



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2004-2021 YILLARI ARASINDA DÜZCE ÜNİVERSİTESİ'NDE
İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
SUŞLARINDA RİFAMPİSİN VE İKİNCİ JENERASYON
ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ ARAŞTIRILMASI

DR EMEL AKBAŞ

DÜZCE-2022



T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**2004-2021 YILLARI ARASINDA DÜZCE ÜNİVERSİTESİ'NDE
İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
SUŞLARINDA RİFAMPİSİN VE İKİNCİ JENERASYON
ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ ARAŞTIRILMASI**

DR. EMEL AKBAŞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

PROF. DR. İDRİS ŞAHİN

DÜZCE-2022

ÖNSÖZ

Tez hazırlık sürecimde kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren tez danışmanım sayın Prof. Dr. İdris ŞAHİN hocama, uzmanlık eğitimim süresince bana eğitimim ve başka birçok konuda yol gösteren kıymetli Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ hocama, asistanlığım süresince bana hem hoca hem abla olan sayın Doç. Dr. Bilge SÜMBÜL'e, uzmanlığımı tamamlarken öğrencileri olma şansına sahip olduğum ve bana daima destek olan çok kıymetli hocalarım Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ ve Doç. Dr. Emel ÇALIŞKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili doktor arkadaşlarıma, hayatım boyunca her zaman yanımda olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim beni bugünlere getiren annem Nuray KALKAN ve babam Eyüp KALKAN'a, her anımı anlamlandıran, keyiflendiren ve bana güç veren canım kızım Zeynep'ime teşekkür ederim.

Tıp fakülesinden itibaren birçok şeyi tecrübe ederken daima benimle olan ve benimle kalacak olan canım eşim Merhum Op. Dr. Ahmet AKBAŞ'a teşekkür ederim.

TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı, laboratuvarımızda izole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarında gelişen antibiyotik direncine neden olan gen paternlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza, 2004-2021 yılları arasında identifiye edilmiş ve antibiyotik duyarlılığı belirlenmiş olan rifampisin dirençli 21 *M. tuberculosis* kompleks suşu dahil edildi. Bu suşların Genotype MTBC kiti ile türüne ve Genotype MTBDR plus kiti ile rifampisin direncine neden olan gen paternine bakıldı. Bunların içinden rifampisin ve izoniazid direnci birlikte olan çoklu ilaca dirençli 12 suşa Genotype MTBDR sl kiti ile ikinci nesil ilaç direncine neden olan gen paternine bakıldı.

Bulgular ve sonuç: Rifampisin dirençli 21 izolat GenoType MTBC yöntemi değerlendirildiğinde 19'u (%90,4) *M. tuberculosis/canetti* olarak sonuçlandı, ikisi bu test ile değerlendirilemedi. Bunların yedisi (%36,8) Genotype MTBDR plus ile rifampisine dirençli iken 12'si (%63,2) duyarlı bulundu. Dirençli olanların ise birinde (%14,3) WT8 ve WT6 bantlarında, birinde (%14,3) WT8 bandında silinme gözlenirken, birinde (%14,3) WT7 bandında silinme ile rpoBMUT2A mutasyonu ve dördünde (%57,1) WT8 bandında silinme ile rpoBMUT3 mutasyonu birlikte görüldü. Suşların 7'si (%36,8) Genotype MTBDR plus ile INH için dirençli iken 12'si (%63,2) duyarlı olduğu görüldü. Dirençli olanların ise beşinde (%71,4) katGWT bandında silinme ile katGMUT1 mutasyonu ve ikisinde (%28,6) yalnızca inhAMUT3B mutasyonu görüldü. Çoklu ilaca dirençli 10 *M. tuberculosis* izolatının GenoType MTBDR sl ver 2.0 yöntemi ile dokuzunda genotipik olarak ikinci nesil ilaçların hiçbirine karşı direnç paterni gözlenmedi. Bir suş bu test ile değerlendirilemedi. Sonuç olarak fenotipik direnç gözlenen suşlarda her zaman geotipik ilaç direnci gözlenmeyebilir. Laboratuvarımızda rifampisin için en sık rastlan genotipik patern WT8 bandında silinmeyle birlikte rpoBMUT3 olarak belirlendi.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *M. tuberculosis* kompleks, Rifampisin direnci, Isoniazid direnci, Çoklu ilaca direnç

ABSTRACT

Background: The aim of our study is to determine the gene patterns that cause antibiotic resistance in *M. tuberculosis* complex strains isolated in our laboratory by molecular methods.

Material and Method: In our study, 21 rifampicin-resistant *M. tuberculosis* complex strains identified between 2004-2021 and antibiotic susceptibility were determined were examined with the GenoType MTBC kit and the gene pattern causing rifampicin resistance with the GenoType MTBDR plus kit. Among them, the gene pattern causing second-generation drug resistance was examined with the GenoType MTBDR sl kit on 12 multi-drug resistant strains with rifampicin and isoniazid resistance together.

Results: When the GenoType MTBC method of 21 rifampicin-resistant isolates was evaluated, 19 (90.4%) resulted as *M. tuberculosis*/canetti, two of which could not be evaluated with this test. Seven of them (36.8%) were resistant to rifampicin with GenoType MTBDR plus, while 12 (63.2%) were susceptible. In the resistant ones, deletion was observed in the WT8/WT6 region in one (14.3%) and in the WT8 region in one (14.3%), while one (14.3%) was deleted in the WT7 region with the rpoBMUT2A mutation and in four (57.1%) the WT8 region. deletion and rpoBMUT3 mutation was observed. While 7 (36.8%) of the strains were resistant to INH with GenoType MTBDR plus, 12 (63.2%) were found to be susceptible. Deletion and katGMUT1 mutation in the katGWT region was observed in five (71.4%) and inhAMUT3B mutation in two (28.6%) of the resistant ones. Genotypically, no resistance pattern was observed against any of the second-generation drugs in nine of the 10 multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates with the GenoType MTBDR sl ver 2.0 method. One strain could not be evaluated with this test. As a result, geotypic drug resistance may not always be observed in strains with phenotypic resistance. In our laboratory, the most common genotypic pattern for rifampicin was determined as rpoBMUT3 with deletion in the WT8 band.

KEYWORDS: *M. tuberculosis* complex, Rifampicin resistance, Isoniazid resistance, Multidrug resistance

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	i
Türkçe Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract).....	iii
İçindekiler.....	iv
Tablolar Listesi.....	viii
Şekiller Listesi.....	ix
Kısaltmalar.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	5
2.2.1. Dünya’da Tüberküloz Durumu.....	6
2.2.2. Türkiye’de Tüberküloz Durumu.....	9
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri.....	11
2.4. <i>M. tuberculosis</i> ’in Hücre Duvar Yapısı.....	13
2.5. <i>M. tuberculosis</i> virülans faktörler.....	15
2.5.1. Hücre Duvarı Komponentleri.....	15
2.5.2. Old Tüberkülin.....	16

2.5.3. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD).....	16
2.5.4. Isı Şok Proteinleri-HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda).....	16
2.5.5. 65 kDa Protein.....	16
2.5.6. 19 kDa Lipoprotein.....	16
2.5.7. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein).....	17
2.5.8. Mikobakteriyel Lipidler.....	17
2.5.9. Enzimler.....	18
2.5.10. Transkrip Regülatörleri.....	19
2.6. <i>M. tuberculosis</i> 'de Patojenite.....	19
2.6.1. <i>M. tuberculosis</i> 'de Doğal Bağışıklık.....	21
2.6.2. <i>M. tuberculosis</i> 'de Kazanılmış Bağışıklık.....	21
2.7. Tüberküloz Genetiği.....	22
2.7.1. <i>M. tuberculosis</i> kompleks Türlerinin Filogenetik Bağları.....	23
2.7.2. <i>M. tuberculosis</i> genomunun tanımı.....	24
2.8. <i>M. tuberculosis</i> Bulaşma Yolları.....	25
2.9. Tüberküloz Kliniği.....	26
2.9.1. Akciğer Tüberkülozu.....	26
2.9.2. Akciğer dışı tüberküloz.....	27
2.10. Tüberkülozda Korunma ve Kontrol.....	28
2.11. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	29
2.11.1. Primer Anti-TB ilaçlar.....	29

2.11.2. Sekonder Anti-TB İlaçlar.....	31
2.12. Antitüberküloz İlaç Dirençleri.....	33
2.12.1. İzoniazid direnci.....	34
2.12.2. Rifampisin direnci.....	34
2.12.3. Pirazinamid direnci.....	35
2.12.4. Etambutol direnci.....	35
2.12.5. Streptomisin direnci.....	35
2.12.6. Aminoglikozidler ve Kapreomisin direnci.....	36
2.12.7. Florokinolon Direnci.....	36
2.13. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı.....	36
2.13.1. Örneklerin toplanması ve işlenmesi.....	36
2.13.2. Mikroskopik değerlendirme.....	38
2.13.3. Kültür yöntemleri.....	39
2.13.4. İdentifikasyon testleri.....	41
2.13.5. Moleküler testler	41
2.13.6. İlaç duyarlılık test yöntemleri.....	42
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1.Gereçler.....	47
3.1.1. Kullanılan Besiyeri, Boya ve Kimyasallar.....	48
3.1.2. PCR ve Ters Hibridizasyon testleri için kullanılan cihaz ve ekipmanlar..	48
3.2. Çalışma Suşları.....	48
3.3. GenoType MTBC (Hain Lifescience).....	49

3.4. GenoType MTBDR <i>plus</i> (Hain Lifescience).....	55
3.5. Geno Type MTBDR sl VER 2.0.....	59
3.6. İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR.....	62
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇLAR.....	83
7. KAYNAKLAR.....	85
8. EKLER	
BOŞ SAYFA	
ARKA DIŞ KAPAK	

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Türkiye’deki ÇİD-TB ve YİD-TB Olgı Dağılımı, 2005-2018.

