ölçebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, *M. tuberculosis*'in floresein diasetat (FDA)'ı hidrolize etmesi sonucu oluşan, floresan veren mikobakterilerin flow sitometrik analizle saptanması esastır. Mikobakteri içeren Middlebrook 7H9 besiyerlerine çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik ilave edilir. Antibiyotiksiz bir besiyeri kontrol amacıyla kullanılır. 24-48 saatlik bir inkübasyon sonrası, ortama FDA eklenir. Mikobakterilerin FDA'yı hidroliz etmesi sonucu oluşan floresan flow sitometri ile saptanır. Antibiyotiklere duyarlı mikobakteriler FDA'yı daha az hidroliz eder (40).

VIII.C. Genotipik Yöntemler

Mycobacterium tuberculosis, yavaş üreyen bir mikroorganizma olduğu için klasik kültür besiyerleri ile yapılan duyarlılık test yöntemleri uzun zaman almaktadır. Moleküler tanı yöntemleri, ilaç direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesini sağlamakta ve ilaç duyarlılığını hızlı bir şekilde belirleyebilmektedir. Rutin uygulamalarda RIF için *rpoB* ve INH için *katG* gen mutasyonları ile ilgili kitler mevcuttur (Genotype MTBDR; Hain Lifescience, Almanya). Rifampine dirençli suşların yaklaşık %90'ında INH direnci de bulunmaktadır. RIF direncinin, INH direncinin de bir göstergesi olduğu söylenebilir. Bu nedenle pratik uygulamalarda moleküler teknikler çoğu kez RIF direncinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır (42,43).

İlaç direncinin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin çoğu üç basamaktan oluşmaktadır (43).

1. DNA eldesi: Mekanik parçalama ve kaynatma gibi basit teknikler bile genomik DNA'nın eldesi için yeterli olmaktadır.

2. Hedef DNA'nın amplifikasyonu: Bu amaçla çoğu kez PCR kullanılmaktadır.

3. Mutasyonların saptanması: Uygun primerle amplifiye edilen hedef DNA'daki mutasyonlar aşağıdaki çeşitli yöntemlerden biriyle saptanır.

DNA Dizi Analizi: Mikroorganizmaların genom dizilimlerinin ortaya çıkarılması ve ilaç direncine sebep olan mutasyonların saptanması için en güvenilir yöntem olan DNA dizi analizi, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından altın standart olarak kabul edilmektedir. Günümüzde DNA dizi analizi amacıyla Sanger'in zincir sonlandırma temeline dayalı dideoksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem manuel ve otomatize sistemlere uyarlanmıştır (43).

Bu yöntemde, DNA polimerazlar deoksi nükleotid trifosfatlara (dNTP) ek olarak, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubuna sahip olmayan dideoksi nükleotid trifosfatları (ddNTP) kullanır. Sentezlenen DNA zincirine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde reaksiyon durmakta ve zincir, eklenen işaretli nükleotid ile sonlanmaktadır (44). Manuel olarak yapılan DNA dizi analizinde reaksiyon tüplerinde oluşan farklı DNA parçaları, poliakrilamid jelde görüntülenebilmektedir. Bu sistemde DNA parçalarının görünür hale getirilmesi için primerler radyoaktif madde ile işaretlenebilir veya ortama, senteze katılan radyoaktif bir nükleotid eklenebilir. Otomatik olarak yapılan DNA dizi analizinde ise, reaksiyonun başlangıcında floresans veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak, baz dizilimi görünebilir hale getirilmektedir (44). Bu yöntem ile bilinen mutasyonların yanında önceden bilinmeyen mutasyonlar da saptanabilmektedir. Mutasyon saptamada kullanılması en çok önerilen yöntem olmasına rağmen, pahalı olması ve teknik donanım gerektirmesi nedeniyle rutin kullanımı sınırlıdır.

Line Probe Assay (Solid Faz Hibridizasyon): Line Probe Assay (LIPA) hızlı RIF direnci saptamak amacıyla geliştirilmiş bir kittir. Yöntem revers hibridizasyon temeline dayanmaktadır. LIPA yönteminde RIF direncinden sorumlu *rpoB* geninin biyotinle işaretlenmiş PCR ürünleri denatüre edilerek nitroselülöz şerit üzerine yerleştirilmiş 10 farklı özgül proba

hibridize edilmektedir. Oluşan hibridler alkali fosfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat eklenerek saptanmaktadır. Genotype MTBDR (Hain Lifescience, Almanya), aynı teknoloji ve test prensibine bağlı olarak geliştirilen, RIF ve INH ilaçlarına karşı oluşan mutasyonları tespit edebilen bir üründür (43, 45).

RNA/RNA Mismatch Analiz: Yöntem, RNA'nın RNazA enziminin yıkıcı etkisine dayanıklı olması temeline dayanmaktadır. Yöntem beş aşamadan oluşur. Test edilen suş ile duyarlı referans suşun hedef DNA'larının RNA polimeraz enzimi için promotor diziler de içeren özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonu birinci aşamayı oluşturur. Daha sonra, RNA polimeraz ile transkripsiyon, hibridizasyon, RNA/RNA dubleksinin eşleşmenin olmadığı mismatch noktasından RNazA ile kesilmesi ve son olarak agaroz jel elektroforezi ile işlem sonlanır. Elektroforezde dirençli suşlarda üç bantlı patern saptanır (43).

PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism): Yöntem, yüksek rezolüsyonlu, denatüre olmayan poliakrilamid jelde mutant ve doğal tip tek sarmallı DNA'nın farklı hareketlilik göstermesi temeline dayanır. Farklı nükleotid dizilerine sahip tek sarmallı DNA fragmanlarının katlanmaları farklı noktalardan olmaktadır. Katlanma yerlerinin değişmesi tek sarmallı DNA'nın tersiyer yapısını değiştirerek jel üzerindeki mobilitesini etkilemektedir. Doğal ve mutant suşlar farklı mobilite gösterirler (43).

Real-Time PCR: Bu yöntemde PCR sırasında oluşan ürünler özgül probalar veya çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği olan boyalar (Sybergreen, etidyum bromid vb) yardımıyla saptanmaktadır. Real-time PCR'da oluşan ampikonların erime sıcaklığı (T_m) değerleri belirlenerek özgül mutasyonlar saptanabilmektedir. Real-time PCR'da saptama, yayılan ışımının sistemin optik parçası ile okunması temeline dayanmaktadır. Ölçülen floresans PCR sırasında artan PCR ürününün miktarı ile orantılıdır. Sikluslar sırasında reporter boyaların yaydığı floresans, sistem tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında değerlendirilir ve kantite edilmektedir. Yapılan çalışmalarda, Real-time PCR ile aynı reaksiyon tüpünde RIF ve INH

direncinden sorumlu *rpoB* ve *katG* mutasyonlarının başarıyla saptandığı bildirilmektedir (43).

DNA Microarray: Son yıllarda, küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunduğu microarray'ler ile farklı DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan çip teknolojileri geliştirilmiştir. Yöntem, PCR ile elde edilen floresanla işaretli ampliconların çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır. Bağlı ampliconların yaydığı floresan sinyaller daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. RIF'e dirençli *M. tuberculosis* suşlarıyla yapılan DNA microarray çalışmalarında DNA dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Farklı ilaç dirençlerini bir arada saptamaya uygun problemler içeren çipler geliştirilmeye çalışılmaktadır (43).

IX. İlaç Direnci

Yeni olguda ilaç direnci: Hiç tüberküloz tedavisi almamış ya da bir aydan daha kısa süreli tedavi almış hastadaki saptanan ilaç direncidir ve bulaş yoluyla alınır. Primer direnç oranının yüksek olması o toplumda uygulanmakta olan tüberküloz korunma ve kontrol önlemlerinin yetersiz olduğunu göstermektedir (46).

Tedavi görmüş olguda ilaç direnci: Bir aydan daha fazla tüberküloz tedavisi görmüş hastalardaki ilaç direncidir. Edinilmiş ilaç direnci denilebilir. Bulaş yoluyla alınmış ya da tedavi anında kazanılmıştır. Sekonder direnç, uygun olmayan tedaviye bağlı olarak yeni mutantların gelişimi sonucu oluşur ve bu direncin artışı uygulanmakta olan tüberküloz tedavisinin yetersizliğini gösterir (46).

Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB): İzonyazid ve rifampin birlikte direnç gösteren hastalardaki direnci tanımlar.

Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD-TB): İzonyazid ve rifampin dirence ek olarak bir kinolon ve birde enjektabl ilaca (amikasin, kanamisin, kapreomisin) direnç saptanmasıdır (47).

Mikobakterilerde gelişen ilaç direnci; primer direnç yani dirençli basille hastalanma ya da tedavi sırasında gelişen sekonder direnç şeklinde olabilir. *M. tuberculosis*'te en sık gözlenen direnç mekanizması, antimikobakteriyel ilaçları aktive eden veya kendileri ilaçların hedefi olan enzimlerde meydana gelen mutasyonlardır. Mikobakterilerdeki mutasyon oranları diğer bakterilerle kıyaslandığında 10 kat daha fazladır. *M. tuberculosis*'in klinikte sorun oluşturan ilaç direnci, tedavide kullanılan ilaçların hedef bölgeleri olan molekülleri kodlayan genlerde mutasyon sonucu gelişmektedir. Yine bu basillerin diğer bir çok bakterinin aksine plazmidleri olmadığından direnç genleri bir, bakteriden diğer bakteriye aktarılamaz. Birbirinden bağımsız ortaya çıkan mutasyonların birikimi sonucu ÇİD-TB enfeksiyonları oluşmaktadır.

