

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ÇOK İLACA DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARININ  
SEKONDER İLAÇLARA DİRENCİ  
VE  
DİRENÇLE İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

DR. İHSAN KULAKSIZ

DANIŞMAN  
PROF. DR. MELTEM UZUN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL – 2023

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



İhsan KULAKSIZ

## İTHAF

*Bıraktığı manevi mirası hayatım boyunca taşımaya gayret edeceğim  
Rahmetli dedem **Kadir DÜNDAR**'a ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, akademik duruşu, insan ilişkileri ve etik anlayışı ile bana örnek olan, yüksek özveri ve sabır ile tez sürecim boyunca daima yanımda olan, öğrencisi olmaktan dolayı çok şanslı hissettiğim ve bunu belirtmekten onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meltem UZUN'a,

Bilgi ve deneyimleri ile tıpta uzmanlık eğitimimde emeği geçen İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a, eğitimime katkıda bulunan hocalarım Sayın Prof. Dr. Betigül ÖNGEN, Sayın Prof. Dr. Özden BÜYÜKBABA BORAL, Sayın Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ, Sayın Prof. Dr. Dilek ŞATANA, Sayın Prof. Dr. Gülseren AKTAŞ, Sayın Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU, Sayın Doç. Dr. Lütfiye ÖKSÜZ, Sayın Doç. Dr. Hayriye Kırkoyun UYSAL, Sayın Doç. Dr. Sevim MEŞE, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖNEL ve Sayın Öğr. Gör. Dr. D. Bahar AKGÜN KARAPINAR'a,

Klinik bakış açısı, bilgi ve tecrübeleriyle Tıbbi Mikoloji eğitimimde büyük emeği geçen Sayın Prof. Dr. Zayre ERTURAN'a, hem akademik hem sosyal konularda desteğini daima hissettirip derdimle dertlenerek bana adeta ablalık yapan, ahlakı ve çalışkanlığıyla etrafındaki herkesin sevgi ve saygı duyduğu Sayın Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ'e,

Samimiyetleri ile bilim dalını ikinci evim gibi hissettiren ve deneyler süresince desteklerini esirgemeyen Bio. Burak PURAL, Sercan ARSLAN ve Muazzez UYAR'a,

Asistanlığa başladığım ilk günden beri tecrübe, ilgi ve desteği ile yanımda olan Uzm. Dr. Onur TOSUN'a, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Uzm. Dr. İlvana ÇAKLOVİCA KÜÇÜKKAYA'ya, türlü zorlukları beraber aştığımız kader ortaklarım Dr. Yasemin BÖLÜKBAŞI, Dr. Betül Minire YILMAZ ve Dr. Sertaç KÜÇÜKKAYA başta olmak üzere birlikte çalıştığım ve nöbet tuttuğum tüm hekim, biyolog, teknisyen ve kayıt görevlisi arkadaşlarıma,

Manevi değerlerin daima maddiyat, akademi ve statüden önce geldiğini bana öğreten, büyük emek ve özveri ile beni yetiştiren, evlatları olmaktan gurur duyduğum, haklarını ödeyemeyeceğim canım anne ve babam, Müzeyyen ve Ahmet KULAKSIZ'a,

Berber çıktığımız yolda elimi asla bırakmayan; sevgi, merhamet, vizyon ve zekasıyla bana daima ilham kaynağı olan en büyük destekçim, hayat arkadaşım, çok sevgili eşim Daria “Моямаркофка” KULAKSIZ’a, teşekkürlerimi sunarım.

Dr. İhsan KULAKSIZ

İSTANBUL - 2023

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39438*

## İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Tüberkülozun etimolojisi ve tarihçesi.....	2
2.2. Sınıflandırma ve Mikobakterilerin Genel Özellikleri .....	5
2.2.1. Sınıflandırma.....	5
2.2.2. Hücre Duvarı.....	6
2.3. Epidemiyoloji.....	8
2.4. Patogenez .....	11
2.5. Laboratuvar Tanısı .....	12
2.5.1. Örnek alınması ve işlenmesi .....	12
2.5.2. Direkt Tanı .....	13
2.5.3. Kültür .....	14
2.5.4. İdentifikasyon .....	16
2.5.4.1. Fenotipik İdentifikasyon Yöntemleri.....	16
2.5.4.2. Kromatografik Yöntemler.....	16
2.5.4.3. Moleküler Tanı ve İdentifikasyon Yöntemleri .....	17
2.6. Antitüberküloz İlaçlar ve Antitüberküloz Duyarlılık Testleri (ADT).....	21
2.6.1. Antitüberküloz İlaçlar .....	21
2.6.2. Duyarlılık Yöntemleri.....	26
2.6.2.1. Konvansiyonel Yöntemler .....	26
2.6.2.2. Konvansiyonel Olmayan Yöntemler.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	34
3.1. Örneklerin seçimi ve deney hazırlığı .....	34
3.2. DNA İzolasyonu .....	35
3.3. Amplifikasyon.....	36
3.4. Hibridizasyon.....	38

3.5. Sonuçların değerlendirilmesi .....	40
4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA .....	55
6. KAYNAKLAR.....	66



**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: Direkt tanıda karbol fuksin boyası kullanılan yöntemlerde preparatların değerlendirilmesi.

Tablo 2-2: Antitüberküloz ilaçlar, etki mekanizmaları ve moleküler hedefe ait gen ürünleri.

Tablo 3-1: Uygulanan amplifikasyon profili.

Tablo 4-1: Rifampine dirençle ilişkili hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRplus)

Tablo 4-2: İzonyazide dirençle ilişkili hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRplus)

Tablo 4-3: Florokinolonlara direnç ile ilişkili hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRsl)

Tablo 4-4: Parenteral ilaçlara direnç saptanan suşlarda hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRsl)

Tablo 4-5: ÇİD olmadığı halde ikincil ilaçlara direnç saptanan suşlar ve dirençle ilişkili mutasyonlar. (MTBDRplus ve MTBDRsl)

Tablo 4-6. Suşların tümünde MGIT, MTBDRplus ve MTBDRsl yöntemleriyle elde edilen direnç sonuçları.

Tablo 4-7: Suşların RIF ve INH'a direnç profilleri (MTBDRplus).

Tablo 4-8: Suşların ikincil ilaçlara direnç profilleri (MTBDRsl).

Tablo 5-1: Birincil ilaçlara dirençle ilgili tespit edilen mutasyonlar.

Tablo 5-2: İkincil ilaçlara dirençle ilgili tespit edilen mutasyonlar.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre duvar yapısı.

Şekil 2-2: Dünya genelinde tahmini insidanslar (2021)/(100.000 kişi).

Şekil 2-3: Türkiye'de 1960-2004 yılları arasında yıllara göre yeni olgu hızları.

Şekil 2-4: Ülkemizin son 10 yıla ait TB insidans verileri(sol), ve HIV-negatif TB mortalitesi (sağ).

Şekil 2-5: GenoType MTBC tesine ait şerit üzerindeki bölgeler (solda) ve tespit edilebilen türler (sağda).

Şekil 2-6: GenoType MTBDRplus (sol) ve MTBDRsl (sağ) kitlerine ait stripler.

Şekil 3-1: GenoType MTBDRplus (üstte) ve GenoType MTBDRsl (altta) testlerinin değerlendirilmesi.

Şekil 3-2: Bir ÇİD suşa ait MTBDRplus test sonucu. (Çarpı işareti WT bandının yokluğunu, yıldız işareti MUT bandı oluşumunu göstermektedir.)

Şekil 3-3: Duyarlı bir suşa ait MTBDRsl test sonucu.

Şekil 4-1: Deneyin akış şeması.

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

AC	: Amplifikasyon kontrol
ADT	: Antitüberküloz duyarlılık testi
AIDS	: Kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu
AKVUAM	: Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi
BAL	: Bronkoalveolar lavaj sıvısı
BDK	: Bedakuilin
CAP	: Kapreomisin
CC	: Konjugat kontrol
ÇİD	: Çok ilaca dirençli
Di	: Dirençli
Du	: Duyarlı
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FLK	: Florokinolon
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
INH	: İzonyazid
ITS	: Internal transcribed spacer
İTF Laboratuvarı	: İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji
KAN	: Kanamisin

LAMP	: Loop-mediated isothermal amplification
LEV	: Levofloksasin
LJ	: Löwenstein-Jensen
LPA	: Line probe assay
MGIT	: Mycobacteria growth indicator tube
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MODS	: Mikroskopik gözleme dayalı ilaç duyarlılık yöntemi
MOX	: Moksifloksasin
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NALC-NaOH	: N-asetil-L-sistein + %4 sodyum hidroksit
OFX	: Ofloksasin
PRZ	: Pirazinamid
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	: Rifampin
SIRE	: Streptomisin, izoniyazid, rifampin, etambutol
STR	: Streptomisin
TB	: Tüberküloz
TDM	: Tüberküloz dışı mikobakteri
VIO	: Viomisin
YİD	: Yaygın ilaca dirençli

## ÖZET

Kulaksız İ (2023). Çok ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis suşlarının sekonder ilaçlara direnci ve dirençle ilişkili mutasyonların araştırılması. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Tüberküloz, hala dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Mycobacterium tuberculosis kompleksinin neden olduğu bu enfeksiyon, her yıl milyonlarca insanı etkilemekte, önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaktadır. Çok ilaca dirençli (ÇİD) ve yaygın ilaca dirençli (YİD) suşların artışı, hastalığın tedavisini daha da zorlaştırmaktadır.

Antitüberküloz ilaçların yaygın veya bilinçsiz kullanımı, Covid-19 salgını sürecindeki sağlık sistemi aksaklıkları, göç hareketleri gibi sebeplerle ÇİD suşlarda ikincil ilaçlara karşı direnç tüberkülozun kontrolü ve tedavisi için bir tehdit oluşturmaktadır. Direncin tespitinde moleküler yöntemlerin kullanımı, hızlı ve güvenilir sonuç sağlamaları nedeniyle önerilmektedir.

Bu amaçla çalışmada 51 ÇİD Mycobacterium tuberculosis kompleksi suşu öncelikle türlerine ayrılmış (GenoType MTBC, Hain Lifescience, Almanya) ve tüm suşlar Mycobacterium tuberculosis/canettii olarak bulunmuştur. Bu suşların 44 (%86,2)'ünün ÇİD olduğu belirlenmiş (GenoType MTBDRplus) ve ÇİD olduğu belirlenen 44 suş için sekonder ilaçlara direnç ve dirençle ilişkili mutasyon bölgeleri (GenoType MTBDRsl) saptanmıştır. ÇİD olduğu belirlenen suşlarda en sık saptanan mutasyon bölgeleri; rpoB S531L (41/44, %93,2) ve katG S315T (37/44, %84) olarak belirlenmiştir. İkincil ilaçlara dirençli bulunan 14 suşun (14/44, %31,8) sekizinde (%18,2) florokinolonlar için en sık tespit edilen mutasyon bölgeleri gyrA A90V (4/8, %50), kalan altısında (%13,6) parenteral ilaçlar için rrs A1401G (4/6, %66,6) olarak saptanmıştır. Dört suş ÇİD olmadığı halde, ikincil ilaçlara dirençli bulunmuştur.

Sonuç olarak, Mycobacterium tuberculosis suşlarında ikincil ilaçlara direnç ve dirence neden olan mutasyonların tanımlanması epidemiyolojik verilere önemli bir katkı sağlamıştır. Yapılan çalışmaların sayısı arttıkça daha farklı mutasyon bölgelerini belirlemek mümkündür. Bu çalışmayla direnç tespitinde moleküler yöntemlerin laboratuvar tanı süreçlerine entegrasyonunun önemli olduğu da ortaya koyulmuştur.

Anahtar kelimeler: Mycobacterium tuberculosis, ÇİD, antitüberküloz ilaç direnci, ikincil ilaç direnci, line probe assay, GenoType MTBC, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39438



## ABSTRACT

Kulaksız İ (2023). Investigation of resistance of multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis strains to secondary drugs and resistance-associated mutations. İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Medical Microbiology Department. Specialization Thesis in Medicine. İstanbul.

Tuberculosis still remains an important public health problem worldwide, affects millions of people every year and is a significant cause of morbidity and mortality. The increase in multidrug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains makes the treatment of the disease more difficult.

Resistance to second-line drugs in MDR strains presents a major obstacle for the control and treatment of tuberculosis. This resistance can occur due to various factors, such as the widespread or inappropriate use of antituberculosis drugs, disruptions in the healthcare system caused by the Covid-19 pandemic, and population movements and migration. Molecular methods are recommended for determining drug resistance as they provide rapid and reliable results.

In this study, species-level identification made for 51 MDR Mycobacterium tuberculosis complex strains (GenoType MTBC, Hain Lifescience, Germany) and all strains were found as Mycobacterium tuberculosis/canettii. Then 44 (86.2%) of these strains were determined to be MDR (GenoType MTBDRplus) and resistance to second-line drugs and mutation sites associated with resistance were detected (GenoType MTBDRsl) for those 44 strains determined to be MDR. The most common mutation sites determined in MDR strains were rpoB S531L (41/44, 93.2%) and katG S315T (37/44, 84%). The most frequently detected mutation sites for fluoroquinolones in eight (18.2%) of 14 strains (14/44, 31.8%) found resistant to second-line drugs were gyrA A90V (4/8, 50%), in the remaining six (13.6%) rrs for parenteral drugs was determined as A1401G (4/6, 66.6%). Despite not being MDR, four strains were determined as resistant to second-line drugs.

In conclusion, the detection of resistance to second-line drugs and associated mutation sites in Mycobacterium tuberculosis strains has made an important contribution to epidemiological data. As the number of studies increases, it is possible to identify more different mutation sites. With this study, it has also been demonstrated that the integration of molecular methods into laboratory diagnostic processes is important in the detection of resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, MDR, antituberculosis drug resistance, second-line drug resistance, line probe assay, GenoType MTBC, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl.

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. Project No: 39438



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB) yıllar boyunca önemli bir halk sağlığı sorunu olmuştur. Günümüzde halen önemini korumakta olup, 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 1,5 milyon insanın ölümüne yol açmıştır. Dünya sağlık örgütü (DSÖ), 2015 yılında “End TB” stratejisini açıklamış ve küresel ölçekte bu hastalıkla mücadeleyi gündemine alarak belirli hedefler çerçevesinde tüberkülozu kontrol altına almayı amaçlamıştır. İnsidansı ve TB kaynaklı ölüm oranını belli seviyelere düşürmek, TB hastalarının tedaviye ulaşmasını maddi açıdan kolaylaştırmak bu hedefler arasındadır. Aşı çalışmaları, aktif ve latent TB enfeksiyonu için yeni ilaç ve tedavi protokolleri, hasta başı uygulanabilen testlerin geliştirilmesi gibi mücadelede kilit rol oynayacak araçların önemi DSÖ tarafından vurgulanmaktadır. Fakat COVID-19 salgını, yıllar boyunca kaydedilen ilerlemeyi tersine çevirmiş ve küresel TB hedefleri çoğunlukla sekteye uğramıştır. Yeni tanı alan TB vaka sayısı 2019 yılında 7,1 milyon iken, 2020 yılında 5,8 milyona gerilemiştir (1). Tanı sayısındaki bu azalma, yaklaşık 10 milyon olduğu tahmin edilen yeni hasta sayısı düşünüldüğünde oldukça olumsuz bir durumdur. Her yıl TB gelişen hasta sayısındaki düşüş ise önceki yıllara göre neredeyse durma noktasına gelmiştir. Bir diğer olumsuz gelişme ise dirençli TB tedavisi alan hasta sayısındaki %15, TB önleyici tedavi alan hasta sayısındaki %21 azalmadır.

Dünya genelindeki tüberkülozlu hanelerin neredeyse yarısı, aile gelirlerinin %20'sinden daha yüksek sağlık maliyetleriyle karşı karşıya kalmaktadır. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), yetersiz beslenme, diyabet, tütün kullanımı gibi sebeplerle bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerin hastalanma riski daha yüksektir. Küresel olarak 2021 yılında yetersiz beslenmeye bağlı 2.2 milyon yeni tüberküloz vakası, alkol kullanımına bağlı olarak 740.000 yeni tüberküloz vakası ve sigara içmeye bağlı olarak 690.000 yeni tüberküloz vakası meydana gelmiştir (2).

Ülkemizde toplam tüberkülozlu hasta sayısı 2005 yılında 20.535 iken 2019 yılında 11.401'e, 2020 yılında ise 9 binin altına düşmüştür. İnsidans hızı 2005 – 2020 yılları arasında yüz binde 29,4'ten yüz binde 10,6'ya düşmüş, toplam olgu hızı ise %56,5 azalmıştır (3). Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı kapsamında tüberküloz ile mücadele ciddi şekilde sürdürülmektedir.

Tüberküloz kontrolündeki en önemli indeks, hastaların tespit edilip etkin bir şekilde tedavi edilmesidir. Antitüberküloz ilaçlara karşı gelişen ve son yıllarda artış gösteren direnç,

bu mücadeledeki önemli zorluklardan biridir (4). Etkin bir tedavi için hastadan izole edilen bakterinin doğru tanımlanması ve uygulanacak tedavinin antitüberküloz duyarlılık testi sonucuna göre düzenlenmesi gerekir. Direnç ve dirence neden olan mutasyonların belirlenmesi yeni teknolojilerin geliştirilmesine katkı sağlarken, öte yandan epidemiyolojik açıdan ulusal ve uluslararası düzeyde değer taşımaktadır.

Bu çalışmada ülkemizde tüberküloz hastalığına neden olan çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD) suşlarında ikincil ilaçlara direnci ve bu dirence neden olan mutasyonları tespit etmek; birincil ilaç direncine sebep olan mutasyonlarla ikincil ilaç direncine sebep olan mutasyonları ve aralarında olası bağlantı ve korelasyon olup olmadığını değerlendirmek, olası yaygın ilaç dirençli (YİD) suşların varlığını araştırmak amaçlanmıştır.

Bu çalışma aynı zamanda ikincil ilaçlara direnç profilinin zaman içerisindeki değişiminin değerlendirilmesine ve bu değişimin sebepleriyle ilgili yeni araştırmalar yapılmasına öncülük etmiş olacak ve ÇİD suşların kompleks içi tür düzeyinde tanımlanması ile tür-direnç profili arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına da ışık tutacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tüberkülozun etimolojisi ve tarihçesi

"Tüberküllerle karakterize hastalık" anlamında bir isim olan "tüberküloz" ilk olarak 1860'larda ortaya çıkmıştır. Latince "tuberculum" yani "küçük şişlik, sivilce" kelimesinin kısaltılmış hali olan "tuber" ile, Yunanca kökenli "-osis" ekinin birleştirilmesiyle oluşturulan bu isim, akciğerlerde oluşan tüberküllerle ilişkilendirilerek kullanılmıştır. Başlangıçta tüberküllerle karakterize herhangi bir hastalığı ifade etmek için kullanılmış ancak 1882 yılında Alman bakteriyolog Robert Koch (1843-1910) tarafından *Mycobacterium tuberculosis*'in (*M. tuberculosis*) keşfiyle, yalnızca bu bakteri tarafından oluşturulan hastalığı tanımlamak için kullanılmaya başlanmıştır (5).

Tüberkülozun tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. *Mycobacterium* cinsinin 150 milyon yıl kadar eski bir kökene sahip olduğu tahmin edilmektedir. *M. ulcerans* gibi bazı türlerin antik zamanlarda enfeksiyon etkeni olduğuna işaret eden veriler vardır (6). Modern *M. tuberculosis* suşlarının ortak atası ise ilk kez 15.000-20.000 yıl önce ortaya çıkmış olabilir (7). Tüberkülozla

ilişkili ilk tarihi belirtiler, antik dönemlerde Mısır mumyalarında tespit edilen iskelet deformiteleri, Pott lezyonları ve yazılı kaynaklara dayandırılmaktadır (8). Ancak, Mısır papirüslerinde tüberküloz lezyonlarına dair bir kanıt bildirilmemiştir. Tüberkülozu tanımlayan ilk yazılı belgeler, sırasıyla MÖ 3300 ve 2300 yıllarında Hindistan ve Çin'de bulunmuştur (9).

Antik Yunanistan'da tüberküloz iyi bilinmekte ve “phtisis” adı verilmekteydi. Hipokrat, phtisis’i özellikle genç yetişkinler için ölümcül bir hastalık olarak tanımlamış, semptomlarını ve karakteristik akciğer lezyonlarını doğru bir şekilde tarif etmiştir. Isocrates, tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğunu belirten ilk yazar olmuşken, Aristoteles domuzlarda ve öküzlerde ekstrapulmoner tüberküloz lezyonlarını (scrofula) “king’s evil” olarak adlandırmıştır (10).

Roma İmparatorluğu döneminde Celso, Kapadokyalı Aretaeus ve Caelius Aurelianus gibi isimler, eserlerinde tüberkülozdan bahsetmişlerdir. Ancak bu dönemde hastalığın ekstrapulmoner belirtileri olan skrofula, Pott hastalığı ve tüberküloz lupusu gibi farklı klinik formlarının aynı etiyojolojiye sahip olduğu fark edilmemiştir. Roma İmparatoru Marcus Aurelius'un kişisel hekimi olan Galen ise, tüberkülozun belirtilerini tanımlamış ve hastalığın tedavisi için taze hava, süt ve deniz yolculuklarını önermiştir (11).

İbn-i Sina, El-Kanun fi't-Tıbb kitabında yalnızca tüberküloz için iki bölüm ayırmış ve hastalığın etiopatogenezi, ayırıcı tanısı ve farmakoterapisini ayrıntılı şekilde açıklamıştır. Hastalığın pre-enflamatuvar, ülseratif ve son olarak kavernoöz olmak üzere üç aşamasını tanımlamış, bulaşıcı karakteristiğinden bahsetmiştir (12).

Batı Avrupa'da 18. yüzyılda, gençler arasında daha yüksek ölüm oranına sahip olan TB, 100.000 kişi başına 900 ölümlerle bir salgın haline gelmiştir. Bu nedenle, TB aynı zamanda "gençlik hırsızı" olarak adlandırılmıştır. Sanayi devrimi sırasında, son derece kötü çalışma koşullarının, yetersiz havalandırılmış ve kalabalık konutların, hijyen eksikliğinin, beslenme yetersizliğinin ve diğer risk faktörlerinin hastalıkla sıkı bir şekilde ilişkili olduğu gözlenmiş; o dönemlerde TB'li insanların aşırı anemik solgunluğu, 18. yüzyılda "beyaz veba" olarak tanımlanmıştır (13). İngiliz cerrah Percivall Pott 1779'da TB'nin sebep olduğu vertebra çökme kırığı ve spinal kord paralizisini “Pott hastalığı” olarak tanımlamıştır (14). İskoç patolog Matthew Baille, 1793'te kazeöz nekroza sebep olan "peynir benzeri" apseleri "tüberküller" olarak adlandırmıştır (15).

Fransız Theophile Laennec, 1819'da konsolidasyon, plörezi ve pulmoner kavitasyonu TB'nin patognomonik belirtileri olarak tanımlamıştır (14). İlk aşamanın karakteristik belirtileri

olan tüberküllerin, ilk olarak akciğerlerde "miliyer" ("darı tanelerine benzeyen") formda ortaya çıktıklarını, daha büyük tüberküllere ilerlemelerini, "kazeöz" ("peynir benzeri") madde içeren tüberküllerin parçalanarak içindeki püyün boşalmasını ve sonunda kavite ve ampiyem oluşturmalarını ayrıntılı bir şekilde tarif etmiştir.

Sanatoryum tedavisi, tüberküloza karşı ilk başarılı tedavi yöntemi olarak kayıtlara geçmiştir. Bu yöntemi ilk kez 1854 yılında, kendi de TB hastalığından muzdarip olan botanik öğrencisi Hermann Brehmer, Himalaya Dağları'na yaptığı bir seyahat sonrasında iyileşme sürecini rapor ettiği "Tüberküloz Tedavi Edilebilir Bir Hastalıktır" adlı doktora tezinde açıklamıştır. Ardından bir kasabadaki çam ormanında hastaların temiz hava ve iyi beslenme ile tedavi olduğu ilk sanatoryumu kurarak sonraki yüzyıllarda kurulacak sanatoryumlara öncülük etmiştir (16).

Ünlü bilim insanı Robert Koch, Paul Ehrlich'in önerdiği metilen mavisi yöntemini kullanarak, hayvan serumunda bakteriyi ilk kez mikroskopik olarak gözlemlemiş, izole etmiş ve kültürünü yapmıştır. Sonunda laboratuvar hayvanlarına bakteriyi enjekte ederek hastalığı yeniden oluşturmuş ve bu keşifleriyle tüberkülozun bulaşıcı etiyolojisinin açıklanmasına katkıda bulunarak 1905 Nobel Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür (17).

Albert Calmette ve Camille Guérin virülan bir *Mycobacterium* suşunu (*M. bovis*) 20 yıl boyunca 230 defa pasajlayarak 1920'li yıllarda Bacille Calmette-Guerin (BCG) aşısını keşfetmişlerdir (14).

Sultan II. Mahmud ve Sultan I. Abdülmecid'in ölümüne sebep olan TB ile mücadele Osmanlı'nın son döneminde büyük bir sorun haline gelmiştir (18). "Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti" adı altında kurulan topluluk, Türkiye'de veremle mücadelenin öncüsü olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde tüberküloz kontrolünün ilk kurumları 1918'de kurulan "İstanbul Verem Savaşı Derneği" ve "Ankara Verem Savaşı Derneği" gibi yapılar da toplumun bütün fertleri ile hastalıkla mücadelede rol alınması gerekliliğinin bir sonucudur. Verem savaşı dernekleri, verem savaşı dispanserleri, tüberküloz hastaneleri/ pavyonları on yıllar içinde artmıştır. Bunların sayısı artarken, 1930 yılındaki Umumi Hıfzıssıhha Kanunu, tüberküloz hastalarının izolasyonu ve bildirimini mevzuatını oluşturmuştur. Aynı zamanda, 1947'de verem eğitim ve propaganda haftasının başlaması, 1948'de Ulusal Verem Savaşı Derneği kurulması, 1950'li yıllarda başlayan BCG aşı kampanyaları, 1960'lı yıllarda başlayan kadastro usulü röntgen taramaları 1970'li yılların ortalarına kadar sürdürülmüştür. Hastaların kayda

alınması da 1960'lı yıllarda başlamış, aylık veriler toplanarak yıllık hale dönüştürülmüştür. Hasta verilerinin 2005 yılından itibaren bireysel olarak toplanmaya başlanması ile takip ve fiyasyon sistemi adına önemli bir gelişme sağlanmıştır (19).