Tablo 2. Yaymaların değerlendirme kriterleri.

Tablo 3. Genotype MTBC için PZR çalışma döngüsü.

Tablo 4. Geno Type MTBDR plus için PZR çalışma döngüsü.

Tablo 5. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının izole edilme hastaların demografik özellikleri.

Tablo 6. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının MGIT SIRE yöntemiyle ilaç duyarlılık sonuçları.

Tablo 7. Genotype MTBDR plus test sonuçları.

Tablo 8. Genotype MTBDR plus test sonuçlarının MGIT ile Streptomisin sonucuna göre karşılaştırılması.

Tablo 9. Genotype MTBDR plus test sonuçlarının MGIT ile Etambutol sonucuna göre karşılaştırılması.

Tablo 10. GenoType MTBDR plus test sonuçlarının MGIT ile RIF+INH sonucuna göre karşılaştırılması.

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** En az 100.00 TB vakası olan ölkelerdeki tahmini TB insidansı, 2020.
- Şekil 2.** TB tanısı konan kişilerin vaka bildirimlerindeki eğilimler, 2016–2020.
- Şekil 3.** Türkiye’deki Yıllara Göre TB İnsidansı, 2005-2018.
- Şekil 4.** Mycobacterium bakterisinin taksonomik ağacı.
- Şekil 5.** *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre duvarı.
- Şekil 6.** *M. tuberculosis* Patogenezi.
- Şekil 7.** *M. tuberculosis* kompleks türlerinin filogenetik bağları.
- Şekil 8.** *M. tuberculosis* H37Rv kromozomunun dairesel haritası.
- Şekil 9.** GenoType MTBC stripleri.
- Şekil 10.** GenoType MTBC testi için değerlendirme şeritleri.
- Şekil 11.** Geno Type Mycobacteria MTBC kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri.
- Şekil 12.** GenoType MTBDR *plus* kiti ile çalışılan MTBC direnç gen bölgeleri.
- Şekil 13.** GenoType MTBDR *plus* kiti değerlendirme içi şeritteki gen bölgeleri.
- Şekil 14.** Direnç bölgeleri ve yaygın dirence aracılık eden mutasyonlar.
- Şekil 15.** Geno Type MTBDR *sl* VER 2.0 kiti ile çalışılan MTBC direnç gen bölgeleri.
- Şekil 16.** RR-TB izole edilen hastaların cinsiyet dağılımları.
- Şekil 17.** Rifampisin dirençli MTBC suşlarının yıllara göre dağılımı.
- Şekil 18.** Rifampisin dirençli MTBC suşlarının EZN pozitifliği.
- Şekil 19.** GenoType MTBDR *plus* test sonuçları.
- Şekil 20.** Genotype MTBDR *sl* ver 2.0 test sonuçları.

Şekil 21. GenoType MTBC test sonuçları.

SİMGELER VE KISALTMALAR

MTBC: *M. tuberculosis* kompleksi

sSNP: Eşanlımlı tek nükleotid polimorfizmleri

TB: Tüberküloz

BCG: Bacille Calmette-Guerin

SM: Streptomisin

PAS: Para-amino Salisilik Asit

INH: İzoniazid

PZA: Pirazinamid

EMB: Etambutol

RIF: Rifampisin

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ÇİD-TB: Çoklu ilaca dirençli TB

RR-TB: Rifampisine dirençli TB

YİD-TB: Yaygın ilaca dirençli TB

İDT: İlaç duyarlılık testi

ARB: Aside dirençli bakteriler

LJ: Löwenstein-Jensen

NTM: Nontuberculosis mycobacteria

PG: Peptidoglikan

AG: Arabinogalaktan

MA: Mikolik asitler

MOM: Mikobakteriyel dış membran

LAM: Lipoarabinomannan

PPD: Saflaştırılmış Protein Türevi

IFN γ : İnterferon gama

TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

ESAT-6: Early secretory antigenic target

CFP-10: Culture filtrat protein

ManLAM: Arabinan terminaline mannoz bağlı

AraLAM: Arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan

PAMP: Patojenle ilişkili moleküler modelleri

PRR: Konakçı hücrelerdeki ön hat tanıma reseptörü

Bp: Baz çifti

G: Guanin

C: sitozin

BOS: Beyin omurilik sıvısı

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotidi

RNAP: RNA polimerazı

FQ: Florokinolonlar

OFX: Ofloksasin

LEV: Levofloksasin

MOX: Moksifloksasin

CIP: Siprofloksasin

KAN: Kanamisin

AMK: Amikasin

CAP: Kapreomisin

ETH: Ethionamide

PTH: Prothionamide

CS: Sikloserin

TZ: Terizidon

RRDR: Rifampin direncini belirleyen bölge

CDC: Centers for Disease Control

MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

MIRU-VNTR: Variable Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

CC: Konjugat Kontrolü

UC: Universal Kontrol

AC: Amplifikasyon Kontrolü

WT: Wild tip

SLID: İkinci basamak enjekte edilebilir ilaçlar

BAL: Bronkoalveolar lavaj

AMS: Açlık mide sıvısı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mycobacterium tuberculosis bakterisinin neden olduğu tüberküloz, dünya çapında önemli ve yeniden dirilen bir sağlık sorunudur. Son zamanlarda hastalık, bağışıklık sistemini zayıflatarak gizli hastalığın yeniden aktivasyonuna izin veren HIV'in yayılmasıyla daha da yaygınlaştı. Son otuz yılda, ilaca dirençli TB oluşumunda da çarpıcı bir artış olmuştur. TB için yalnızca az sayıda ilaç onaylanmış olsa da, bunların etki mekanizmaları ve farmakokinetiğine ilişkin giderek artan çalışmalar, kapsamlı kombinasyon çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tahmini son yıllarda tahmini yarım milyon vakanın çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olduğunu ve bunların %8,5'inin yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB) olduğunu rapor etmiştir.

Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektedir ve bu mikroorganizmayı en başarılı insan patojenlerinden biri yapar. Bu durum, herhangi bir semptom oluşturmada, konakta uzun süre hayatta kalabilme kabiliyetine ve bu asemptomatik bulaşıcı olmayan faz ile klinik olarak belirgin bir bulaşıcı faz arasında geçiş yapabilme kabiliyetine atfedilebilir. Yoksulluk ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) kaynaklı immün yetmezlik ile yakın ilişkisi, onu dünyanın az gelişmiş bölgelerinde en önemli halk sağlığı sorunlarından biri haline getirmektedir. Bununla birlikte, hastalığın seyrinde bulaşıcı bir bireyi mümkün olduğunca erken dönemde bulaşıcı olmayan bir kişiye dönüştüren müdahaleler de önemlidir.

M. tuberculosis izolatlarının zamanında ve doğru ilaç duyarlılık testi (DST), ÇİD-TB suşlarının bulaşmasını önlemek için hayati önem taşımaktadır. *M. tuberculosis*'in yavaş büyümesi ve katı biyogüvenlik gereksinimleri, kültüre dayalı tekniklerle tam bir DST profilinin elde edilmesini haftalar veya aylar meselesi haline getirir. *M. tuberculosis* ilaç direnci, esas olarak birkaç gendeki kromozomal mutasyonlarla sağlanır, bu da bu genleri sıralayarak veya moleküler hibridizasyonla araştırarak ilaç direncini tespit etmeyi mümkün kılar. Dirençle ilişkili mutasyonların tespiti için çeşitli ticari testler mevcuttur. Dünya Sağlık Örgütü, çoklu ilaç direncini belirlemek amacıyla rifampisin (RIF) direncinin saptanması için GenoType MTBDR plus V2 (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) ve Xpert MTB/RIF testini (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD) desteklemektedir.

Bu alışmada, TB n tanısı ile Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama Ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerde; *M. tuberculosis* kompleks tanısı ve RIF direncinin belirlenmesinde Genotype MTBDR plus testinin performansının, boyalı mikroskopik inceleme ve altın standart yöntem olan kültür yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz (TB) tarihi insanlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır ve tüberküloz hakkında ilk bilgiler Milattan üç bin yıl önce Nil nehri kenarındaki Dra Abu-El Naga isimli kasabada yaşamış olan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kızıdan öğrenilmiştir (1). Tüberküloza özgü iskelet anormallikleri de Mısır mumyalarında bulunmuştur ve eski Mısır sanatı tarafından da açıkça tasvir edilmiştir (2). Pott apsesi denilen vertebra tüberkülozu Milattan önce binyılında yaşamış olan rahip Nesperehan'ın mumyasında ortaya çıkarılmıştır (1). Aceves-Avila ve arkadaşlarının Meksika'da XVI. yüzyılda yaşamış Amerikan Yerlileri'ne ait, 443 iskelette, romatizmal hastalıkları yönünden yaptıkları araştırmada 19 Pott hastalığı görmelerine karşın Gut görülmemiştir (3).

Klinik olarak tüberküloz hastalığı, Roma İmparatorluğu döneminde hekimlik yapmış olan Dr. Aretaus tarafından, terleme ve aralıklı ateş ile birlikte genel halsizliğin eşlik etmesi şeklinde tariflenmiştir (1). Yine, Roma döneminde hekimlik yapmış olan Bergama'lı Galen veremi ateş, kanlı öksürük ve terleme belirtileri ile giden ve az bulaşıcı bir hastalık olarak nitelendirmiştir (1).