IX.A. İzoniazid (INH) Direnci

***katG* Gen Mutasyonu:** INH, mikolik asit biyosentezinde rol alan enoyl ACP redüktaz enziminin aktivitesini inhibe etmektedir. INH normalde inaktif formda olup, *M. tuberculosis*'in *katG* geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enzimi tarafından aktive edilerek hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir. *KatG* genindeki mutasyon sonucu inaktif formdaki INH aktif forma dönüşmemekte ve hücre duvarının sentezine inhibitör etki gösterememektedir. Bu mekanizma INH direncinin %50-70'inden sorumludur (48).

***inhA* Gen Mutasyonu:** Mikolik asit biyosentezinde rol alan enoyl ACP redüktaz, *inhA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gende oluşan mutasyon sonucu sürekli olarak mikolik asit sentezlenmektedir ve izoniazidin etkinliğini ortadan kaldırmaktadır. Bu tip direnç INH direncinin %25'ini oluşturmaktadır (48). INH dirençli suşlarda, *katG* geninde %67.8, *inhA* geninde %20.4 oranında mutasyon gözlenmiştir ve *katG* için 315. kodonda, *inhA* için 209. kodonda en sık mutasyon saptanmıştır (49).

***ahpC* Gen Mutasyonu:** Klinik suşlardaki INH direncinin %10-15'inden sorumludur. INH'in aktif formunu inhibe eden alkil hidroperoksit redüktaz enziminin bu dirençten sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (48).

IX.B. Rifampin (RIF) Direnci:

Rifampin, bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimerazının potent inhibitörüdür. Rifampin, RNA polimerazın β -sub ünitesine bağlanarak mRNA sentezini inhibe etmektedir. RIF'e dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %96'sından fazlasında dirençten, RNA polimeraz enziminin β -sub ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533 kodonlar arasındaki 81 baz çift uzunluğundaki yüksek sıklıkta değişken bölgedeki (RRDR; rifampicin resistance-determining region) mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar sorumludur (50). Yine *rpoB* genini kodlayan bu bölge dışında 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlarda da mutasyonlar gösterilmiştir. RIF dirençli vakaların %34-57'inde *rpoB* geninin 531. kodonundaki Ser531Leu mutasyonu saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyon izlemektedir. Kodon 531, 526, ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzeyde rifampin direncine (MİK $\geq 64 \mu\text{g/ml}$) neden olurken, 514 ve 533. kodon mutasyonları genellikle düşük düzeyde mutasyonlardır. Rifampine dirençli türlerin tümünde rifapentin'e de çapraz direnç görülmektedir (49).

IX.C. Streptomisin (SM) Direnci:

M. tuberculosis'de SM'e karşı direnç, ribozomda ilacın hedef bölgesinde oluşan mutasyonlar sonucu gelişir. Mutasyonlar genellikle, ribozomal küçük alt ünite S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde oluşurlar ve streptomisin direncinin %50'sinden sorumludurlar. Ayrıca 16S ribozomal RNA'nın bir bölgesini kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlarda streptomisin direncinden sorumludur. Bu da streptomisin direncinin %20'sini oluşturmaktadır (48). *rpsL* proteinindeki aminoasit değişikliği yüksek düzeyde (MİK $> 500 \mu\text{g/ml}$) streptomisin direnci oluştururken, *rrs* genindeki mutasyonlar orta düzeyde (MİK $< 250 \mu\text{g/ml}$) SM direnci oluşturur (49).

IX.D. Etambutol (EMB) Direnci

Etambutol, arabinozil transferazın özgül hedefidir. EMB, arabinozun arabinogalakton ve lipoarabinomannana polimerize olmasına aracılık eden arabinozil transferaz enzimini bloke ederek arabinogalakton ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engeller. Arabinogalakton mikobakteriyel hücre duvarının en önemli polisakkarididir. Arabinozil

transferaz enzimini kodlayan, *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kilo baz çiftlik bir operon şeklinde organize olmuştur. Etambutole dirençli türlerde *embB* genindeki en sık mutasyonlar, 306. kodondaki missense mutasyonlardır (51). EMB direncinin %47-65'inden *embB* genindeki mutasyonlar sorumludur. Yine Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630İl diğer sık olan mutasyonlardır. Met306Leu, Met306Val, Phe330Val ve Thr631le mutasyonlarında EMB için MİK değerleri genellikle daha yüksektir.

IX.E. Pirazinamid (PZA) Direnci:

Pirazinamide duyarlı *M. tuberculosis* suşları, pirazinamidi aktif formu olan pirazinoik aside çeviren pirazinamidaz enzimi üretirler. *M. tuberculosis*'de bu enzimi kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar, pirazinamidaz aktivitesinin kaybına neden olurlar. Bu olay pirazinamid direncinin %72-94'ünden sorumludur. *pncA* geninin üç bölgesinde 3-17, 61-85 ve 132-142 kodonlar arası mutasyonlar belli bir kümeleşme gösterirler. Bu mutasyonlar dışında, delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonları da görülmektedir. PZA'ya doğal dirençli olan *M. bovis* BCG türlerinde *pncA* geninin 169. kodonunda *M. tuberculosis* türlerindeki histidin yerine aspartik asit gelmiştir.

IX.F. Florokinolon Direnci:

Florokinolonların hedefi DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve ATP bağımlı Tip-II DNA topoizomeras olan, DNA giraz enzimidir. Bu enzimin inhibe edilmesiyle, DNA'nın süpersarmal yapısı bozulur ve bakteri hayatını devam ettiremez. İnsan DNA'sı bu durumdan etkilenmez. DNA giraz enzimi A ve B alt ünitelerinden oluşmuş bir heterodimerdir. Bu üniteler *gyrA* ve *gyrB* genlerince kodlanırlar ve dirençli vakalarda bu gen bölgelerinde mutasyonlar saptanmıştır. Tüberküloz tedavisinde etkili olan, siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve sparfloksasin birinci grup tüberküloz ilaçlarına alternatif olarak kullanılmaktadır. Yüksek düzeyde siprofloksasin direnci, *gyrA* geninin 90. kodonu civarındaki mutasyonla ilişkili bulunmuştur. Yüksek düzeyde florokinolon direnci saptanan türlerde, bu bölgedeki 40 aminoasitlik Quinolone rezistance determining region (QRDR) olarak adlandırılan gen bölgesinde mutasyonlar bulunmaktadır. *M.*

tuberculosis türlerindeki kazanılmış florokinolon direncinin %75-94'ünden, QRDR bölgesindeki *gyrA* mutasyonları sorumludur (49).

Bu çalışmada bölgemizdeki fenotipik ilaç duyarlılık testi ile RIF ve EMB direnci belirlenen suşlarda, dirençten sorumlu *rpoB* ve *embB* gen bölgelerindeki mutasyon varlığının ve mutasyon paternlerinin DNA dizi analizi ile araştırılması amaçlanmıştır.



GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.06.2015 tarih ve 2015-12/17 sayılı kararla alınan izin ve Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden sağlanan destek (KUAP(T)-2015/43) ile yapıldı.

I. Çalışma Suşları

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUAM) Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı Tüberküloz Laboratuvarına 2005-2014 yılları arasında gönderilen klinik örneklerden izole edilmiş ve mikrobanklarda (OR-BAK Bakteri Saklama Seti) -20°C'de saklanmış fenotipik olarak en az bir anti-tüberkülo ilaç direnci saptanan 110 *M. tuberculosis* kompleks suşu incelenmiştir. Çalışmaya alınan suşlar gönderilen klinik örnek dağılımı ve direnç profili yönünden değerlendirilmiştir. Moleküler çalışmaya ise RIF dirençli 7, EMB dirençli 15, hem RIF hem de EMB dirençli 6 tane olmak üzere toplam 28 suşa dahil edilip *rpoB* ve *embB* gen bölgelerinde mutasyon varlığı araştırılmıştır.

Suşları canlandırmak için mikrobanktaki (OR-BAK Bakteri Saklama Seti) adsorban boncuklar MGIT sıvı besiyerine inoküle edildi ve MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) cihazına yerleştirildi.

Çalışmaya alınan suşların izole edildiği örnekler laboratuvarında rutin olarak aşağıda tanımlanan işlemler uygulanarak değerlendirildi.

Steril klinik örnekler santrifüjlendikten sonra santrifüj tüpünün dip kısmından, steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işleminden sonra katı (L-J) ve sıvı (MGIT) besiyerlerine ekilmiş ve üremeleri için de 37°C'de inkübatörde 6 haftaya kadar bekletilmiştir. Üremesi gözlenen suşların MTK ve TB dışı mikobakterler (MOTT) ayrımı tüm pozitif kültürde kord faktör ve 2005-2010 yılları arasında PNB asit testi ile, 2011-2012 yılları arasında PNB asit testi ve MGIT TBc identification test (Becton Dickinson,

ABD) ile, 2013-2014 yılları arasında ise sadece MGIT TBc identification test (Becton Dickinson, ABD) ile yapılmıştır. MTK olduğu tespit edilen suşların primer antitüberküloz ilaç duyarlılıkları MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) ile çalışılmıştır. İlaçlardan herhangi birine dirençli olan suşlar içerisinde adsorban boncuklar bulunan mikrobanklara (OR-BAK Bakteri Saklama Seti) konarak -20°C'de saklandı.