## 2.2. Sınıflandırma ve Mikobakterilerin Genel Özellikleri

### 2.2.1. Sınıflandırma

*Mycobacterium* cinsi, *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesidir ve DNA'larında yüksek guanin + sitozin (G+C) içeren ve hücre duvarında mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Segniliparus* cinsleriyle ilişkilidir (20,21).

*Mycobacterium* cinsinin farklı patojenik özellikleri nedeniyle tür (veya kompleks) düzeyinde doğru tanımlanması önemlidir. Bu nedenle mikobakterilerin katı besiyerinde üreme hızları ve sarı karotenoid pigmenti oluşturma özelliklerine dayanan Runyon sınıflandırması kullanılmıştır. Işığa maruz kaldıklarında sarı pigment oluşturan (Runyon grup I, Fotokromojenler), karanlık ortamda sarı pigment oluşturan (Runyon grup II, Skotokromojenler), pigment oluşturmeyen (Runyon grup III, Non-fotokromojenler), ve 7 günden daha kısa sürede, hızlı üreyenler (Runyon grup IV) olmak üzere dört gruba ayrılarak yapılan bu sınıflandırma günümüzde önemini yitirmiştir.

#### Sınıflandırma (22):

Kingdom (Alem): Prokaryot (Bacteria)

Divisio (Bölüm): *Firmicutes*

Classis (Sınıf): *Actinobacteria*

Ordo (Takım): *Actinomycetales*

Familia (Aile): *Mycobacteriaceae*

Genus (Cins): *Mycobacterium*

Species (Tür): *Mycobacterium tuberculosis*

Genetik olarak %99,97 - %99,99 oranında benzeyen türler "kompleks" içinde toplanmıştır ve *M. tuberculosis* kompleksi olarak adlandırılmakta ve aşağıdaki türleri kapsamaktadır (23–26):

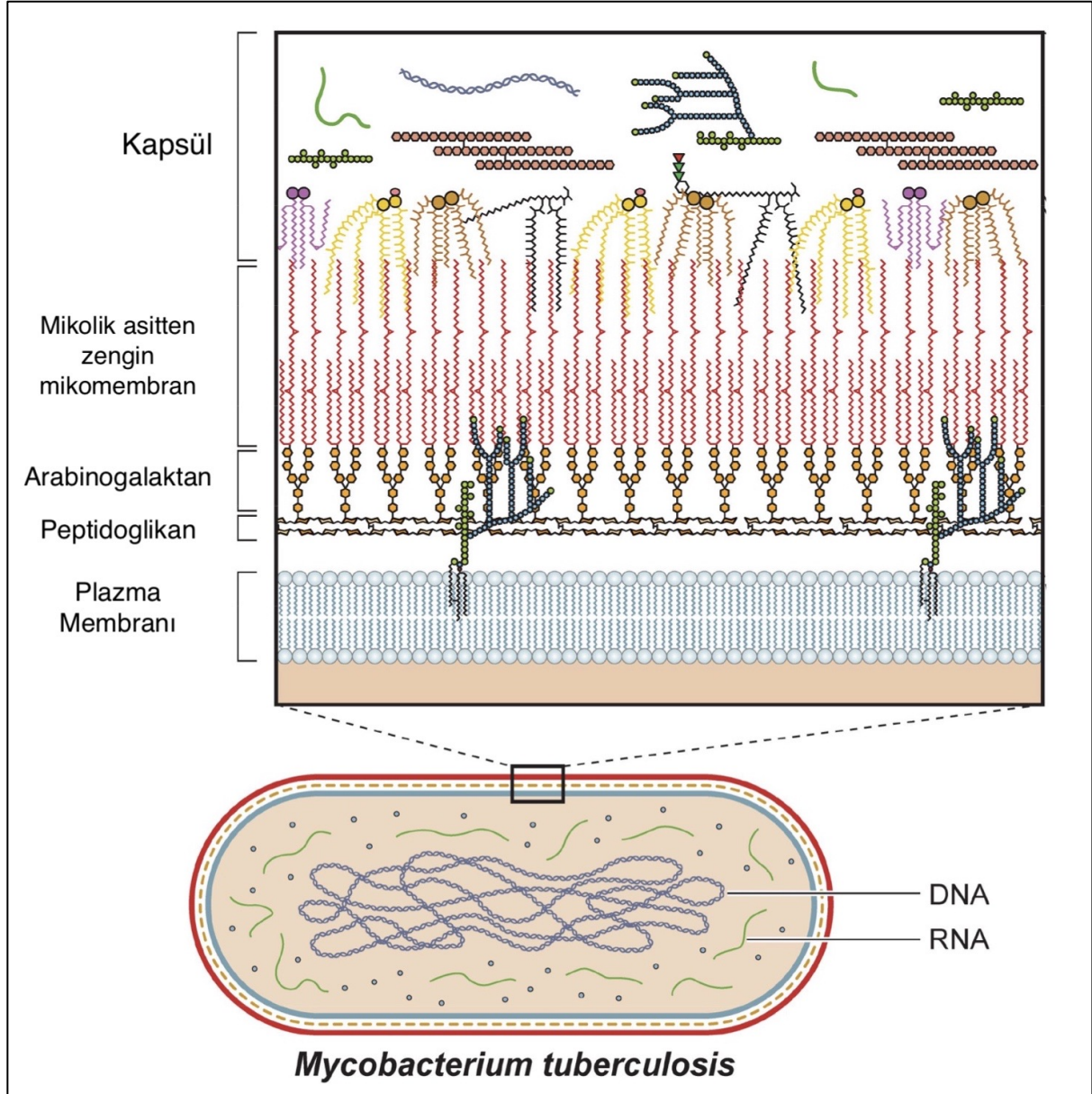
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium bovis BCG*
- *Mycobacterium africanum*
- *Mycobacterium caprae*
- *Mycobacterium microti*
- *Mycobacterium canettii*
- *Mycobacterium pinnipedii*
- *Mycobacterium mungi*
- *Mycobacterium orygis*

Çeşitli memelilerde TB hastalığına neden olabilen *M. orygis* ve *M.mungi*, yapılan son tüm genom dizileme çalışmaları ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleksine dahil edilmiştir (25,26).

### 2.2.2. Hücre Duvarı

Mikobakteriler de diğer bakteriler gibi kimi zaman konak fizyolojisini ciddi şekilde etkileyebilen yağlar ve glikolipitleri salgırlar. Mikobakteriyel lipid ve glikanlar hücre duvarının dayanıklılığını artırır ve konak savunmasına karşı aşılması güç bir bariyer sağlar. Bu lipidler arasında en önemlilerinden biri olan mikolik asitler, mikobakterinin dış zarındaki 60-90 karbonluk uzun zincirli yağ asitleridir. Arabinogalaktan tabakasına bağlı olarak veya kapsül içerisinde serbest halde bulunabilirler. Bu bölge, içerdiği yüksek lipid oranından dolayı oldukça özeldir ve “mikomembran” olarak da bilinir (27) (Şekil 2-1). Hücre duvarı mikobakterilerin yavaş üreme, deterjanlara, yaygın antibiyotiklere ve konak immünitesine direnç, antijenite gibi birtakım karakteristik özelliklerinden sorumludur. Ayrıca yapısındaki kompleks lipid tabaka anilin bazlı klasik boyaların geçişine imkan tanımadığı için bakterinin Gram yöntemi ile boyanmasını zorlaştırır (28). Asit-alkol ile dahi kolaylıkla dekolorize olmazlar ve bu nedenle “aside-alkole dirençli” bakteriler olarak tanımlanırlar. Hızlı üreyen mikobakteriler bu özelliğini tamamen veya kısmen kaybedebilirler.

Mikobakteriler çomak şeklinde, aerob ve spor oluşturmeyen bakterilerdir. Çoğu mikobakteri türü (*M. leprae* hariç) yumurta sarısı veya oleik asit tarafından sağlanan yağ asitlerince zengin ortamda üreyebilir. Optimum üreme sıcaklığı türden türe 30°C-45°C arasında değişebilir (29).



Şekil 2-1: *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre duvar yapısı (30).

*Mycobacterium* türleri, güneş ışığı görmediği sürece dış ortamda haftalarca canlı kalabilir. Donma veya kuruma ile kolayca canlılıklarını yitirmezler ancak sıcaklık ve ultraviyole (güneş ışığı) ile canlılığını kaybeder. Asitlere, bazlara ve bazı kimyasal dezenfektanlara karşı diğer çoğu sporsuz bakteriye göre daha dirençlidirler. Dezenfeksiyon için orta düzey dezenfektanlar önerilmektedir. Fenoller, klor ve alkol bazlı dezenfektanlar, tüberküloz laboratuvarlarında kullanım için öncelikli olarak tavsiye edilen dezenfektanlardır. Ayrıca, etilen oksit ve formaldehit buharı ile %2 alkali glutaraldehit, %2 perasetik asit ve stabilize hidrojen peroksit gibi dezenfektanlar da *M. tuberculosis*'e bakterisid etki gösterir (31).

Günümüzde tanımlanmış 200'den fazla mikobakteri türü vardır ve birçoğu saprofitlerdir. *Mycobacterium leprae* cilt lezyonları ile karakterize kronik granülomatöz bir hastalık tablosuna sebep olur. *Mycobacterium ulcerans*, kısa zaman içinde hızlı şekilde büyüyen ülserle lezyonlarla karakterize nekrotizan cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olur. *Mycobacterium avium-intracellulare* (*M. avium* kompleksi veya MAC) ve diğer tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) genellikle akut immün yetmezlik sendromu (AIDS) hastalarında veya diğer bağışıklığı baskılanmış kişilerde hastalığa sebep olur. Diğer TDM'lerden birçoğu insanda nadiren hastalık oluşturur.

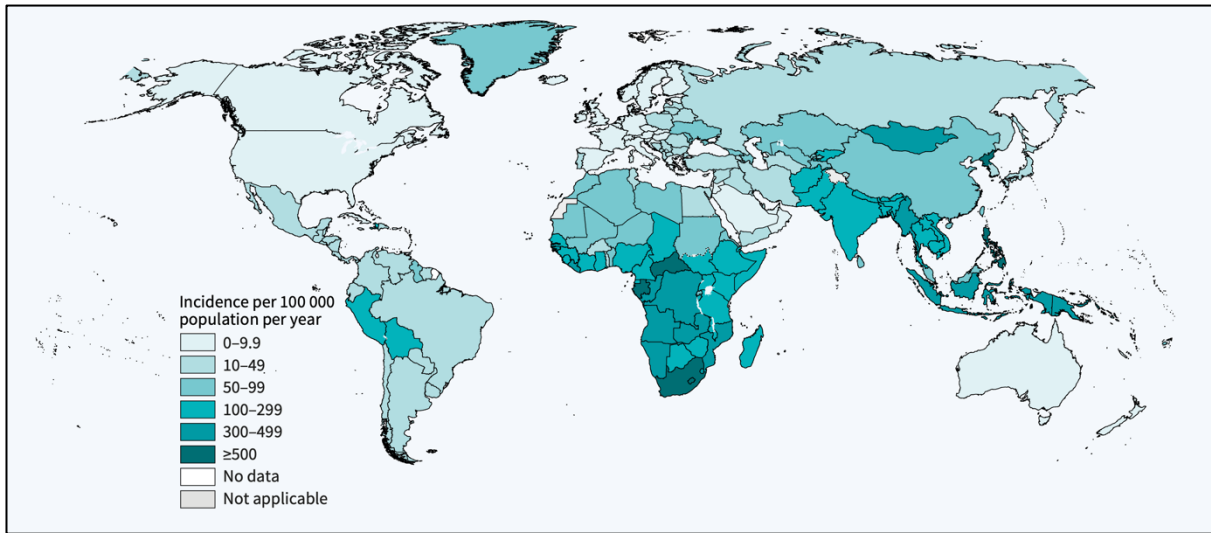
### 2.3. Epidemiyoloji

Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birinin *M. tuberculosis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir, ancak çoğu kişi yeterli immün yanıt oluşturarak TB hastalığına yakalanmaz. Her yıl TB gelişen vakaların yaklaşık %90'ı yetişkindir ve hastalık oranı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Tedavi edilmediği takdirde, TB hastalığından ölüm oranı yaklaşık %50 gibi yüksek bir seviyededir (32).

Günümüzde kullanılan antitüberküloz tedavi protokolü (4-6 ay süren anti TB ilaç tedavisi) ile yaklaşık %85 hasta iyileştirilebilir. Bulaş, hastalanan insan sayısı ve bunun sonucunda TB kaynaklı ölümler; yoksulluk, yetersiz beslenme, HIV enfeksiyonu, sigara ve diyabet gibi TB etkenlerine yönelik çok sektörlü bir müdahale ile azaltılabilir. Bazı ülkeler, TB hastalığının yılda 100.000 kişi başına 10'dan az vaka ve 1'den az ölüm ile azaldığı düşük yük taşıyan ülkeler olarak tanımlanmaktadır. Yeni bilimsel gelişme ve buluşlar ile (örneğin yeni bir aşı) dünya genelindeki TB insidansı bu düşük yük taşıyan ülkelerdeki seviyelere hızlı bir şekilde düşürülebilir (32) (Şekil 2-2).

Dünya Sağlık Örgütü, 1997 yılından bu yana her yıl küresel bir TB raporu yayınlamaktadır. Raporun amacı, küresel taahhütler, stratejiler ve hedefler bağlamında küresel, bölgesel ve ulusal düzeyde TB salgını ve mücadelede ilerlemenin kapsamlı ve güncel bir değerlendirmesini sağlamaktır. Rapor temel olarak Ulusal Sağlık Bakanlıkları'ndan DSÖ aracılığıyla toplanan verilere dayanmaktadır. Dünya nüfusunun ve TB vakalarının %99'dan fazlasına denk gelen 202 ülke ve bölge 2022 yılında veri rapor etmiştir. Covid-19 salgını sırasında DSÖ, dünya çapındaki TB vaka bildirim verilerini %90'lık oranla kapsayan 100'den fazla ülkeden sürekli olarak aylık veya üç aylık dönemsel veriler toplamıştır (32).

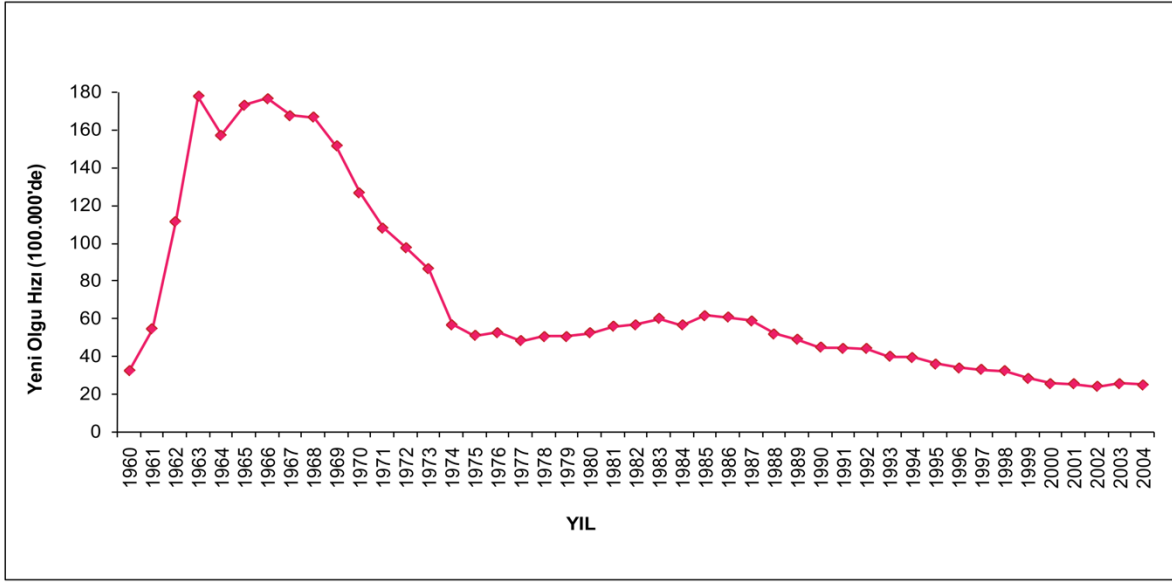
*Mycobacterium tuberculosis* suşları çok ilaca dirençli (ÇİD) olarak tanımlandığında, tedavi daha karmaşık, daha pahalı ve daha güçtür. Tedavide başarı oranı daha düşüktür ve nüks durumunda kötü klinik sonuçlar ortaya çıkar (33). Bu nedenlerle TB kontrolünün sağlanmasında ÇİD-TB önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Dünya genelinde 2020 yılında ÇİD-TB veya RIF dirençli TB geliştiği tahmin edilen hasta sayısı sabit ve 437.000 civarında iken, 2021 yılında bu sayı artarak 450.000'e çıkmıştır (32). Çok ilaca dirençli tüberkülozun laboratuvar doğrulamasının yapılmadığı durumlarda uygulanacak yetersiz tedavi girişimi, dirençli suşların toplumda yayılmasına ve direncin artmasına sebep olmaktadır.



**Şekil 2-2: Dünya genelinde tahmini insidanslar (2021)/(100.000 kişi) (32).**

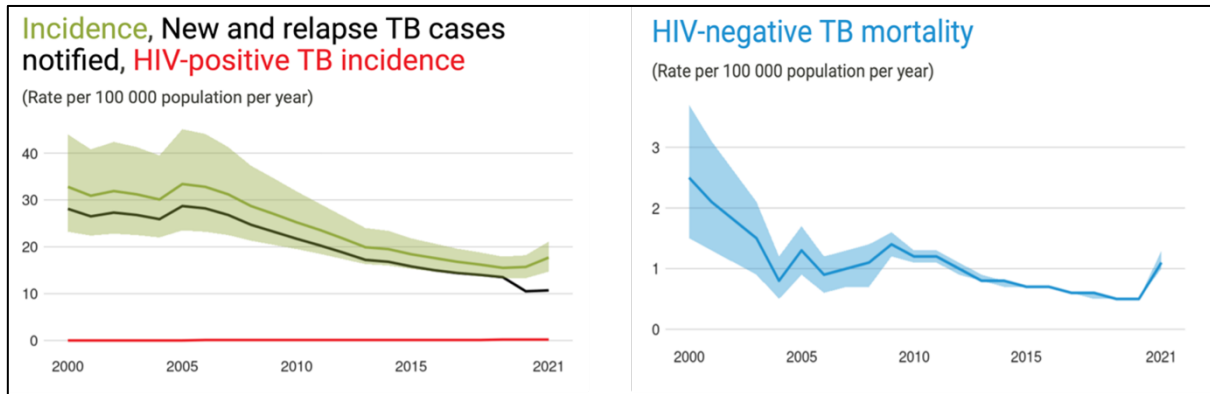
Küresel olarak 2021 yılında bakteriyolojik tanı almış 2,4 milyon pulmoner TB hastasının %71'ine RIF duyarlılık testi yapılabilmektedir. Direnç testi yapılma oranları 2020'deki ile aynı, 2019'dakine (%61) göre artmıştır. Test edilenler arasında 141,953 ÇİD/RIF dirençli TB ve 25,038 öncül yaygın ilaç dirençli TB (Pre-YİD-TB, en az bir florokinolona veya en az bir parenteral ilaca dirençli ÇİD-TB) veya yaygın ilaç dirençli TB (YİD-TB, en az bir florokinolon + parenteral ilaca dirençli veya florokinolon + bedakuilin veya florokinolon + linezolid dirençli ÇİD-TB) (34) olmak üzere toplamda 166,991 dirençli vaka tespit edilmiştir. Bu sayı, 2020'deki toplam 156,982'ye kıyasla %6.4 artmıştır (32). Dünya genelindeki YİD-TB vakalarının artış eğilimi ve tedaviye dirençli TB'da levofloksasin veya moksifloksasinin yaygın kullanımı, florokinolonlar için antitüberküloz ilaçlara duyarlılık testi (ADT) yapılmasını zorunlu kılmıştır (35). Ancak 2021 yılında dünya genelinde yapılan florokinolonlara duyarlılık testi oranı %50'de kalmıştır. Bu oran YİD-TB'nin artan eğilimine

bakıldığında oldukça düşüktür ve ilerleyen yıllarda tedavi seçim stratejisi için bir risk oluşturmaktadır (32).



Şekil 2-3: Türkiye'de 1960-2004 yılları arasında yıllara göre yeni olgu hızları (3).

Ülkemizde 1950'li yıllarda BCG aşı kampanyaları başlatılmış, ardından 1970'li yılların ortalarına kadar kadastro usulü röntgen taramaları ve hastaların kayda alınması, verilerin periyodik olarak düzenlenmesi ve analiz edilmesi ile yeni olgu hızında ciddi bir düşüş sağlanmıştır (Şekil 2-3)(19). Son yıllarda Suriye'deki iç savaş dolayısıyla Türkiye'ye göç eden üç milyondan fazla mülteci ve olumsuz yaşam koşulları (36) ve Covid-19 pandemisinin de ciddi olumsuz etkisi sebebiyle tüberküloz yeniden gündeme gelmiştir (37). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2021 yılı raporunda ülkemizde tahmini insidans hızı yüz binde 18 ve tahmini mortalite hızı yüz binde 0,51 olarak bildirilmiştir (38). Bu sonuçlar son birkaç yıla ait verilerin üzerindedir (Şekil 2-4). En son 2018 yılında yayımlanan Verem Savaşı Raporu'na göre 176 ÇİD-TB olgusunun 8'i (%4,5) YİD-TB olgusu olarak tespit edilmiştir (3).



Şekil 2-4: Ülkemizin son 10 yıla ait TB insidans verileri(sol), ve HIV-negatif TB mortalitesi (sağ) (38).

## 2.4. Patogenez

Pulmoner TB, hem TB'nin en yaygın şekli, hem de bulaşma mekanizmasıdır. *M. tuberculosis* yalnızca canlı hücreler içinde hayatta kalabildiği ve çoğalmaya devam edebildiği için, solunum yoluna ve akciğere ulaştığında yaşam döngüsünün başladığı varsayılmaktadır. Hava yolu ile bakteri arasındaki bu ilk karşılaşmaya primer enfeksiyon da denir.

*Mycobacterium tuberculosis*, içinde 1-3 bakteri bulunan havada asılı damlacık çekirdekleri ile inhale edildikten sonra üst solunum yolunda hücrelerle karşılaşır ve çoğu durumda distal akciğere geçerek alveolar boşluğa ulaşır. *Mycobacterium tuberculosis* canlı kalmak ve enfeksiyon oluşturmak için daha sonra mukozal veya alveolar epitelin ötesine geçer, üst ve alt hava yollarından geçerken solunum yolunun başlangıç yeri olan nazal mukoza dokusunda veya bronşiyal mukoza dokusundaki epitel hücrelerini enfekte edebilir (39). Proksimal ve nispeten büyük distal hava yollarını geçtikten sonra, konak ile bir sonraki etkileşim alanı alveol içinde gerçekleşir.

Alveollere ulaşan bakteri, ilk olarak alveolar makrofajlarla karşılaşır. Alveolar makrofajlara ek olarak, interstisyel boşlukta bulunan dendritik hücreler de etkileşime girebilir. Böylece, birincil enfeksiyon sırasında alveollere ulaşan *M. tuberculosis*, interstisyel dendritik hücrelerin yanı sıra, alveolar boşlukta bulunan alveolar ve tip II alveolar epitel hücreleri de enfekte edebilir (39–41). Bu hücreler, enfekte olduktan sonra yüksek ölüm oranına sahiptir ve enfeksiyonu kontrol etmede başarısız olurlar. Alveolar epitel hücrelerinin sayısı alveolar makrofajlardan çok daha fazla olduğundan, *M. tuberculosis* mukozayı bu yolla geçebilir (42).

*Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olmuş alveolar makrofajlar ve dendritik hücreler enfeksiyonun erken döneminde görev alır ve adaptif bir immün yanıt başlatırlar. Enfekte alveolar makrofajlar alveolar keseden interstisyel boşluğa göç eder ve bazen buraya yerleşebilir. Bazı durumlarda ise enfekte makrofajlar, enfekte dendritik hücrelerle birlikte enfeksiyonun ilerlemesini sınırlandıran T ve B hücrelerini hazırlamak ve aktive etmek için akciğerden drene olan lenf nodlarına göç eder (43). İnterstisyuma yerleşen interstisyel makrofajlar, ilk fagositozdan kaçan veya ölmekte olan hücrelerden açığa çıkan bakterileri fagosite eder. Enfekte alveolar ve interstisyel makrofajlar, enfekte olmayan makrofajlar, monositler, nötrofiller ve enflamasyon sebebiyle bölgeye toplanan T hücreleri ile karakteristik granülomu oluşturur. Bununla birlikte, çoğu birincil enfeksiyon, ya bakterilerin tamamen yok

edilmesi yoluyla geride sadece immün hafıza bırakarak, ya da stabil bir granülom oluşumu yoluyla kontrol edilir (44,45).

Konak açısından bakıldığında iyi biçimlenmiş ve stabil bir granülom enfeksiyonun ilerlemesini sınırlar ve doku hasarını küçük, iyi sınırlanmış bir bölgeyle sınırlandırır. *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte bireylerin çoğu bu aşamadır ve asemptomatir. Bakteri açısından bakıldığında, granülom bakterilerin dinlenme durumunu korumasına olanak tanır ve bu sayede bağışıklık sistemi tarafından temizlenmesini önler. Böylece *M. tuberculosis* dormant kalarak konak immünesinden izole olur.

Bazı enfekte kişilerde ya primer enfeksiyondan hemen sonra, ya da latent enfeksiyonun "reaktivasyon"undan sonra, aktif enfeksiyona ilerleme görülür ve bu durum genellikle immünesupresyon varsa gerçekleşir. Bu aşamada granülomun yapısı değişir ve merkezi kısım kimi zaman nekrotize olarak sıvılaşır, beyaz peynir benzeri bir kıvama ulaşır ve *M. tuberculosis*'in üremesini kolaylaştırabilen "kazeum" oluşur (kazeifikasyon nekrozu). *Mycobacterium tuberculosis* daha sonra vücudun diğer bölgelerine lenfatik ve hematojen yolla yayılabilir (46,47). Sonuç olarak, aynı zamanda doku tahribatıyla da ilişkili olan granülom sıvılaşması (48), tüberkülozun yeni konaklara hava yoluyla yayılmasını kolaylaştırabilir (49,50). Daha ileri aşamada *M. tuberculosis*, solunum yolları noziseptif nöronlarını uyararak hastalığın en karakteristik semptomlarından biri olan kanlı öksürüğün oluşmasını sağlar. Bu devamlı öksürük ile *M. tuberculosis* havada yayılarak yaşam döngüsünü yeni bir konakta tekrar başlatır (49).