Mikobakteriler 150 milyon yıldan daha önce ortaya çıkmıştır ve insanlarda hastalık yapan diğer patojenlere göre daha fazla can kaybına neden oldukları bilinmektedir (4). Önceleri göçebe yaşarken, yerleşik hayata geçen insanlar ilk olarak verem mikrobunu (*Mycobacterium bovis*) evlerinde baktıkları sığırlarından almıştır. İlk araştırmalarda sığırlarda tüberküloz benzeri bir hastalığa neden olan *M. bovis*'in, *M. tuberculosis*'in evrimsel öncüsü olduğu varsayılmıştır (5). Ancak bu hipotez *M. tuberculosis* kompleksi (MTBC) genomunun DNA dizilimi ve diğer moleküler yöntemler ile karakterize edilerek ortaya çıkarılan yeni veriler nedeniyle artık şüpheli kabul edilmektedir. Bu çalışmalar ile MTBC üyeleri arasında %99,9'dan fazla DNA dizisi benzerliği gösterilmiştir (6), ancak nadir eş anlamlı tek nükleotid polimorfizmlerinin (sSNP) varlığı, bu yakın ilişkili bakteriler arasında ayırım yapılmasına olanak tanır. sSNP analizleri, *M. bovis*'in *M. tuberculosis* ile aynı

zamanda evrimleştiğini (7) ve MTBC genomlarındaki delesyonların ve insersiyonların dağılımına ilişkin bir çalışma ise, her iki *M. tuberculosis* ve *M. bovis* bakterilerinin *M. canetti* ile ilişkili başka bir öncü türden oluştuğunu göstermiştir (6).

Thomas Domandy ‘Beyaz Veba’ isimli kitabında veremin ortaya çıkmasında sadece mikroorganizmanın varlığı değil aynı zamanda kötü barınma koşulları, yetersiz beslenme, aşırı nüfus artışı, göçler ve hava kirliliğinin de katkısı olduğunu yazmaktadır (1).

Orta Çağ Avrupa'sında tüberkülozun yaygın olduğu Arkeolojik kanıtlar ile gösterilmiştir. Orta Çağ ve sonrasında “King’s Evil” olarak bilinen lenf bezi tüberkülozu çok yaygındı (8). Fransa Kralı Clovis’in 496 yılındaki tac giyme töreninde skrofulalı hastalara dokunan ilk Avrupa hükümdarı olduğu biliniyor ve nesiller boyunca kralın soyundan gelenlerin onun şifa gücünü miras aldıkları düşünülüyordu. Hastalıktan etkilenen kişilerin kralın dokunuşu ile iyileşebileceğine inanılıyordu (9). İngiltere Kralı VI. Edward, Fransa Kralı IX. Charles, tüberküloz hastalığından ölen krallardır (9).

Tüberküloz basilini ilk kez 1882 yılında bir kasabada doktorluk yapan Robert Koch, kendisine doğum günü hediyesi olarak eşinin verdiği mikroskopla gösterdi. Bu mikroorganizmayı TB hastalığına yakalanmış bütün hastalarda gösterdi ve çalışmaları sonucunda “Tüberküloz bulaşıcı, korunabilir ve iyileştirilebilir bir hastalıktır” tezini yayınladı (1). Doktor ve Bakteriyolog olan Albert Calmette ve Fransız Pateur Enstitüsündeki Veteriner Calmille Guerin, birlikte bu mikroorganizmaya karşı aşı bulmaya yönelik araştırmalar yapmaya başladılar. Amaçları, vereme karşı bağışıklık oluşturacak virülansı düşük bir mikobakteri üretmektir. Bir sığırdan elde ettikleri virülen bir TB basilini (*M. bovis*) patates, sığır safrası ve gliserinden oluşan yapay bir kültür ortamına ektiler. Bu bakteriyi yaklaşık 20 senelik bir süre içerisinde 230 defa pasajladıktan sonra istedikleri sonuca vardılar. Bilim çevreleri, bağışıklık yapma özelliği olan bu bakteriye Bacille Calmette-Guerin (BCG) adını verdiler (10). BCG aşısı artık test edilmek için hazır. Aşı ilk defa 1921 yılında Paris’te annesi akciğer tüberkülozundan ölen bir yenidoğana uygulandı ve çocukta bağışıklık sağlanarak TB hastalığı gelişmedi. Bundan sonraki yedi yılda 100

binden fazla çocuk bu aşı ile aşılandı ve artık aşı Avrupa'da kolayca bulunabiliyordu (10,11).

Tüberkülozun bulaşıcı ve önemli bir hastalık olduğu 19. yüzyılda artık bilinmekteydi. Doktor Herman Biggs, 1881 yılında tüberkülozun bir halk sağlığı sorunu olduğunu sapmatasıyla birlikte 1889 yılında tüberküloz vaka bildiriminin önemini vurguladı. 1894 yılında Herman Biggs New York Şehri Yönetim Kurulu'nu tüberkülozun bildirimi zorunlu bir hastalık olması gerektiği konusunda ikna edebildi ancak sağlık uzmanları 1900'e kadar bu uygulamaya karşı çıktı (12–15). Aynı şekilde Domasevicius 1934 yılında yayınladığı makalesinde tüberkülozun bir birey hastalığı ya da bir aile hastalığı olmadığını, tüberkülozun genel popülasyonun hastalığı olduğunu belirtti (16). Bu gelişmelerden sonra XIX. yüzyılın sonlarında ve XX. yüzyılda veremli hastaların izolasyonu düşünülerek bunun için dağlık yerlerde sanatoryumlar yapılmaya başlanmıştır.

Tüberküloz tarihinde yeni bir dönem, 1940'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde streptomisin (SM), İsveç'te para-amino salisilik asit (PAS)'ın bulunması ile başlamıştır. Tedavide kullanılan bu ilaçlara zamanla direnç gelişmesiyle yeni ilaç araştırmaları başlamıştır. Robizek ve Selikof 1952 yılında izoniazidin (INH) bulmasından sonra 18-24 ay süren üçlü kombine tedavi rejimi sonucu TB tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. 1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında etambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur.

Kendi tarihimize baktığımızda tüberkülozla ilgili kaynaklarda verem hastalığının Osmanlı'da da önemli bir sağlık sorunu olduğunu görüyoruz. Sultan II. Mahmut'un analığı Nakşidil Sultan ve oğlu Abdülmecid'in veremden öldüğü bildirilmektedir (17). Osmanlı'da verem ve kuduz hastalığı ile savaş II. Abdülhamit tarafından başlatılmıştır. II. Abdülhamid'in arzusu üzerine Cemiyet-i Tıbbiye-i Şahane tüberküloz konusu üzerinde çalışmaya yönelmiştir. 1918 yılında Prof. Dr. Besim Ömer Paşa tarafından kurulan Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti Türkiye'deki veremle mücadelenin öncü kuruluşu kabul edilir (18). Bunu takiben Behçet Uz tarafından 1923 yılında İzmir'de Verem Savaş Derneği kurulmuş. 1925 yılında Tevfik Sağlam'ın organize ettiği Milli Türk Tıp Kongresi'nde esas konu

olarak veremle savaş gündeme girmiştir. İstanbul'da verem savaş dispanserlerinin sayısı hızla artmıştır (18).

2.2. Epidemiyoloji

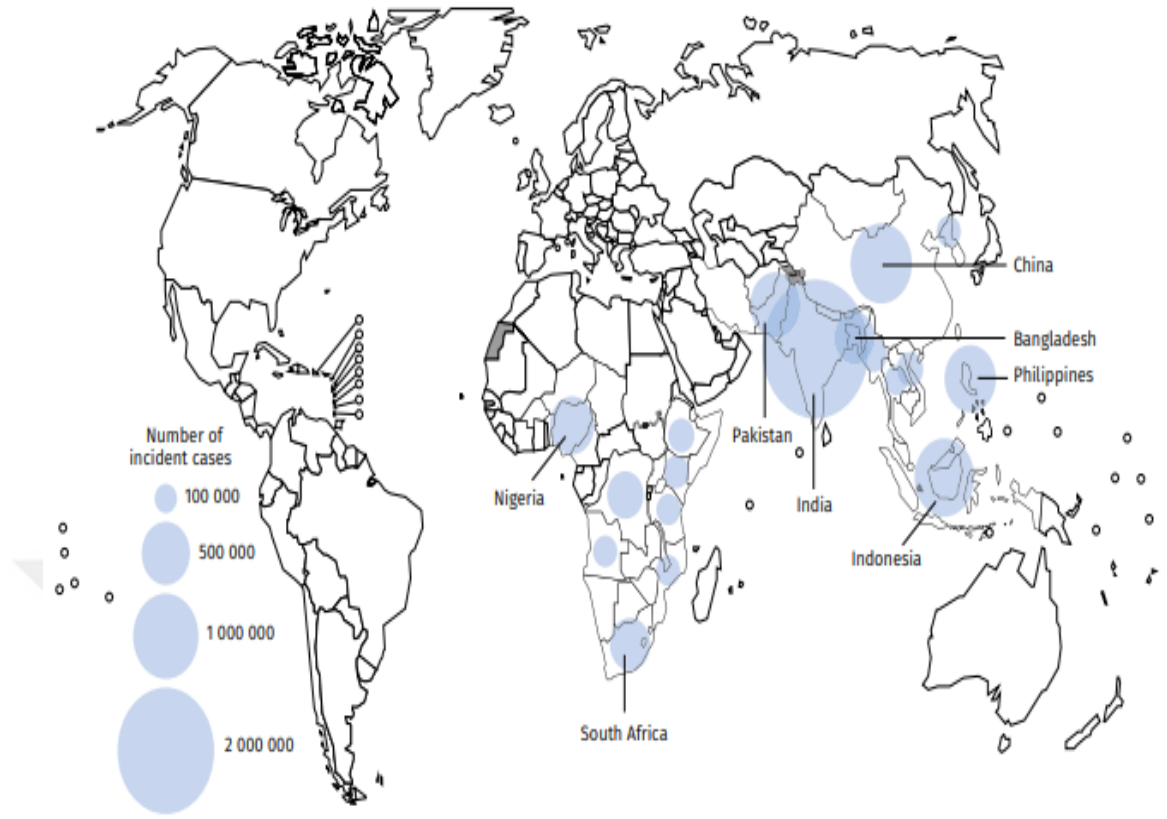
2.2.1. Dünya'da Tüberküloz Durumu

Tüberküloz dünyada yaygın görülen önemli bir bulaşıcı hastalıktır ve dünyada ölüme neden olan başlıca 10 hastalıktan biridir. Tek başına ölüme neden olan enfeksiyon etkeni olarak ilk sırada yer alır. Tüberküloza *M. tuberculosis* basili neden olur ve çoğunlukla akciğerleri etkiler. Akciğer tüberkülozu olan kişiler öksürdüğünde, hapşırdığında veya tükürdüğünde tüberküloz hava yoluyla yayılır. Bir kişinin enfekte olması için sadece birkaç mikrop soluması yeterlidir (19).