II. Moleküler Çalışma

M. tuberculosis suşlarında *rpoB* ve *embB* genindeki mutasyonları saptamak amacıyla dizi analizi yapıldı. Dizi analizi için ise aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

II. A. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu negatif basınçlı ortamda, Sınıf II Biyogüvenlik kabini içerisinde yapıldı. Üreme olmuş MGIT sıvı besiyerinden 500 µl alınıp 1,5 ml'lik vidalı kapaklı steril ependorf tüpüne aktarıldı. Daha sonra 99°C'de 20 dk kuru ısı bloğunda tutuldu. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant kısmından 200 µl alınıp yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 µl Tris-EDTA eklenip vortekslendi ve 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım atılıp dipte kalan çökelti üzerine TE ile santrifüjlenme işlemi 2 kez daha tekrarlandı. Süpernatant atılıp dipte kalan kısım PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

II. B. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

M. tuberculosis'in RIF ve EMB direncinden sorumlu önemli gen bölgeleri primer spesifik PCR tekniği ile çoğaltıldı. RIF direnci ile ilişkili RNA polimeraz enziminin β-sub ünitesini kodlayan *rpoB* gen bölgesi *rpoB*-1f ve *rpoB*-2r primer çiftleri ile, arabinozil transferaz enzimini kodlayan *embB* gen bölgesi *embB*-3f ve *embB*-4r primer çiftleri ile çoğaltılmıştır (Tablo-5). Her bir gen bölgesi için standart PCR reaksiyonu son hacmi 25 µl olacak şekilde; 2,5 µl 10X PCR buffer (abm, made in Canada), 0,5 µl MgSO₄ (abm, made in Canada), 0,4 µl dNTP (abm, made in Canada), 1'er µl F ve R primerler, 0,2 µl Taq DNA polimeraz (abm, made in Canada) ve 3 µl ekstrakte edilen *M.*

tuberculosis DNA'sı konularak hazırlandı ve toplam hacim distile su ile 25 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon termal döngü cihazında (Esco Technologies Inc, Hatboro PA/ABD) denatürasyon 94°C'de 5 dk; daha sonra 45 siklus boyunca 94°C'de 30 sn, 60°C'de 30 sn ve 72°C'de 45 sn; son uzama için ise 72°C'de 5 dk tutularak gerçekleştirildi.

Tablo-5: Rifampin ve Etambutol direncinden sorumlu *rpoB* ve *embB* gen bölgelerine spesifik primer dizileri

Gen bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -1f	CTTGCACGAGGGTCAGACCA	543
	<i>rpoB</i> -2r	ATCTCGTCGCTAACCACGCC	
<i>embB</i>	<i>embB</i> -3f	CTGACCGACGCCGTGGTGATAT	490
	<i>embB</i> -4r	TGAATGCGGCGGTAACGACG	

II. C. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Çoğaltılmış gen bölgesi ürünleri, ethidyum-bromid içeren %2'lik agaroz (SeaKem LE Agarose) jel elektroforez ile (BioRad MINI-SUB Cell GT,USA) 110 V'da 50 dk yürütülerek moleküler ladder (100 bç marker) yardımı ile BioDocAnalyse (Biometra, Transilluminator, Almanya) cihazında UV ışığı altında değerlendirildi ve görüntülendi.

II. D. Genlerin Dizi Analizi

DNA dizi analizi için Sangerman yöntemi prensibi ile çalışan ticari kapiller kanallı otomatik dizi analiz kiti (Dye Terminator Cycle Sequencing [DTCS] Quick Start Kiti; Beckman-Coulter Inc, Brea CA/ABD) kullanıldı. Dizi analizi öncesi PCR ürünlerinin saflaştırılması yapıldı.

II. E. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Kolon bazlı bir saflaştırma sistemi olan Omega E.Z.N.A.® Cycle Pure Kiti (CP: Omega Bio-Tek, Norcross GA/ABD) kullanılarak PCR ürünlerinin primerlerden, enzimlerden, tuzlardan ve DNA'nın saflığını bozan diğer ürünlerden ayrılması sağlandı. Bu amaçla CP tampon solüsyonuyla karıştırılan PCR ürünü spin kolondan geçirilerek DNA'nın filtreye tutunması ve yıkama basamakları ile fenol ve kloroform gibi toksik organik maddelerden

ayrıştırılması sağlandı. Son basamak olan elüsyon basamağı ile saflaştırılmış DNA elde edildi. Elde edilen saf DNA tekrar ethidyum-bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezde 110 V'da 50 dakika yürütülerek bantların kalitesi kontrol edildi ve dizi reaksiyonuna alınincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

II. F. Dizi Reaksiyonu

DNA dizi analizi için Tablo-6'da belirtilen karışım, soğuk blok üzerinde 0,2 ml'lik PCR tüplerinde hazırlandı. Sekans reaksiyonu 96°C'da üç dakika ve takiben 30 siklus boyunca 96°C'da 20 saniye, 50°C'da 20 saniye ve 60°C'da dört dakika olacak şekilde Esco termal döngü cihazında gerçekleştirildi.

Tablo-6: Dizi reaksiyonu karışımı.

Reaktifler	Miktar
DTCS Quick Start Master Mix (Beckman-Coulter)	8 µl
Saflaştırılmış PCR ürünü	2 µl
Distile su	10 µl
Tek yönlü (F veya R) ^a Primer (10pmol/µl)	0,5 µl

^aF: Forward; R: Reverse.

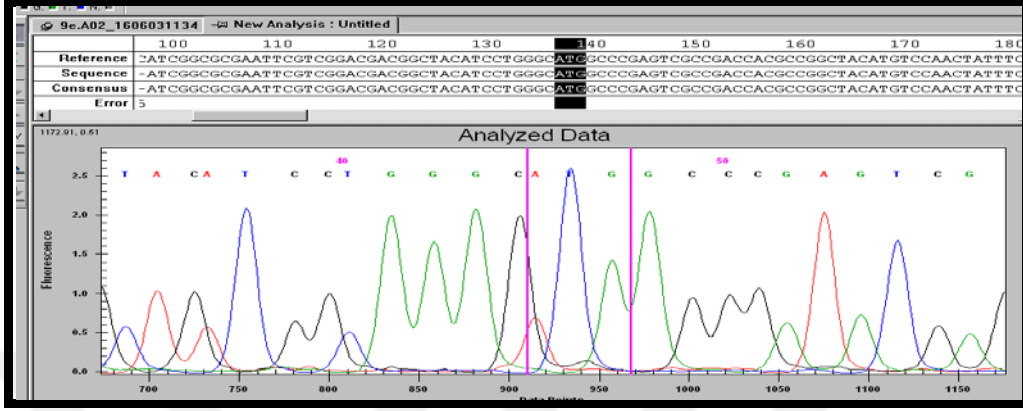
II. G. Alkol Çöktürme

Dizi reaksiyonu tamamlanan her bir ürün üzerine, reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 2 µl sodyum asetat, 2 µl sodyum etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 1 µl glikojen eklendi ve 60 µl % 95'lik soğuk etanol ile karıştırılarak +4°C'da 14.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra çökelti 200 µl %70'lik soğuk etanolle iki kez (14.000xg'de beş dakika) daha yıkandı. Çökelti, 37°C etüve konularak kurumaya bırakıldı ve alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı.

II. H. Ürünün Dizi Analiz Cihazına Yüklenmesi ve Yorumu

Kuruyan pellet üzerine kitin içinden çıkan yükleme solüsyonundan 40 µl eklendi ve 96 kuyucuklu plaklara aktarımı yapıldı. Her bir kuyucuk mineral

yağ ile kapatıldıktan sonra plak, DNA dizi analizi cihazına (Beckman Coulter CEQ8000XL) yerleştirildi ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçlar pikler şeklinde görüntülendi (Şekil-3).



Şekil-3: DNA dizi analiz cihazından alınan bir görüntü.

Ayrıca, belirlenen dizilerdeki mutasyonları saptamak için web tabanlı bir program ile (Bioedit Sequence alignment editor) "ClustalW Analiz" yapıldı (52). Değerlendirme aşamasında, Genbank'tan elde edilen H37Rv standart suş dizisiyle karşılaştırılarak okundu. Belirlenen nükleotid değişiklikleri kayıt edildi.

Amplifikasyon sonrası işlemler ÜÜTF Tıbbi Biyoloji AD Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı Tüberküloz Laboratuvarına 2005-2014 yılları arasında gönderilen fenotipik olarak en az bir anti-tüberkülo ilaç direnci saptanan 110 *M. tuberculosis* kompleks suşu incelenmiştir. İncelenen *M. tuberculosis* kompleks suşları 105 hastaya aittir. Dört hastanın 5 mükerrer örneği farklı zamanlarda gönderildiği ve anti-tüberküloz ilaç duyarlılıkları farklı olduğu için incelemeye dahil edilmiştir. Örnekler en çok Göğüs Hastalıkları bölümünden (%60) gönderilmiş olup bunu Enfeksiyon Hastalıkları ve Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları bölümü takip etmiştir (Tablo-7).