## 2.5. Laboratuvar Tanısı

Diğer bakteri cinslerinden farklı bir karakteristiğe sahip olması, *M. tuberculosis*'nin laboratuvar tanısını da özel kılmaktadır. Tanıda altın standart kültürde bakterinin izole edilmesidir (19,51,52).

### 2.5.1. Örnek alınması ve işlenmesi

Tüberküloz tanısı için laboratuvara gönderilen örnekler genellikle balgam, trakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi solunum yolları ile ilişkili olsa da, açlık mide suyu (AMS), idrar, plevral sıvı, beyin omurilik sıvısı, eklem sıvısı, biyopsi materyali, gibi örnekler

de tanıda kullanılır. Kan ve dışkı örnekleri genellikle yalnızca immün yetmezlikli hastalarda incelenir. Genel mikrobiyolojik örnek alma ve taşıma kurallarına ek olarak kontaminasyon potansiyeli taşıdığı için örneklerin musluk suyu ile temasından kaçınılmalıdır (53). Balgam ve steril olmayan bölgelerden alınan örneklere N-asetil-L-sistein + %4 NaOH (NALC-NaOH) yöntemi uygulanarak örneğin mukoid yapısı sıvılaştırılır ve diğer birçok bakteri ve mantar elimine edilir. Son aşamada fosfat tamponu ile ortam nötralize edilir ve örnek santrifüjde çevrilerek konsantrasyon işlemi uygulanır. Bu şekilde ön işlem uygulanan örneklerdeki sediment, direkt tanı ve kültür için kullanılır. Beyin omurilik sıvısı gibi steril bölgelerden alınan örnekler ise doğrudan santrifüjde çevrilip direkt tanı ve kültür için kullanılabilir (54).

### 2.5.2. Direkt Tanı

Direkt tanı, tüberküloz tanısında en hızlı ve ucuz yöntemdir. Şüpheli hastalarda *M. tuberculosis* tespit ihtimalini artırmak için balgam, idrar ve AMS örneklerinin 3 gün üst üste incelenmesi önerilir (55). Direkt tanıda genellikle karbol fuksin temelli Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve Kinyoun olmak üzere iki yöntem kullanılır ve EZN boyama yöntemi esnasında lam altından uygulanan sıcaklık ile boyanın hücre duvarından geçişi artırılır (sıcak boyama). Mikobakteriler fuksin gibi fenol bazlı arilamid boyalarla kararlı kompleksler oluştururlar. Hücre duvarındaki mikolik asit, boyayı çok kuvvetli bağladığı için asit alkol veya çok kuvvetli asitlerle muameleye rağmen boyayı bırakmaz. Bu nedenle *Mycobacterium* cinsi bakteriler, aside-alkole dirençli bakteriler olarak tanımlanır. Her iki boyama yönteminde de bakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde görülür (56,57).

Alternatif olarak mikobakteriler auramin ve rodamin gibi floresan boyalarla da boyanabilirler. Bu yöntem hem sıcaklık uygulaması gerektirmediği, hem de çok daha hızlı inceleme yapılabildiği için daha avantajlıdır ancak EZN'ye göre pahalıdır; soğuk boyama yöntemi olan Kinyoun yöntemi ise EZN preparatlar ve florokrom yöntemlerinden daha düşük bir başarıya sahiptir (58). Tercih edilen yöntemle boyanan preparatlar Tablo 2-1'e göre değerlendirilir.

**Tablo 2-1: Direkt tamda karbol fuksin boyası kullanılan yöntemlerde preparatların değerlendirilmesi.**

<b>Rapor</b>	<b>Bakteri sayısı/taranan alan (x1000)</b>
“Aside dirençli bakteri görülmedi.”	<b>0/300 alan</b>
“Şüpheli sonuç, tekrar örnek gönderilmesi uygundur.”	<b>1-2/300 alan</b>
“Aside dirençli bakteri görüldü” (1+)	<b>1-9/100 alan</b>
“Aside dirençli bakteri görüldü” (2+)	<b>1-9/10 alan</b>
“Aside dirençli bakteri görüldü” (3+)	<b>1-9/1 alan</b>
“Aside dirençli bakteri görüldü” (4+)	<b>&gt;9/1 alan</b>

### 2.5.3. Kültür

Kültür, hala tüberküloz tanısında altın standarttır. Güncel rehberler mikobakterilerin kültürü için bir sıvı ve bir katı olmak üzere en az iki farklı besiyeri kullanılmasını tavsiye etmektedir (52,59). Katı besiyerleri içeriğine göre üçe ayrılır.

- **Yumurta bazlı besiyerleri**

Bütün yumurta veya yumurta sarısı, patates unu, tuzlar ve gliserol içeren katı besiyerleridir. En yaygın kullanılanı Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri, birçok mikobakterinin üremesi için ideal ortam sağlar, uzun raf ömrüne ve tamponlama kapasitesine sahiptir. İçeriğindeki malaşit yeşili (anilin boya) diğer mikroorganizmaların üremesini bir miktar inhibe eder ve ekim yapılan örnek içindeki mikobakteriler için toksik olan maddeleri nötralize eder. (60). Yumurta bazlı besiyerine ekilen örnekler, emilinceye kadar kapakları gevşek, besiyeri yüzeyi yukarı bakacak şekilde yatık pozisyonda 35-37°C’de bir hafta süresince inkübe edilir. Birinci hafta sonunda kapakları sıkıştırılarak dik konumda inkübasyona devam edilir (61). İlaç konsantrasyonlarının ayarlanmasıyla ilgili zorluklardan dolayı bu besiyerleri ADT için tercih edilmez (51,57).

- **Agar bazlı besiyerleri**

Yumurta bazlı besiyerlerine göre kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini daha iyi inhibe eden başarılı bir kimyasal içeriğe sahiptir, fakat raf ömrünün çok daha kısa olması ve yüksek maliyeti gibi dezavantajları vardır. Agar temelli besiyerleri, mikro kolonileri erken dönemde hızlı bir şekilde tespit etmeye imkan tanıyan katı besiyerleridir. Yumurta bazlı besiyerlerinde 18-24 günde görülebilen koloniler, ince dökülmüş Middlebrook 7H11 besiyerlerinde 10-12 gün içinde mikroskop yardımıyla gözlenebilir (62). Ayrıca, antimikrobiyal ilaç duyarlılık testleri için tercih edilirler (56,63).

- **Selektif besiyerleri**

Kontaminasyona neden olan organizmaların üremesinin engellenmesi için besiyerine antimikrobiyal ajanlar katılarak selektif besiyerleri elde edilebilir. Bunlara örnek olarak penisilin ve nalidiksik asit içeren LJ Gruft besiyeri; sikloheksimid, linkomisin ve nalidiksik asit içeren Mycobactosel LJ besiyeri; karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat ve amfoterisin B içeren ve psödomonaların inhibisyonunda etkili olan modifiye Mitchison 7H11 besiyeri sayılabilir (51,64).

Tüm katı besiyerleri, hızlı üreyen mikobakterilerin erken saptanabilmesi ve kontamine kültürlerin hemen uzaklaştırılması amacıyla inokülasyondan 3-5 gün sonra incelenir. Ardından kontaminasyon ve üreme takibi açısından ilk hafta iki kez, sonra sekizinci haftaya dek en az haftada bir kez üreme açısından kontrol edilir (61).

- **Sıvı besiyerleri**

Mikobakteriye sıvı ortamda üreme imkanı sağlayan bu besiyerleri, Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albümin gibi besiyerleridir.

Sıvı besiyeri temelli identifikasyon sistemlerinden biri olan BACTEC 460 TB, 1980'li yılların başında kullanıma girmiş, hızlı ve güvenilir tanı sağlaması sebebiyle altın standart olarak kabul görmeye başlamıştır (65). Zaman içinde daha hızlı ve güvenli bir kültür sistem olan BACTEC MGIT 960 (Mycobacteria growth indicator tube, Becton Dickinson) sürekli olarak üreme monitörizasyonu yapabilmesi ve radyometrik olmaması gibi avantajlarla öne çıkmıştır (66). Günümüzde kullanılan diğer Modifiye Middlebrook 7H9 besiyeri temelli kültür sistemleri MB/BacT ALERT 3D

(bioMérieux), Septi-Check (Roche) ve VersaTREK (Trek Diagnostic Systems) sistemleridir.

## 2.5.4. İdentifikasyon

### 2.5.4.1. Fenotipik İdentifikasyon Yöntemleri

Mikobakteriler üreme hızı ve koloni morfolojileri ile diğer birçok bakteriden ayrılır. Bunun dışında üreme sıcaklıkları, pigment oluşturmaları ve metabolizmaları ile ilgili özellikleriyle gruplandırılır ve aşağıda belirtilen uygun biyokimyasal yöntemlerle tanımlanır. Bu yöntemlerle identifikasyon 3-6 hafta ve daha uzun sürer (51). Bu nedenle kullanımları büyük ölçüde terk edilmiştir.

Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan fenotipik (konvansiyonel) testler (67):

- Üreme hızı
- Optimum üreme sıcaklığı
- Koloni morfolojisi
- Pigmentasyon ve fotoreaktivite
- Niasin birikim testi
- Nitrat redüksiyon testi
- Katalaz testi
- Tween 80 hidroliz testi
- Telürit redüksiyon testi
- Arilsülfataz testi
- Üre hidrolizi testi
- p-nitro benzoik asit içeren besiyerinde üreme
- Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid ile inhibisyon
- Pirazinamidaz testi
- NaCl tolerans testi

### 2.5.4.2. Kromatografik Yöntemler

Mikobakterilerin ayırt edici bileşenlerinin kromatografik yöntemler kullanılarak incelenmesi esasına dayanır. Gaz-sıvı kromatografisinde tüberkülostearik asit incelenir fakat bu maddenin TDM ve aktinomiçeslerde de olması bir dezavantajdır. Yüksek performanslı sıvı

kromatografisi (HPLC) ise, mikobakterilere ait hücre duvarı bileşenlerinden olan mikolik asit esterlerinin tespit edildiği hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Özellikle kültür doğrulaması amacıyla kullanılır (68).

### 2.5.4.3. Moleküler Tanı ve İdentifikasyon Yöntemleri

Moleküler yöntemlerle klinik örnekten direkt tanı veya identifikasyon, hızlı tanı için oldukça önem taşır ve bu yöntemler nükleik asit amplifikasyon temeline dayanır (69). Hızlı tanı, hem tedavi stratejilerinin, hem de tüberküloz kontrol yöntemlerinin iyileştirilmesine katkı sağlar.

- **GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD)**

Direkt örnekten *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin identifikasyonunda kullanılan otomatize, kartuş temelli bir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testidir. Aynı zamanda RIF'e direnci de tespit edebilmektedir. Preparat pozitif örneklerde %90 'ın üzerinde, negatif örneklerde ise %70'in üzerinde duyarlılığa sahip, uygulanması oldukça basit ve yaklaşık 2 saat içinde tanımlama ve duyarlılık sonucu verebilen bir testtir (70,71). İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) şüpheli hastalar ve ÇİD-TB insidansı yüksek olan bölgelerde DSÖ tarafından öncelikli tanı testi olarak kullanılması önerilmektedir (72). Aynı anda hem tanı, hem identifikasyon, hem de RIF'e direncin değerlendirilmesinde kullanılan bir sistemdir.

- **Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (AMTD, Hologic GenProbe, San Diego, CA, ABD)**

Bu test mikobakteriye ait rRNA'yı hedefleyen bir izotermal transkripsiyon aracılı amplifikasyon sistemidir. Balgam ve BAL gibi solunum yolu örneklerinden *Mycobacterium tuberculosis* kompleksine ait rRNA hedeflerini içeren örnekler hazırlanır. İzotermal amplifikasyon reaksiyonları kullanılarak belirli sıcaklık koşullarında ve özel enzimlerin yardımıyla rRNA hedefleri DNA ara ürünlerine dönüştürülür. DNA ara ürünlerinin özel RNA primerleri ile hibridize olması ve RNA polimeraz enzimlerinin kullanılması ile RNA amplikonları elde edilir. Elde edilen RNA amplikonları, akridinyum ester ile işaretlenmiş *M. tuberculosis* kompleksine özgül DNA probu ile hibridize olur. Hibridizasyon sonucunda oluşan RNA-DNA kompleksleri, akridinyum ester ile floresans oluşturur. Bu ışımaya, özel bir detektör

ile tespit edilir ve sonuçlar analiz edilir. Eğer örnek içerisinde *M. tuberculosis* kompleksine ait rRNA hedefleri varsa, ışına oluşur ve test pozitif kabul edilir (73).

- **cobas MTB (Roche Diagnostics, İsviçre)**

cobas MTB, cobas 5800/6800/8800 sistemleri ile kullanılan otomatik, kalitatif in vitro tanı testidir. Ön işlem (NALC-NaOH) yapılmış veya yapılmamış balgam ve BAL örneklerinde kullanılabilir ve *M. tuberculosis* kompleksi DNA'sının gerçek zamanlı PZR ile doğrudan tespiti için kullanılır. Tüberküloz şüphesi olan ve antitüberküloz tedavi almayan hastalardan alınan örneklerle çalışılmak üzere tasarlanmıştır. 16S rRNA geni ve *esx* genleri için çift hedefli amplifikasyon uygular. *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* türlerinin identifikasyonunu yapabilir (74).

- **GenoType MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)**

GenoType testleri genel olarak ters hibridizasyon prensibine dayanır. Belli genlerin spesifik bölgelerindeki belli mutasyonları saptamaya yönelik testlerdir. İşaretli PZR ürünlerinin bir strip üzerindeki oligonükleotid problemleriyle hibridize olduğu yerde kolorimetrik reaksiyonla saptanan bir çizgi oluşur.

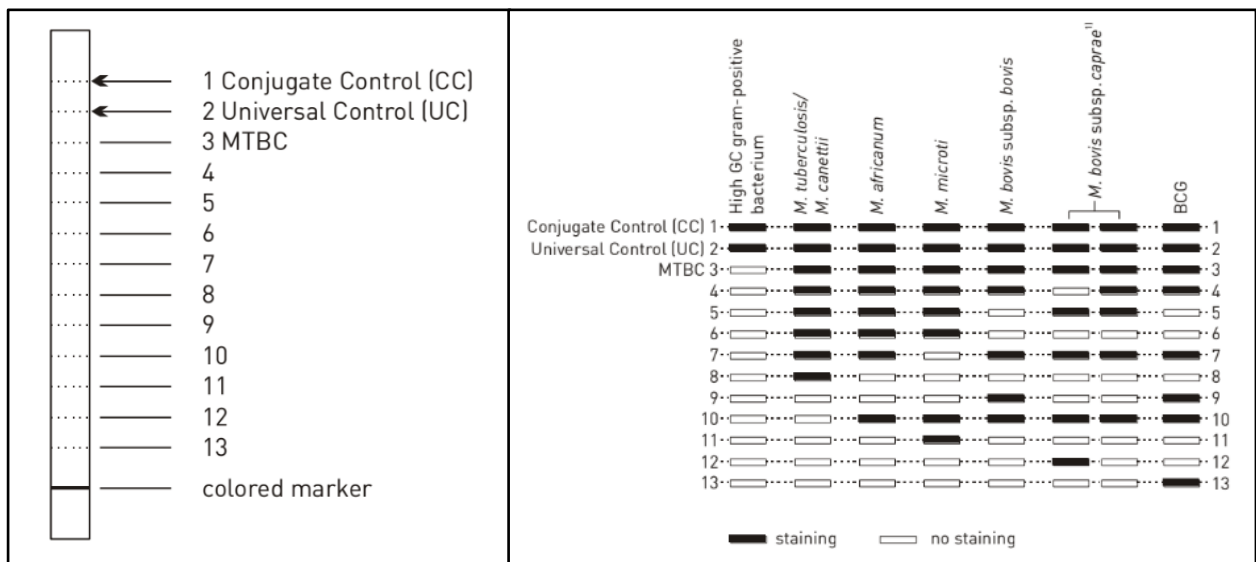
GenoType MTBC'nin çalışma prensibi, PZR ve gerçek zamanlı PZR gibi yüksek hassasiyete sahip moleküler yöntemlerine dayanır. Bu yöntemler, *M. tuberculosis* kompleksinin genetik materyalini çoğaltmak ve belirli gen bölgelerini tespit etmek amacıyla tasarlanmış spesifik primer ve prob adı verilen kısa nükleotid dizilerini kullanır. Genotip tayini için gereken genetik materyal hem kültürden hem de doğrudan klinik örneklerden elde edilebilir. Dolayısıyla hem direkt tanıda, hem de identifikasyonda tercih edilebilir.

Yöntemde genellikle *M. tuberculosis* kompleksinin genetik yapısında yer alan değişken bölgeler hedef alınır. Bu değişken bölgeler, farklı tür ve alt türlere özgü genetik farklılıkların bulunduğu yerlerdir. Test, özellikle IS6110, *katG*, *rpoB*, *inhA*, ve *embB* gibi gen bölgelerini inceler. Gerçek zamanlı PZR veya PZR ile bu bölgelerdeki özgün nükleotid dizileri çoğaltılır ve varlıkları tespit edilir.

Test sonuçları, tespit edilen nükleotid dizilerinin analiziyle elde edilir. Bu analiz, *M. tuberculosis*'in spesifik genetik profiline dayanarak, farklı tür ve alt türleri ayırt etmeyi sağlar.

Bu tür ve alt türlerin belirlenmesi, etken suşun ilaçlara direnç durumu, bulaşma paternleri ve epidemiyolojik özellikleri hakkında önemli bilgiler sağlar.

Şerit üzerinde 13 adet reaksiyon bölgesi bulunur (Şekil 2-5). Sorunsuz şekilde yapılmış bir testte *M. tuberculosis* kompleksi için 1, 2 ve 3 numaralı bantların mutlaka oluşması beklenir. Diğer bantlardaki pozitiflikler kılavuz şablon ile değerlendirilerek tür tanımlaması yapılmış olur.



Şekil 2-5: GenoType MTBC tesine ait şerit üzerindeki bölgeler (solda) ve tespit edilebilen türler (sağda) (75).

- **INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Gent, Belçika)**

GenoType MTBC benzeri bir “line probe assay (LPA)”dır. İdentifikasyon için kullanılan hedef bölge 16S rRNA’ya ait bölgeden daha spesifik olan “16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS)” bölgesidir ve buradaki nükleotid farklılıklarına dayanarak hem *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi, hem de *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. goodii*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium*/*M. intracellulare*/*M. scrofulaceum* kompleksi, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense* ve *M. haemophilum* gibi yavaş üreyen mikobakterilerin identifikasyonunu sağlar (76).

- **GenoType Mycobacterium CM ve GenoType Mycobacterium AS**

GenoType MTBC ile tamamen aynı çalışma prensibi ile klinik öneme sahip TDM'lerin tanımlanması için kullanılan testlerdir. Yaklaşık beş saat içerisinde sonuç verir. GenoType Mycobacterium CM, *M. tuberculosis* kompleksi ve en sık görülen TDM'lere ait problemler içerirken GenoType Mycobacterium AS ise daha nadir görülen türlere ait problemleri içerir (77,78).

- **Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (“Loop-Mediated Isothermal Amplification”, LAMP)**

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin hızlı tanımlanması amacıyla son yıllarda geliştirilen etkili bir gen amplifikasyon yöntemidir. Bu yöntem, hızlı, basit ve yüksek özgüllüğü ile dikkat çeker. Dünya sağlık örgütü, semptomatik hastalarda veya önceden tanı almış preparat negatif hasta örneklerinde mikroskopi yerine kullanılabileceğini tavsiye etmiş ancak bazı endikasyonlar bildirmiştir (79). LAMP reaksiyonu, belirli mikobakteriyel rRNA hedef bölgeleri üzerinden çalışır. Reaksiyon, iki tip uzama reaksiyonunun döngü bölgelerinde tekrarlanmasıyla gerçekleşir. En önemli özelliklerinden biri, sadece tek bir tür enzim kullanılması ve amplifikasyon işleminin sabit bir sıcaklıkta gerçekleştirilmesidir. Bu sayede reaksiyon genellikle bir saat içinde tamamlanır ve katmanlı (nested) PZR ile benzer bir hassasiyete sahiptir. Sonuçlar UV altında çıplak gözle değerlendirilebilir. Ayrıca LAMP, farklı gen bölgelerini hedef alır ve iç primerlerin temel karakteristiği, amplifikasyonun özgüllüğünün diğer yöntemlere kıyasla çok daha yüksek olmasını sağlar (80).

- **BD ProbeTEC ET (Becton Dickinson, Maryland, ABD)**

Tuberküloz şüpheli hastalardan alınan solunum örnekleri için direkt bir test olarak *M. tuberculosis* kompleksinin tanımlanması amacıyla kullanılır. Test sistemi, “strand displacement amplification (SDA)” teknolojisini ve floresan enerji transferini (ET) kullanarak, dekontamine edilmiş ve NALC-NaOH ile işlenmiş solunum örneklerinden *M. tuberculosis* kompleksinin doğrudan tespit edebilmektedir. (81).

## 2.6. Antitüberküloz İlaçlar ve Antitüberküloz Duyarlılık Testleri (ADT)

Antibiyotiklere dirençli *M. tuberculosis* suşları, küresel tüberküloz salgınının kontrol altına alınmasındaki ilerlemeyi tehdit etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*, birçok antibiyotiğe doğal dirençlidir ve bu da tedavi için kullanılacak antibiyotiklerin sayısını sınırlamaktadır. Bu doğal direnç, kalın, balmumu benzeri, hidrofobik bir hücre duvarı ve ilaç moleküllerini parçalayan enzimlerin varlığı gibi bir dizi mekanizma tarafından sağlanır. *M. tuberculosis*'e karşı etkili olan ilaçlara karşı direnç, yatay olarak transfer edilen direnç belirleyicilerinin olmaması durumunda, kromozomal mutasyonlar yoluyla kazanılır. Bu kromozomal mutasyonlar, ilaç hedefinin değiştirilmesi veya aşırı ifadesi yoluyla ilaç direncini sağlayabileceği gibi, pro-ilaç aktivasyonunun önlenmesi yoluyla da ilaç direncini sağlayabilir. Dirence neden olan mutasyonlar, bakterinin uyum yeteneğinde azalmaya yol açabilen çok yönlü etkilere sahip olabilir, örneğin in vitro üreme hızında azalmaya neden olabilir. Dirence neden olan mutasyonlar ile bağlantılı olmayan ikincil "telafi" mutasyonları, direnç mutasyonu ile epistatik olarak etkileşime girerek uyum maliyetini azaltabilir. *M. tuberculosis*'in genetik çeşitliliği, diğer patojen bakterilere göre düşük olsa da, suşun genetik arka planının ilaç direncinin evrimi üzerinde birçok etkisi olduğu gösterilmiştir. Direncin evrim hızı ve ilaç direnci mutasyonlarının uyum maliyeti, genetik arka planın bir fonksiyonu olarak değişebilir (82).

### 2.6.1. Antitüberküloz İlaçlar

- **İzoniiazid**

İlk kez 1952 yılında TB tedavisi için kullanılan izoniiazid (INH), diğer mikobakterilere karşı genellikle etkili olmasa da, *M. tuberculosis*'in etken olduğu tüberkülozun tedavisine özgü ve çok etkili bir bakterisidal ilaçtır. Yalnızca replikasyon esnasında etki gösterir ve bu nedenle oksijene bağımlıdır. Diğer antitüberküloz ilaçlara göre daha az toksiktir ve teorik olarak tüm vahşi tip *M. tuberculosis* suşlarına etkilidir. *katG* geni tarafından kodlanan katalaz peroksidaz enzimi INH'ın oksidasyonunu sağlar. Okside INH, NAD(H) molekülünün nikotinamid kısmına kovalent olarak bağlanarak INH-NAD(H) bileşiklerini oluşturur. Bu bileşikler *inhA* geni tarafından kodlanan bir enoil-açill taşıyıcı protein redüktaza bağlanmak için NAD(H) üzerinde yarışmalı inhibisyona sebep olur (83). NAD metabolizması bozulan ve mikolik asit sentezi inhibe olan bakterinin hücre dayanıklılığı azalır. İzoniiazid dirençli organizmaların maruziyet sonrası aside dirençli boyanma özelliğini kaybetmeleri bu durumu açıklar (84).

İzoniyazid direncinde *katG* ve *inhA* genleri ön planda olsa da, bunların haricinde alkil hidroperoksit redüktaz sentezinden sorumlu *ahpC* promoter bölgesindeki mutasyonların da dirençe ilişkili olduğu bilinmektedir (85).

Yan etkileri yaşa bağlı hepatit, nadiren periferik nöropati ve ateş, döküntü, artralji gibi hipersensitivite reaksiyonlarıdır (29).

- **Rifampin**

Rifampin (RIF), hem kazeöz lezyonlardaki hücre içi yavaş replike olan bakterilere, hem de kaviterlerde aktif şekilde replikasyona devam eden bakterilere etkilidir. Lipofilik yapısından dolayı mikobakteri hücre duvarından kolaylıkla geçer. *rpoB* geni tarafından kodlanan DNA bağımlı RNA polimeraz beta alt ünitesine bağlanarak etkisini gösterir (86). Dünya genelinde antibiyotik direncine bağlı tüm ölümlerin yaklaşık dörtte biri RIF'e dirençli *M. tuberculosis* suşlarıyla oluşan TB nedeniyle meydana gelmektedir (87). *rpoB* geninde meydana gelen bir mutasyon, RNA polimeraz beta alt ünitesinde RIF'in bağlanma afinitesini değiştirecek bir yapısal değişikliğe neden olur ve düzgün bağlanma sağlayamayan RIF, etkisiz hale gelir (88). Rifampine dirençli suşların yaklaşık %90-95'inde *rpoB* geninde mutasyonların bulunduğu gösterilmiştir (89-91). *Mycobacterium tuberculosis*'te rifamisinlere direnç büyük ölçüde *rpoB* genindeki 81 baz çiftinden oluşan "rifampin direnç belirleyici bölge (RRDR)" içindeki mutasyonlarla ilişkilidir (92-94). Bu bölge, *rpoB*'nin 507 ila 533 kodonlarına karşılık gelir. Ancak, *M. tuberculosis*'in yaklaşık %5'inde rifampine dirençli suşlarda direnç mekanizması bilinmemektedir, bu da hücre duvar geçirgenliğinin azaltılması veya pompalama sistemi (efflux) aktivitesi gibi alternatif mekanizmaları düşündürmektedir (95). Öte yandan bazı fenotiplerin RIF'e duyarlı olmasına rağmen *rpoB* mutasyonuna sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (90,96). Yani *rpoB* mutasyonu her zaman için mutlak bir direnç anlamına gelmez. Bu çelişki, RIF'e direnç ile *rpoB* mutasyonları arasındaki ilişkinin daha detaylı araştırılması gerektiğini gözler önüne sermektedir.