1997'den beri her yıl Dünya Sağlık Örgütü (WHO), küresel TB durumunun güncel bir değerlendirmesini saptayan ve hastalığın önlenmesi, teşhisi ve tedavisindeki ilerleme ve çabaları özetleyen ülkesel, bölgesel ve küresel düzeyde TB raporu yayınlamaktadır. Bu rapora göre her yıl yaklaşık 10 milyon kişi tüberküloz hastalığına yakalanmaktadır. Önenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, TB her yıl 1,5 milyon insanın ölümüne neden olmakta ve bu da onu dünyada en sık ölüme neden olan bulaşıcı hastalık yapmaktadır (19).

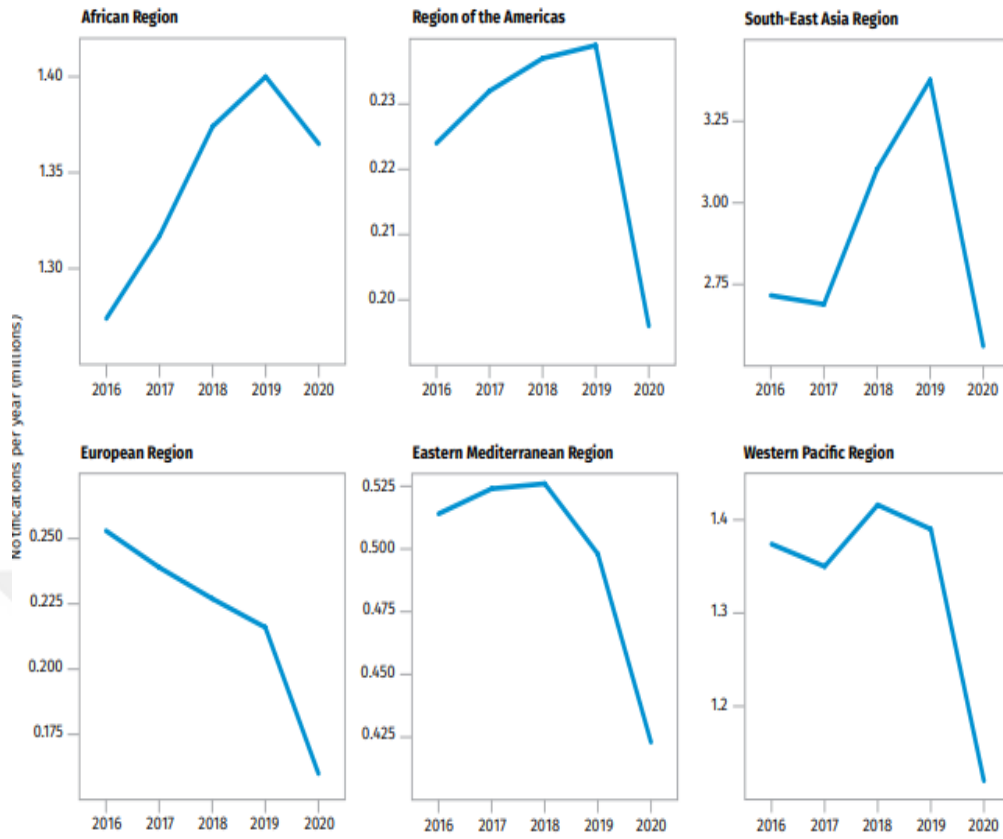
Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birinin *M. tuberculosis* tarafından enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Bu kişilerin sadece %5-15'inde aktif TB hastalığı gelişmektedir. Geri kalanlarda hastalık oluşturmada TB enfeksiyonu vardır ve bulaştırıcı değildir. TB antibiyotik kullanımı ile tedavi edilebilir bir hastalıktır (20). TB gelişen hastaların %85'i altı aylık ilaç tedavi rejimi ile tedavi edilebilir ve tedavi bulaşıcılığın önlenmesinde faydalı olur (20).

Tüberküloz tüm dünyada mevcuttur ancak yoksul ülkelerin hastalığı olarak bilinmektedir ve tüberküloza yakalanan insanların çoğu düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Tüm TB hastalarının yaklaşık yarısı şu 8 ülkede bulunmaktadır: Bangladeş, Çin, Hindistan, Endonezya, Nijerya, Pakistan, Filipinler ve Güney Afrika (Şekil 1) (19).



Şekil 1. En az 100.00 TB vakası olan ülkelerdeki tahmini TB insidansı, 2020 (WHO) (19)

2020 Mart ayında COVID-19 pandemisi patlamasıyla birlikte tüberkülozla ilgili verilerde önemli değişiklikler görülmüştür. En belirgin etki, yeni TB tanısı konan ve rapor edilen kişi sayısındaki büyük küresel düşüş olmuştur (Şekil 2). Yeni TB vaka sayısı 2019'da 7,1 milyondan 2020'de 5,8 milyona kadar düşmüştür, veriler %18'lik bir düşüşle 2012 seviyesine geri dönmüştür ve bir önceki yıla göre çok geride kalmıştır. TB tanı ve tedavisine erişimdeki bu azalma, TB nedenli ölüm sayısında artışa neden olmuştur. 2020 yılında en iyi ihtimalle tahmini, TB nedenli ölüm sayısı HIV negatif insanlar arasında 1,3 milyon (2019'da 1,2 milyon) ve HIV pozitif insanlar arasında 214.000'dir (2019'da 209.000). Ölüm sayısındaki bu artış verilerin 2017 düzeyine geri döndüğünü göstermektedir. TB insidansındaki düşüş önceki yıllara göre durma noktasına kadar yavaşlamıştır. Bu etkilerin 2021 ve 2022'de çok daha kötü olacağı tahmin edilmektedir (19).



Şekil 2. TB tanısı konan kişilerin vaka bildirimlerindeki eğilimler, 2016–2020 (WHO) (19)

İlaça dirençli TB halk sağlığı tehdidi olmaya devam etmektedir. Birinci basamak ilaçlardan en etkili olan izoniazid ve rifampisine karşı direnç en büyük endişe kaynağıdır. Her iki ilaca karşı direnç, çoklu ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) olarak tanımlanır. Hem ÇİD-TB hem de sadece rifampisine dirençli TB (RR-TB), ikinci basamak ilaçlarla tedavi gerektirir. Yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB), izoniazid ve rifampisine, ayrıca herhangi bir florokinolon ve enjekte edilebilir ikinci basamak ilaçtan yani amikasin, kanamisin veya kapreomisin en az birine dirençli, nadir görülen bir ÇİD-TB türüdür.

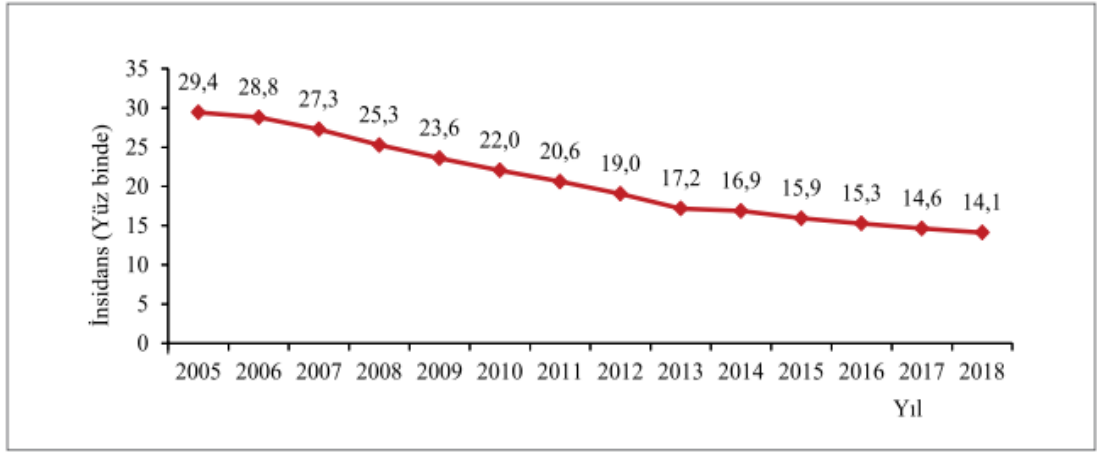
2020'de dünyada, bakteriyolojik olarak doğrulanmış akciğer TB hastalığı teşhisi konan kişilerin %71'i (2,1/3 milyon) antibiyotik direnci için test edilmiştir. Aynı oranlar 2018'de %51, 2019'da %61 şeklindedir. Toplam 157.903 vakanın 132.222'si ÇİD/RR-TB ve 25.681'i YİD-TB olarak tespit edilmiştir. Bu, 2019'da ilaca dirençli tüberküloz tespit edilen toplam 201.997 vaka sayısına göre büyük bir düşüştür (%22)

ve yeni teşhis edilen toplam vaka sayısında benzer şekilde büyük düşüşlerle tutarlı görülmektedir (%18). Dünya’da 2020 yılında ÇİD/RR-TB tespit edilen 150.359 kişi tedavi edilmiştir. Kayıtlı olduğu bildirilen ÇİD/RR-TB’li tedavi edilen kişilerin kümülatif toplam sayısı 2018’den 2020’ye kadar 482.683 idi, bu 5 yıllık hedefin sadece %32’sine denk gelmektedir (2018-2022 toplam 1,5 milyon hedef) (19).