Tablo-7: İncelenen suşların kliniklere göre dağılım

Klinik	Sayı	%
Göğüs Hastalıkları	66	60,0
Enfeksiyon Hastalıkları	9	8,2
Çocuk Enfeksiyon	9	8,2
Onkoloji	4	3,6
Nefroloji	4	3,6
Beyin Cerrahisi	3	2,7
Genel Cerrahi	2	1,8
Hematoloji	2	1,8
Gastroloji	2	1,8
Romatoloji	2	1,8
Diğer	7	6,4
Toplam	110	100

İncelenen suşların %65,5'ini solunum yolu örnekleri oluşturmuş olup örneklere göre dağılımı Tablo-8'de yer almaktadır.

Tablo-8: İncelenen suşların örneklere göre dağılımı

Örnek	Sayı	%
Solunum yolu örnekleri ^a	72	65,5
Plevra sıvısı	7	6,4
Pü-abse	7	6,4
Biyopsi	5	4,5
İdrar	5	4,5
Ameliyat materyali	4	3,6
Beyin omurilik sıvısı	3	2,7
Mide açlık suyu	3	2,7
Diyalizat sıvısı	2	1,8
Periton sıvısı	1	0,9
Aspirasyon mayi	1	0,9
Toplam	110	100

^aBalgam, endotrakeal aspirat ve bronkoskopi ile alınan örnekler

Toplam 110 suşun 75'inde (%68,2) tek ilaca direnç, 23'ünde (%21) iki ilaca direnç ve 12'sinde (%11) ise çok ilaca direnç mevcuttur. Tek ilaca ve çok ilaca dirençli suşların yıllara göre dağılımı Tablo-9'da, tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçlara direnç Tablo-10'da yer almaktadır.

Tablo-9: Tek ilaca ve çok ilaca dirençli suşların yıllara göre dağılımı

KODLAR	İLAÇLAR	YILLAR										TOPLAM	
		2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	n	%
A	INH	2	6	1	1	-	2	1	6	9	5	33	30,0
B	RIF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0
C	SM	1	3	3	3	2	2	4	3	7	6	34	30,9
D	EMB	-	1	-	-	-	-	4	1	2	-	8	7,3
E	INH+RIF	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,9
F	INH+SM	-	5	1	1	2	2	2	1	-	1	15	13,6
G	INH+EMB	-	3	-	-	-	-	1	-	2	-	6	5,5
H	RIF+SM	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,9
I	RIF+EMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0
J	SM+EMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0
K	INH+RIF+SM	-	-	2	-	-	1	1	-	1	-	5	4,5
L	INH+RIF+EMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,9
M	INH+SM+EMB	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	0,9
N	RIF+SM+EMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0
O	INH+RIF+SM+EMB	-	-	2	-	-	-	-	-	1	2	5	4,5
TOPLAM		3	18	10	6	4	7	14	11	22	15	110	100

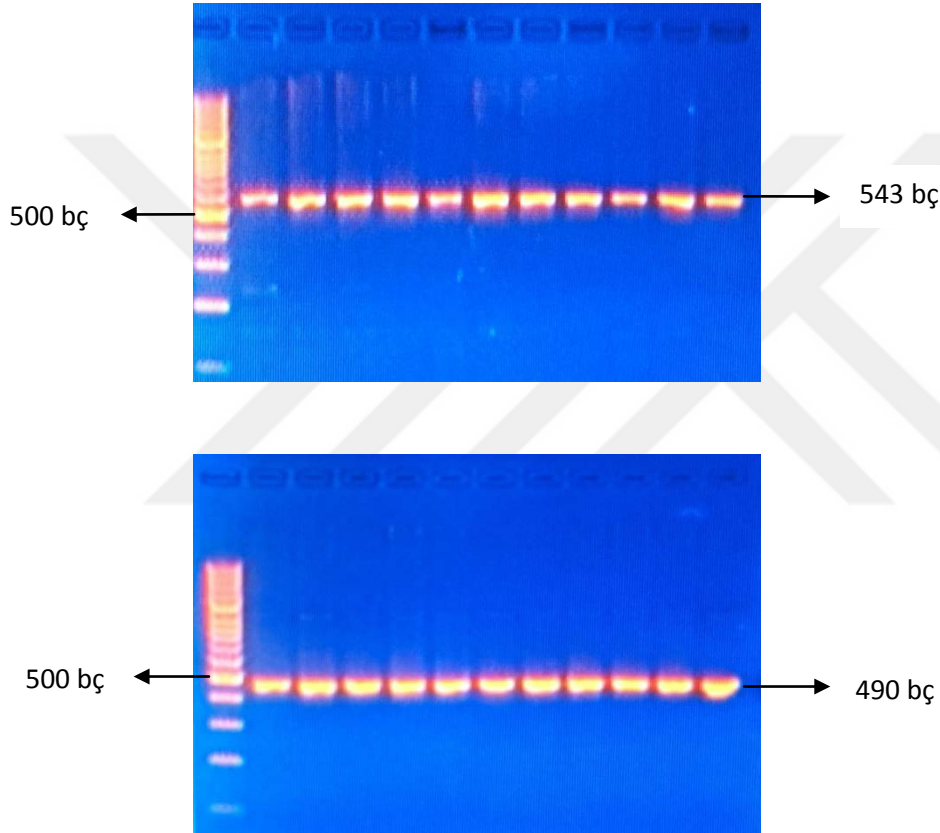
INH: İzoniazid, RIF: Rifampin, SM: Streptomisin, EMB: Etambutol

Tablo-10: Tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçlara direncin yıllara göre dağılımı

İLAÇLAR	YILLAR										TOPLAM	
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	n	%
INH Direnci Olan	2	14	7	3	2	5	5	7	13	9	67	41.4
RIF Direnci Olan	-	-	5	-	-	1	2	-	2	3	13	8.0
SM Direnci Olan	1	8	8	5	4	5	8	4	9	9	61	37.7
EMB Direnci Olan	-	4	2	1	-	-	5	1	5	3	21	13.0

INH: İzoniazid, RIF: Rifampin, SM: Streptomisin, EMB: Etambutol

Moleküler analize RIF dirençli 7, EMB dirençli 15, hem RIF hem de EMB dirençli 6 tane olmak üzere toplam 28 suş dahil edildi ve *rpoB* ile *embB* gen bölgelerinde mutasyon varlığı araştırıldı. Suşlar canlandırıldıktan sonra DNA izolasyonunu takiben *rpoB*-1f, *rpoB*-2r ile *embB*-3f, *embB*-4r primerleri kullanılarak bant varlığını göstermek için PCR yapıldı. PCR'da elde edilen 543 ve 490 baz çifti büyüklüğündeki DNA bantları %2'lik agaroz jelde 110 V'da 50 dk yürütülerek görüntülendi (Şekil-4).

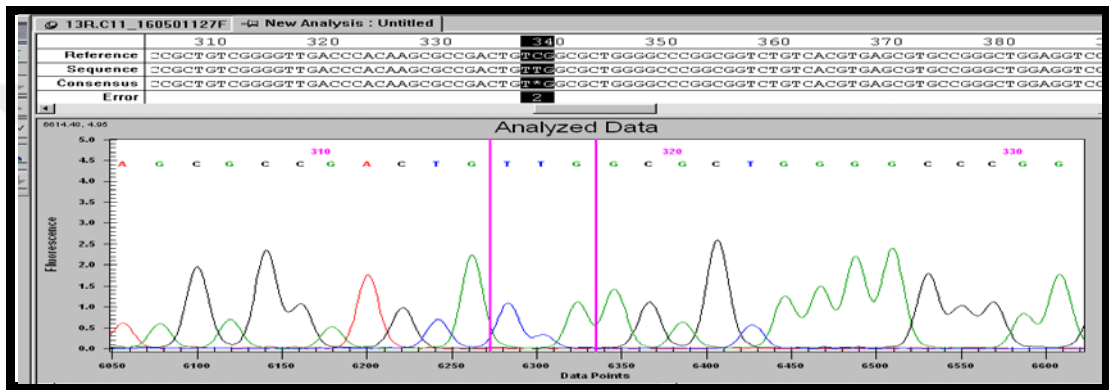


Şekil-4: Direnç ile ilişkili *rpoB* ve *embB* gen bölgelerinin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

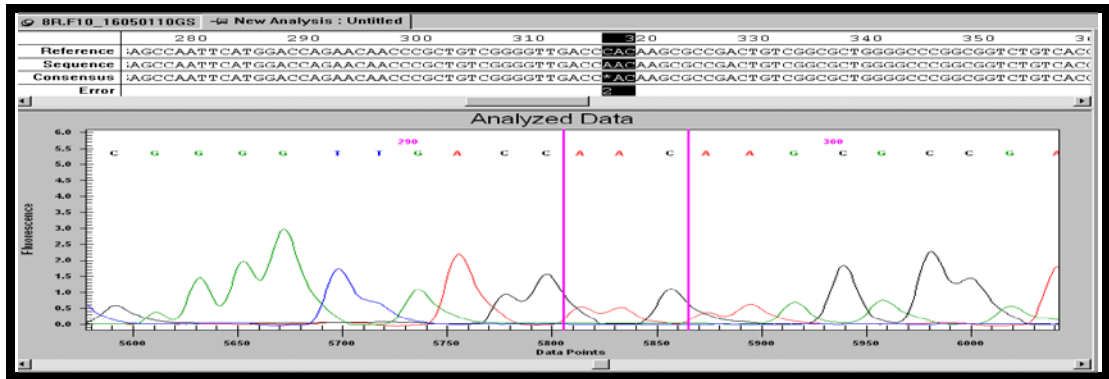
Dizi analizi öncesi PCR ürünlerinin saflaştırılması yapıldı. Elde edilen saf DNA tekrar ethidyum-bromid içeren %2'lik agaroz jel elektroforezde 110 V'da 50 dakika yürütülerek bantların kalitesi kontrol edildi.