- **Pirazinamid**

Nikotinamidin bir sentetik derivesi olan pirazinamid (PRZ), özellikle INH ile kombine edildiğinde üremekte olan veya latent formdaki *M. tuberculosis*'e karşı hızlı bakterisidal etki gösterir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da karaciğerde hidrolize olarak aktif metaboliti pirazinoik aside çevrilir. Ürettiği pirazinamidaz enzimi dışında efflux gibi çeşitli mekanizmalarla *M. tuberculosis*'in direnç kazandığı düşünülmektedir (97). Bu enzimi

kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar, suşların çoğunda dirençten sorumludur (98). Yan etkileri hepatotoksisite, fotosensitivite ve döküntüdür. Hiperürisemiye sebep olabildiğinden gut hastalığında kullanılması kontrendikedir. Özellikle sığırlarda hastalık etkeni olan *M. tuberculosis* kompleksi üyesi olan *M. bovis*, ayırt edici filogenetik özelliği olan tek nükleotid polimorfizmi (C169G) sayesinde PRZ'ye doğal dirençlidir (99).

- **Etambutol**

Genel olarak 1–5 µg/mL konsantrasyonu in vitro ortamda *M. tuberculosis*'in inhibisyonu için yerelidir. Yalnızca üremekte olan bakterilere etkilidir. Arabinogalaktan sentezini ve dolayısıyla hücre duvar sentezini engeller (100). Bakteriyostatik etki gösterir. Dirençli suşların %70'inden arabinoziltransferaz sentezinden sorumlu olan 306 numaralı kodondaki *embB* geninde meydana gelen mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir (101). En sık bildirilen yan etkiler optik nörite bağlı görme kusurlarıdır ve genellikle tedavi kesildiğinde düzelir.

- **Aminoglikozidler: Streptomisin, Kanamisin, Amikasin ve Viomisin**

Kanamisin (KAN)'in bir derivativesi olan amikasin (AMK), mikobakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı gentamisin ve tobramisinin aksine yüksek etki gücüne sahip bir aminoglikozittir. Temel etkisini bakterinin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanıp protein sentezini bozarak gösterir. Aminoglikozidlere çapraz direnç genellikle AMK ile tedavi sonrası, *rrs* geninde meydana gelen mutasyonlarla gerçekleşir. Fakat streptomisin (STR) ve KAN direnci, AMK ile çapraz dirence sebep olmaz. KAN dirençli, AMK duyarlı suşlar *eis* promoter bölge mutasyonlarına sahip olabilmektedir (102).

Streptomisine direnç ise *rrs* mutasyonundan ziyade temel olarak ribozomal protein S12'yi kodlayan *rpsL* geninde veya bu proteinle ilişkili 16S rRNA bölgesinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (103,104).

- **Kapreomisin**

Tedaviye dirençli TB tedavisinin önemli antibiyotiklerinden olan kapreomisin (CAP), *Streptomyces mutabilis* subsp. *capreolus*'tan izole edilmektedir. Etki mekanizması aminoglikozidlere benzer şekilde translasyon inhibisyonudur. Bakterisidal olarak kabul edilse de in vitro ortamda bakterisidal etkisi de gösterilmiştir (105). 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* genindeki veya *tlyA* genindeki mutasyonlar dirençle ilişkilidir (106).

- **Florokinolonlar**

Ofloksasin (OFX), levofloksasin (LEV) ve moksifloksasine (MOX) duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* suşlarına karşı iyi in vitro etki gösterir ve bu nedenle ÇİD-TB tedavisinde kullanılmaktadır.

Florokinolonlar (FLK), bakteriyel topoizomeraz-2'ye bağlanarak DNA sentezini inhibe ederler. DNA giraz alt ünitelerini kodlayan *gyrA* ve *gyrB*'deki mutasyonlar bakteriye direnç kazandırır. Başka antibiyotik grubu arasında çapraz direnç görülmesi de FLK grubu içerisindeki antibiyotikler arasında bu durum görülebilir. Bu nedenle tedavi düzenlenirken herhangi bir FLK'a direnci olan bakterinin muhtemelen diğer FLK üyelerine de direnç kazanmış olduğu kabul edilmektedir (107).

- **Bedakuilin**

Diarilkinolin türevi bir antitüberküloz ilaç olan bedakuilin (BDK), 2005 yılında üretilmiştir. Tüberküloz tedavisinde 40 yıldan fazla bir aradan sonra üretilen ilk ilaçtır. Mikobakteride ATP sentezini inhibe eder ve ÇİD-TB tedavisinde kullanılmaktadır.

Her yeni ilaç beraberinde direnç gelişimi ile ilgili soru işaretlerini de getirmektedir. ATP sentaz C alt ünitesini kodlayan *atpE* genindeki mutasyonlar ve aminopeptidazı kodlayan *pepQ* genindeki mutasyonlar BDK için dirence neden olur.

Kazanılmış BDK direncine dolaylı olarak sebep olan faktörlerden biri de FLK direncidir. Bedakuilin aktivitesi tedavinin ilk günlerinde zayıftır ve etkisini göstermesi yaklaşık bir hafta sürer (108). Bu ilk günlerde dirençli mutantların seçilmesini önlemek için yüksek bakterisidal etkiye sahip ve hızlı etki gösteren ilaçlara ihtiyaç vardır. Bu görev için en uygun ajan FLK olarak tercih edilmektedir (109). Son 15 yıla ait FLK direnci olan ÇİD/RIF dirençli suşlarla enfekte TB vakalarının oranı %20,1'dir ve ÇİD/RIF dirençli *M. tuberculosis* suşlarının ancak %50'si FLK direnci için test edilmektedir (1). Tespit edilmeyen FLK direnci veya düşük düzey FLK direncinin olduğu durumlar, BDK dirençli suşların da seçilmesine yol açabilir. Bu nedenle yavaş etkili antitüberküloz ilaçlarla tedavide direnç gelişimini engellemek için önce kullanılacak hızlı etkili ilaçlara karşı ADT yapılması önerilmektedir(110).

Bedakuilin için direnç gelişimi ve sebep olan mutasyonların daha iyi anlaşılması ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir.

Antitüberküloz ilaçlar, etki mekanizmaları ve moleküler hedefe ait gen ürünleri Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2-2: Antitüberküloz ilaçlar, etki mekanizmaları ve moleküler hedefe ait gen ürünleri.**

<b>Antimikrobiyal Ajan</b>	<b>Etki Mekanizması</b>	<b>Moleküler Hedef</b>	<b>Gen Ürünü</b>
<b>Amikasin</b>	Protein sentez inhibisyonu	<i>rrs</i>	16S rRNA
<b>Bedakuilin</b>	ATP sentaz için proton pompasını etkiler	<i>atpE</i>	ATP sentaz
<b>Kapreomisin</b>	Protein sentez inhibisyonu	<i>rrs</i>	16S rRNA
		<i>tlyA</i>	rRNA metiltransferaz
<b>Etambutol</b>	hücre duvarı arabinogalaktan sentez inhibisyonu	<i>embB</i>	Arabinoziltransferaz
<b>Etiyonamid</b>	hücre duvarı mikolik asit sentez inhibisyonu	<i>inhA</i> promoter	<i>inhA</i> ekspresyonunu düzenler
		<i>ethA</i>	Flavoprotein monooksijenaz
<b>Florokinolonlar</b>	DNA giraz inhibisyonu	<i>gyrA</i>	DNA giraz A alt ünitesi
		<i>gyrB</i>	DNA giraz B alt ünitesi
<b>İzoniiazid</b>	Yağ asidi uzamasını engellenmesi. Mikolik asit sentezinin inhibisyonu	<i>katG</i>	Katalaz peroksidaz
		<i>inhA</i>	Enoil açıl taşıyıcı protein redüktaz
		<i>inhA</i> promoter	<i>inhA</i> ekspresyonunu düzenler
		<i>ahpC</i> promoter	<i>ahpC</i> ekspresyonunu düzenler
		<i>ndh</i>	NADH dehidrojenaz
<b>Kanamisin</b>	Protein sentez inhibisyonu	<i>rrs</i>	16S rRNA
		<i>eis</i> promoter	Kanamisine özgü bir aminoglikozid asetiltransferazın ekspresyonunu düzenler
<b>Pirazinamid</b>	Sitoplazmanın asiditesini artırarak membran geçirgenliğinin bozulması	<i>pncA</i>	Pirazinamidaz
<b>Rifampin</b>	RNA transkripsiyonu inhibisyonu	<i>rpoB</i>	RNA polimeraz $\beta$ alt ünitesi
<b>Streptomisin</b>	Protein sentez inhibisyonu	<i>rpsL</i>	Ribozomal protein S12

## 2.6.2. Duyarlılık Yöntemleri

### 2.6.2.1. Konvansiyonel Yöntemler

Bu yöntemler bakterinin belirli bir konsantrasyonda antitüberküloz ilaç içeren sıvı veya katı besiyerlerindeki üremelerini esas alır.

#### A. Fenotipik Yöntemler

##### a. Agar Proporsiyon (Orantı) Yöntemi

Canetti tarafından 1960 yılında geliştirilen bu yöntem birçok ülkede standardize yöntem olarak kullanılmıştır (111). Middlebrook 7H10 agar kullanılan bu yöntemde ilaçlar agar difüzyon veya disk elüsyon yöntemine uygun şekilde eklenebilir (54). Duyarlık testi için indirekt yöntemde saf kültür kullanılırken, direkt yöntemde preparat pozitif örneklerin kendisi kullanılır. Üç haftalık inkübasyon sonucunda elde edilen direnç yüzdesi, ilaç içeren kadrandaki koloni sayısının, kontrol kadranındaki suşun koloni sayısına bölünerek hesaplanır. Elde edilen değer kritik proporsiyon değeri olan %1'den büyük ise bu, suşun o ilaca dirençli olduğu anlamına gelir. Test sonuçlarının yorumlanmasında mikrokolonilerin varlığı, gerçek dirençle ilişkili olabileceği gibi, kimi zaman duyarlı organizmaların üremelerinden de kaynaklanabilir. Özellikle direkt yöntemle yapılan duyarlık testi sonuçlarının raporlanmadan önce organizmanın ön identifikasyonunun yapılması önemlidir (112).

##### b. BACTEC MGIT 960 Yöntemi

Bu sistem 1995 yılından beri kullanılmaktadır ve modifiye Middlebrook 7H9 besiyeri içerir. Besiyerinin bulunduğu tüp tabanında rutenyum içerikli oksijen sensörü bulunmaktadır. Aktif olarak üreyen organizmalar çözülmüş oksijeni kullandığında, azalan oksijen konsantrasyonu floresans oluşturur ve oluşan floresans 0 – 999 arasında sayısal bir değerle ifade edilir. MGIT 960 sistemi tamamen otomatik bir sistem olup, mikroorganizmaların üremesini sürekli olarak saat başı floresans tespiti yoluyla izler. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2002'de *M. tuberculosis* kompleksinin streptomisin, INH, RIF ve etambutol (SIRE) ve pirazinamide duyarlık testi için onaylanmıştır. Birçok çalışma, MGIT 960 sisteminin birincil ilaçların test edilmesi için performansının agar proporsiyon yöntemi ile eşdeğer olduğunu göstermiştir (113–116).

### c. VersaTREK Myco Yöntemi

VersaTREK, mikobakterilerin üremesini ve varlığını sürekli olarak izleyen tam otomatik bir sistemdir ve aynı zamanda *M. tuberculosis* kompleksinin birincil ilaçlara duyarlılığını değerlendirebilir. Bu teknoloji, kapalı tüpün içindeki besiyerinin üzerindeki hava boşluğunda oksijen tüketiminden dolayı meydana gelen basınç değişikliklerini tespit ederek çalışır. Besiyeri olarak Middlebrook 7H9 ve üremeyi desteklemek için besiyeri içinde selüloz süngerler bulunur, böylece oksijene daha fazla yüzey alanı sağlanır.

Besiyerleri VersaTREK Myco duyarlılık sisteminde 35°C'de inkübe edilir ve üreme sürekli olarak her 24 dakikada bir otomatik olarak izlenir. Kontrol besiyerinde inokülasyondan 3 ila 10 gün sonra tespit edilecek üreme varlığı, testin geçerli olduğunu gösterir. Bu değerlendirmeden sonraki en fazla 3 gün içerisinde üreme olan besiyerlerindeki bakteriler o ilaca dirençli kabul edilir.

VersaTREK Myco sistemi, diğer test yöntemleriyle iyi uyum gösterir ve tespit süreleri hızlıdır, böylece hızlı ve güvenilir sonuçlar sağlar ve FDA tarafından onaylanmıştır.

### d. TREK Sensititre MYCOTB MIC Plate Yöntemi

Birincil ve ikincil ilaçlar için mikrobeseiyeri içinde hazırlanan ilaç dilüsyonları ile çalışan, 96 kuyucuklu bir plak formatında, FDA onayı henüz alınmamış olup, sadece araştırma amaçlı kullanılan bir sistemdir. Tek bir minimum plak üzerinde 12 ilaç için minimum inhibitör konsantrasyonlar (MİK) test edilir ve sonuçlar 10 ila 21 gün sonra alınır. İnokulum hazırlamak için katı besiyeri kullanımını gerektirdiğinden sonuçlarda gecikmeye neden olabilir (117).

### e. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi

Test edilecek her antitüberküloz ilaca ait MİK değerlerinin her bir suş için ayrı ayrı tespit edildiği bir yöntemdir. Mililitre başına belirli bir miktarda (Genellikle  $2 \times 10^3$  veya  $2 \times 10^4$ ) koloni oluşturan birim (CFU/ml) içeren bakteri solüsyonu hazırlanır. Artan oranda ilaç içeren ve kontrol olarak ilaç içermeyen besiyerlerine ekim yapılır. İnkübasyon sonrası üremeler değerlendirilir ve üreme olmayan besiyerine ait ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilir (118).

### f. Nispi Direnç Yöntemi

Temelde mutlak konsantrasyon yöntemine benzer bir mekanizma kullanılır. *M. tuberculosis* H37Rv suşu ile birlikte ADT yapılan suş seri dilüsyon yapılmış ilaç konsantrasyonlarının olduğu besiyerlerine ekilir. ADT yapılan suşa ait elde edilen MİK değeri, standart *M. tuberculosis* suşu için saptanan MİK değerine oranlanarak karşılaştırmalı bir sonuç elde edilir ve bu şekilde direnç durumu öğrenilir (63).

## B. Genotipik Yöntemler

Teknolojinin gelişmesi ve yapılan araştırmalar sayesinde mikobakterilerde dirence sebep olan birçok mutant gen tespit edilmiştir ve günümüzde bu genler çok çeşitli yöntemlerle saptanabilmektedir (119).

### a. Line Probe Yöntemleri (Line Probe Assay, LPA)

Bu testler PZR ve ardından ters hibridizasyon temelli “DNA strip” teknolojisinin kullanıldığı teknikler olarak geliştirilmiştir. Hedeflenen diziler biyotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılır. Çoğaltılmış PZR ürünleri, mutasyona özgü dizi parçalarını kapsayan membran üzerine sabitlenmiş problarla hibridize olur ve daha sonra enzim aracılı renklenme reaksiyonu ile sonuçlandırılır. Oluşan bant paternleri, yorumlama çizelgesindeki paternlerle karşılaştırılarak gözle analiz edilebilir. Direncin belirlenmesi, özel bant paternlerine dayanır.

- **INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Gent, Belçika)**

İdentifikasyon bölümünde (2.5.4.3) anlatılan INNO-LiPA Mycobacteria testinin rpoB genindeki belli mutasyonları tespit etmeyi sağlayan duyarlılık testi versiyonudur. Yöntem yalnızca RIF direncini saptamak üzere tasarlanmıştır.

- **GenoType MTBDRplus ve MTBDRsl (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)**

GenoType MTBDRplus testi DNA-STRIP teknolojisi temelinde oluşturulan PZR temelli, ters hibridizasyon testidir. Tüm prosedür üç temel adımda tamamlanır. İlk aşamada direkt klinik örnek veya besiyerinde üremiş koloniden DNA izole edilir. İkinci aşamada

biyotinlenmiş primerler ile multipleks PZR yapılır ve son aşamada ters hibridizasyon sağlanır. Kimyasal denatürasyon sonrası tek zincirli amplikonlar bu problara bağlanır (hibridizasyon).

Tamamlayıcı DNA ipliklerinin yüksek düzeyde spesifik bağlanması, tampon bileşimi ve belirli bir sıcaklığın kombinasyonundan kaynaklanan katı koşullarla sağlanır. Böylece problemler, incelenen gen bölgelerindeki birkaç dizi varyasyonunu güvenilir bir şekilde ayırt eder. Streptavidin ile konjuge alkalin fosfataz, streptavidin kısmı aracılığıyla amplikonların biyotinine bağlanır. Son olarak, alkalin fosfataz, sonradan eklenen substrat ile temas ettiğinde membran şerit üzerinde görünür hale gelen çizgi şeklinde renklenme oluşturur. Kit içeriğinde bulunan bir şablon, elde edilen bantlanma modelinin kolay ve hızlı yorumlanmasını sağlar.

MTBDRplus testi ile RIF'e direncin tanımlanması, RNA polimerazın  $\beta$ -alt birimini kodlayan *rpoB* geninin en yaygın mutasyonlarının saptanmasıyla sağlanır. Yüksek düzey INH direncini test etmek için katalaz peroksidazı kodlayan *katG* geni incelenir ve düşük düzey INH direncini test etmek için NADH enoil ACP redüktazı kodlayan *inhA* geninin promotor bölgesi analiz edilir (120).

MTBDRsl testinde florokinolonlara direncin tespiti DNA giraz A alt ünitesini kodlayan *gyrA* ve B alt ünitesini kodlayan *gyrB* genlerinin en yaygın mutasyonlarının saptanmasıyla sağlanır. Parenteral ilaçlardan KAN, AMK, CAP ve viomisin (VIO)'e direncin tespiti için 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* geninin yaygın mutasyonları, düşük düzey kanamisin direncinin tespiti için ise kanamasine özgü bir aminoglikozid asetiltransferazın ekspresyonunu düzenleyen *eis* promotor bölgesinin mutasyonu saptanır.

Şerit üzerinde toplam 27 reaksiyon bölgesi bulunur. Bu bölgeler, bant numaraları ve açıklamaları şu şekildedir;

**Conjugate Control (CC):** Bu bölge konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun etkinliğini gösterir ve mutlaka bir çizgi oluşması beklenmektedir.

**Amplification Control (AC):** Test doğru bir şekilde gerçekleştirildiğinde, bir kontrol amplikonu amplifikasyon kontrolü bölgesine bağlanır. Bu bölge aynı zamanda değerlendirme için bir referans olarak kullanılır. Bant renklenme yoğunluğu yaklaşık olarak AC bölgesi ile aynı güçte veya daha güçlü olan bantlar pozitif kabul edilir.

*M. tuberculosis* kompleksi bölgesi (TUB bandı): Bu bölge, *M. tuberculosis* kompleksinin tüm üyelerinden oluşan amplikonlarla hibridleşmektedir. Negatif ve değerlendirilebilir bir direnç deseni gelişmediği durumlarda, test edilen örnekte *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin olmadığı kabul edilir.

Lokus Kontrolleri (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*): Lokus kontrol bölgeleri, ilgili lokusa özgü gen bölgesini tespit eder. Mutasyondan bağımsız şekilde genin varlığının kontrol edilmesini sağlar.

Vahşi tip problemler (WT bantları): İlgili genlerin en önemli direnç bölgelerini içerir. Bir genin tüm vahşi tip problemleri pozitif olduğunda, incelenen bölgelerde tespit edilebilir bir mutasyon olmadığı anlaşılır. Bu, test edilen suşun ilgili antibiyotiğe duyarlı olduğunu gösterir. Bir mutasyon durumunda, ilgili amplikon karşılık gelen vahşi tip proba bağlanamaz. Böyle bir durumda vahşi tip problemlerden en az birinin sinyalinin eksik olması, test edilen suşun ilgili antibiyotiğe dirençli olduğunu gösterir. MTBDRplus VER2.0 kitinde sekiz tane *rpoB*, bir tane *katG* ve iki tane *inhA* genine ait olmak üzere toplam 11 WT probu bulunur. MTBDRsl VER2.0 kitinde ise üç tane *gyrA*, bir tane *gyrB*, iki tane *rrs*, üç tane *eis* genine ait olmak üzere toplam dokuz adet WT probu bulunur. Pozitif WT bandı, test edilen suşun ilgili gen için vahşi tip olduğu, direnç sağlayacak bir mutasyonun olmadığı anlamına gelir. Aksine vahşi tip deseninden sapmış her bant deseni, test edilen suşun dirençli olduğunu göstermektedir.

Mutasyon problemleri (MUT bantları): Her bir antitüberküloz ilaca direnç sağlayan en yaygın mutant genler seçilerek bunlara karşılık gelecek problemler strip üzerine yerleştirilmiştir. MTBDRplus VER2.0 kitinde dört tane *rpoB*, iki tane *katG* ve dört tane *inhA* genine ait olmak üzere toplam 10 MUT probu bulunur. MTBDRsl VER2.0 kitinde ise altı tane *gyrA*, iki tane *gyrB*, iki tane *rrs*, bir tane *eis* genine ait olmak üzere toplam 11 adet MUT probu bulunur. Diğer problemlere göre, mutasyon problemlerinin pozitif sinyalleri daha düşük bir sinyal gücüne sahip olabilir. Örneğin nadir durumlarda, *rpoB* MUT3 bandı pozitif olduğunda, *rpoB* WT8 bandında zayıf boyama tespit edilebilir ve bu negatif olarak kabul edilir.

Test sonuçları değerlendirilirken üzerindeki çeşitli bölgelerde renkli bantlar oluşan selüloz stripler, üretici tarafından sağlanan şablon üzerine doğru şekilde yerleştirilerek “Conjugate Control(CC)” ve “Amplification Control(AC)” bantlarının varlığı doğrulandıktan sonra şerit üzerinde oluşan diğer bantların hangi lokusa denk geldiği gözlemlenir. Bir suşa ait tüm WT problemleri pozitif olduğunda (yani bantlar görünür hale geldiğinde), araştırılan gen

bölgelerinde tespit edilebilir herhangi bir mutasyon olmadığı anlaşılır. Mutasyon durumunda ise ilgili amplikon, ona karşılık gelen WT probuna bağlanmaz. Böylece WT problemlerinden en az bir tanesine ait negatiflik, ilgili antibiyotiğe karşı bir direnç varlığını gösterir. Wild type (WT) bant paterninden sapmalar, beraber olduğu MUT bantları ile birlikte değerlendirilerek bir dirençle ilişkilendirilmektedir.

*rpoB* problemleri ile elde edilen patern RIF'e direnç,

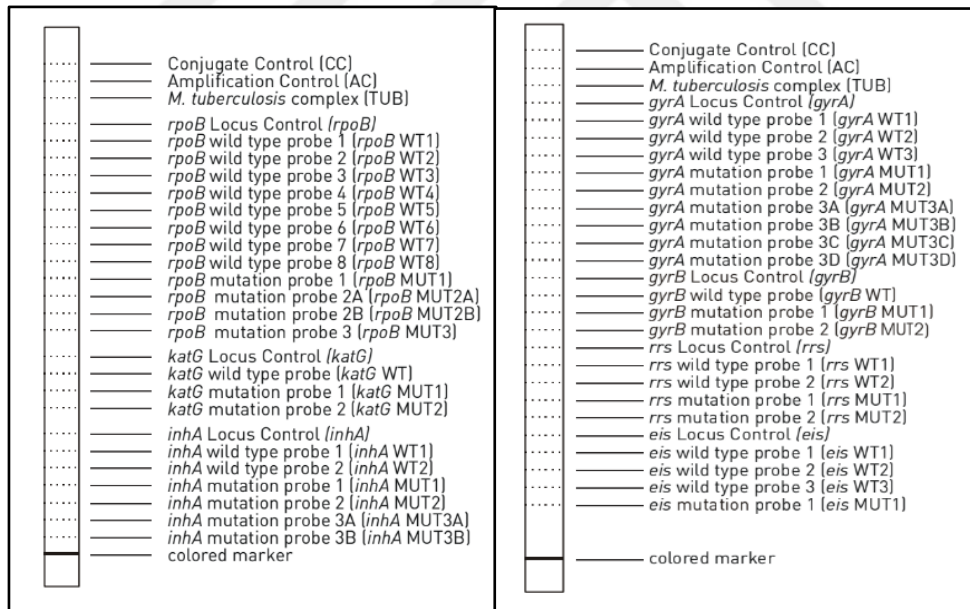
*katG* ve *inhA* paternini INH'a direnç,

*gyrA* ve *gyrB* paternini FLK'a direnç,

*rrs* paternini parenteral ilaçlara (KAN, AMK, CAP, VIO) direnç,

*eis* paternini ise düşük düzey kanamisine direnç

ile ilgili bir sonuca varılmasını sağlar (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: GenoType MTBDRplus (sol) ve MTBDRsl (sağ) kitlerine ait stripler (120,121).