Tüberkülozu Sonlandırma Stratejisinde öngörüldüğü gibi 2035 yılına kadar küresel bir halk sağlığı tehdidi olan tüberkülozun sona erdirilemeyeceği tahmin edilmektedir. Örneğin, hedef 2015 ve 2020 arasında TB insidansını %20 azaltmak iken, 2020 küresel TB raporu, bu dönemde TB insidansında sadece %9’luk bir azalma olduğunu ve yıllık olarak sadece yaklaşık %2’lik bir azalma olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, 2015 ve 2020 arasında ölüm oranlarında sadece %14’lük bir azalma ile %35 olarak belirlenen ölüm azaltma hedeflerine ulaşamamıştır.

2.2.2. Türkiye’de Tüberküloz Durumu

Türkiye’de TB için başarılı bir verem savaşı programı yürütülmektedir. Ülkemizdeki tüberkülozlu hasta sayısı her yıl azalmaya devam etmektedir. Türkiye’de Verem Savaşı 2020 Raporu’ndaki verilere göre 2005 yılında 20.535 olan toplam olgu sayısı, 2019 yılında 11.401 olarak gerçekleşmiştir. Yıllar içinde nüfusun artmasına rağmen hasta sayısı düşmüş, toplam olgu hızı yüz binde 29,8’den 13,7’e gerilemiştir (Şekil 3). Mülteci hastaların göçle birlikte artışı da bu program içinde başarıyla ele alınmıştır. Bu başarıda hastaların erken tanısı ve tedavisi, hasta temaslılarının muayenesi ve hastalanma riski taşıyanlara koruyucu tedavi verilmesini kapsayan bütünlüklü bir programla çalışan verem savaş dispanserlerinin büyük katkısı bulunmaktadır (21).



Şekil 3. Türkiye’deki Yıllara Göre TB İnsidansı, 2005-2018 (21).

Ülkemizin coğrafik konumundan dolayı çok sayıda göç alması TB verilerini önemli derecede etkilemektedir. Yabancı ülke doğumlu TB hastalarında %56,2 ile Suriye doğumlular birinci sırada yer almaktadır. ÇİD-TB olgularının doğduğu ülke dağılımına bakıldığında doğum yeri Türkiye olanlardan sonra en sık görüldüğü ülkeler Suriye, Azerbaycan ve Türkmenistan’dır.

İlaç duyarlılık testi (İDT) çalışılan olgularda toplam direnç oranı %19,2 olarak gerçekleşmiştir. İDT yapılanlarda ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,6 iken, önceden tedavi görmüş olgularda %9,9 olarak saptanmıştır. 2018 yılındaki 176 ÇİD-TB olgusunun 8’i (%4,5) YİD-TB olgu olarak tespit edilmiştir (Şekil 4) (21).

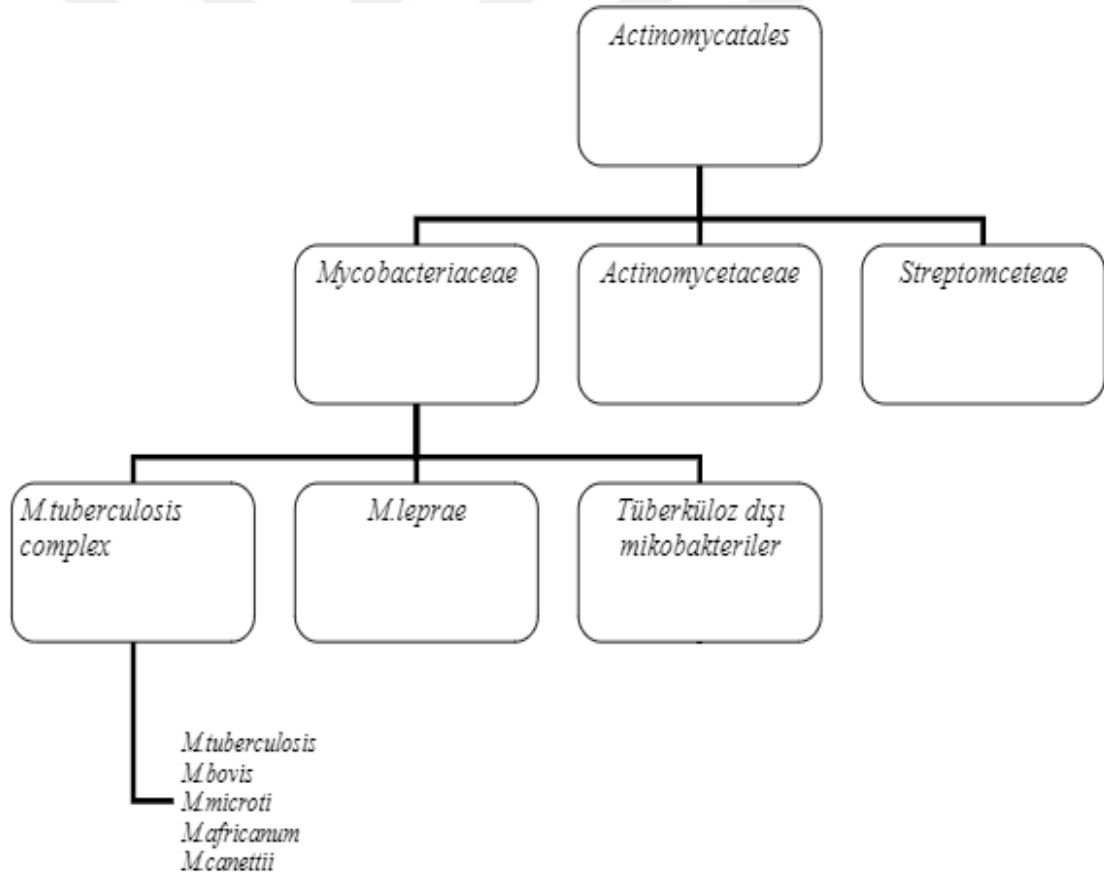
Tablo 1. Türkiye’deki ÇİD-TB ve YİD-TB Olgu Dağılımı, 2005-2018 (21).

Yıl	ÇİD-TB		YİD-TB*		Toplam TB
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde**	Olgu Sayısı
2005	191	0,9	-	-	20.535
2006	249	1,2	-	-	20.526
2007	240	1,2	-	-	19.694
2008	263	1,4	-	-	18.452
2009	222	1,3	-	-	17.402
2010	250	1,5	3	1,2	16.551
2011	262	1,7	1	0,4	15.679
2012	291	2,0	6	2,1	14.691
2013	228	1,7	3	1,3	13.409
2014	253	1,9	2	0,8	13.378
2015	230	1,8	3	1,3	12.772
2016	200	1,6	9	4,5	12.417
2017	191	1,6	2	1,0	12.046
2018	176	1,5	8	4,5	11.786

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Mikobakteriler hücre duvarı mikolik asitleri benzerliği sebebi ile *Actinomycetales* takımı içerisinde yer alan *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesidir (Şekil 5). Mikobakteriler zorunlu aerobik, spor oluşturmayan (*M. marinum* dışında), hareketsiz, 0,2-0,6 µm genişliğinde, 1-10 µm uzunluğunda, ince, düz basillerdir (22).

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı diğer bakterilerden farklıdır. Mikobakterilerin lipidden zengin kompleks hücre duvar yapısı bakterinin karakteristik özelliklerinin büyük kısmından sorumludur. Hücre duvarı Gram boyamada kullanılan basit anilin boya ile boyanmaz. Basiller bir kere boyandıklarında asit solüsyonları ile boyalarını bırakmazlar bu nedenle ‘asit dirençli bakteriler (ARB)’ olarak adlandırılırlar (23). ARB özelliği mikobakteriler dışında *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, *Isospora* ve *Cryptosporidium* gibi mikroorganizmalarda da bulunur. Ancak bu bakteriler mikobakterilere kıyasla daha kısa mikolik asit zincirine sahiptirler ve daha az yoğun boyanırlar. Bu nedenle bu türler kısmi asit dirençli olarak da nitelendirilirler (24). Mikobakterilerin ikiye bölünme süreleri 18 saattir, bu nedenle uygun sıcaklıkta kolonilerin görülmeye başlaması ortalama 2-60 gün sürmektedir (23,25)



Şekil 4. Mycobacterium bakterisinin taksonomik ağacı (26).

Mikobakterium cinsi, bir kısmı saprofit bir kısmı zorunlu parazit 70 civarında tür içerir. Mikobakteriler geleneksel olarak fenotipik karakterizasyonlarına göre sınıflandırılmıştır ancak 1980 yıllarının sonunda moleküler yöntemler geliştirildikçe genotipik özelliklerine göre sınıflandırılmaya başlanmıştır (25).

Mikobakterilerin fenotipik sınıflandırmasında üreme hızları ve koloni morfolojileri kullanılır. Hızlı üreyen mikobakterilerin kültürü yapıldıktan sonra yedi günden daha kısa sürede Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kolonileri görülmeye başlar. Yavaş üreyen mikobakterilerin katı besiyerinde kolonilerin oluşması için gereken süre yedi günden fazladır. Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri yönünden birbirleriyle ilişkili türler *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak isimlendirilmiştir. MTBC akciğerlerde görülen ve tüberkül olarak adlandırılan nodüler lezyonlardan dolayı tüberkülozun zorunlu patojenleri ve etiyolojik ajanlarıdır (27). MTBC, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti* ve *M. tuberculosis*'ten oluşur.