Rifampin ve Etambutol direnç mekanizmasını belirlemek için *rpoB* ve *embB* genindeki olası mutasyonlar dizi analizi ile belirlendi. Belirlenen nükleotid ve aminoasit değişiklikleri kayıt edildi.

Çalışmamızda fenotipik olarak RIF'ne dirençli toplam 13 suşun 11'inde (%84,6) *rpoB* geninde mutasyon saptanmıştır. İki (%16,4) fenotipik olarak RIF'e dirençli olmasına rağmen incelenen gen bölgesinde mutasyon görülmemiştir. Saptanan mutasyonlar RRDR bölgesi olarak tanımlanan 507-533. kodonlar arasında bulunmuştur. Mutasyon saptanan 11 suşun 10'unda 531. kodonda yer alan Ser531Leu (TCG-TTG) mutasyonu bulunmaktadır (Şekil-5). Bir suшта ise His526Asn (CAC-AAC) mutasyonu saptanmıştır (Şekil-6).



Şekil-5: Kodon 531 mutasyonu (Mutasyonun olduğu yer siyah olarak gösterilmektedir).



Şekil-6: Kodon 526 mutasyonu (Mutasyonun olduğu yer siyah olarak gösterilmektedir).

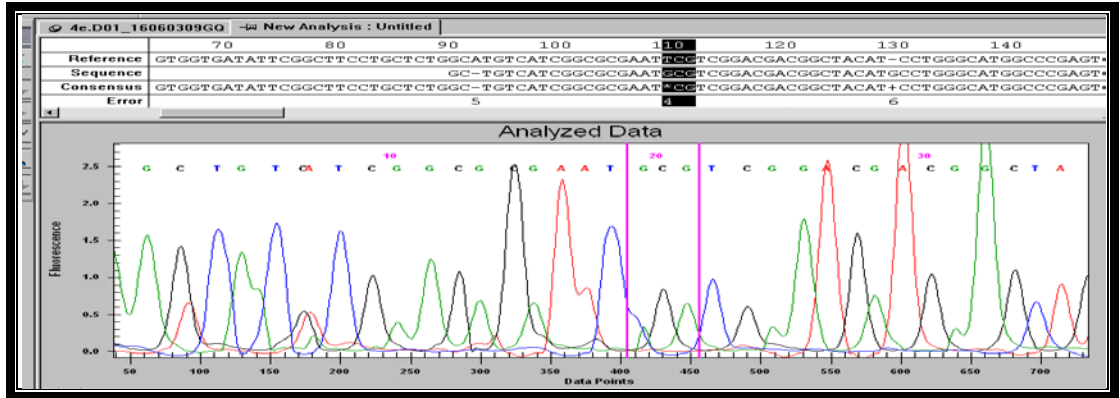
rpoB gen mutasyon saptanan suşların birinde INH ile RIF (E), dördünde INH, RIF ve SM (K), birinde INH, RIF ve EMB (L) VE beşinde INH, RIF, SM ve EMB (O) direnci mevcuttur. İki farklı kodonda saptanan *rpoB* gen mutasyonlarının yıllara göre dağılımı Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo-11: Saptanan rifampin direnç mutasyonlarının yıllara göre dağılımı

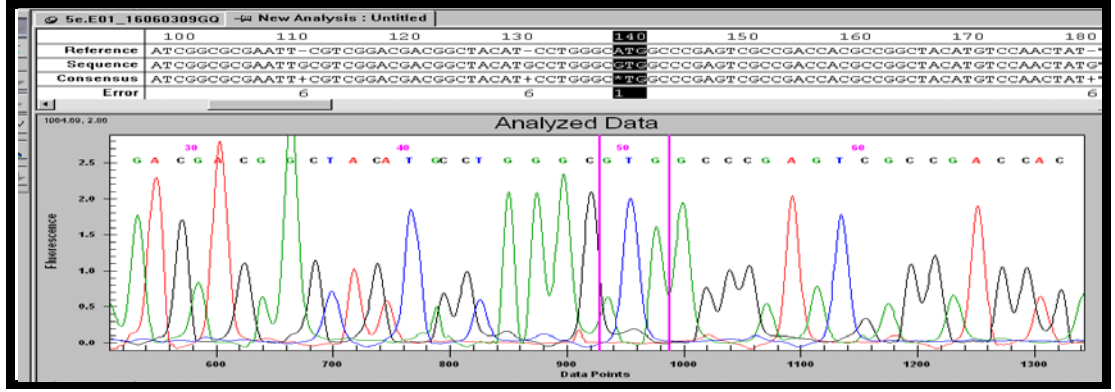
Mutasyon Yıllar	Rifampin Direnç Mutasyonları		
	Ser531Val	His526Asn	Toplam (n)
2007	5 (1E,2K, 2O)	-	5
2010	-	1 (K)	1
2013	2 (1K, 1O)	-	2
2014	3 (1L,2O)	-	3
Toplam	10	1	11

E: İzoniazid ve Rifampin , K: İzoniazid, Rifampin ve Streptomisin, L: İzoniazid, Rifampin ve Etambutol,
O: İzoniazid, Rifampin, Streptomisin ve Etambutol

Fenotipik olarak EMB'e dirençli toplam 21 suşun ise 14'ünde (%66,6) *embB* geninde mutasyon saptanmıştır. Yedisi (%33,3) fenotipik olarak EMB'e dirençli olmasına rağmen incelenen gen bölgesinde mutasyon görülmemiştir. Mutasyon saptanan 14 suşun 3'ünde ikili mutasyon, 11'inde ise tek mutasyon saptanmıştır. En sık saptanan mutasyon 297. kodonda yer alan Ser297Ala (TCG-GCG) mutasyonudur ve 8 suшта saptanmıştır (Şekil-7). Dört suшта ise 306. kodonda Met306Val (ATG-GTG) mutasyonu saptanmıştır (Şekil-8).



Şekil-7: Kodon 297 mutasyonu. Mutasyonun olduğu yer siyah olarak gösterilmektedir.



Şekil-8: Kodon 306 mutasyonu. Mutasyonun olduğu yer siyah olarak gösterilmektedir.

Saptanan diğer mutasyonlar ve neden oldukları aminoasit değişiklikleri Tablo-12’de gösterilmiştir.

Tablo-12: Etambutole dirençli *M. tuberculosis* suşlarında saptanan *embB* geni mutasyonları ve görülme sıklığı

Kodon no	Nükleotid değişikliği	Aminoasit değişikliği	Mutasyon sayısı n=18 (%)
297	TCG - GCG	Ser297Ala	8
306	ATG - GTG	Met306Val	4
405	GAG - GAC	Glu405Asp	2
406	ATG - GTG	Gly406Asp	2
378	GAG - GCG	Glu378Ala	1

Mutasyon saptanan suşların dördünde EMB (D), beşinde INH ile EMB (G), birinde INH, SM ve EMB (M) ve yedisinde INH, RIF, SM ve EMB (O) direnci mevcuttur. Dört farklı kodonda saptanan *embB* gen mutasyonlarının yıllara göre dağılımı ise Tablo-13’de görülmektedir.

Tablo-13: Saptanan Etambutol direnç mutasyonlarının yıllara göre dağılımı

Mutasyon Yıllar	Etambutol Direnç Mutasyonları					Toplam (n)
	Ser297Ala	Met306Val	Glu405Asp	Gyl406Asp	Glu378Ala	
2006	-	1(G)	-	-		1
2007	2(O)	-	-	1(O)		3
2008	-	-	-	1(M)		1
2011	1(G)	-	1(D)	-	1(D)	3
2012	1(D)	-	-	-		1
2013	4(1D,2G,1O)	1(O)	1(G)	-		6
2014	-	2 (O)	-	-		2
Toplam	8	4	1	1	1	17

D: Etambutol, G: İzoniazid ve Etambutol, M: İzoniazid, Streptomisin ve Etambutol,
O: İzoniazid, Rifampin, Streptomisin ve Etambutol

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüberküloz geçmişi çok eski tarihlere dayanmasına rağmen, bugün hala güncelliğini koruyan bir enfeksiyon hastalığıdır. Etkenin kesin olarak bilinmesine ve tedavide etkili ilaçların kullanılmasına rağmen hala yüksek seviyede morbidite, mortaliteye sebep olmaktadır (47). Tüberküloz hastalarının erken tanısı, etkili ve düzenli tedavisi ve tedavilerin uygun takipleri, TB kontrol programının temelini oluşturmaktadır. TB'un kesin tanısında altın standart etkenin kültürde üretilmesi olarak kabul edilmektedir. Kültür aynı zamanda basilin identifikasyonu ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılması için gereklidir (53). Tüberkülozun kontrolü için mikrobiyoloji laboratuvarına düşen en önemli görevlerden biri ilaç direncinin hızlı ve güvenilir yöntemler ile belirlenmesidir. Tüberküloz basillerinde kültüre dayalı fenotipik duyarlılık yöntemlerinin zaman alıcı ve zahmetli olması moleküler yöntemlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır.