- **Speed-oligo Mycobacteria (Vircel, Granada, İspanya)**

Bir diğer LPA testi olan Speed-oligo Mycobacteria, hedef olarak hem 16S rRNA hem de 16S-23S rRNA bölgelerine odaklanmaktadır. Bu test, *M. tuberculosis* kompleksi üyelerini

(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae*) ve 10 ek TDM (*M. avium*, *M. gordonae*, *M. interjectum*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. scrofulaceum* ve *M. xenopi*) dahil olmak üzere 19 mikobakteri türünü tanımlayabilir. Speed-oligo Mycobacteria sistemi, diğer testlere kıyasla sınırlı bir tür tanımlama spektrumuna sahiptir ve birçok mikobakteri türünü kompleks veya grup düzeyinde tanımlar. Yanlış tanımlama ile ilgili yayınlar mevcuttur ve hala duyarlılık özgüllük ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (122,123). Speed-oligo Mycobacteria sistemi, solunum örneklerinden direkt olarak kullanım için de değerlendirilmiş ve genel duyarlılığı %76 (preparat pozitif örneklerden %93 ve preparat negatif örneklerden %56) ve özgüllüğü %99 olarak gösterilmiştir. Çalışma, testin özellikle preparat pozitif örneklerden mikobakterileri tespit etmek ve *M. tuberculosis* kompleksi ile TDM arasında ayırım yapmak için kolay ve hızlı bir alternatif olduğunu sonucuna varmıştır (124).

#### **b. Gene Xpert MTB/RIF testi (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD)**

GeneXpert MTB/RIF testi, *M. tuberculosis* ve RIF'e direnci tespit etmek için beş moleküler prob kullanarak basit bir şekilde çalışan kapalı bir sistem olan "mikrofluid" teknolojisini kullanır (125). Bu test ile RIF'e dirençle ilgili yalancı pozitiflik bildiren çalışmalar olduğu için, RIF'e duyarlılık sonucunun tekrarlayan örneklerle veya bir fenotipik ADT yöntemi ile teyit edilmesi tavsiye edilmektedir (126).

#### **c. cobas MTB-RIF/INH**

cobas MTB-RIF/INH, cobas 5800/6800/8800 sistemleri ile kullanılan otomatik, kalitatif in vitro tanı testidir ve gerçek zamanlı PZR kullanır. *Mycobacterium tuberculosis*'in *rpoB* genindeki rifampisin direnciyle ilişkili mutasyonları, *katG* ve *inhA* genlerindeki izoniyazid direnciyle ilişkili mutasyonları doğrudan tespit etmek için kullanılan gerçek zamanlı PZR testidir. Çok ilaca dirençli tüberküloz tanısına yardımcı olmak için tasarlanmıştır. Preparat pozitif örneklerde veya preparat negatif örneklerde ön işlem (NALC-NaOH) yapılmış veya yapılmamış balgam ve BAL örneklerinde kullanılabilir (127).

#### **d. Tüm Genom Dizileme Yöntemi (Whole Genome Sequencing)**

Nispeten küçük genom yapısı gereği *M. tuberculosis*, dizileme için oldukça uygundur. Özellikle filogenetik araştırmalarda, halk sağlığı uygulamalarında, epidemiyolojik araştırmalarda ve kapsamlı filyasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Geleneksel genotipleme

yöntemleri ile kıyaslandığında birden fazla suşa ait tam genom analizini yapabilmesi, suşlar hakkında çok daha fazla bilgiye ulaşılabilmesini sağlar. Ayrıca tüm genom verisi elde edildiği için suş ile ilgili direnç sebep olan mutasyonların tespiti de sağlanmış olur. Geleneksel tanı yöntemlerine göre çok daha hızlı şekilde sonuç almayı sağlayan bir yöntemdir (128).

### 2.6.2.2. Konvansiyonel Olmayan Yöntemler

#### a. Mikroskopik Gözleme Dayalı İlaç Duyarlılık Yöntemi (MODS)

Kültüre dayalı bir duyarlılık yöntemi olan MODS yönteminde her bir örnek için 12 kuyucuk kullanılır; bunların içinde, antitüberküloz ilaç içermeyen 4 kontrol kuyucuğu ve INH, RIF, etambutol ve streptomisin düşük ve yüksek kontrasyonlarından oluşan toplam 8 ilaç içeren kuyucuk bulunur. Sonuçlar her kuyucuğun invert mikroskopla incelenmesiyle değerlendirilir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin üremesi, “kord” adı verilen kümeleşmelerin varlığı ile belirlenir (129,130). Üremeyi ve birincil ilaçlara direnci hızlı tespit edebilmesi, özel bir besiyeri ihtiyacı olmaması ve malzemelerin farklı tedarikçilerden ucuza temin edilebilmesi gibi avantajlarına karşın plakların kullanımı ile ilgili güvenlik endişeleri, sınırlı kaynaklara sahip laboratuvarlarda invert mikroskop gibi araçların maliyeti yükseltmesi gibi nedenlerle kullanımı kısıtlanmaktadır (118).

#### b. Kolorimetrik Redoks Yöntemleri

Üremenin tespiti için redoks (indirgeme/oksidasyon) göstergelerinin kullanıldığı yöntemlerdir ve sıvı veya katı besiyerleri kullanılabilir ve oluşan renk değişikliklerine göre direnç belirlenir. Sıvı besiyerlerinin kullanılması, genellikle BACTEC MGIT 960 yöntemiyle benzer bir sonuç süresi sağlar. Kolorimetrik redoks yöntemi, BACTEC MGIT 960 olmayan veya manuel MGIT ADT yöntemini kullanmayan kaynakça sınırlı ortamlarda için iyi bir alternatif olabilir. Besiyeri ve reaktiflerin ticari kit olmaması maliyetleri azaltabilmektedir (131).

#### c. Nitrat Redüktaz Yöntemi

Nitrat redüktaz, *M. tuberculosis*'te bulunan bir enzimdir ve bu yöntem, bakterinin nitrat redüktaz aktivitesini tespit etmeye dayanır. Preparat pozitif solunum yolu örneklerinden doğrudan veya katı besiyerinde üremiş olan *M. tuberculosis* kolonilerinden uygulanabilir. Yöntem, bakterinin nitrat tuzlarını nitrite dönüştürme yeteneğine dayanır. İlk olarak, örnek

üzerine bir nitrat tuzu eklenir ve daha sonra bir reaktif (genellikle p-fenilendiamin) eklenir. Eğer bakteride nitrat redüktaz aktivitesi mevcut ise (canlı), nitrat tuzları nitrite dönüşecektir ve bu da reaktifin renk değiştirmesine neden olacaktır. Elde edilen renk değişikliği ile ilaç duyarlılığı değerlendirilir (132,133).

#### **d. Faj Temelli Yöntemler**

Fajlar, özel olarak tasarlanmış genetik yapıya sahip virüslerdir ve bakterilerin spesifik bölgelerini tanıyıp enfekte edebilirler. Bu yöntemde, klinik örneklerden veya kültürlerden alınan örnekler, fajlarla inkübe edilir. Eğer örneklerde *M. tuberculosis* varsa, fajlar tarafından enfekte edilirler, fajlar bakteri içinde çoğalmaya başlar ve belirli bir süre sonra gözle görülür bir etki oluşur. Faj-bazlı yöntemler, hızlı ve spesifik bir tespit sağlar ve bazı durumlarda geleneksel kültür yöntemlerinden daha hızlı sonuçlar elde etmeye olanak tanır. Ancak, bu yöntemlerin kullanımı için özel laboratuvar ekipmanları ve teknik bilgi gerekebilir (134).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Örneklerin seçimi ve deney hazırlığı**

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 09.09.2022 tarihinde Etik Kurul onayı alındıktan sonra (16 sayılı etik kurul kararı) çalışmaya başlanmıştır.

İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na (İTF) 2012-2022 yılları arasında gelen hastalara ait çeşitli örneklerden izole edilen 14 ve Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (AKVUAM) gönderilen 39 olmak üzere toplam 53 ÇİD suş çalışmaya dahil edilmiştir. AKVUAM'dan gelen suşlar için gereken resmi prosedür, biyolojik materyal transfer formu doldurulup taraflarca imzalanarak belgelenmiştir.

Tüm klinik örneklerin kültür ve duyarlılık deneyleri BACTEC™ MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson) sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Deney sürecinde yapılan tüm işlemler gerekli biyogüvenlik önlemleri alınarak ve iyi laboratuvar uygulamaları prensipleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Kalite kontrol amacıyla *M. tuberculosis* H37rv ATCC 27294 suşu kullanılmıştır.

Çalışmada İTF'de izole edilen suşlarla çalışılırken bu suşlara ait MGIT besiyerleri direkt olarak kullanılmıştır. AKVUAM'da izole edilen ve LJ besiyerinde gönderilen suşlar ise 37°C'de 2-3 hafta bekletilerek üreyen taze kültürleri kullanılmıştır.

Çalışmada üretici talimatlarına uygun şekilde:

- Her bir *M. tuberculosis* kompleksi suşunu **kompleks içi tür** düzeyinde tanımlamak için **GenoType® MTBC** (Hain Lifescience, Nehren, Almanya),
- Birincil ilaçlar, yani **izoniyazid** ve **rifampisine** direnci ve bu dirençlerden sorumlu mutasyonların meydana geldiği gen bölgelerini belirlemek için **GenoType® MTBDRplus VER 2.0** (Hain Lifescience, Nehren, Almanya),
- İkincil ilaçlardan **florokinolon** ve **aminoglikozid/siklik peptidlere** (kanamisin, amikasin, kapreomisin ve viomisin olmak üzere enjekte edilebilir antitüberküloz ilaçlar) direnci ve bu dirençlerden sorumlu mutasyonların meydana geldiği gen bölgelerini belirlemek için **GenoType® MTBDRsl VER 2.0** (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)

olmak üzere üç farklı ticari kit kullanılmıştır.

Her üç kit de benzer prosedürlere sahip olduğu için ve **DNA izolasyonu**, **Amplifikasyon** ve **Ters hibridizasyon** adımları sırasıyla uygulanmıştır.

### 3.2. DNA İzolasyonu

İzolasyon için FluoroLyse (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) nükleik asit izolasyon kiti kullanılmıştır. Bu izolasyon kitinin içeriği lizis tamponu (F-LYS, Lysis Buffer) ve nötralizasyon tamponu (F-NB, Neutralization Buffer) olmak üzere iki tampon solüsyonundan oluşmaktadır. Üretici yönergesine uygun şekilde aşağıda belirtilen adımlar takip edilmiştir:

- 1) İşleme alınacak örnek sayısına (analiz edilecek örnekler ve negatif kontrol dahil) göre gereken solüsyon miktarı belirlenmiş ve bir tüp içerisinde stok solüsyon hazırlanmıştır.

- 2) MGIT besiyerlerinden alınan 500 µl örnek, 1.5 ml'lik örnek tüpüne aktarılmış ve tüp uygun şekilde kapatılmıştır.
- 3) Örnek tüpleri 10.000 g'de 15 dakika santrifüjde çevrilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 4) Her örnek için 100 µl F-LYS, pellet ile vortekslenerek yeniden süspanse edilmiştir.
- 5) Örnek tüpleri, kapalı şekilde 95°C'deki ısı bloğunda beş dakika boyunca inkübe edilmiş ve ardından kısa süreli çevrilmiştir.
- 6) Daha sonra, örneğe 100 µl F-NB eklenerek beş saniye boyunca vortekslenmiştir.
- 7) Vorteksleme işleminden sonra, örnek tüpleri tam hızda beş dakika boyunca santrifüjde çevrilmiştir.
- 8) Elde edilen süpernatant iki farklı tüpe paylaştırılmıştır. Tüplerden bir tanesi PZR için hemen kullanılmak üzere +4°C'de, diğeri ise daha sonra ihtiyaç olması halinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Her çalışmada, olası kontaminasyonu tespit etmek için negatif kontrol kullanılmıştır. Negatif kontrol için 100 µl F-LYS solüsyonu boş bir örnek tüpüne alınmış ve normal örneklerle aynı şekilde işlenmiştir.

İzolasyon işleminin ardından amplifikasyon aşamasına geçilmiştir.

### 3.3. Amplifikasyon

Amplifikasyon için polimeraz enzimi ve primerler gibi gereken tüm reaktifler, her testin kendi kit içeriğinde sunulan ve yapılacak olan PZR için optimize halde olan "AM-A" ve "AM-B" karışımları içinde verilmiştir. Bu karışımlar -20°C'de saklandığı için işleme başlamadan önce oda sıcaklığında çözündürülerek sıvı hale gelmesi beklenmiştir. Çözülme sonrasında, AM-A ve AM-B tüpleri çevrilerek tüm içeriğin tüp dibine çökmesi sağlanıp, tüp içeriğinin homojenize olması için her bir tüp pipet kullanılarak karıştırılmıştır. Temiz oda olarak kullanılacak ayrı bir bölmede her bir PZR tüpüne aşağıda belirtilen miktarlarda AM-A ve AM-B çözeltileri aktarılmıştır. Ardından tüplerin kapakları kapatılarak üzerlerine içine DNA izolatu

eklenecek örneğin numarası yazılmıştır. DNA izolatlarının tüplere eklenmesi farklı bir ortamda, kişisel koruyucu ekipmanlar ile biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmıştır.

Her bir örnek için PZR tüpü içeriği son hacim 50 µl olacak şekilde:

– 10 µl AM-A

– 35 µl AM-B

– 5 µl DNA çözültüsü

Tüplerin kapaklarının tam kapandığından emin olunarak ısı bloğuna (thermal cycler) yerleştirilmiştir. Toplam döngü sayısı 32 olacak şekilde, cihazda her üç test için de aynı amplifikasyon profili kullanılmıştır (Tablo 3-1).

**Tablo 3-1: Uygulanan amplifikasyon profili.**

	<b>Döngü Sayısı</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>
<b>Ön-PZR</b>	1 döngü	95	15 dakika
<b>PZR</b>	10 döngü	95	30 saniye
		65	2 dakika
<b>PZR</b>	20 döngü	95	25 saniye
		50	40 saniye
		70	40 saniye
<b>Son Uzama</b>	1 döngü	70	8 dakika
<b>Isıtma hızı: ≤2.2°C/saniye</b>			

Yaklaşık 1 saat 46 dk süren amplifikasyon sonrası tüpler cihazdan çıkarılarak +4°C’de saklanmış, uzun süre kullanılmayacak olan PZR ürünleri ise ihtiyaç halinde daha sonra kullanılmak üzere -20°C’lik ortama kaldırılmıştır.

Amplifikasyon işleminin tamamlanmasından sonra hibridizasyon aşamasına geçilmiştir.

### 3.4. Hibridizasyon

Hibridizasyon aşamasında her üç test kitinde de bulunan ortak çözeltiler ve kullanılan cihazlar şunlardır:

- TwinCubator; GenoType testi için kullanılan bir cihazdır. Hibridizasyon işlemi için kontrol edilebilir ısıtma ve inkübasyon koşulları sağlar. TwinCubator, hassas sıcaklık kontrolü ve ısı dağılımının homojen olmasıyla, prob ve hedef DNA arasındaki hibridizasyon reaksiyonu için ideal koşulları sağlar.
- Spesifik probalarla kaplanmış membran şeritleri (strip)
- Denatürasyon çözeltisi (DEN); <2% NaOH ve boya içerir.
- Hibridizasyon tamponu (HYB); <10% noniyonik tensid ve boya içerir.
- Yoğun yıkama çözeltisi (STR); >25% kuaterner amonyum bileşiği, <1% noniyonik tensid ve boya içerir.
- Durulama çözeltisi (RIN); tampon, <1% NaCl, <1% noniyonik tensid içerir.
- Konjugat konsantresi (CON-C); streptavidin ile konjuge alkalin fosfat ve boya içerir.
- Konjugat tamponu (CON-D); tampon, 1% blokaj reaktifi, <1% NaCl içerir.
- Substrat konsantresi (SUB-C); <70% dimetil sülfoksit, <10% 4-nitro mavi tetrazolium klorür, <10% 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat içerir.
- Substrat tamponu (SUB-D); tampon, <1% MgCl<sub>2</sub>, <1% NaCl içerir.

Öncelikle hibridizasyonda kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığına getirilerek TwinCubator çalıştırılmıştır. HYB ve STR solüsyonları su banyosunda 40°C'ye kadar ısıtılmıştır. CON-C ve SUB-C konsantreleri uygun bir tüpe alınarak, ilgili tamponla (CON-C için CON-D, SUB-C için SUB-D) gereken miktarlarda iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığına getirilmiştir (her bir şerit için, 1 ml tampona 10 µl konsantre eklenerek 1:100 oranında

seyreltilmiştir). Böylelikle seyreltilmiş konjugat ve seyreltilmiş substrat çözeltileri elde edilmiştir. Ardından 12 kuyucuklu plastik plaklar kullanılmıştır.

- 1) Kullanılacak kuyucukların her birinin bir köşesine 20 µl DEN dağıtılmıştır.
- 2) DEN çözeltisine 20 µl amplifikasyon yapılmış örnek eklenmiş, iyi karıştırmak için pipetle yukarı ve aşağı hareket ettirilmiş ve oda sıcaklığında beş dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 3) Bu sırada, kit içeriğinde sunulan plastik penset kullanılarak şeritler tüpten alınmış ve bir kurşun kalemle numaralandırılmıştır. Şeritlerle çalışırken her zaman eldiven kullanılmıştır.
- 4) Her bir kuyucuğa dikkatlice 1 ml önceden ısıtılmış HYB tamponu eklenmiş ve plak elle hafifçe çalkalanarak kuyucuk içerisindeki çözeltinin homojen bir renk alması sağlanmıştır. Bu aşamada henüz bağlanma gerçekleşmediğinden olası kontaminasyon riskine karşı komşu kuyucuklara herhangi bir sıçrama olmamasına dikkat edilmiştir.
- 5) Her bir kuyucuğa bir şerit yerleştirilmiştir. Şeritler tamamen çözelti ile kaplanmış ve problemlerin bulunduğu yüzü (renkli işaret bulunan tarafı) yukarıya bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu esnada ters dönmüş olan şeritler varsa penset kullanılarak düzeltilmiştir. Her kullanımdan sonra çapraz kontaminasyonu önlemek adına pensetin temizlenmesine dikkat edilmiştir.
- 6) Plak TwinCubator'e yerleştirilerek 45°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 7) Her bir şeride 1 ml yoğun yıkama çözeltisi (STR) eklenmiş ve TwinCubator'de 45°C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu adımdan sonraki adımlarda oda sıcaklığında çalışılmıştır.
- 8) Yoğun yıkama çözeltisi (STR) tamamen dökülüp plak ters çevrilmiş ve kalan tüm sıvı bir emici kurutma kağıdı üzerine emdirilerek kuyucuklardaki sıvı boşaltılmıştır. (Bu adım diğer tüm yıkama adımları için benzer şekilde tekrarlanmıştır.)
- 9) Her bir şerit TwinCubator'de 1 ml RIN ile 1 dakika boyunca yıkanmış, sonrasında RIN dökülmüştür.

- 10) Her bir şeride başlangıçta hazırlanan seyreltilmiş konjugattan 1 ml eklenmiş ve TwinCubator'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 11) Konjugat çözeltisi boşaltılıp her bir şerit TwinCubator'de 1 ml durulama çözeltisi (RIN) ile iki kez 1 dakika, ardından 1 ml distile su ile bir kez 1 dakika yıkanmıştır. (her seferinde çözelti dökülmüştür).
- 12) Her bir şeride başlangıçta hazırlanan seyreltilmiş substrattan 1 ml eklenmiş ve çalkalama yapmadan karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
- 13) Reaksiyon bantları şerit üzerinde net bir şekilde görünür hale gelir gelmez, distile su ile iki kez durulayarak reaksiyon durdurulmuştur. (Bu süre ortalama 7-8 dakika sürmüştür fakat her seferinde değişebilmektedir)
- 14) Penset kullanarak şeritler kuyucuklardan çıkarılmış ve kurutma kağıdı arasına alınarak kurumaya bırakılmıştır.

Bu işlemlerin bitmesinin ardından değerlendirme aşamasına geçilmiştir.

### **3.5. Sonuçların değerlendirilmesi**

Kullanılan üç kitin de değerlendirme prosedürü benzerdir. Her üç test için de testin sonunda, üzerinde bantlar oluşan şeritler kit içeriğinde sunulan değerlendirme kağıdındaki ilgili örneğe ait yere yapıştırılmış, numaralandırılmış ve ışıktan korunacak şekilde saklanmıştır. Şeritler yapıştırılırken her kit için belirtilmiş referans kontrol bantlarının değerlendirme kağıdındaki ilgili yerlere hizalandırılmasına dikkat edilmiştir. Kit beraberinde sunulan kılavuz şablon kart yardımıyla her şerit ayrı ayrı değerlendirilerek pozitif bantlara ait reaksiyon bölgeleri belirlenmiş ve değerlendirme kağıdındaki ilgili kutucuklara not edilmiştir.

Öncelikle suşların kompleks içi tür düzeyinde tanımlanması amacıyla GenoType MTBC testi yapılmış ve sonuçları değerlendirilmiştir. İlgili türe ait spesifik propların bulunduğu şeritler değerlendirilmiş ve pozitif bantlar not edilmiştir.





#### 4. BULGULAR

Toplam 53 suş GenoType® MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) kiti kullanılarak tanımlanmıştır. İki suşun ilgili prob bölgelerinde bant oluşumu gözlenmediğinden bu suşların *Mycobacterium* cinsi olmadığı sonucuna varılmış ve bu suşlar direnç çalışmalarına dahil edilmemiştir. Elde edilen sonuçlara göre *M. tuberculosis* kompleksi olan 51 suşun 51 (%100)'i de GenoType® MTBC ile *M. tuberculosis/canettii* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen suşların tamamının identifikasyon ve duyarlılık testleri MGIT sistemi ile belirlenmiştir ve bu bilgilere göre ÇİD oldukları kabul edilmiştir.

Tanımlama işleminin ardından RIF ve INH'a direnç profilinin ve bu dirençlere neden olan genetik mutasyon bölgelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) ile 51 suşun dördünde (%7,8) RIF veya INH'a dirençten herhangi biri tespit edilmemiştir. Farklı olarak iki (%3,9) suшта yalnızca RIF'e direnç, bir (%1,9) suшта ise yalnızca INH'a direnç saptanmıştır. Kalan 44 (%86,3) suş INH+RIF'e dirençli bulunmuştur (ÇİD).

Rifampine dirençli bulunan suşlarda mutasyon en sık *rpoB* S531L (41/44, %93,2) olarak saptanmıştır. Bir suшта (1/44, %2,2) *rpoB* H526D mutasyonu tespit edilmiş ve kalan iki suş (2/44, %4,5) ise WT bandı bulunmaması mutasyonu gösterdiğinden RIF'e dirençli olarak kabul edilmiştir (Tablo 4-1).

*katG* ve *inhA* genleri için WT bandının kaybı daima bir MUT bandı varlığı ile birlikte saptanmıştır. Bu sayede her dirençli suşa ait bir veya daha fazla mutasyon tespit edilebilmiştir. Çok ilaca dirençli 44 suş içinde INH'a direnç oluşturan tüm mutasyonlar değerlendirildiğinde en sık mutasyonun (37/44, %84,1) *katG* S315T olduğu belirlenmiştir. Her bir suşun bant profili incelendiğinde 24 suшта (%54,5) *katG* S315T, 13 suшта (%29,5) *katG* S315T ile birlikte *inhA* C-15T, beş suшта (%11,4) *inhA* C-15T, iki suшта (%4,5) *inhA* T-8A direnç profili saptanmıştır (Tablo 4-2).

**Tablo 4-1: Rifampine dirençle ilişkili hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRplus)**

Hedef gen	Bant Profili	İlgili Kodonlar	Mutasyon Bölgesi	Suş Sayısı
<i>rpoB</i>	$\Delta$ WT7, MUT2B	526-529	H526D	1 (%2,2)
<i>rpoB</i>	$\Delta$ WT8, MUT3	530-533	S531L	41 (%93,2)
<i>rpoB</i>	$\Delta$ WT7	526-529	-	1 (%2,2)
<i>rpoB</i>	$\Delta$ WT8	530-533	-	1 (%2,2)
<b>Toplam ÇİD suş</b>				<b>n=44 (%100)</b>

$\Delta$ : kayıp bant

**Tablo 4-2: İzoniyaide dirençle ilişkili hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRplus)**

Hedef gen	Bant Profili	İlgili Kodon veya Nükleik Asit Pozisyonu	Mutasyon Bölgesi	Suş Sayısı
<i>katG</i>	$\Delta$ WT, MUT1	315	S315T	24 (%54,5)
<i>inhA</i>	$\Delta$ WT1, MUT1	-15	C-15T	5 (%11,4)
<i>inhA</i>	$\Delta$ WT2, MUT3B	-8	T-8A	2 (%4,5)
<i>katG</i>	$\Delta$ WT, MUT1	315	S315T	13 (%29,5)
<i>inhA</i>	$\Delta$ WT1, MUT1	-15	C-15T	
<b>Toplam ÇİD suş</b>				<b>n=44 (%100)</b>

$\Delta$ : kayıp bant

MTBDRsl kiti ile suşların sekonder ilaçlardan FLK'a direnci değerlendirildiğinde, 44 suşun sekizinde (%18,2) direnç saptanmıştır. Bu dirence neden olan mutasyonların, suşların dördünde (4/8, %50) *gyrA* A90V, birinde (1/8, %12,5) *gyrA* D94G olduğu belirlenmiştir.

Kalan üç suş (3/8, %37,5), MUT bandı oluşmamasına rağmen WT bandı kaybı dolayısıyla dirençli olarak kabul edilmiştir. (Tablo 4-3).

Parenteral ilaçlara direnç değerlendirildiğinde toplam altı suş (6/44, %13,6), en az bir parenteral ilaca (KAN, AMK, CAP, VIO) dirençli bulunmuştur. Bu suşların dördünde (%66,6) *rrs* genine ait WT1 bandı kaybı ile MUT1 bandı oluşması (A1401G mutasyonu), KAN/AMK/CAP'e direnç olarak değerlendirilmiştir. Bir suşta (1/6, %16,6) sadece *rrs* WT1 bandı kaybı sebebiyle KAN/CAP/VIO'e direnç saptanmıştır. *eis* geni ile ilişkili sadece bir suşta (1/6, %16,6) WT2 kaybı dolayısıyla düşük düzey KAN direnci saptanmıştır (Tablo 4-4).

Tüm suşlar değerlendirildiğinde 44 suşun 14 (%31,8)'ü öncül yaygın ilaca dirençli (Pre-YİD) suşlar olarak saptanmıştır. Bu suşlardan sekizi INH + RIF + FLK'a ve altısı INH + RIF + parenteral ilaca dirençli bulunmuştur.