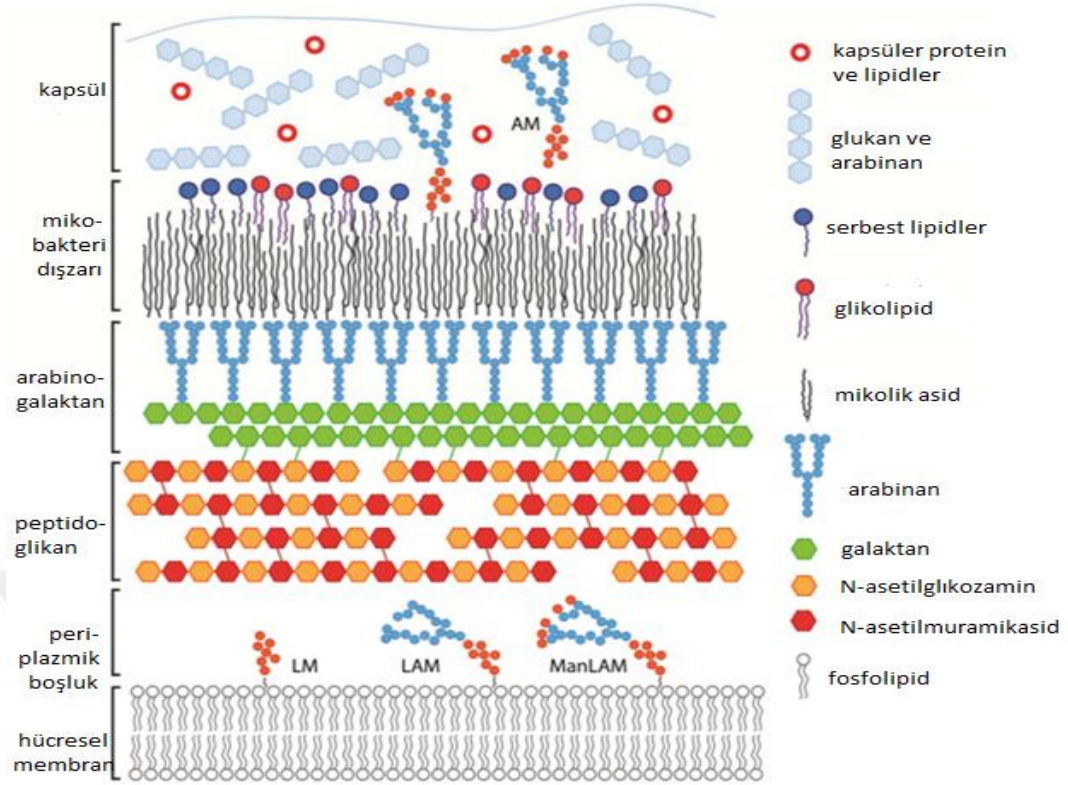
Diğer mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler ‘‘nontuberculosis mycobacteria (NTM)’’ olarak tanımlanmıştır. Runyon tarafından mikobakteriler 1950 yılında koloni morfolojileri, pigment üretimi ve üreme hızları gibi özelliklere göre fotokromojen, skotokromojen, nonkromojen ve hızlı üreyenler olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır (28). Bu sınıflandırma şeması dört gruptan oluşur:

1. Yavaş üreyen fotokromojenler: *M. marinum*, *M. kansasii*
2. Yavaş üreyen skotokromojenler: *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*
3. Yavaş üreyen nonkromojen mikobakteriler: *M. avium* kompleksi (MAC), *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. terrae*, *M. haemophilum*, *M. genavense*
4. Hızlı üreyen mikobakteriler: *M. chelonae*, *M. fortuitum*, , *M. abscessus*

2.4. *M. tuberculosis*'in Hücre Duvar Yapısı

M. tuberculosis bilinen en karmaşık yapılı hücre duvarına sahip bakteridir. Biyokimyasal çalışmalar ile mikobakteri hücre duvar iskeletinin temel üç makromolekülden oluştuğunu göstermiştir. Bunlar peptidoglikan (PG), arabinogalaktan (AG) ve mikolik asitlerdir (MA). Hücre duvarı yapısı, ilk olarak hücre zarı ile arasında periplazmik boşluk bulunan PG tabaka ile kaplıdır. AG'den oluşan tabaka PG'na kovalent olarak bağlıdır. Arabinan kalıntılarının çoğu uzun, dallanan yağ asitleri olan MA ile bağlantılıdır, hücre duvarının %60 ını oluşturan MA hücre duvarının mumsu yapısını oluşturur ve bu tabaka mikomembran veya mikobakteriyel dış membran (MDM) olarak adlandırılır (29). MDM ayrıca glikolipidler, ftiyoserol dimikoserozat kord faktör, süfolipidler ve fosfatidilinositol mannozidler gibi çeşitli serbest lipidler içerir, bunların birçoğu immunmodülatör özelliklere sahiptir ve virölans faktörleri olarak kabul edilir. Hücre duvarı boyunca devam eden ve yüzeyi kapsül ile örtülü lipoarabinomannan (LAM) da aynı özelliklere sahiptir (30).

Mikobakteriyel hücre duvarı dış etkenlere karşı önemli bir bariyer oluşturur. Bu sayede *M. tuberculosis*'i dehidratasyon, osmoz, pH direnci ve makrofaj içerisinde canlı kalma özelliği kazandırır ve birçok antibiyotiğe karşı dirençli olmasını sağlar (31). Mikobakterilerin hücre duvarı, intrinsik antibiyotik direnci ve virölansında da kilit rol oynar (32). Mikomembrandan salgı proteinlerinin taşınması için özel sekresyon sistemleri kullanılır (33) ve besinler gibi hidrofilik moleküllerin alımı hücre duvarı ve membranda bulunan porinler tarafından sağlanır. Mikobakteri hücre duvar yapısı Şekil 5'de gösterilmiştir (34).



Şekil 5. *M. tuberculosis*'in hücre duvarı (35).

M. tuberculosis hücre duvarının yoğun lipid yapısından dolayı aside dirençli boyanır. Aside dirençli basil olarak adlandırılmasının nedeni hücre duvarının %95 etil alkol ve %3 hidroklorik asit tarafından dekolarizasyona direnç göstermesidir (36). Aside dirençli boyama yöntemi Franz Ziehl ve Friedrich Neelsen tarafından 19. yüzyılın sonlarında bulunmuş ve zamanla geliştirilmiştir (37).

2.5. *M. tuberculosis* virülans faktörler

Mikobakteriyel patojenler, konakçıda kolonizasyon, replikasyon ve hayatta kalmasını sağlayan çeşitli mekanizmalar sayesinde hastalığa neden olmaktadır. Bu nedenle mikobakteriyel virülans faktörleri, tipik olarak, konakta genel olarak yaşamaya devam etmelerini sağlayan bakteriyel genler veya hücresel bileşenlerden oluşmaktadır (38).

2.5.1. Hücre Duvarı Komponentleri

M. tuberculosis' in antijenik özelliklerini belirleyen hücre duvarı yapıları konağın immun cevabını modifiye ederek immünsupresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşumu, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi *M. tuberculosis*'in hücre içi yaşamasını sağlayan fonksiyonları düzenlerler (39).

2.5.2. Old Tüberkülin

Tüberküloz basilinin kaynatılarak elde edilmiş kültür ekstraktıdır. Önceleri intradermal cilt testinde kullanılmış ancak sadece mikobakteriyel proteinleri içermemesi nedeniyle saflaştırılarak cilt testinde kullanılmıştır (40).

2.5.3. Saflaştırılmış Protein Türevi (PPD)

İlk kez Seibert ve Glenn tarafından (1941) yapay besiyerlerinde hazırlanmış old tüberkülinin kollodyan membranlardan geçirilerek ve amonyum sülfatla çöktürülmesinden elde edilmiştir. Tam saflaştırılamamıştır ve diğer mikobakterilerle enfeksiyonda çapraz reaksiyon verebilir. DSÖ 0,1 ml solüsyonda 5TU (0,0001 mg PPD-S proteini) dozunda PPD bulunmasını önermektedir (41).

2.5.4. Isı Şok Proteinleri-HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)

Anoksik şartlarda üretilen şeparon benzeri proteinlerdir. Konakta Th1 cevabını indükler ve koruyucu immünite gelişmesinden ve komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir (42).

2.5.5. 65 kDa Protein

Konak hücre içinde çoğalan basillerden salgılandığı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu lezyonda kazeifikasyon ve likefaksiyon oluşturduğu bulunmuştur. İmmünojenitesi yüksek olan bir ısı şok proteinidir (41).

2.5.6. 19 kDa Lipoprotein

M. tuberculosis'in hücre duvarında bulunur. Özellikle immüniteyle ilgili çok önemli rolleri vardır. İnterferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 sentezini azaltarak T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. Nitrojen ara ürünlerinin üretimini, MHC-I'in antijen bağlamasını inhibe eder. Monosit ve makrofajların apoptozunda görevlidir (42).

2.5.7. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)

M. tuberculosis genomunun RD1 bölgesi üzerine yapılan son çalışmalar, bunun iki önemli salgı proteinini kodladığını göstermektedir, bunlar ESAT-6 ve CFP-10 proteinleridir (43). ESAT-6 ve CFP-10 antijenleri üzerinde yapılan çalışmalar, hücresel immün yanıtların güçlü uyarıcıları olduklarını, aynı anda humoral yanıtları tetikleyebildiklerini ve spesifik antikor düzeylerini önemli ölçüde artırdıklarını ortaya koymuştur (44). *M. tuberculosis* virülans faktörü olan ESAT-6 fagozomal yırtılma, mikobakteriyel sitozolik translokasyon ve hücreden hücreye yayılma dahil olmak üzere patogeneizde birçok işleve sahiptir (45).