Rifampin tüberküloz tedavisinde en etkili ilaçlardan biri olup izoniazid ile birlikte kombine tedavi rejiminin temelini oluşturur. RIF'e dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %96'sından fazlasında dirençten, RNA polimeraz enziminin β -sub ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533 kodonlar arasındaki 81 baz çift uzunluğundaki RRDR bölgesindeki mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar sorumludur (50). Yapılan bir çok çalışmada rifampin direnci ile ilişkili mutasyonların en sık 531, 526, 516 kodonlarda olduğu gösterilmiştir (54 ,55).

Etambutol tüberküloz tedavisinde kullanılan dar spektrumlu birinci seçenek antimikobakteriyel bir ajandır. Özellikle kombine tedavide önemli olup rifampin, aminoglikozid ve kinolonların etkinliğini artırır. Ayrıca bu ilacın AIDS'li hastalarda bakteriyemi seviyesini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (56). Fakat etambutol direnç mekanizması halen tam olarak anlaşılammıştır. Etambutole dirençli türlerde *embB* genindeki en sık mutasyonlar, 306. kodondaki missense mutasyonlardır (51). Bununla birlikte

Mokrousov ve ark.'ları (57) *embB* 306 mutasyonunu hem EMB duyarlı hem de EMB dirençli suşlarda saptamıştır.

Bu çalışmada fenotipik ilaç duyarlılık testi ile dirençli olduğu belirlenen 7'si RIF, 15'i EMB dirençli, 6'sı ise hem RIF hem de EMB dirençli olarak bulunan toplam 28 suşun *rpoB* ve *embB* gen bölgelerinde dirençten sorumlu mutasyon varlığını ve mutasyon paternlerini DNA dizi analizi ile araştırmak amaçlanmıştır.

Campbell ve ark.'nın (10) CDC'de 2011 yılında 314 klinik örnek ile yaptıkları çok merkezli çalışmada fenotipik olarak RIF dirençli olduğu bilinen 174 suşun %97'sinde ve fenotipik olarak RIF duyarlı olduğu bilinen 140 suşun ise %6,5'inde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır. En sık saptanan mutasyonlar ise sırasıyla %62,1 Ser531Leu, %11,5 His526Tyr, %6,9 Asp516Val'dir. Çalışmamızda fenotipik olarak RIF'ne dirençli bulunan toplam 13 suşun 11'inde (%84,6) *rpoB* geninde mutasyon saptanmıştır. İki tanesi (%16,4) fenotipik olarak RIF'e dirençli olmasına rağmen incelenen gen bölgesinde mutasyon görülmemiştir. Saptanan mutasyonlar RRDR bölgesi olarak tanımlanan 507-533. kodonlar arasında bulunmuştur. Mutasyon saptanan 11 suşun 10'unda 531. kodonda yer alan Ser531Leu (TCG-TTG) mutasyonu, bir suşta ise His526Asn (CAC-AAC) mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışmada kodon 526'daki mutasyonda histidin yerine tirozin geçerken çalışmamızda histidin yerine asparajinin geçtiğini görmekteyiz.

Aynı çalışmada fenotipik olarak EMB dirençli olduğu bilinen 154 suşun %80,5'inde, duyarlı olduğu bilinen 160 suşun ise %16,8'inde *embB* gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır. Mutasyon saptanan suşların %53,8'inde 306. kodon mutasyonu vardır. Kodon 306 mutasyonları ise sırasıyla %64,7 Met306Val, %31,8 Met306Ile, %3,5 Met306Leu olarak bulunmuştur. Saptanan diğer mutasyonlar ise 313, 319, 328, 351, 354, 355, 369, 378, 405, 406. kodonlarda yer almaktadır. Çalışmamızda fenotipik olarak EMB'e dirençli toplam 21 suşun ise 14'ünde (%66,6) *embB* geninde mutasyon saptanmıştır. Fenotipik olarak EMB'e dirençli olmasına rağmen 7 suşta (%33,3) incelenen gen bölgesinde mutasyon görülmemiştir. Mutasyon saptanan 14 suşun 3'ünde ikili mutasyon, 11'inde ise tek mutasyon

saptanmıştır. En sık saptanan mutasyon 297. kodonda yer alan Ser297Ala (TCG-GCG) mutasyonudur ve 8 suşta saptanmıştır. Dört suşta ise 306. kodonda Met306Val (ATG-GTG) mutasyonu saptanmıştır. İkişer suşta 406. kodonda Gly406Asp (GGC-GAC) ve 405. kodonda Glu405Asp (GAG-GAC) mutasyonu bir suşta ise 378. kodonda Glu378Ala (GAG-GCG) mutasyonu saptanmıştır. Çalışmamızda, Campbell ve ark.'nın çalışmasıyla uyumlu olarak 378, 405 ve 406. kodonlarda mutasyon saptanmıştır.

Engström ve ark.'nın (11) 2012 yılında yaptıkları çok merkezli çalışmada toplam 290 *M. tuberculosis* suşu ile yapılan çalışmada fenotipik olarak RIF dirençli olduğu bilinen 209 suşun 198'inin (%94,7) RRDR bölgesinde mutasyon saptanmış ve bunların da 189'unda kodon 516, 526, 531 mutasyonu olduğu bildirilmiştir. Fenotipik olarak RIF duyarlı olduğu bilinen 71 suşta mutasyon saptanmamıştır. Bu çalışmada fenotipik olarak RIF dirençli olduğu bilinen RRDR bölgesinde mutasyon saptanmayan suş oranı %5,3 iken çalışmamızda bu oran %16,4'dür. Bu çalışmada fenotipik olarak EMB dirençli olduğu bilinen 134 suşun 82'sinde (%61,2) *embB* gen bölgesinde mutasyon saptandığı, mutasyonların 80'inin 306. kodonda, birer tanesinin de 313. ve 315. kodonda yer aldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada fenotipik olarak EMB dirençli olan suşların %38,8'inde mutasyon saptanmazken çalışmamızda bu oran %33,3'tür. Fenotipik olarak EMB duyarlı olduğu bilinen 138 suşun 21'inde *embB* gen bölgesinde mutasyon saptanmış olup bu mutasyonlar da 306. kodonda yer almaktadır. Çalışmamızda ise duyarlı suşlarda *embB* gen bölgesine yönelik DNA dizi analizi yapılmamıştır.

Zhao ve ark.'nın (58), dünyada tüberkülozun en sık görüldüğü ülkelerden biri olan Çin'de 2014'de 171 *M. tuberculosis* suşu ile yaptıkları çalışmada RIF dirençli 46 suşun %87'sinde (40/46) *rpoB*, EMB dirençli 17 suşun %76,5'inde (13/17) *embB* gen mutasyonu olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise sırayla *rpoB* ve *embB* gen bölgelerinde mutasyon saptama oranları %86,6 ve %66,6'dır. Bu çalışmada *rpoB* geni ile ilişkili bulunan mutasyonlar sırasıyla %47,8 531. kodonda, %21,7 526. kodonda, %8,7 516. kodonda saptanmıştır. *embB* gen mutasyonu olan 13 suşun 11'inde 306.

kodonda, birinde 406. kodonda, birinde ise hem 306. hem de 406. kodonda mutasyon saptanmıştır. Bu çalışma ile uyumlu olarak çalışmamızda da *rpoB* gen mutasyonları sırayla 531. ve 526. kodonda saptanırken 306. kodon *embB* gen mutasyonları ikinci sırada saptanmış olup en sık 297. kodon mutasyonu saptanmıştır.

Park ve ark.'nın (59) Kore'de 2012 yılında 124 EMB duyarlı, 93 EMB dirençli suş ile yaptığı çalışmada EMB duyarlı suşların 13'ünde (%10,5) *embB* gen mutasyonu saptanmıştır. Etambutol dirençli olanların ise %9,7'sinde mutasyon saptanırken çalışmamızda bu oran %33,3 olarak bulunmuştur. Tüm suşlar içinde en sık mutasyonlar sırasıyla 306. kodon (%67,9), 497. kodon (%14,3) ve 406. kodonda (%7,1) bulunmuştur. Mutasyon saptanan diğer kodonlar ise 319, 354, 360, 399, 405, 459'dur. Çalışmamızda bu bulgulardan farklı olarak en sık 297. kodonda mutasyon görülürken 306. kodon mutasyonu ikinci sıklıkta görülmüştür. Diğer mutasyonlar ise 405 ve 406. kodonda saptanmıştır.

Bakula ve ark.'nın (60) Polonya'da 2013 yılında 17 EMB dirençli, 33 EMB duyarlı olmak üzere toplam 50 çok ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşu ile yaptığı çalışmada EMB dirençli suşların 13'ünde (%76,5), duyarlı suşların ise 14'ünde (%42,4) *embB* mutasyonu saptanmıştır. En sık 306. kodon (%40) mutasyonu ikinci sıklıkta ise 406. kodon mutasyonu saptanmış olup diğer mutasyonlar 413, 497, 504, 507. kodonda saptanmıştır. Çalışmamızda farklı olarak 297. kodon mutasyonu en sık saptanmıştır.