**Tablo 4-3: Florokinolonlara direnç ile ilişkili hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRsl)**

Hedef gen	Bant Profili	Mutasyon	Suş Sayısı
<i>gyrA</i>	ΔWT2, MUT1	A90V	4 (%50)
<i>gyrA</i>	ΔWT2	-	1 (%12,5)
<i>gyrA</i>	ΔWT3, MUT3C	D94G	1 (%12,5)
<i>gyrA</i>	ΔWT3	-	1 (%12,5)
<i>gyrB</i>	ΔWT	-	1 (%12,5)
<i>gyrB</i>	ΔWT	-	1 (%12,5)
<b>Toplam florokinolona dirençli ÇİD suş</b>			<b>n=8 (%100)</b>

Δ: kayıp bant

Tüm suşlar ele alındığında hiçbirinde heterodirenci düşündürecek şekilde WT bandı ve ilgili kodona ait MUT bantları birlikte oluşmamıştır.

Yedi suş MTBDRplus sonucuna göre ÇİD olmadığı halde, dördünde MTBDRsl kiti ile ikincil ilaçlara direnç saptanmıştır. Bu dört suştan ikisi hem RIF hem INH'a duyarlı bulunmasına rağmen, birinde FLK diğerinde KAN/AMK/CAP'e direnç saptanmıştır. Rifampine dirençli INH'a duyarlı diğer iki suş ise FLK'a dirençli bulunmuştur (Tablo 4-5).

**Tablo 4-4: Parenteral ilaçlara direnç saptanan suşlarda hedef gen ve mutasyon bölgeleri. (MTBDRsl)**

Hedef gen	Bant Profili	Mutasyon	Direnç Profili	Suş Sayısı
<i>rrs</i>	ΔWT1, MUT1	A1401G	KAN, AMK, CAP	4 (%66,6)
<i>rrs</i>	ΔWT1	-	KAN, CAP, VIO	1 (%16,6)
<i>eis</i>	ΔWT2	-	Düşük düzey KAN	1 (%16,6)
<b>Toplam parenteral ilaçlara dirençli ÇİD suş</b>				<b>n=6 (%100)</b>

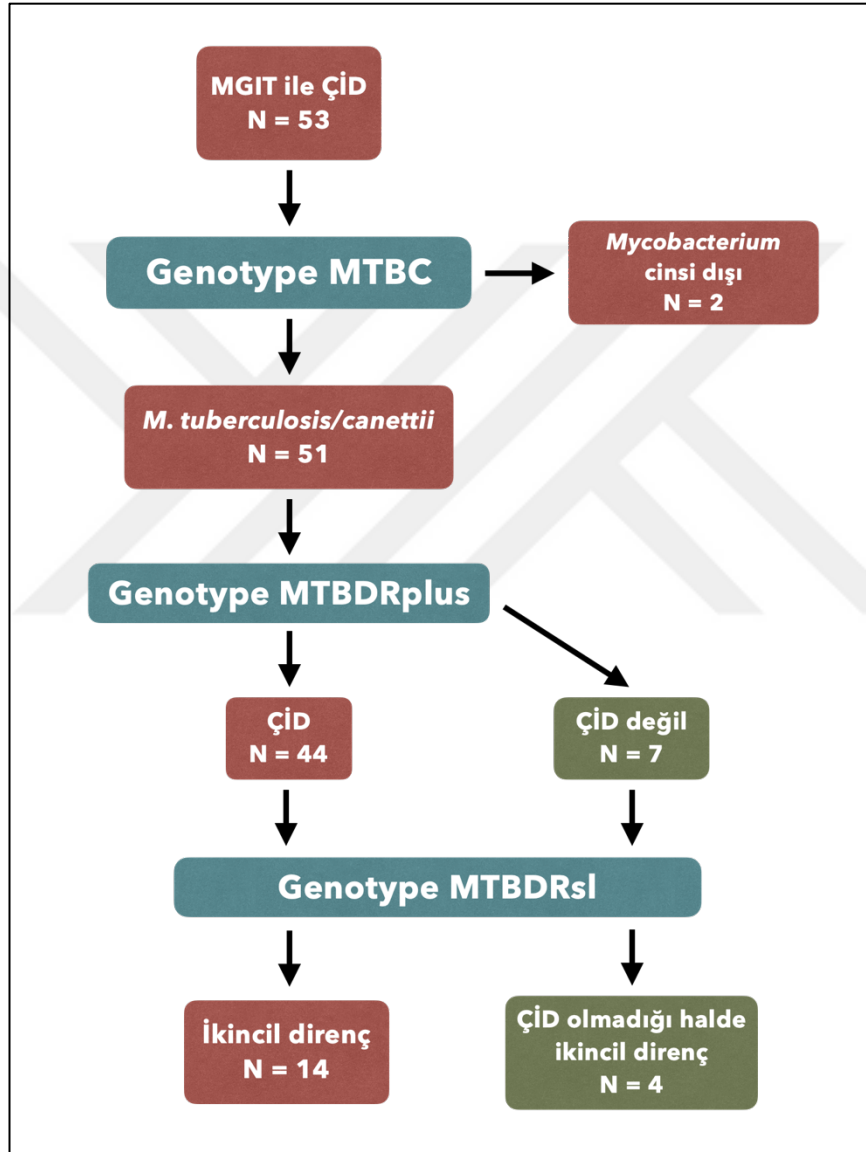
Δ: kayıp bant

**Tablo 4-5: ÇİD olmadığı halde ikincil ilaçlara direnç saptanan suşlar ve dirençle ilişkili mutasyonlar. (MTBDRplus ve MTBDRsl)**

Suş No.	RIF	INH	FLK	ENJ
17	<b>Di</b> <i>rpoB</i> S531L	Du	<b>Di</b> <i>gyrA</i> D94N veya D94Y	Du
22	<b>Di</b> <i>rpoB</i> S531L	Du	<b>Di</b> <i>gyrA</i> D94A	Du
24	Du	Du	Du	<b>Di</b> (KAN/AMK/CAP) <i>rrs</i> A1401G
26	Du	Du	<b>Di</b> <i>gyrA</i> D94G	Du

Du: Duyarlı, Di: Dirençli, ENJ: parenteral ilaçlar

*rpoB* genine ait iki, *gyrA*'ya ait üç, *rrs*'ye ait bir, *eis*'e ait bir adet olmak üzere, tüm suşların toplam 7 (%13,7)'sinde MUT bandı oluşmaksızın WT bandı kaybı görülmüştür. Hiçbir suşta aynı anda birden fazla ikincil ilaca direnç saptanmadığından 44 ÇİD suş içinde yaygın ilaca dirençli (YİD) suş olmadığı belirlenmiştir. Deneyin akış şeması Şekil 4-1, suşların tümüne ait direnç sonuçları Tablo 4-6, MTBDRplus kiti ile ilgili sonuçlar Tablo 4-7, MTBDRsl ile ilgili sonuçlar Tablo 4-8'de verilmiştir.



Şekil 4-1. Deneyin akış şeması.

Tablo 4-6. Suşların tümünde MGIT, MTBDRplus ve MTBDRsl yöntemleriyle elde edilen direnç sonuçları.

Suş	MGIT				MTBDRplus		MTBDRsl				
	S	I	R	E	INH	RIF	FLK	KAC	KCV	KACV	LOWK
1	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
2	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
3	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Di
4	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
5	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
6	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
7	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
8	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
9	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
10	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
11	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
12	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
13	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
14	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
15	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du
16	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
17	Du	Di	Di	Du	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du
18	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du
19	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
20	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
21	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
22	Du	Di	Di	Du	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du
23	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
24	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Di	Du	Du	Du
25	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du

KAC: KAN/AMK/CAP, KCV: KAN/CAP/VIO, KACV: KAN/AMK/CAP/VIO, LOWK: Düşük düzey KAN, Di: Dirençli, Du: Duyarlı.

Yeşil fon: INH ve/veya RIF'e duyarlı suşlar (MTBDRplus ile).

Pembe fon: İkincil ilaçlara dirençli suşlar.

Tablo 4-6: (devamı)

Suş	MGIT				MTBDRplus		MTBDRsl				
	S	I	R	E	INH	RIF	FLK	KAC	KCV	KACV	LOWK
26	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Di	Du	Du	Du	Du
27	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
28	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
29	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
30	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du
31	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
32	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Di	Du	Du
33	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
34	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
35	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
36	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
37	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
38	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
39	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
40	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
41	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
42	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
43	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
44	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
45	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
46	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du
47	Di	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du
48	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
49	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du
50	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du
51	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du

Tablo 4-7: Suşların RIF ve INH'a direnç profilleri (MTBDRplus).

Suş	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> WT1	<i>rpoB</i> WT2	<i>rpoB</i> WT3	<i>rpoB</i> WT4	<i>rpoB</i> WT5	<i>rpoB</i> WT6	<i>rpoB</i> WT7	<i>rpoB</i> WT8	<i>rpoB</i> MUT1	<i>rpoB</i> MUT2A	<i>rpoB</i> MUT2B	<i>rpoB</i> MUT3	<i>katG</i>	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT1	<i>katG</i> MUT2	<i>inhA</i>	<i>inhA</i> WT1	<i>inhA</i> WT2	<i>inhA</i> MUT1	<i>inhA</i> MUT2	<i>inhA</i> MUT3A	<i>inhA</i> MUT3B	RIF direnci	INH direnci
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
23	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+

“+”: bant oluşumu/pozitif, “-”: kayıp bant/negatif. İzoniyazid ve/veya rifampine duyarlı suşlar yeşil fon ile belirtilmiştir.

Tablo 4-7: (devamı)

Suş	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> WT1	<i>rpoB</i> WT2	<i>rpoB</i> WT3	<i>rpoB</i> WT4	<i>rpoB</i> WT5	<i>rpoB</i> WT6	<i>rpoB</i> WT7	<i>rpoB</i> WT8	<i>rpoB</i> MUT1	<i>rpoB</i> MUT2A	<i>rpoB</i> MUT2B	<i>rpoB</i> MUT3	<i>katG</i>	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT1	<i>katG</i> MUT2	<i>inhA</i>	<i>inhA</i> WT1	<i>inhA</i> WT2	<i>inhA</i> MUT1	<i>inhA</i> MUT2	<i>inhA</i> MUT3A	<i>inhA</i> MUT3B	RIF-TB	INH-TB
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
39	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
40	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
41	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
42	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
43	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
44	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
46	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
49	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
51	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+

Tablo 4-8: Suşların ikincil ilaçlara direnç profilleri (MTBDRsl).

Suş	<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> WT1	<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT1	<i>gyrA</i> MUT2	<i>gyrA</i> MUT3A	<i>gyrA</i> MUT3B	<i>gyrA</i> MUT3C	<i>gyrA</i> MUT3D	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	<i>gyrB</i> MUT2	<i>rrs</i>	<i>rrs</i> WT1	<i>rrs</i> WT2	<i>rrs</i> MUT1	<i>rrs</i> MUT2	<i>eis</i>	<i>eis</i> WT1	<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> WT3	<i>eis</i> MUT1	FLK	KAN/AMK/CAP	KAN/CAP/VIO	KAN/AMK/CAP/VIO	low-level KAN
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	
16	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
17	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	
19	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
20	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	

Dirençle ilişkili bantlar pembe fon ile belirtilmiştir. “+”: bant oluşumu/pozitif, “-”: kayıp bant/negatif.

Tablo 4-8: (devami)

Sus	<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> WT1	<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT1	<i>gyrA</i> MUT2	<i>gyrA</i> MUT3A	<i>gyrA</i> MUT3B	<i>gyrA</i> MUT3C	<i>gyrA</i> MUT3D	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	<i>gyrB</i> MUT2	<i>rrs</i>	<i>rrs</i> WT1	<i>rrs</i> WT2	<i>rrs</i> MUT1	<i>rrs</i> MUT2	<i>eis</i>	<i>eis</i> WT1	<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> WT3	<i>eis</i> MUT1	FLK	KAN/AMK/CAP	KAN/CAP/VIO	KAN/AMK/CAP/VIO	low-level KAN
21	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
22	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
23	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
25	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
26	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
27	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
29	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
31	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
33	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
37	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
38	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
39	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tablo 4-8: (devami)

Sus	<i>gyrA</i>										<i>gyrB</i>				<i>rrs</i>				<i>eis</i>					Resistance				
	<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> WT1	<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT1	<i>gyrA</i> MUT2	<i>gyrA</i> MUT3A	<i>gyrA</i> MUT3B	<i>gyrA</i> MUT3C	<i>gyrA</i> MUT3D	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	<i>gyrB</i> MUT2	<i>rrs</i>	<i>rrs</i> WT1	<i>rrs</i> WT2	<i>rrs</i> MUT1	<i>rrs</i> MUT2	<i>eis</i>	<i>eis</i> WT1	<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> WT3	<i>eis</i> MUT1	FLK	KAN/AMK/CAP	KAN/CAP/VIO	KAN/AMK/CAP/VIO
41	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
42	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
45	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
46	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
47	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
49	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
51	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

## 5. TARTIŞMA

*Mycobacterium tuberculosis* kompleksi; *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium mungi* (25) ve *Mycobacterium orygis* (26) olmak üzere genetik olarak birbirine çok benzeyen kompleks üyelerinden oluşur. Afrika'nın bazı bölgeleri hariç, dünya genelinde insanlarda hastalık yapan en yaygın üyesi *M. tuberculosis*'dir. Afrika'da ise *M. africanum* görülebilmektedir (135). Bu türlerin konakları, patojeniteleri, coğrafi dağılımları ve ilaç dirençleri değişiklik gösterebildiğinden halk sağlığına olan etkileri de farklıdır (136).

Dünyanın pek çok bölgesinde kompleks içi türlerin tanımlanmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, Neonakis ve ark., 120 *M. tuberculosis* kompleksi suşunu GenoType MTBC kitiyle tanımlamış, 119 (%99,1)'unun *M. tuberculosis* olduğunu tespit etmiş, kalan bir suşu ise *M. bovis* olarak tanımlamıştır (137).

Richter ve ark., BACTEC MGIT sistemi ile izole edilen 75 *M. tuberculosis* kompleksi suşunu GenoType MTBC ile değerlendirmiş, 71 (%94,6)'inin *M. tuberculosis*, üçünün (%4) *M. bovis* subsp. *bovis*, bir suşun ise (%1,3) *M. africanum* subtip I olduğunu saptamışlardır (138).

Addo ve ark., Gana'da yaptıkları çalışmada 165 *M. tuberculosis* kompleksi suşunu GenoType MTBC kiti kullanarak tür düzeyinde tanımlamışlar ve 161 (%97,6) suşun *M. tuberculosis*, kalan dört suşun ise (%2,4) *M. africanum* olduğunu bildirmişlerdir (139).

Bayraktar ve ark., İstanbul'da 2007-2010 yılları arasında izole ettikleri 188 *M. tuberculosis* kompleksi suşunu *hsp65* PZR-"restriction fragment length polymorphism" (RFLP) yöntemiyle kompleks içi tür düzeyinde *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. caprae* olarak tanımlamışlardır. Tanımlanan suşların oranları sırasıyla %94.1, %4.3 ve %1.6 olarak bulunmuştur (140).

Öztürk ve ark., Düzce'de yaptıkları çalışmada 2004 – 2014 yılları arasında 220 hastadan izole edilen *M. tuberculosis* kompleksi suşlarını GenoType MTBC ile tür düzeyinde tanımlayarak, 217 (%98,6)'sinin *M. tuberculosis*/*M. canettii*, üçünün (%1,4) *M. bovis* olduğunu belirtmişlerdir. *M. bovis* olarak tanımlanan suşların tamamı son üç yıla ait olduğunu, 2004 – 2011 yılları arasında izole edilen suşların tamamının ise *M. tuberculosis*/*M. canettii* olduğunu bildirmişlerdir (141).

Çavuşoğlu ve Yılmaz'ın İzmir'de yaptığı çalışmada 2009 – 2014 yılları arasında izole edilen 482 *M. tuberculosis* kompleksi suşunun 13 (%2,7)'ünü GenoType MTBC ve spoligotipleme ile *M. bovis* olarak tanımlanmıştır (142).

Ağaçayak ve ark., Elazığ'daki 44 *M. tuberculosis* kompleksi suşunu PZR-RFLP yöntemiyle identifiye etmiş, 34 suşu (%77,3) *M. tuberculosis*, sekiz suşu (%18,2) *M. bovis*, bir suşu (%2,3) *M. microti* ve bir suşu (%2,3) *M. africanum* olarak tespit etmişlerdir (143).

Bu çalışmada ÇİD olarak saptanan *M. tuberculosis* kompleksi suşlarının tamamı (%100) GenoType MTBC kiti ile *M. tuberculosis/M. canettii* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur ancak yayınlarda da görüldüğü gibi ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar mevcuttur.

Konvansiyonel yöntemler tüm dünyada altın standart olarak kabul edilmektedir ancak moleküler yöntemler de hızlı tanıda önemini korumaktadır. Bu nedenle moleküler yöntemlerin konvansiyonel yöntemlerle uyumunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır.

Anek-vorapong ve ark., BACTEC MGIT 960 yöntemi kullanılarak INH'a dirençli olduğu saptanan 43 *M. tuberculosis* suşunun 41(%95,3)'ini MTBDRplus ile INH'a dirençli, ikisini (%4,6) INH'a duyarlı olarak saptamıştır. Rifampine dirençli 25 suşun tamamı MTBDRplus ile de dirençli olarak tespit edilmiştir (144).

Maningi ve ark., MGIT yöntemiyle 97 *M. tuberculosis* suşunun 53 (%54,6)'ünü, MTBDRplus ile 40 (%41,2)'ini ÇİD olarak tanımlanmıştır (145).

Abanda ve ark., MGIT ile ÇİD olarak tanımlanan 49 suşun 46 (%93,9)'sını MTBDRplus ile ÇİD olarak tanımlanmıştır (146).

Meaza ve ark., yaptıkları çalışmada MGIT ile ÇİD bulunan 28 suşun 27 (%96,4)'si MTBDRplus ile ÇİD olarak saptanmıştır (147).

Cauwelaert ve ark., LJ'de %1 proporsiyon yöntemi ile ÇİD olarak tanımladıkları 40 suşun 33'ünü (%82,5) MTBDRplus ile ÇİD olarak bildirmişlerdir (148).

Kebede ve ark., fenotipik yöntemle ÇİD olarak belirlenen 49 suşun 48'ini (%97,9) MTBDRplus ile ÇİD olarak tespit etmişlerdir (149).

Bu çalışmada MGIT 960 ile ÇİD olduğu belirlenen 51 suşun 44 (%86,3)'ü MTBDRplus ile ÇİD olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemler bu çalışmada ve diğer çalışmalarda da görüldüğü gibi direncin saptanmasında daha yüksek duyarlılığa sahiptir ancak moleküler yöntemler, özellikle riskli hastalarda hızlı sonuç alma açısından önemlidir.

Etkin bir tedavi için hastadan izole edilen bakterinin doğru tanımlanması ve uygulanacak tedavinin antitüberküloz duyarlılık testi sonucuna göre düzenlenmesi gerekir. Direnç ve dirence neden olan mutasyonların belirlenmesi yeni teknolojilerin geliştirilmesine katkı sağlarken, öte yandan epidemiyolojik açıdan ulusal ve uluslararası düzeyde değer taşımaktadır.

Son yıllarda kullanımı giderek yaygınlaşan moleküler yöntemler, antitüberküloz ilaçlara karşı direncin hızlı bir şekilde tespit edilmesini ve tedaviye hızla başlanmasını sağlamaktadır. Bu testler, mikobakterilere özgü nükleik asit dizisinin belirlenebilir seviyeye kadar çoğaltılması esasına dayanan nükleik asit amplifikasyonu temelli testlerdir (150).

Javed ve ark., Pakistan'da yaptığı çalışmada LJ besiyerinde %1 proporsiyon yöntemi ile belirledikleri 100 ÇİD suşunu MTBDRplus ile incelemişler, suşların %66'sında INH'a direncin *katG* mutasyonu (en sık S315T) ile ilgili olduğunu belirlemişler, %34'ünde ise *katG* mutasyonuna rastlamamışlardır. On suşta (%10) gözlenen *inhA* promoter bölge mutasyonları ise C-15T (*inhA* MUT1, 10 suş) ve T-8C (*inhA* MUT3A, iki suş) olarak saptanmıştır (151).

Abanda ve ark., 49 ÇİD suşta MTBDRplus ile tespit edilebilen mutasyonları, *rpoB* S531L (41/49, %83,7), *katG* S315T1 (30/49, %61,2), *inhA* C15T (17/49, %34,7) olarak bildirmişlerdir. Bir suşta INH'a direnç aynı anda iki farklı mutasyonla (*katG* S315T1 + *inhA* T8C) ortaya çıkmıştır (146).

Maningi ve ark., MTBDRplus ile yaptıkları çalışmada 97 *M. tuberculosis* suşunu değerlendirmişler, *rpoB*'de en sık S531L (46/97, %47,4) mutasyonunu saptamışlardır. *rpoB*'de görülen diğer mutasyonlar, D516V (27/97, %27,8), H526Y (7/97, %7,2), H526D (3/97, %3,1)'dir. İzonyazide dirençten sorumlu mutasyonlar incelendiğinde *katG* S315T1 (32/97, %33), *inhA* C15T (14/97, %14,4), *katG* T8A (8/97, %8,2) olarak bildirilmiştir (145).

Alelign ve ark., 20 *M. tuberculosis* suşunu MTBDRplus ile değerlendirmişler, INH'a dirençli 20 suşun 12'sinde (12/20, %60) WT bandı kaybı ile *katG* MUT1 mutasyonu, ikisinde (2/20, %10) WT bandı varlığı ile birlikte *katG* MUT1 mutasyonu tespit etmişler ve bu durumu

heterodirenç olarak bildirmişler; *inhA*'da mutasyon tespit etmemişlerdir. Rifampine dirençli iki suşun ikisinde de MUT bandı olmaksızın *rpoB* WT7 kaybı bildirmişlerdir (152).

Gashaw ve ark., Etiyopya'da yaptıkları çalışmada MTBDRplus ile değerlendirilen 95 *M. tuberculosis* kompleksi suşunun %6,3'ünü (6/95) sadece RIF'e dirençli, %2'sini (2/95) sadece INH'a dirençli ve %8,4'ünü (8/95) ÇİD olarak tanımlamışlardır. Rifampine dirençli saptanan 14 suş içinde en sık direnç paternini suşların %71,4 (10/14)'ünde görülen WT8 bandı kaybı olarak tespit etmişlerdir. Bu suşların hiçbirinde MUT bandı oluşumu saptanmamıştır. İzonyazide dirençli 12 suşun %66,7'sinde (8/12) WT bandı kaybı kaynaklı *katG* mutasyonu belirlemiş, iki suşa ise *katG* S315T1 mutasyonu tespit etmişlerdir (153).

Bedewi ve ark., aktif tüberküloz hastalarından alından 279 suş ile yaptıkları çalışmada MTBDRplus ile RIF'e dirençli bulunan dokuz suşun üçünde (%33,3) *rpoB* S531L, ikisinde (%22,2) H536Y mutasyonu saptamışlardır. Kalan dört (%44,4) RIF'e dirençli suşa MUT bandı oluşmadan sadece *rpoB* WT8 bandı kaybı gözlenmiştir. İzonyazide dirençli suşlarda görülen mutasyonlar *katG* S315T1 mutasyonu (22/25, %88) ve *inhA* C15T mutasyonu (2/25, %8) olarak saptanmış, bir suşa MUT bandı oluşmadan sadece *inhA* WT2 bandı kaybı gözlenmiştir (154).

Addo ve ark., *M. tuberculosis* kompleksi suşlarını MTBDRplus ile değerlendirdikleri çalışmada, 18 suş sadece INH'a dirençli, iki suş sadece RIF'e dirençli, 11 suş ise ÇİD olarak saptanmıştır. Sadece RIF'e dirençli suşlardan bir tanesinde MUT bandı oluşmadan WT8 kaybı, diğerinde ise WT kaybı olmadan sadece MUT3 (S531L) mutasyonu gözlenmiştir. Sadece INH'a dirençli suşlarda görülen mutasyonlar ise *katG* S315T1 (14/18, %77,8) ve *inhA* C15T (4/18, %22,2) olarak saptanmıştır. Çok ilaca dirençli suşlarda en sık görülen mutasyonlar *rpoB* D516V (6/11 %54,5), *katG* S315T1 (10/11, %90,9) ve *inhA* T8C (6/11, %54,5). *rpoB* geninde az sayıda görülen diğer mutasyonlar ise bir suşa saptanan S531L (1/11, %9,1) ve üç suşa saptanan H526Y (%27,3) mutasyonlarıdır (139).

Cauwelaert ve ark., 297 balgam örneğinde MTBDRplus kullanarak dirençle ilgili mutasyon bölgelerini araştırmışlardır. Rifampine dirençli olduğu belirlenen 51 suşun 28 (%60,8)'inde *rpoB* S531L mutasyonu, altısında (%11,7) sadece WT8 kaybı görülmüş; üç suşa (%5,9) *rpoB* H526Y mutasyonu saptanmıştır. Bir suşa (1/51, %1,9) iki mutasyon birlikte (*rpoB* H526Y + *rpoB* S531L) görülmüştür. INH'a dirençli olduğu belirlenen 59 suşun 43 (%72,9)'ünde *katG* S315T mutasyonu, 12 (%20,3)'sinde *inhA* C15T promoter bölge mutasyonu saptanmıştır. İki suşa (%3,4) *katG* WT bandı ile birlikte MUT1 bandı, bir suşa (%1,7) *katG* S315T ve *inhA*

C15T mutasyonu birlikte görülmüştür. Üç suşta (%5,1) INH'a direnç, MUT bandı olmadan sadece *katG* WT bandı kaybı ile gözlenmiştir. (148).

Meaza ve ark., ÇİD suşlarla yaptıkları çalışmada MTBDRplus ile değerlendirilen 35 suştan 27 (%77,1)'sinde *rpoB* S531L mutasyonu, 28 (%80) suşta ise *katG* S315TL mutasyonu bildirmişlerdir. Bir suşta (%2,8) *inhA* C15T ve A16G mutasyonları birlikte saptanmıştır (147).