Tüm MTBC'de bulunan ancak *M. bovis* BCG genomunda bulunmayan RD1, büyük bir virülans faktörü olarak ESX-1 tip VII salgılama sistemini kodlar (46,47). ESX-1'in aktivitesinde ESAT-6 proteininin aracılık ettiği gösterilmiştir. ESX-1 sisteminin ayrıca in vitro enfeksiyon deneylerinde tüm hücreleri parçalayarak makrofaj ve epitel hücre nekrozuna neden olduğu bulunmuştur (46,48).

2.5.8. Mikobakteriyel Lipidler

M. tuberculosis hücre yüzeyinde çok çeşitli kompleks lipidler ve lipoglikanlar bulunması bakımından bakteriyel patojenler arasında benzersizdir (49). Sahip olduğu bu hücre duvarı lipidlerinin tüberküloz basil için virülansda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

- **Trehaloz-6,6 dimikolat (Kord faktör)**

Tüberküloz basilinin küme oluşturmaya sağlayan önemli bir virülans faktörüdür. Kord faktörün yalnızca virülen mikobakteriler oluşturmaktadır. Kord faktörün adjuvan etkisi vardır ve komplemanı alternatif yolla aktive eder. Dokularda granülom oluşumunda etkilidir. PNL göçünü inhibe eder. Konak hücrede mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyon hasarına neden olmaktadır (40,41).

- **Sülfolipidler (Sülfatidler)**

Sülfür içeren glikolipidlerdir. Kord faktöre sinerjik etki yapar ve makrofaj içinde fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek, basili lizozomal enzimlerin etkisinden koruyarak makrofajlara karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir (41).

- **Wax D**

Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini arttırıcı özelliğe sahiptir. Tümör süpresör özelliğe sahip olup, BCG aşısının bazı tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapotik etkisinde rolü vardır (41).

- **Lipoarabinomannan**

M. tuberculosis' in major hücre duvarı lipoglikanıdır. Lipoarabinomannanın üç tipi mevcuttur. Bunlar, ManLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı), fosfomyoinozitol bağlı LAM ve AraLAM (arabinan terminaline mannoz bağlı olmayan). ManLAM yalnızca virulan mikobakterilerde bulunurken diğerleri hızlı üreyen avirulan mikobakterilerde bulunmaktadır. ManLAM, monositleri inaktive eden ve lenfositleri baskılayan bir sitokin olan TGF- β 'nın ekspresyonunu indükler ve monositleri inaktive edici TNF- α 'nın ekspresyonunu inhibe eder. Ayrıca manLAM'ın insan periferik kan T hücre kemotaksisini indüklediğine dair çalışmalar, granülamatöz yanıtın başlamasında manLAM'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir (40,50).

- **Fosfatidil inozitol mannozid**

Lipid yapısındadır ve hapten özelliği gösterir. Çapraz koruyucu immünitede rolünün olabileceği düşünülmektedir (41).

2.5.9. Enzimler

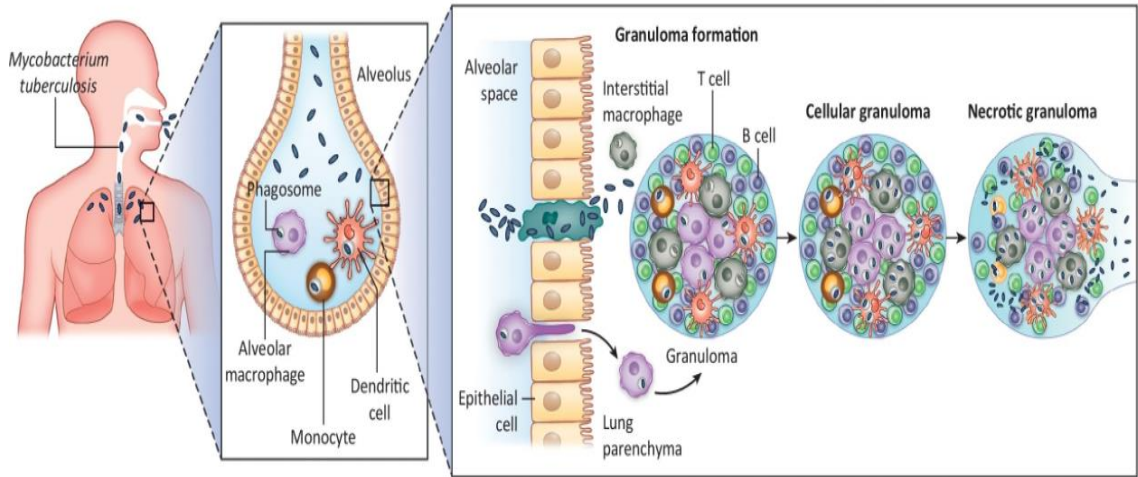
M. tuberculosis, enfeksiyon ve çoğalma sürecinde metabolizması için ihtiyaç duyduğu karbonhidratlar, aminoasitler, pürin-pirimidinler ve eser elementler gibi esansiyel metabolitler ve kofaktörleri ürettiği konak ortamından sağlar. Ayrıca makrofajlardaki oksidatif strese karşı korunmak üzere antioksidan enzimler üretirler. Mutasyon çalışmaları bu enzimlerin enfeksiyonun sürekliliği ve mikobakterinin virulansı için gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu enzimlerden en önemlileri; izositrat liyaz, lipaz/esteraz, açılCoA sentaz (FadD33) ve fosfolipaz C gibi lipid metabolizması ile ilişkili enzimler, isopropilmalat izomeraz, antranilat fosforibozil transferaz, pyroline-5- karboksilat redüktaz ve 1-fosforibozil aminoimidazol-süksinokarboksamid sentaz gibi aminoasit ve pirolin sentezinde rol oynayan enzimlerdir. Ayrıca nitrat redüktaz, katalaz-peroksidaz, alkil hidroperoksid redüktaz, demir ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz ve Cu, Zn ile güçlendirilmiş süperoksit dismutaz gibi solunum enzimleri ile metal transferazlardır (51).

2.5.10. Transkrip Regülatörleri

Genlerin transkripsiyonunu regüle eden regülatörler, metabolizma, hücre duvarı sentezi, bölünme ve virulans faktörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek mikroorganizmanın bulunduğu ortamda canlılığını devam ettirmesini sağlarlar. Bu regülatörlerden, housekeeping genlerin ekspresyonunu düzenleyen sigma A, insanda latent enfeksiyonların oluşumunda metabolizmayı bazal düzeye taşıyan Sigma F, dış ortamdaki ısı artışı veya dezenfektanların varlığını algılayarak gen düzenlemeleri yapan sigma E ve oksidatif strese cevap olarak ekspresyonu artan sigma H gibi sigma faktörler ile virulans genlerinin ekspresyonunu düzenleyen ve makrofaj içerisinde çoğalma ile ilgili olarak düzenlenen cevap regülatörleri ve diğer transkripsiyonel regülatörlerin virulans ile ilişkili oldukları yine mutasyon ve atenuasyon bazı çalışmaları gösterilmiştir (52).

2.6. *Mycobacterium tuberculosis*'de Patojenite

Tüberküloz hala tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. HIV/AIDS pandemisi, gelişmekte olan ülkelerdeki halk sağlığı sistemlerindeki bozulma ve tüberkülozun çoklu ilaca dirençli formlarının ortaya çıkması bu yayılmaya daha fazla katkıda bulunmuştur. TB bulaşı aerosol yolla yani canlı basil içeren enfeksiyöz damlacık çekirdeklerinin solunması ile gerçekleşir. Bulaşdaki etkili faktörler, kaynak vakanın basil yükü, maruz kalmanın yakınlığı ve süresidir (53). *M. tuberculosis* ile enfekte olan bireylerin çoğunda (~%90) hastalık gelişmemektedir. Dünya nüfusunun üçte biri TB ile enfekte olduğu ve bunların yalnız %15'inde aktif hastalık gelişeceği tahmin edilmektedir (54). *M. tuberculosis*'in ilk olarak akciğerde dokuda bulunan alveolar makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından fagositoza uğradığı bilinmektedir (55). Akciğerde, fagozomlara olgunlaşan endositik kompartmanda bulunan mikobakteriler, alveolar makrofajlar tarafından yutulur. Basil taşıyan dendritik hücreler, distal hava yollarından drene olan mediastinal lenf düğümlerine giderek burada T hücre yanıtını başlatırlar (56). Normal şartlar altında fagozomlar lizozomlara birleşir ve fagozomal içerikler hücre içi bakterileri yok eden lizozomal hidrolazlara, reaktif oksijene ve nitrojen türlerine maruz kalır. MTBC türleri, fagozom-lizozom füzyonunu inhibe ederek ve fagolizozom içindeki asidik ortamlardan kaçarak canlılığını sürdürecektir mekanizmalar geliştirmiştir (57). *M. tuberculosis*'in daha sonra, enfekte hücrelerin lokal drenaj lenf düğümlerine göç ettiği kısa bir sınırsız hücre içi replikasyon periyoduna maruz kaldığı düşünülmektedir. Bölgesel lenf düğümüne ulaştıktan sonra, *M. tuberculosis*'in kan ile dolaşıma katılır ve burada yeni konakçı hücrelerle karşılaşarak onları enfekte eder ve nihayetinde akciğerde ek bölgelerde yeniden yerleşerek enfeksiyona neden olur. Hücresel bağışıklığın aktiflenmesiyle birlikte, lokal pro-inflamatuar yanıtlar ile monositlerin ve lenfositlerin toplanmasına yol açar (55), bunlar da granülom olarak isimlendirilen organize hücresel bir yapı içinde *M. tuberculosis*'i sınırlandıracak şekilde enfekte olmuş makrofajların etrafında toplanır (Şekil 6). Granülom, tüberkülozun tipik patolojik özelliğidir ve *M. tuberculosis*'in uzun süreli yavaşlamış veya durdurulmuş bir replikasyon durumunda kaldığına inanılan bölgedir (58). Granülomların, enfeksiyonu kontrol altına almak ve yayılmayı önlemek için immünolojik ve fiziksel bir engel oluşturduğu düşünülmektedir (58).