Özkütük ve ark.'nın (61) Manisa'da 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada fenotipik olarak RIF'e dirençli olduğu saptanan 43 *M. tuberculosis* suşu ile RIF'e duyarlı bulunan 7 klinik suş olmak üzere toplam 50 suş incelenmiştir. Araştırmada incelenen rifampine dirençli 43 klinik suşun 40'ında (%93) *rpoB* geninde mutasyon saptanmıştır. Mutasyon görülen 40 suşun 37'sinde (%92,5) mutasyonlar RRDR bölgesi olarak tanımlanan 507-533. kodonlar arasında bulunmuştur. En sık 531. (%67), 516. (%9) ve 526. (%5) kodonlarda *rpoB* gen mutasyona rastlanmıştır. Çalışmamızda da 531. kodon mutasyonu ilk sırada yer alırken (%90,9) bu çalışmada üçüncü sıklıkta görülen 526. kodon mutasyonu ikinci sırada (%9,1) yer almıştır.

Aslan ve ark.'nın (62) Mersin'de 2007 yılında yaptığı çalışmada toplam 19 RIF dirençli suşun 14 (%73,6)'ünde *rpoB* gen mutasyonu saptanmıştır. Çalışmamızda bu oran %86,6'dır. Bu mutasyonlar 531 (%64,2), 545 (%28,6), 516 (%7,1), 524. (%7,1) kodonlarda saptanmıştır. Çalışmamızda da 531. kodon mutasyonu en sık görülürken bu çalışmada saptanan diğer mutasyonlar suşlarımızda bulunmamaktadır.

Aktaş ve ark.'nın (63) Malatya'daki ÇİD-TB'lu suşlarda yaptıkları çalışmada RIF'e dirençli suşlarda sırasıyla 531 (%47,6), 516 (%23,8), 526 (%14,3) ve 513. (%14,3) kodonlarda mutasyon belirlenmiştir. Çalışmamızda da en sık 531. kodon mutasyonu görülürken bu çalışmada üçüncü sırada görülen 526. kodon mutasyonu ikinci sıklıkta görülmüştür. 516. kodonda mutasyon saptanan 5 suşun 3'ünde aynı zamanda 527. kodonda, 1'inde 572. kodonlarda da mutasyonlar kaydedilmiştir.

Avkan ve ark.'nın (64) İzmir'de yaptıkları çalışmada RIF direnci olan toplam 48 suşa dizi analizi yapılmış ve 46 (%95,8) suşda 13 farklı mutasyon saptanmış. Yazarların verileri mutasyon saptanan suşlar üzerinden değerlendirildiğinde en sık mutasyonlar 531. (%54,3) ve 526. (%19,6) kodonda saptanmış. Kodon 531'de saptanan mutasyonlar arasında ise en sık %43,8 Ser531Leu mutasyonu görülmüştür. Çalışmamızda ise suşların %86,6'sında (11/13) iki farklı mutasyon saptanmış, bu mutasyonlar Avkan ve ark.'nın verileri ile uyumlu olarak en sık 531. kodonda (%90,9) ve ikinci sıklıkta 526. kodonda (%9,1) mutasyon görülmüştür. Çalışmamızda 531. kodondaki tüm mutasyonlar Ser531Leu olarak saptanmıştır.

Karahan ve ark.'nın (65) 2004 yılında 80 RIF dirençli *M. tuberculosis* suşu ile yaptığı çalışmada 72 suşda (%90) *rpoB* gen mutasyonu saptanırken 8 suşda (%10) ilgili gen bölgesinde mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda ise %86,6 oranında *rpoB* gen mutasyonu saptanırken %16,4 oranında mutasyon görülmemiştir. En sık görülen mutasyonlar bizim çalışmamızla da paralel olarak sırasıyla 531 (%51,4), 526 (%18,1), 516 (%13,9), 513. (%12,5) kodonda saptanmıştır.

Çavuşoğlu ve ark.'larının (66) çalışmalarından elde ettikleri veriler de yaptığımız çalışmanın bulguları ile uyumlu olup araştırmacılar Ege

Bölgesinden izole ettikleri 41 rifampine dirençli *M. tuberculosis* suşunda en sık 531. kodon (%56,1), 526. kodonda (%19,5) mutasyon saptamışlardır. Çalışmamızda saptadığımız Ser531Leu aminoasit değişimini (%90,9), onlarda en sık görülen aminoasit değişikliği olarak (%46,3) tespit etmişlerdir.

Sekans analizi ile RIF dirençli *M. tuberculosis* suşlarının % 95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -sub ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533. kodonlar arasındaki 81 baz çift uzunluğundaki yüksek sıklıkta değişken RRDR bölgesindeki mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da ülkemizde ve dünyada yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak *rpoB* geninin 531. ve 526. kodonda mutasyon saptanmıştır. Ayrıca bu yöntem ile mutasyonların belirlenmesi direnç epidemiyolojisi belirlemek için de önemlidir. Çalışmamızda %86,6 oranında *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptanırken Campbell ve ark.'nın(10), Engström ve ark.'nın(11) yaptıkları çok merkezli, Zhao ve ark.'nın (58) Çin'de yaptığı, Özkütük ve ark.'nın (61), Aslan ve ark.'nın (62), Avkan ve ark.'nın (64), Karahan ve ark.'nın (65) yaptıkları çalışmalarda bu oran sırasıyla %97, %94,7, %87, %93, %73,6, %95,8 ve %90 olarak bulunmuştur. Bu da *rpoB* gen bölgesi dışındaki alanlarında araştırılması gereğini ortaya koymaktadır. Campbell ve ark.'nın (10) CDC'de yaptığı çalışmada RIF'e fenotipik olarak duyarlı oldukları halde *rpoB* gen bölgesinde mutasyon saptanmış olması fenotipik testler yapılmadan direnç için mutasyonları gösteren DNA dizi analizlerinin yapılması yanıtıcı olabilecektir.

Etambutol için ise dünya genelinde en sık 306. kodon mutasyonu saptanırken çalışmamızda en sık 297. kodonda mutasyon saptanmış olup 306. kodon mutasyonu ise ikinci sırada yer almıştır. Etambutol direncinin moleküler incelenmesine yönelik ülkemizde yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bu nedenle ülkemizdeki EMB direnç profilini göstermek için moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Etambutol dirençli suşlarda var olan diğer mutasyonların da gösterilmesi birinci seçenek antitüberküloz ilaç direnç mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Campbell ve ark. (10), Engström ve ark. (11), Park ve ark. (59) ile Bakula ve ark. (60)'nın yaptıkları çalışmalarda fenotipik olarak EMB'e duyarlı bulunan suşlarda da mutasyon

saptanması direnç profillerini DNA dizi analizi yoluyla yorumlanmasında sıkıntı yaratacaktır.

Sonuç olarak, Bursa ili ve çevresinden izole edilen *M. tuberculosis* suşlarında rifampin ve etambutole karşı dirençten sorumlu genlerin ve mutasyonların varlığı ilk kez araştırılmış olup bölgesel suşlar ile çalışılıyor olmasına rağmen hem Marmara Bölgesi hem de ülkemiz için literatüre katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. Moleküler yöntemler *M. tuberculosis*'in hızlı tanısı ve direnç tanımlanmasında önemli olup DNA dizi analizi yöntemiyle ilaç direnci ile ilişkili genlerindeki mutasyonların gösterilmesi, tüberküloz hastalığında doğru tedavi protokollerinin belirlenebilmesi için referans yöntem olarak önerilmektedir. Fenotipik olarak antitüberkülo ilaçlara dirençli suşlarda sık mutasyon görülen gen bölgelerinde DNA dizi analizi ile herhangi bir mutasyonun saptanmaması diğer gen bölgeleri ile çalışmalar yaparak doğru tanıya gitmeye bizi zorlarken, fenotipik olarak duyarlı suşlarda sık çalışılan gen bölgelerinde mutasyonların varlığının gösterilmesi de sadece genetik değişikliğin varlığının ortaya konmasının tek başına anlamlı olamayacağını bize ifade etmektedir. Mutasyon varlığı ancak ilgili gen bölgesinin kodladığı proteinlerin varlığının gösterilmesi ile anlam kazanabilir. Bu bakımdan antitüberkülo ilaçlara direnç proteomiks çalışmaları için yeni bir araştırma alanı oluşturabilir.

Tüm dünyada ciddi bir tehdit olarak karşımıza çıkan çok ilaca dirençli tüberküloz olguların tespiti ve eliminasyonun gerçekleştirilebilmesine yönelik planlamalarda DNA dizi analizi gibi yeni çalışmaların yaygın olarak yapılması önemli katkı sağlayacaktır.