Kebede ve ark., Etiyopya'da yaptıkları bir çalışmada MTBDRplus ile 49 suşta saptanan *rpoB* mutasyonlarını sıklık sırasına göre S531L (40/49, %81,6), H526Y (4/49, %8,16) ve D516V (1/49, %2) olarak belirlemişlerdir. Üç suşta (%6,2) MTBDRplus ile herhangi bir *rpoB* mutasyonu saptamamışlar fakat WT3, WT4 ve WT7 kaybı nedeniyle RIF'e dirençli olarak bildirmişlerdir. MTBDRplus ile INH'a dirençli 52 örneğin tamamında (%100) S315T1 *katG* mutasyonu ile birlikte *katG* 315 numaralı kodonda WT kaybı saptamışlar, hiçbir suşta *inhA* promoter bölge mutasyonu tespit etmemişlerdir (149).

Yıldırım Servi ve Uzun yaptıkları çalışmada BACTEC 460 TB sistemiyle ÇİD olarak belirlenen 25 suşa ait *rpoB* mutasyon profilini MTBDRplus ile incelemiştir ve en sık S531L (13/25, %52), ardından H526Y (4/25 %16), H526D (1/25 %4) ve D516V (1/25, %4) mutasyonlarını saptamışlardır. Bir suş (1/25, %4) BACTEC 460 ile RIF'e dirençli olmasına rağmen MTBDRplus ile bir mutasyon tespit edilmemiştir (155).

Singhal ve ark., 366 ÇİD suşuna ait mutasyonları MTBDRplus ile değerlendirmişler, RIF'e dirençle ilgili *rpoB* geninde saptanan en yaygın mutasyonları S531L (231/366, %63,1), D516V (29/366, %7,9), H526Y (20/366, %5,5) olarak bildirmişlerdir. Suşların %20,7 (76/366)'sindeki direnç herhangi bir MUT bandı oluşmadan WT bandı kaybı ile meydana gelmiş, dört suşta ise (4/366, %1,1) çift mutasyon bandı saptanmıştır. İzonyazide dirençle ilişkili tespit edilen en yaygın mutasyonlar *katG* S315T1 (337/366, %92,1) ve *inhA* C15T (25/366, %6,8)'dir. *katG* mutasyonlarından 14 (14/356, %3,9)'ü, *inhA* mutasyonlarından dördü (4/33, %12,1), MUT bandı oluşmadan WT bandı kaybı şeklinde tespit edilmiştir (156).

Yıldırım ve Uzun yaptıkları çalışmada 25 ÇİD suşun 14 (%56)'ünde *katG* S315T1, üçünde (%12) *inhA* C15T promoter bölge mutasyonu saptamışlardır (157).

Vietnam'da yapılan bir DNA dizileme çalışmasında RIF'e dirençli suşların %20,3'ünde kodon 490'de yeni mutasyonlar tespit edilmiştir (158).

Bu çalışmada ÇİD suşlarda en sık karşılaştığımız mutasyon, diğer çalışmalarla uyumlu olarak WT8 bandı kaybı ve MUT3 bandı oluşumuyla saptanan *rpoB* S531L mutasyonudur (41/44, %93,2). Bir suшта (1/44, %2,2) WT7 bandı kaybı ile beraber MUT2B bandı oluşumu, *rpoB* H526D mutasyonu olduğunu göstermiştir. İzonyazid direncine sebep olan tüm mutasyonlar ele alındığında en sık görülen mutasyonlar *katG* S315T (37/44, %84) ve *katG* C-15T (18/44, %41) olarak bulunmuştur ve bu sonuç diğer çalışmalarla uyumludur (159,160). Bazı çalışmalarda bulunan farklı sonuçların sebepleri; coğrafi olarak o bölgede hastalığa sebep olan dirençli suşların ülkemizdeki suşlardan farklı mutasyonlara sahip olmaları, hastaların tedaviye uyumu, çalışmaların yapıldığı zaman diliminin farklı olması nedeniyle direnç profillerinin zaman içinde değişmesi, sadece en sık mutasyon görülen hedef kodonlara ait problemlerin bulunduğu bir sistemin kullanılması, dolayısıyla farklı mutasyonların belirlenememesi sayılabilir. Örneğin ülkemizde yapılan iki farklı çalışmada (142,161) kodon 490, 535, 504, 541, 553 ve 572 gibi bölgelerde mutasyonlar bildirilmiştir. Bu durum, Minh ve ark.'nın Vietnam'da yaptıkları çalışma ile desteklenmektedir (158). GenoType MTBDRplus VER2.0'de RIF için 505-529 arasındaki kodonlar haricindeki lokuslara ait prob yoktur ve bu bölge dışındaki mutasyonlar tespit edilememektedir. Öte yandan INH direnci için yalnızca *katG* ve *inhA* genlerine ait mutasyonlarla ilişkili problemler bulundurmaktadır. Bu sebeple *ahpC* ve *kasA* gibi direnç ilişkili diğer genlerde meydana gelen mutasyonlar tespit edilememektedir. Birincil ilaçlara dirençle ilgili yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçları toplu şekilde Tablo 5-1'de gösterilmiştir.

**Tablo 5-1: Birincil ilaçlara dirençle ilgili tespit edilen mutasyonlar.**

Yazar	Ülke	Birincil ilaçlara dirençle ilişkili en sık mutasyon bölgeleri		
		<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>
Javed ve ark.	Pakistan		<i>katG</i> S315T - %66 (66/100 ÇİD)	<i>inhA</i> C-15T - %10 (10/100 ÇİD)
Abanda ve ark.	Kamerun	<i>rpoB</i> S531L - %83,7 (41/49 ÇİD)	<i>katG</i> S315T - %61,2 (30/49 ÇİD)	<i>inhA</i> C15T - %34,7 (17/49 ÇİD)
Maningi ve ark.	Güney Afrika	<i>rpoB</i> S531L - %47,4 (46/97)	<i>katG</i> S315T - %33 (32/97)	<i>inhA</i> C15T - %14,4 (14/97)
Aleign ve ark.	Etiyopya	<i>rpoB</i> WT7 $\emptyset$ - %100 (2/2)	<i>katG</i> S315T - %60 (12/20) <i>katG</i> MUT1 + WT $\rightarrow$ heterodirenç - %10 (2/20)	<i>inhA</i> 'da mutasyon $\emptyset$
Gashaw ve ark.	Etiyopya	<i>rpoB</i> WT8 $\emptyset$ - %71,4 (10/14)	<i>katG</i> WT $\emptyset$ - %66,7 (8/12) <i>katG</i> S315T - %16,6 (2/12)	
Bedewi ve ark.	Etiyopya	<i>rpoB</i> S531L - %33,3 (3/9)	<i>katG</i> S315T - %88 (22/25)	<i>inhA</i> C15T - %8 (2/25)
Addo ve ark.	Gana	<i>rpoB</i> D516V - %54,5 (6/11)	<i>katG</i> S315T - %90,9 (10/11)	<i>inhA</i> T8C - %54,5 (6/11)
Cauwelaert ve ark.	Madagaskar	<i>rpoB</i> S531L - %60,8 (28/51)	<i>katG</i> S315T - %72,9 (43/59) <i>katG</i> MUT1 + WT $\rightarrow$ heterodirenç - %3,4 (2/20)	<i>inhA</i> C15T - %20,3 (12/59)
Meaza ve ark.	Etiyopya	<i>rpoB</i> S531L - %77,1 (27/35 ÇİD)	<i>katG</i> S315T - %80 (28/35 ÇİD)	<i>inhA</i> C15T + A16G - %2,8 (1/35 ÇİD)
Kebede ve ark.	Etiyopya	<i>rpoB</i> S531L - %81,6 (40/49 ÇİD)	<i>katG</i> S315T - %100 (52/52 ÇİD)	
Yıldırım S. ve Uzun	Türkiye	<i>rpoB</i> S531L - %52 (13/25 ÇİD)		
Singhal ve ark.	Hindistan	<i>rpoB</i> S531L - %63,1 (231/366 ÇİD)	<i>katG</i> S315T - %92,1 (337/366 ÇİD)	<i>inhA</i> C15T - %6,8 (25/366 ÇİD)
Yıldırım ve Uzun	Türkiye		<i>katG</i> S315T - %56 (14/25)	<i>inhA</i> C15T - %12 (3/25)
<b>Bu çalışma</b>	Türkiye	<i>rpoB</i> S531L - %93,2 (41/44 ÇİD)	<i>katG</i> S315T - %54,5 (24/44 ÇİD)	<i>inhA</i> C15T - %6,8 (5/44 ÇİD)

Küresel olarak endikasyon dışı yaygın kullanımlarından dolayı ikincil ilaçlara direnç son yıllarda önemli bir sorun haline gelmiştir. Özellikle FLK'a direnç artış göstermiş, son 15 yılda küresel olarak ÇİD ve RIF'e dirençli suşlarla oluşan TB'da FLK'a dirençli suşların yaygınlığı %20,1 olarak bildirilmiştir (1,162). Bu durum birincil ilaçlara dirençli suşlarda ikincil ilaçlara duyarlılık testi yapılmasının önemini göstermektedir. Dünya genelinde MTBDRsl ile ikincil ilaçlara direncin araştırıldığı çeşitli çalışmalar vardır.

Chandak ve ark., Hindistan'da yaptıkları çalışmada MTRBDRplus ile ÇİD olduğu belirlenen 205 *M. tuberculosis* kompleksi suşunun ikincil ilaçlara direncini MTBDRsl ile değerlendirmişlerdir. Suşların 109 (%53,2)'u ofloksasine dirençli, 39 (%19)'u parenteral ilaçlara (AMK, KAN, CAP) dirençli, 85 (%41,5)'i etambutole dirençli saptanmış, 36 (%17,6) suşu YİD olarak tanımlamışlardır. *gyrA* geninde en sık görülen mutasyonu D94G olarak bildirilmişlerdir (45/109, %41,3). Üç (%2,7) suшта D94H mutasyonu görülmüştür. Suşların 11 (%5,4)'inde heterodirenç (MUT1 ile birlikte WT bandı varlığı) saptarken, parenteral ilaçlara dirençle ilişkili en sık *rrs* A1401G (24/39, %61,5) mutasyonu bildirmişlerdir. İki suшта (2/39, %5,1) *rrs* G1484T mutasyonu, dört suшта (4/39, %10,3) MUT bandı oluşmadan *rrs* WT1 kaybı tespit etmişlerdir (163).

Mujuni ve ark., 2017-2019 yılları arasında Uganda Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında toplanan RIF ve/veya INH'a dirençli 20.508 *M. tuberculosis* suşunu analiz etmişlerdir. Toplam 576 adet ÇİD suşu MTBDRsl V2.0 kullanarak değerlendirilmiş, 42 (42/576, %7,3)'sinde sadece FLK'a direnç, 12 (12/576, %2,1)'sinde sadece parenteral ilaçlara direnç, kalan 14 (14/576, %2,4) suшта ise hem FLK hem parenteral ilaca direnç (YİD) bildirmişlerdir. Bu çalışmada FLK'a direnç ile ilişkili en yaygın mutasyon *gyrA* D94G (%37) ve sadece bir suшта *gyrB* E540D olarak bildirilmiştir. Parenteral ilaçlara dirençten sorumlu mutasyonlar *rrs* A1401G (%77) ve *eis* C14T mutasyonları olarak saptanmıştır.

Lv ve ark., MTBDRplus ile ÇİD olarak tespit ettikleri 10 suşu MTBDRsl ile değerlendirmişler, iki suшта (2/10, %20) FLK'a ve etambutole direnç tespit ederek bu suşları Pre-YİD olarak tanımlamışlardır, FLK'a direnç ile ilişkili mutasyonları *gyrA* D94H (%10) ve *gyrA* A90V (%10) olarak saptamışlardır. Herhangi bir *rrs* mutasyonu bildirmemişlerdir (164).

Jeong ve ark., daha önce LJ besiyerinde proporsiyon yöntemi ile fenotipik olarak ÇİD olduğu belirlenen 40 suşu MTBDRsl ile değerlendirmiş, 30 (%75) suşu FLK'a dirençli bulmuş ve

dirençle ilişkili en sık saptanan mutasyonu *gyrA* D94G (20/40, %50) olarak bildirmişlerdir. *gyrA* geninde bildirdikleri diğer mutasyonlar A90V (6/40, %15), S91P (2/40, %5), D94A (1/40, %2,5), D94N/D94Y (1/40, %2,5)'dir. Bir suşta *gyrA* WT2 ve WT3 kaybı (1/40, %2,5), bir suşta *gyrA* WT3 kaybı %2,5 (1/40) saptamışlardır. Parenteral ilaçlara dirençli olan 29 (29/40, %72,5) suşta *rrs* A1401G (25/40, %62,5) ve *rrs* G1484T (2/40, %5) mutasyonlarını bildirmişlerdir. Bir suşta (1/40, %2,5) parenteral ilaca direnç MUT bandı oluşmadan *rrs* WT1 ve WT2 bantlarının kaybı ile belirlemişlerdir (165).

Zeng ve ark., Çin'de yaptıkları çalışmada MTBDRplus ile ÇİD olduğunu tespit ettikleri 189 suşu MTBDRsl ile değerlendirmişlerdir. En sık görülen mutasyonları *gyrA* D94G (%48,2), *rrs* A1401G (%76,2) ve *rrs* G1484T (%14,3) olarak bildirmişlerdir. Florokinolonlara direnci araştırılan 162 suşun beşinde (%3,1) hem MUT hem WT bantları gözleyerek bu durumu heterodirenç olarak değerlendirmişlerdir. Fenotipik olarak LEV'e dirençli olan 103 suştan 85'i MTBDRsl ile FLK'a dirençli saptamışlar ve mutasyonları D94G (39/85, %45) ile D94B (12/85, %14) olarak bildirmişlerdir. Dört suşta herhangi bir MUT bandı oluşmadan WT bandı kaybı bildirilmiştir. Beş suşta (5/59, %8,5) fenotipik olarak LEV duyarlı olmasına rağmen MTBDRsl ile direnç saptamışlardır. Parenteral ilaçlara direnç ile ilişkili olarak AMK'e dirençli suşlarda A1401G (16/20, %80), C1484T (5/20, %25) mutasyonları, CAP'e dirençli suşlarda A1401G (15/18, %83), C1484T (4/18, %22,2) mutasyonlarını bildirmişlerdir (166).

Sethi ve ark., 863 dirençli suşun (RIF'e dirençli, INH'a dirençli veya ÇİD) ikincil ilaçlara direncini MTBDRsl ile incelemiş, FLK'a dirençli suşlarda en sık görülen mutasyonu *gyrA* D94G (139/324, %42,9) olarak bildirmişlerdir. Saptanan diğer mutasyonlar *gyrA* A90V (58/324, %17,9) ve *gyrA* D94A (30/324, %9,2), *gyrA* D94N/D94Y (22/324, %6,8), *gyrA* S91P (11/324, %3,4) ve *gyrA* D94H (3/324, %0,9) olarak belirlemişlerdir. Toplam sekiz (%2,4) suşta iki farklı *gyrA* mutasyonunu bir arada bildirmişlerdir. Yirmi altı suşta (26/324, %8) MUT bandı oluşmadan yalnız WT bandı kaybı tespit etmişlerdir. Hiç bir suşta *gyrB* geni ile ilişkili MUT bandı oluşumu izlenmemiş, 10 suşta (10/324, %3,1) *gyrB* WT1 kaybı tespit etmişlerdir. Parenteral ilaçlara dirençli (*rrs* veya *eis* mutasyonu olan) suşlar içerisinde ise *rrs* A1401G (44/73, %60,3), *rrs* G1484T (4/73, %5,4) ve *eis* C-14T (10/73, %13,7) mutasyonları bildirmişlerdir (167).

Yadav ve ark., Hindistan'da yaptıkları çalışmada ÇİD suşları MTBDRsl ile değerlendirmişlerdir. Test edilen 415 suşun 176'sında (%42,4) *gyrA* mutasyonu tespit etmişler, bu 176 suşta belirlenen mutasyonların büyük kısmının (109/176, %61,9) 94 numaralı kodonda olduğunu tespit etmişlerdir. Saptanan tekli mutasyonları *gyrA* D94G (73/176, %41,5), *gyrA* D94A

(13/176, %7,4), *gyrA* D94H (7/176, %3,9) ve *gyrA* D94N/D94Y (9/176, %5,1) olarak bildirmişlerdir. Diğer *gyrA* mutasyonları 90 numaralı kodon (49/176, %27,8) ve 91 numaralı kodondadır (8/176, %4,5) ve bunlar *gyrA* A90V (42/176, %23,8) *gyrA* S91P (6/176, %3,4) mutasyonlarıdır. Bunlara ek olarak beş suşta bildirilen çift mutasyonlar MUT1 + MUT3B (2/176, %1,1), MUT1 + MUT3C (1/176, %0,6) ve MUT2 + MUT3B (2/176, %1,1)'dir. Dört suşta yalnızca WT bandı kaybı gözlemlenmişler, bunlardan üç tanesi WT2, bir tanesi WT3 olarak bildirilmiştir. *gyrB* genine ait herhangi bir mutasyon bildirilmemiştir. Parenteral ilaçlara direnç ile ilgili en sık saptanan mutasyon *rrs* A1401G (35/40, %87,5) olup bunlardan iki suşta hem *rrs* WT hem de MUT1 bantları birlikte saptanmışlardır. Bir suşta *rrs* MUT2 (G1484T) mutasyonu tespit etmişler, üç suşta *eis* WT2 kaybı ile birlikte herhangi bir MUT bandı oluşumu bildirmemişlerdir (168).

Bu çalışmada MTBDRplus ile ÇİD olarak belirlenen 44 suş MTBDRsl V2.0 kullanarak değerlendirilmiş, suşların 14 (14/44 %31,8)'ü Pre-YİD suşlar olarak saptanmıştır. İkincil ilaçlara direnç saptanan suşların 8 (8/14, %57,1)'i FLK'a dirençli, kalan altı suş (6/14, %42,8) parenteral ilaçlara dirençli bulunmuştur. Mujuni ve Sethi'nin çalışmaları ile kıyaslandığında bu çalışmadaki toplam FLK'a dirençli suş oranı daha düşüktür ve FLK'a dirençli saptanan suşlardan herhangi birinde herhangi bir parenteral ilaca direnç birlikteliği saptanmamıştır. İkincil ilaçlara dirençle ilgili yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçları toplu şekilde Tablo 5-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 5-2: İkincil ilaçlara dirençle ilgili tespit edilen mutasyonlar.**

Yazar	Ülke	FLK'a direnç	En sık <i>gyrA</i> ve <i>gyrB</i> mutasyonları	Parenteral ilaçlara direnç	En sık <i>rrs</i> ve <i>eis</i> mutasyonları	YİD
Chandak ve ark.	Hindistan	%53 (109/205)	<i>gyrA</i> D94G - %41,3 (45/109)	%19 (39/205)	<i>rrs</i> A1401G - %61,5 (24/39) <i>rrs</i> WT $\emptyset$ - %10,3 (4/39)	%17,6 (36/205)
Mujuni ve ark.	Uganda	%9,7 (56/576)	<i>gyrA</i> D94G - %37 <i>gyrB</i> E540D - %1,8 (1/56)	%4,5 (26/576)	<i>rrs</i> A1401G - %77 (20/26) <i>eis</i> C-14T	%2,4 (14/576)
Lv ve ark.	Çin	%20 (2/10)	<i>gyrA</i> D94H - %10 <i>gyrA</i> A90V - %10	-	<i>rrs</i> $\emptyset$	-
Jeong ve ark.	Kore	%75 (40/30)	<i>gyrA</i> D94G - %50 (20/40) <i>gyrA</i> WT - %5 (2/40)	%72,5 (29/40)	<i>rrs</i> A1401G - %62,5 (25/40) <i>rrs</i> WT $\emptyset$ - %2,5 (1/40)	
Zeng ve ark.	Çin	%45 (85/189)	<i>gyrA</i> D94G - %45 (39/85) <i>gyrA</i> WT $\emptyset$ - %4,7 (4/85)	AMK: %10,6 (20/189) CAP: %9,5 (18/189)	<i>rrs</i> A1401G - %80 (16/20)	
Sethi ve ark.	Hindistan	%37,5 (324/863)	<i>gyrA</i> D94G - %43 (139/324) <i>gyrA</i> WT $\emptyset$ - %8 (26/324) <i>gyrB</i> WT $\emptyset$ - %3,1 (10/324)	%8,4 (73/863)	<i>rrs</i> A1401G - %60,3 (44/73) <i>eis</i> C-14T - %13,7 (10/73)	
Yadav ve ark.	Hindistan	%42,4 (176/415)	<i>gyrA</i> D94G - %41,5 (73/176) <i>gyrA</i> WT $\emptyset$ - %2,3 (4/176)	%9,6 (40/415)	<i>rrs</i> A1401G - %87,5 (35/40) <i>eis</i> WT $\emptyset$ - %7,5 (3/40)	
Bu çalışma	Türkiye	%18,2 (8/44)	<i>gyrA</i> A90V - %50 (4/8) <i>gyrB</i> $\emptyset$	%13,6 (6/44)	<i>rrs</i> A1401G - %66,6 (4/6) <i>eis</i> WT2 $\emptyset$ - %16,6 (1/6)	0

Bu çalışmanın sonuçlarına göre ikincil ilaç direnci olan suşlar arasında *eis* mutasyonu düşük orandadır (1/14, %7,1) ve bu WT2 bandının kaybı şeklinde olup herhangi bir MUT bandı oluşumu tespit edilmemiştir. Çeşitli çalışmalarda bildirilen *eis* C-14T mutasyonuna bu çalışmada rastlanmamıştır (169). Ayrıca bu çalışmada en sık saptanan *gyrA* mutasyonu A90V olarak tespit edilmiş, literatürde sıkça *gyrA* D94G olarak bildirilen çalışmalardan farklı bulunmuştur. Bu durum, tedavi protokollerinin ve yukarıda sayılan nedenlerle direncin coğrafi olarak değişim gösterebileceğini, her bölgenin ve ülkenin kendi direnç profili ve suşlarına ait sık görülen mutasyonları olduğunu göstermektedir.

İkincil ilaç dirençli suşlar için DSÖ'nün yıllık raporlarındaki verilere ve literatürdeki çeşitli çalışmalara bakıldığında FLK'a ve parenteral ilaçlara direncin birlikte bulunma oranı, ayrı ayrı bulunma oranından genellikle daha düşüktür (162,169–171). Bu çalışmada herhangi bir suшта birden fazla ikincil ilaç direnci saptanmamış olması bu genellemeyi desteklemektedir.

Çalışmamızın en ilginç sonuçlarından biri MTBDRplus testi ile ÇİD olmadığı saptanan yedi suştan dördünde FLK'a direnç, birinde ise KAN/AMK/CAP'e direnç saptanmasıdır. Yani toplamda %57,1 (4/7) suшта GenoType test sonuçlarına göre ÇİD olmamasına rağmen sekonder ilaç direnci saptanmıştır. Bu oran alışlageldik *M. tuberculosis* direnç profillerine göre farklı olup dikkat çekici bulunmuştur.

TB ile mücadelede yeni ilaç çalışmaları devam etse de direnç gelişimi daima karşımıza bir engel olarak çıkmaya devam etmektedir. *M. tuberculosis*, farklı mutasyonlar ve çeşitli mekanizmalar sayesinde antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mücadelesini sürdürmektedir. Bu nedenle dirence neden olabilecek yeni mutasyon bölgelerinin tespit edilmesine yönelik güncel moleküler çalışmaların yapılması önemlidir. Bu son derece başarılı bakterinin populasyon biyolojisi üzerindeki yeni bir ilacın veya herhangi bir müdahalenin etkisini değerlendirmek için, ideal olarak türün tüm filogenetik alanını temsil eden çok sayıda *M. tuberculosis* suşlarının yapılacak yeni çalışmalara dahil edilmesi önemlidir (82).

Rifampine dirençli suşlarda *rpoB* S531L, INH'a dirençli suşlarda ise *katG* S315T1 ve *inhA* C15T promoter bölge mutasyonlarını izlemek tanısal ve epidemiyolojik açıdan değerlidir. Tüberküloz hastalarında RIF ve INH'a dirençli *M. tuberculosis*'in hızlı teşhisi, tedavi rejimlerinin hızla yeniden düzenlenmesini sağlayarak uygun zamanda yapılacak enfeksiyon kontrol müdahaleleri, ÇİD bakterilerle oluşacak TB'nin ilerleme ve yayılma riskini azaltabilir (159).

İkincil ilaçlara direnç ve dirence neden olan mutasyon bölgeleri ile ilgili çalışmaların yapılması, yeni mutasyon bölgelerinin tespit edilmesine, dolayısıyla var olan kitlerin güncellenmesi ve yeni kitlerin geliştirilmesini sağlayacaktır. Örneğin Vietnam'da yapılan bir çalışmada parenteral ilaçlara direncin daha çok *eis* geninde olduğu bulunmuş ve kitler bu gendeki mutasyon bölgelerini de tespit edebilecek şekilde güncellenerek yeni ve daha etkili bir versiyonun ortaya çıkmasını sağlamıştır (172). Bu çalışma da bu amaçla yapılmış çalışmalardan biridir. Bu tip çalışmalar yapılmaya devam ettikçe epidemiyolojik verilere katkı sağlanacak ve en önemlisi, dirence neden olan olası yeni mutasyon bölgeleri tespit edilerek YİD suşların belirlenme şansı artmış olacaktır.