Tüberküloz ilaçlarına karşı direnci saptamaya yönelik moleküler çalışmalar, tespitte bize hız kazandırıyor olsa da mevcut veriler ışığında konvansiyonel yöntemler ile mikobakterinin antitüberkülo ilaçlara verdiği cevabın in vitro test edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Global Tuberculosis Report 2015. World Health Organization, Geneva. 2015.
- 2- Türkiye'de verem savaşı 2014 raporu. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Ankara. 2015.
- 3- De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(1):36-52.
- 4- Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett 1994; 123(1-2):11-8.
- 5- Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. Lancet 1994; 344(8918): 293-8.
- 6- Almeida da Silva P, Ainsa JA. Drugs and drug interactions. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds). Tuberculosis 2007, from Basic Scienceto Patients Care. First Edition. Brazil: 2007. 593-633.
- 7- Treatment of tuberculosis guidelines. Fourth edition. World Health Organization, Geneva. 2010.
- 8- Tüberküloz tanı ve tedavi rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, Ankara. 2014.
- 9- Maruya AK, Kant S, Kushwaha S, Nag VI. Molecular mechanisms of anti-tuberculosis drugs in drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. JPBMS 2011; 3:1-5.
- 10- Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD et al. Molecular detection of mutations associated with first and second line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:2032-41.
- 11- Engström A, Morcillo N, Imperiale B, Hoffner SE, Jureen P. Detection of first and second line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing. J of Clin Microbiol 2012; 50:2026-33.
- 12- Flores-Trevino S, Morfin-Otero R, Rodriquez-Noriega E et al. Characterization of phenotypic and genotypic drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a city in Mexico. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014; 33:181-5.
- 13- Özkuyumcu C. Mikobakterium. Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2009. 76-93.
- 14- Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S, Bekiroğlu N. Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A media for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in laboratories with a high prevalance of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:314-7.
- 15- Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyum Kitabı. Samsun, 2003; 34-47.

- 16- Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2002; 15:716–46.
- 17- Woods GL, Washington JA. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. Rev Infect Dis 1987; 79:275-9.
- 18- Global Tuberculosis Report 2013. World Health Organization, Geneva. 2014.
- 19- Glaziou P, Falzon D, Floyd K, Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis. Semin Respir Crit Care Med 2013; 34:3-16.
- 20- Güncel Tüberküloz İstatistikleri 2014. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Ankara. 2015.
- 21- Çavuşoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis* genomu ve genetik özellikleri. Toraks Kitapları 2010; 11:56-7.
- 22- Ceyhan İ. Tüberkülozda bakteriyolojik tanı. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara. 2007.
- 23- Peterson R. Molecular epidemiology of tuberculosis. Sweden: Karolinska institute, 2009.
- 24- Kent PT ve Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. 1985.
- 25- Albay A. *Mycobacterium* genel özellikleri, laboratuvar tanısı, ve boyama işlemleri. Klinik Mikrobiyoloji. Başustaoglu A (Çev. Ed) 9. Baskı.Cilt1 Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009. 543-72.
- 26- Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Ustaçelebi S, Cengiz AT (editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Günes Kitabevi; 1999. 419-55.
- 27- Silva PA, Ainsa J. Drugs and drug interactions. In: Palamino JC, Leao SC, Rittacco V (eds). Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. 1st edition. 2007. 593-634.
- 28- Siddiqi SH. In BACTEC TB System Product and Procedure Manual, Drug susceptibility testing. Becton Dickinson, Maryland. 1989. IV.1-IV.18
- 29- Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun: 2003. 285-90.
- 30- Koneman EW, Winn WJ, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (eds). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2006; 1064-124.
- 31- Griethuysen AJ, Jansz AR, Buiting AGM. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB System, Septi-Chek AFB System and Lowenstein-Jensen Medium for detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1996; 2391-4.
- 32- Zeytinli ÜO. Çukurova bölgesinde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının spoligotiping ve MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirilmesi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Adana: Çukurova Üniversitesi; 2010.

- 33- Bulut Y. Trabzon mikobakteri günleri. Moleküler tanı yöntemleri ve yenilikler. Trabzon: 2009. 16-21.
- 34- Albay A. Tüberkülozun tanısında yenilikler. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı. Antalya: 2009. 150-5.
- 35- Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: 2003. 325-37.
- 36- Çilli A. Antitüberküloz ilaçlar ve etki mekanizmaları. 21. yüzyılda tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun. 2003: 163-72.
- 37- Saniç A. Antitüberküloz İlaçlar. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (editörler). Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2008. 691-705.
- 38- Tansel Ö. Klasik antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun. 2003: 348-51.
- 39- Özakın C. Tüberküloz kültüründe kullanılan yeni yöntemler. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı. Bolu. 2002: 49-56.
- 40- Aktoprak HB. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinde artmış ilaç direncinin belirlenmesi (Uzmanlık Tezi). İzmir: Ege Üniversitesi; 2009.
- 41- Ruiz P, Zerolo FJ, Casal MJ. Comparison of susceptibility testing of *M. tuberculosis* using the ESP Culture System II with that using the BACTEC Method. J Clin Microbiol 2000: 4663-4.
- 42- Saniç A. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin yeri. ANKEM Derg 2007; 21: 81-5.
- 43- Çavuşoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis*'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun. 2003: 369-85.
- 44- Durmaz R. DNA baz dizi analizi. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 169-71.
- 45- Özyurt M. Moleküler tanıda ticari sistemler. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun. 2003: 224-39.
- 46- Öztoprak N. Türkiye'deki ve dünyadaki ÇİD-TB direnci, 2. Türkiye EKMUD Bilimsel Platform Kitabı, Ankara. 69-72.
- 47- Özkara Ş. Dünyada ve Türkiyede ilaç direnci; ilaç direnci olan hastaya yaklaşım. Trabzon Mikobakteri Günleri Kitabı. Trabzon. 2009; 61-5.
- 48- Kocagöz T. Mikobakterum türlerinin genel özellikleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2008. 2277-311.
- 49- Saniç A. *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç ve patogenezin araştırılmasında moleküler yöntemlerin yeri. IV. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kursu. Malatya. 3-7 Eylül 2007: 163-77.
- 50- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* 1998 update. Tuber Lung Dis 1998; 79:3-29.

- 51- Sreevatsan S, Stockbauer K, Pan X, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1677-81.
- 52- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41:95-8.
- 53- Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Various Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(4):1206-9.
- 54- Somoskovi A, Parson LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2:164-8.
- 55- Caws M, Duy PM, Tho DQ, Lan NT, Hoa DV, Farra J. Mutations prevalent among rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from hospital in Vietnam. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2333-7.
- 56- Kemper CA, Havlir D, Haghightat D, et al. The individual microbiologic effect of three antimycobacterial agents clofazimine, ethambutol and rifampin on *Mycobacterium avium complex* bacteremia in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1994; 170:157-64.
- 57- Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB* 306 mutations in ethambutol susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3810-3.
- 58- Zhao L, Chen Y, Chen Z, et al. Prevalence and molecular characteristics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Hunan, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:3475-80.
- 59- Park YK, Ryoo SW, Lee SH, et al. Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with *embB* gene mutations in Korea. *J Med Microbiol* 2012; 61:529-34.
- 60- Bakula Z, Napiorkowska A, Bielecki J, et al. Mutations in the *embB* gene and their association with ethambutol resistance in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *Biomed Research International* 2013; Article ID:167954.
- 61- Özkütük N, Sürücüoğlu S, Biçmen C, ve ark. Manisada izole edilen rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerin moleküler epidemiyolojisi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2008; 22(1):35-41.
- 62- Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G. Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in southern Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61:255-60.
- 63- Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z. Molecular Characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey. *Microb Drug Resist* 2005; 11:94-9.
- 64- Avkan Oguz V, Eroglu C, Guneri S, ve ark.. *rpoB* gene mutations in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the Aegean region of Turkey. *J Chemother* 2004; 16:442-5.

- 65- Karahan ZC, Atalay F, Uzun M, Erturan Z, Atasever M, Akar N. Sequence analysis of *rpoB* mutations in rifampin resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 2004; 10:325-33.
- 66- Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4435-8.



TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca her konuda desteklerini ve bilgilerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. Gũher Gũral baŐta olmak üzere, Prof. Dr. Beyza Ener, tez danıŐmanım Prof. Dr. Cũneyt Özakın, Prof. Dr. H. Barbaros Oral, Doç. Dr. Melda SınırtaŐ, Doç. Dr. Harun Ađca, Doç. Dr. Ferah Budak, Doç. Dr. Oktay Alver'e; mesleğimin laboratuvar ve klinik bũtũnlũđũnũ sağlamam konusunda faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Safiye Helvacı, Prof. Dr. ReŐit Mıstık, Prof. Dr. Halis Akalın, Prof. Dr. Emel Yılmaz, Doç. Dr. Yasemin Heper, Doç. Dr. Esra Kazak'a; birlikte çalıŐmaktan keyif aldığım Uzm. Dr. Burcu Dalyan Cilo, Uzm. Dr. Tuncay Topaç, Uzm. Dr. Ece Őzmerdiven'e; laboratuvar pratiği kazanmamdaki katkılarından dolayı laboratuvardaki tũm çalışma arkadaŐlarıma;

Ayrıca doğduğum gũnden itibaren her tũrlũ desteği, emeği ve sevgiyi fedakarca sunan canım anne ve babama sonsuz teŐekkũr ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sezcan Sağlam

Doğum Yeri ve Tarihi: Kadirli, 23.06.1985

Medeni Durumu: Bekar

Ünvanı: Doktor

Yabancı Dili: İngilizce

Yazışma Adresi, Tel, e-posta:

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Görükle, Bursa

Tel: (0532) 4982460

e-posta: sezcansaglam@hotmail.com

Eğitimi:

2012-2016 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD - Bursa

2003-2009 Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi - Adana

1996-2003 Kadirli Anadolu Lisesi - Kadirli

1992-1996 Fatih Mehmet İlköğretim Okulu - Kadirli

Uzmanlık Tezi: *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında anti-tüberkülo ilaçlara direncin moleküler yöntemlerle araştırılması

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cüneyt Özakin