## 6. KAYNAKLAR

1. Chakaya J, Petersen E, Nantanda R, Mungai BN, Migliori GB, Amanullah F, ve ark. The WHO Global Tuberculosis 2021 Report – not so good news and turning the tide back to End TB. *Int J Infect Dis.* 2022;124:S26-9.
2. Tuberculosis (TB) [Internet]. [Erişim: 19 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
3. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye’de Verem Savaşı 2020 Raporu, 1205, Ankara, 2021 [Internet]. [Erişim: 19 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.ivsd.org.tr/verem/detay/87#>
4. Khawbung JL, Nath D, Chakraborty S. Drug resistant Tuberculosis: A review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2021;74:101574.
5. tuberculosis | Etymology, origin and meaning of tuberculosis by etymonline [Internet]. [Erişim: 19 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.etymonline.com/word/tuberculosis>
6. Hayman J. MYCOBACTERIUM ULCERANS: AN INFECTION FROM JURASSIC TIME? *The Lancet.* 1984;324(8410):1015-6.
7. Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is Mycobacterium tuberculosis 15,000 years old? *J Infect Dis.* 1994;170(5):1348-9.
8. Zimmerman MR. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bull N Y Acad Med.* 1979;55(6):604-8.
9. Brown L. The Story of Clinical Pulmonary Tuberculosis. *Radiology.* 1941;37(1):108-9.
10. The Genuine Works of Hippocrates - Hippocrates - Google Kitaplar [Internet]. [Erişim: 19 Temmuz 2023]. Erişim adresi: [https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=bsdEAQAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&ots=SvqQmYyZRm&sig=hDGg\\_W9M6S7RCjjK17aE5Lg\\_TsE&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=bsdEAQAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&ots=SvqQmYyZRm&sig=hDGg_W9M6S7RCjjK17aE5Lg_TsE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
11. Some Remarks on the Diagnosis and Treatment of Tuberculosis in Antiquity | *Isis: Vol 31, No 2* [Internet]. [Erişim: 19 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/347595?journalCode=isis>
12. Maddahi SZ, Jokar A, Behnampour N, Babamahmoodi F. Risk factors of Pulmonary Tuberculosis (PTB): Avicenna’s Viewpoint. *Jorjani Biomed J.* 2020;8(4):1-3.
13. Frith J. History of tuberculosis. Part 1 - Phthisis, consumption and the white plague. 2014;22:29-35.
14. Daniel TM. *Pioneers of Medicine and Their Impact on Tuberculosis.* University Rochester Press; 2000. 292 s.

15. Dormandy T. The White Death: A History of Tuberculosis. BMJ : British Medical Journal [İnternet]. [Erişim: 04 Eylül 2023]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1116046/>
16. Daniel TM. Hermann Brehmer and the origins of tuberculosis sanatoria. Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis. 2011;15(2):161-2, i.
17. Gradmann C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. Med Hist. 2001;45(1):1-32.
18. Özdemir H. Salgın Hastalıklardan Ölümler 1914-1918. Türk Tarih Kurumu; 2010. 446 s.
19. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Tüberküloz Dairesi Başkanlığı. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi [İnternet]. [Erişim: 21 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://dosyaism.saglik.gov.tr/Eklenti/79564/0/tuberkuloztanitedavirehber0619pdf.pdf>
20. Butler WR, Floyd MM, Brown JM, Toney SR, Daneshvar MI, Cooksey RC, ve ark. Novel mycolic acid-containing bacteria in the family Segniliparaceae fam. nov., including the genus Segniliparus gen. nov., with descriptions of Segniliparus rotundus sp. nov. and Segniliparus rugosus sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55(4):1615-24.
21. Conville PS, Witebsky FG. Nocardia, rhodococcus, gordonia, actinomadura, streptomyces, and other aerobic actinomycetes. Man Clin Microbiol. 2015;504-35.
22. Stanford J, Ratledge C. The Biology of the mycobacteria. London ; New York: Academic Press; 1982. 1 s.
23. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, ve ark. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(6):3684-9.
24. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, ve ark. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog. 2005;1(1):e5.
25. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, ve ark. Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, M. mungi. Emerg Infect Dis. Ağustos 2010;16(8):1296-9.
26. van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, ve ark. Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis Complex Subspecies. Emerg Infect Dis. Nisan 2012;18(4):653-5.
27. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, ve ark. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. Mol Microbiol. 2008;69(1):164-74.
28. Kremer L, Besra GS. A waxy tale, by Mycobacterium tuberculosis. Tuberc Tuberc Bacillus. 2004;287-305.
29. Brown-Elliott BA, Wallace Jr. RJ. Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria. Manual of Clinical Microbiology [İnternet]. John Wiley

- & Sons, Ltd; 2015 [Erişim: 26 Temmuz 2023]. s. 595-612. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555817381.ch32>
30. Rahlwes KC, Dias BRS, Campos PC, Alvarez-Arguedas S, Shiloh MU. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*. 2023;14(1):2150449.
  31. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. 2009.
  32. Bagcchi S. WHO's Global Tuberculosis Report 2022. *Lancet Microbe*. 2023;4(1):e20.
  33. Johnston JC, Shahidi NC, Sadatsafavi M, Fitzgerald JM. Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2009;4(9):e6914.
  34. Langer AJ, Starks AM. Surveillance definitions for extensively drug resistant (XDR) and pre-XDR tuberculosis [Internet]. [Erişim: 15 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/tb/publications/letters/2022/surv-def-xdr.html>
  35. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update [Internet]. [Erişim: 28 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240063129>
  36. Birleşmiş Milletler Mülteci Örgütü. Situation Syria Regional Refugee Response [Internet]. [Erişim: 20 Temmuz 2023]. Erişim adresi: [https://data.unhcr.org/en/situations/syria?\\_gl=1\\*1kuj74c\\*\\_rup\\_ga\\*MTMxMjM0NzUzOC4xNjg5NzU4Mjg2\\*\\_rup\\_ga\\_EVDQTJ4LMY\\*MTY4OTc1ODI4Ni4xLjEuMTY4OTc1ODI5MS4wLjAuMA..\\*\\_ga\\*MTMxMjM0NzUzOC4xNjg5NzU4Mjg2\\*\\_ga\\_X2YZPJ1XWR\\*MTY4OTc1ODI4Ni4xLjEuMTY4OTc1ODI5MS4wLjAuMA..#\\_ga=2.178402724.1037334576.1689758286-1312347538.1689758286](https://data.unhcr.org/en/situations/syria?_gl=1*1kuj74c*_rup_ga*MTMxMjM0NzUzOC4xNjg5NzU4Mjg2*_rup_ga_EVDQTJ4LMY*MTY4OTc1ODI4Ni4xLjEuMTY4OTc1ODI5MS4wLjAuMA..*_ga*MTMxMjM0NzUzOC4xNjg5NzU4Mjg2*_ga_X2YZPJ1XWR*MTY4OTc1ODI4Ni4xLjEuMTY4OTc1ODI5MS4wLjAuMA..#_ga=2.178402724.1037334576.1689758286-1312347538.1689758286)
  37. COVID-19 and TB [Internet]. [Erişim: 28 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/covid-19-and-tb>
  38. Tuberculosis profile: Türkiye [Internet]. [Erişim: 28 Temmuz 2023]. Erişim adresi: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb\\_profiles/?\\_inputs\\_&entity\\_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22TR%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22TR%22)
  39. Rodrigues TS, Conti BJ, Fraga-Silva TF de C, Almeida F, Bonato VLD. Interplay between alveolar epithelial and dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Leukoc Biol*. 2020;108(4):1139-56.
  40. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun*. 1996;64(4):1400-6.
  41. Killick KE, Ní Cheallaigh C, O'Farrelly C, Hokamp K, MacHugh DE, Harris J. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cell Microbiol*. 2013;15(9):1484-95.
  42. Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermudez LE. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2003;5(9):649-60.

43. Shaler CR, Horvath C, Lai R, Xing Z. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:628293.
44. Cohen SB, Gern BH, Urdahl KB. The Tuberculous Granuloma and Preexisting Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2022;40:589-614.
45. Cronan MR. In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. *Front Immunol*. 2022;13:820134.
46. Barr DA, Schutz C, Balfour A, Shey M, Kamariza M, Bertozzi CR, ve ark. Serial measurement of *M. tuberculosis* in blood from critically-ill patients with HIV-associated tuberculosis. *EBioMedicine*. 2022;78:103949.
47. Lerner TR, Queval CJ, Lai RP, Russell MR, Fearn A, Greenwood DJ, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* cords within lymphatic endothelial cells to evade host immunity. *JCI Insight*. 2020;5(10):e136937, 136937.
48. Ong CWM, Elkington PT, Brilha S, Ugarte-Gil C, Tome-Esteban MT, Tezera LB, ve ark. Neutrophil-Derived MMP-8 Drives AMPK-Dependent Matrix Destruction in Human Pulmonary Tuberculosis. *PLOS Pathog*. 2015;11(5):e1004917.
49. Ruhl C, Pasko B, Khan H, Kindt L, Stamm C, Franco L, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* Sulfolipid-1 Activates Nociceptive Neurons and Induces Cough. *Cell*. 2020;181.
50. Shiloh MU. Mechanisms of mycobacterial transmission: how does *Mycobacterium tuberculosis* enter and escape from the human host. *Future Microbiol*. Aralık 2016;11(12):1503-6.
51. Pfyffer GE. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*. İçinde: *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [Erişim: 26 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555817381.ch30>
52. Brett K, Dulong C, Severn M. *Identification of Tuberculosis: A Review of the Guidelines* [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2020 [Erişim: 22 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562928/>
53. Erkose Genc G, Richter E, Erturan Z. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2013;121.
54. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. [Internet]. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.; 1985 [Erişim: 26 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/PB86216546.xhtml>
55. Wilmer A, Bryce E, Grant J. The role of the third acid-fast bacillus smear in tuberculosis screening for infection control purposes: A controversial topic revisited. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale*. 2011;22(1):e1-3.

56. Ray CG, Ryan KJ. Sherris medical microbiology. McGraw-Hill Education/Medical New York, NY, USA; 2014.
57. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology - E-Book. Elsevier Health Sciences; 2022. 1154 s.
58. Somoskövi A null, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. Chest. 2001;120(1):250-7.
59. Clinical Microbiology Procedures Handbook. John Wiley & Sons; 2020. 2891 s.
60. Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, ve ark. Manual of Clinical Microbiology [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015 [Erişim: 21 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817381>
61. Şimşek H, Tarhan G, Albay A, Ceyhan İ, Arslan G, Albayrak N, ve ark. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). 2014 [Erişim: 23 Ağustos 2023]; Erişim adresi: <https://avesis.bozok.edu.tr/yayin/acf49932-b883-420c-ae61-2bf2b08409da/ulusal-tuberkuloz-tani-rehberi-uttr>
62. Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJ. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. J Clin Microbiol. 1993;31(8):2178-84.
63. Woods GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes: approved standard. 2. ed. Wayne, Pa: CLSI; 2011. 61 s. (Clinical and Laboratory Standards Institute).
64. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Jones & Bartlett Learning; 2020. 1964 s.
65. Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable Radiometric Detection of Growth of Mycobacterium Tuberculosis In Selective Media. Am Rev Respir Dis. 1977;115(6):1066-9.
66. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol. 2004;42(5):2321-5.
67. Tankeshwar A. Microbe Online. 2013 [Erişim: 27 Temmuz 2023]. Biochemical Tests to identify Mycobacteria, NTM • Microbe Online. Erişim adresi: <https://microbeonline.com/key-biochemical-methods-used-to-distinguish-mycobacterial-group/>
68. Coban AY. Tanıda Hızlı Testler: Tüberküloz. İçinde Klimik Dergisi; 2007 [Erişim: 27 Temmuz 2023]. s. 132-4. Erişim adresi: <https://www.klimikdergisi.org/wp-content/uploads/2021/01/xiii.-turk-klinik-mikrobiyoloji-ve-infeksiyon-hastaliklari-kongresi.pdf>
69. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2009;58(1):7-10.

70. Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, Mazzola E, Dal Monte P, Pascarella M, ve ark. Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 2012;40(2):442-7.
71. Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, Shetty A, Alland D, Rodrigues C. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2540-5.
72. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol*. 2011;6(9):1067-82.
73. Jonas V, Alden MJ, Curry JJ, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, ve ark. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*. 1993;31(9):2410-6.
74. cobas® MTB Intended Use, Specifications and Analytical Performance. [İnternet]. [Erişim: 29 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-mtb.html#productInfo>
75. GenoType MTBC | Differentiation of *M. tuberculosis* complex from culture, user manual [İnternet]. [Erişim: 29 Ağustos 2023]. Erişim adresi: <https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbc.html>
76. García-Agudo L, Jesús I, Rodríguez-Iglesias M, García-Martos P. Evaluation of INNO-LiPA mycobacteria v2 assay for identification of rapidly growing mycobacteria. *Braz J Microbiol*. 2011;42(3):1220-6.
77. GenoType Mycobacterium CM | Detection and differentiation of NTM [İnternet]. [Erişim: 29 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html>
78. GenoType Mycobacterium AS | Detection and differentiation of NTM [İnternet]. [Erişim: 29 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-as.html>
79. The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance [İnternet]. Geneva: World Health Organization; 2016 [Erişim: 23 Ağustos 2023]. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK384520/>
80. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol Seoul Korea*. 2015;53(1):1-5.
81. Huang TS, Huang WK, Lee SSJ, Tu HZ, Chang SH, Liu YC. Rapid detection of pulmonary tuberculosis using the BDProbeTEC ET Mycobacterium tuberculosis Complex Direct Detection Assay (DTB). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46(1):29-33.
82. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):354-73.

83. Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: In vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. *Antibiot Lab Med* 5th Ed Phila PA USA Lippincott Williams Wilkins. 2005;155-225.
84. FG W. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. *Biol Mycobact*. 1982;1:353-438.
85. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Deretic V, Musser JM. Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and-susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(3):600-6.
86. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, ve ark. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*. 23 2001;104(6):901-12.
87. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016;
88. Swain SS, Sharma D, Hussain T, Pati S. Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):1651-63.
89. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, ve ark. 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(5):2032-41.
90. Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C. Profiling of rpoB Mutations and MICs for Rifampin and Rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2157-62.
91. Jagielski T, Bakula Z, Brzostek A, Minias A, Stachowiak R, Kalita J, ve ark. Characterization of Mutations Conferring Resistance to Rifampin in Mycobacterium tuberculosis Clinical Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e01093-18.
92. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(1):3-29.
93. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirakata Y, ve ark. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and rpoB mutations of Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(5):621-8.
94. Schön T, Juréen P, Chryssanthou E, Giske C, Kahlmeter G, Hoffner S, ve ark. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible Mycobacterium tuberculosis strains: a breakpoint artefact? *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(9):2074-7.
95. Louw G, Warren R, Gey van Pittius N, McEvoy C, Van Helden P, Victor T. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3181-9.

96. Berrada ZL, Lin SYG, Rodwell TC, Nguyen D, Schecter GF, Pham L, ve ark. Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(2):177-81.
97. The curious characteristics of pyrazinamide: a review - PubMed [Internet]. [Erişim: 22 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12701830/>
98. Juréen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide Resistance and pncA Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1852-4.
99. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996;2(6):662-7.
100. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(9):1493-9.
101. Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2004;9:975-94.
102. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3192-7.
103. Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Böttger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol*. 1993;9(6):1239-46.
104. Nair J, Rouse DA, Bai G, Morris SL. The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 1993;10(3):521-7.
105. Heifets L, Simon J, Pham V. Capreomycin is active against non-replicating *M. tuberculosis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;4:6.
106. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Mutation of tlyA Confers Capreomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(2):571-7.
107. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(7):432-42.
108. Tahseen S, Van Deun A, de Jong BC, Decroo T. Second-line injectable drugs for rifampicin-resistant tuberculosis: better the devil we know? *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(4):831-5.
109. Van Deun A, Decroo T, Piubello A, De Jong B, Lynen L, Rieder H. Principles for constructing a tuberculosis treatment regimen: the role and definition of core and companion drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22(3):239-45.

110. Mallick JS, Nair P, Abbew ET, Van Deun A, Decroo T. Acquired bedaquiline resistance during the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review. *JAC-Antimicrob Resist.* 2022;4(2):dlac029.
111. Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerová M, Mahler HT, ve ark. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ.* 1963;29(5):565-78.
112. Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, ve ark. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):3976-9.
113. Horne DJ, Pinto LM, Arentz M, Lin SYG, Desmond E, Flores LL, ve ark. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):393-401.
114. Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the Fully Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, and Ethambutol and Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1109-14.
115. Rüsç-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. *J Clin Microbiol.* 1999;37(1):45-8.
116. Bemer P, Palicova F, Rüsç-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):150-4.
117. Lee J, Armstrong DT, Ssengooba W, Park J ae, Yu Y, Mumbowa F, ve ark. Sensititre MYCOTB MIC Plate for Testing Mycobacterium tuberculosis Susceptibility to First- and Second-Line Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):11-8.
118. Woods GL, Lin SYG, Desmond EP. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, Nocardia, and Other Actinomycetes. İçinde: *Manual of Clinical Microbiology* [İnternet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [Erişim: 26 Temmuz 2023]. s. 1356-78. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555817381.ch76>
119. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology.* 2010;15(2):220-40.
120. GenoType MTBDRplus | Detection of resistance to rifampicin and isoniazid, user manual [İnternet]. [Erişim: 18 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>
121. GenoType MTBDRsl | Detection of resistance of MTBC complex, user manual [İnternet]. [Erişim: 24 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdsl.html>

122. Hofmann-Thiel S, Turaev L, Alnour T, Drath L, Müllerova M, Hoffmann H. Multi-centre evaluation of the speed-oligo Mycobacteria assay for differentiation of Mycobacterium spp. in clinical isolates. *BMC Infect Dis.* 2011;11:353.
123. Quezel-Guerraz NM, Arriaza MM, Avila JAC, Sánchez-Yebra Romera WE, Martínez-Lirola MJ, Indal-TB Group. Evaluation of the Speed-oligo® Mycobacteria assay for identification of Mycobacterium spp. from fresh liquid and solid cultures of human clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(2):123-31.
124. Lara-Oya A, Mendoza-Lopez P, Rodriguez-Granger J, Fernández-Sánchez AM, Bermúdez-Ruiz MP, Toro-Peinado I, ve ark. Evaluation of the speed-oligo direct Mycobacterium tuberculosis assay for molecular detection of mycobacteria in clinical respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):77-82.
125. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, ve ark. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010;363(11):1005-15.
126. Ngabonziza JCS, Decroo T, Migambi P, Habimana YM, Deun AV, Meehan CJ, ve ark. Prevalence and drivers of false-positive rifampicin-resistant Xpert MTB/RIF results: a prospective observational study in Rwanda. *Lancet Microbe.* 2020;1(2):e74-83.
127. Diagnostics [Internet]. [Erişim: 29 Temmuz 2023]. cobas® MTB-RIF/INH Intended Use, Specifications and Analytical Performance. Erişim adresi: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-mtb-rif-inh.html>
128. Nikolayevskyy V, Niemann S, Anthony R, van Soolingen D, Tagliani E, Ködmön C, ve ark. Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(11):1377-82.
129. Moore DAJ, Evans CAW, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, ve ark. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med.* 2006;355(15):1539-50.
130. Sertel Şelale D, Uzun M. The value of microscopic-observation drug susceptibility assay in the diagnosis of tuberculosis and detection of multidrug resistance. *Apmis.* 2018;126(1):38-44.
131. Summary of results: Noncommercial Culture and Drug-Susceptibility Testing Methods for Screening Patients at Risk for Multidrug-Resistant Tuberculosis: Policy Statement [Internet]. World Health Organization; 2011 [Erişim: 26 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131920/>
132. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Martin A. Nitrate Reductase Assay for Rapid Detection of Isoniazid, Rifampin, Ethambutol, and Streptomycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):15-9.
133. Coban AY, Cayci YT, Deveci A, Akgunes A, Uzun M, Durupinar B. A rapid detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis by a nitrate reductase assay on blood agar. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:378-80.
134. Noncommercial Culture and Drug-Susceptibility Testing Methods for Screening Patients at Risk for Multidrug-Resistant Tuberculosis: Policy Statement [Internet]. Geneva: World

Health Organization; 2011 [Erişim: 26 Temmuz 2023].Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131916/>

135. Pinsky BA, Banaei N. Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Members to the Species Level. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2241-6.
136. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. Mycobacterium africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(9):e744.
137. Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E, Maraki S, Spandidos DA. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(2):151-2.
138. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüsç-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC Assay for Differentiating Species of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Cultures Obtained from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4303-6.
139. Addo KK, Addo SO, Mensah GI, Mosi L, Bonsu FA. Genotyping and drug susceptibility testing of mycobacterial isolates from population-based tuberculosis prevalence survey in Ghana. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1-7.
140. Bayraktar B, Bulut E, Barış AB, Toksoy B, Dalgıç N, Celikkan C, ve ark. Species Distribution of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a Prospective Study. *J Clin Microbiol.* 2020;49(11):3837-41.
141. Öztürk CE, ŞahiN İ, Öksüz Ş, Kiliç N, Kiliçel Ö, Aydın L, ve ark. Investigation of Mycobacterium bovis subsp. bovis Among the Strains of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolated in Düzce Province, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50(3):392-400.
142. 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(12):4435-8.
143. Ağaçayak A, Bulut Y, Seyrek A. [Detection of Mycobacterium species distribution in the sputum samples of tuberculosis patients by PCR-RFLP method in Elazığ province]. *Mikrobiyol Bul.* 2007;41(2):203-9.
144. Anek-vorapong R, Sinthuwattanawibool C, Podewils LJ, McCarthy K, Ngamlert K, Promsarin B, ve ark. Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. *BMC Infect Dis.* 2010;10:123.
145. Maningi NE, Malinga LA, Antiabong JF, Lekalakala RM, Mbelle NM. Comparison of line probe assay to BACTEC MGIT 960 system for susceptibility testing of first and second-line anti-tuberculosis drugs in a referral laboratory in South Africa. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):795.
146. Abanda NN, Djiougoué JY, Lim E, Pefura-Yone EW, Mbacham WF, Vernet G, ve ark. Diagnostic accuracy and usefulness of the Genotype MTBDRplus assay in diagnosing multidrug-resistant tuberculosis in Cameroon? a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2017;17:379.

147. Meaza A, Kebede A, Yaregal Z, Dagne Z, Moga S, Yenew B, ve ark. Evaluation of genotype MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples. *BMC Infect Dis.* 2017;17:280.
148. Dubois Cauwelaert N, Ramarokoto H, Ravololonandriana P, Richard V, Rasolofo V. DNA Extracted from Stained Sputum Smears Can Be Used in the MTBDRplus Assay. *J Clin Microbiol.* 2011;49(10):3600-3.
149. Kebede A, Demisse D, Assefa M, Getachew Z, Yenew B, Tedla Y, ve ark. Performance of MTBDRplus assay in detecting multidrug resistant tuberculosis at hospital level. *BMC Res Notes.* 2017;10(1):661.
150. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, ve ark. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Biol Rep.* 2020;47(5):4065-75.
151. Javed H, Jamil N, Jagielski T, Bakula Z, Tahir Z. Evaluation of genotype MTBDRplus assay for rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Pakistan. *Int J Mycobacteriology.* 2016;5(Suppl 1):S147.
152. Alealign A, Zewude A, Mohammed T, Tolosa S, Ameni G, Petros B. Molecular detection of Mycobacterium tuberculosis sensitivity to rifampicin and isoniazid in South Gondar Zone, northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2019;19:343.
153. Gashaw F, Erko B, Mekonnen Y, Yenew B, Amare M, Gumi B, ve ark. Phenotypic and genotypic drug sensitivity profiles of Mycobacterium tuberculosis infection and associated factors in northeastern Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):1-12.
154. Bedewi Omer Z, Mekonnen Y, Worku A, Zewde A, Medhin G, Mohammed T, ve ark. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for detection of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in central Ethiopia. *Int J Mycobacteriology.* 2016;5(4):475-81.
155. Yıldırım Servi E, Uzun M. GENE MUTATION PATTERNS OF RIFAMPICIN IN MULTIDRUG RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX STRAINS. *J Istanbul Fac Med.* 2022;85(2):216-22.
156. Singhal R, Myneedu V, Arora J, Singh N, Bhalla M, Verma A, ve ark. Early detection of multi-drug resistance and common mutations in Mycobacterium tuberculosis isolates from Delhi using GenoType MTBDRplus assay. *Indian J Med Microbiol.* 2015;33:S46-52.
157. Yıldırım E, Uzun M. İsoniazide Dirençli Mycobacterium tuberculosis İzolatlarında Minimal İnhibitör Konsantrasyonun ve Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bül.* 2017;51(4):305-16.
158. Minh NN, Van Bac N, Son NT, Lien VTK, Ha CH, Cuong NH, ve ark. Molecular Characteristics of Rifampin- and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2020;50(3):598-601.
159. Reta M, Alemnew B, Abate BB, Fourie PB. Prevalence of drug resistance-conferring mutations associated with isoniazid and rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;26.

160. Rostamian M, Kooti S, Abiri R, Khazayel S, Kadivarian S, Borji S, ve ark. Prevalence of Mycobacterium tuberculosis mutations associated with isoniazid and rifampicin resistance: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Tuberc Mycobact Dis.* 2023;32:100379.
161. 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 Larchmt N.* 2005;11(2):94-9.
162. Global tuberculosis report 2020 [Internet]. [Erişim: 24 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131>
163. Chandak RJ, Malhotra B, Bhargava S, Goel SK, Verma D, Tiwari J. Evaluation of MTBDRsl for detecting resistance in Mycobacterium tuberculosis to second-line drugs. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 2019;23(12):1257-62.
164. Lv C, Wu J, Pierre-Audigier C, Lu L, Alame-Emane AK, Takiff H, ve ark. Combination of Xpert MTB/RIF and MTBDRplus for Diagnosing Tuberculosis in a Chinese District. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2020;26:e923508-1-e923508-9.
165. Jeong HY, Kim H, Kwon S, Ryoo S. Evaluation of the GenoType® MTBDRsl assay in Korean patients with MDR or XDR tuberculosis. *Infect Dis Lond Engl.* 2016;48(5):361-6.
166. Zeng X, Jing W, Zhang Y, Duan H, Huang H, Chu N. Performance of the MTBDRsl Line probe assay for rapid detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs and ethambutol in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;89(2):112-7.
167. Sethi S, Agarwal P, Khaneja R, Kumar N, Kumar N, Chandna J, ve ark. Second-line Drug Resistance Characterization in Mycobacterium tuberculosis by Genotype MTBDRsl Assay. *J Epidemiol Glob Health.* 2020;10(1):42-5.
168. Yadav R, Saini A, Kaur P, Behera D, Sethi S. Diagnostic accuracy of GenoType® MTBDRsl VER 2.0 in detecting second-line drug resistance to M. tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 2018;22(4):419-24.
169. Mujuni D, Kasemire DL, Ibanda I, Kabugo J, Nsawotebba A, Phelan JE, ve ark. Molecular characterisation of second-line drug resistance among drug resistant tuberculosis patients tested in Uganda: a two and a half-year's review. *BMC Infect Dis.* 2022;22(1):363.
170. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 [Internet]. World Health Organization; 2018 [Erişim: 24 Temmuz 2023]. 231 s. Erişim adresi: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>
171. Global tuberculosis report 2019 [Internet]. [Erişim: 24 Temmuz 2023]. Erişim adresi: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565714>
172. Huang WL, Chi TL, Wu MH, Jou R. Performance assessment of the GenoType MTBDR sl test and DNA sequencing for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2502-8.