Şekil 6. *M. tuberculosis* Patogenezi (59).

2.6.1. *M. tuberculosis*'de Doğal Bağışıklık

Hücre içi patojen olan *M. tuberculosis*, bağışıklık sistemi ve özellikle doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından temizlenmesinden kaçınmak için çok sayıda strateji geliştirmiştir (60). *M. tuberculosis* enfeksiyonunda yer alan başlıca doğal bağışıklık hücre tipleri arasında makrofajlar, dentritik hücreler, nötrofiller ve NK hücreleri bulunur. Bunlara ek olarak mukozaya ile ilişkili değişmez T hücreleri, CD1 T lenfositler ve NK T hücreleri gibi alışılmadık T hücreleri de *M. tuberculosis*'e karşı konak savunmasında çeşitli hücreler arasında yer almaktadır (61–63). TB enfeksiyonu sırasında doğal bağışıklık aktivasyonu patojenin tanınması ile başlar. Fagositoz sırasında, *M. tuberculosis* yüzeyindeki korunmuş patojenle ilişkili moleküler modelleri (PAMP), konakçı hücrelerdeki ön hat tanıma reseptörü (PRR) sistemi tarafından tanınır. TLR'ler, NLR'ler, CLR'ler, CD14 reseptörleri, AIM2 ve AhR gibi çeşitli PRR'lerin mikobakteriyel PAMP'leri tanıdığı gösterilmiştir (64–66). Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalar ubiquitin sistemi gibi protein modifikasyon sistemlerinin PRR sinyal ağlarının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (67).

2.6.2. *M. tuberculosis*'de Kazanılmış Bağışıklık

T lenfositlerin bağışıklık tepkisi, *M. tuberculosis*'in lenf düğümlerine yayıldığı anda başlar, ancak uyarılması, doğal bağışıklık sisteminin erken aktivasyonunda ile olmaktadır. Lenf düğümlerinin içinde, T lenfositleri, *M. tuberculosis* antiijenleri için spesifik popülasyonların aktivasyonu ve genişlemesi sürecinden geçer (68). Dentritik hücreler ve CD4⁺ T lenfositler aracılığı ile IFN- γ 'nin yanı sıra IL-17 üretimi gerçekleştirilir (69). CD4⁺ hücreleri tarafından IFN- γ üretimi, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun erken evrelerinde özellikle önemlidir. IFN- γ üretimi tek başına enfeksiyonu kontrol etmekte yeterli olmaz ayrıca IL-6, IL-1 ve TNF-a gibi diğer moleküllerinde ortama salınması ile birlikte savunma sistemi güçlendirilir. Ayrıca CCL5, CCL9, CXCL10 ve CCL2 kemokinleri, enfeksiyon bölgesine diğer bağışıklık hücrelerini de çeker ve bunların üretimi TNF-a ile uyarılması ile gerçekleşir (70).

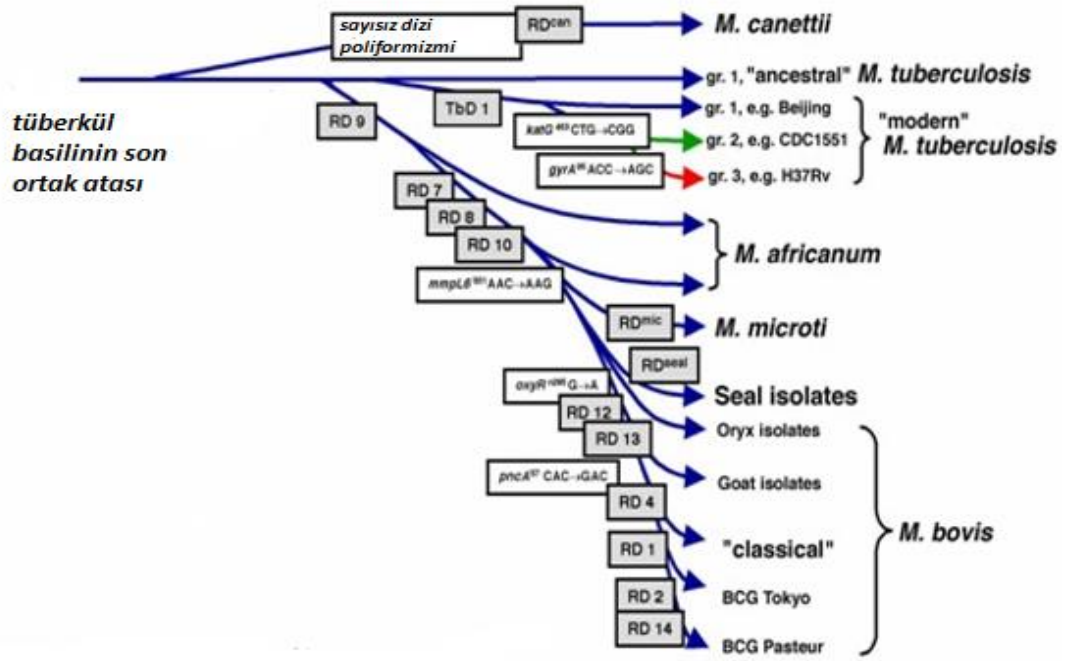
Uzun bir süre CD4 T lenfositlerin farklı olarak CD8 T lenfositlerin enfeksiyon ve TB hastalığının kontrolünde hiçbir rolü olmadığı düşünülmüştür. CD8 T lenfositlerinin MHC sınıf I molekülleri aracılığıyla *M. tuberculosis* antiijenlerini tanıdığı ve iyi bilinen bir rolü olan IL-2, IFN- γ ve TNF-a ürettiği düşünüldüğünde *M. tuberculosis* enfeksiyonunu kontrol altına almak için aktif rolü olduğu görülmektedir. Ayrıca CD8 T lenfositleri, Fas (CD95) -Fas ligand etkileşimi ile olmasa da, perforin ve granülizin aracılığıyla *M. tuberculosis*'e karşı sitolitik bir etki gösterir (67,71). Bu doğrudan hücreden hücreye temas, bakteri ile enfekte olmuş hücrenin apoptozunu belirler, *M. tuberculosis*'i doğal büyüme ortamından yoksun bırakır ve aynı zamanda bilinmeyen mekanizma ile canlılığını azaltır (72). Öte yandan CD8 T lenfositler, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun gelişimini destekleyen IL-10 ve TGF- β üretir.

2.7. Tüberküloz Genetiği

Çok yakın zamana kadar, *M. tuberculosis*'in genetiği, organizma ile çalışmadaki zorluklar ve uygun araçların bulunmaması nedeniyle ihmal edilen bir konuydu. Son yıllarda bu başlık altında yazılan önemli bir kitap ile mikobakteriumla ilgili genetik çalışmalar hız kazandı (73). Bunun nedeni, başta Gicquel ve Jacobs laboratuvarları tarafından olmak üzere birçok genetik yöntemin geliştirilmesi ve Genomik Araştırma Enstitüsü ve Sanger-Pasteur Enstitüsü ile birlikte yürütülen tüberküloz H37Rv genomunun (74) ve ilgili mikobakterilerin tamamlanan ve çalışmaya devam edilen DNA dizilimi ve açıklamalarıdır (75).

2.7.1. *M. tuberculosis* kompleks türlerinin filogenetik bağları

M. tuberculosis kompleks türleri arasındaki filogenetik bağları açıklamak için ilk defa Brosch ve ark. yüz suşta tüberkül basilinin genomundaki insersiyon ve delesyon olaylarından kaynaklanan 20 değişken bölgeyi analiz etmiştir (74). *M. tuberculosis* spesifik delesyon 1 (TbD1) varlığına veya yokluğuna göre bir *M. tuberculosis*; eski TbD1 pozitif ve modern TbD1 negatif suşlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma Streevatsan ve ark. ortaya çıkardığı ana genetik grupla uyuşmaktadır (7). MTBC'de farklılaşmasında ilk oluşan üye, 26 farklı gen bölgesindeki delesyon nedeni ile *M. canettii* olmuştur. RD9 bölgesindeki silinme, evrimsel olarak TbD1 ortaya çıkmadan önceki mevcut MTBC'den ayrılan *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis*'i ifade eder (6). RD9, RD7, RD8 ve RD10 gen bölgelerindeki delesyon ile *M. microti* ayrılmıştır. *M. bovis* RD12, RD13 ve RD4 gen bölgelerindeki delesyonlar ile birkaç türdeki virülans özelliğini kaybetmiştir. Bununla birlikte atenüe *M. bovis* BCG suşları, *M. bovis*'in RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerindeki delesyonlar sonucu ortaya çıkmıştır (6).



Şekil 7. *M. tuberculosis* kompleks türlerinin filogenetik bağları (6).

M. tuberculosis kompleksinde yer alan suşların striktürel genlerde, özelliklede *oxyR*, *pncA*, *katG* ve *gyrA* gen dizilerinde görülen sinonim ve non sinonim nokta mutasyonlarında evrimsel gelişim ile ilgisi vardır. Arjomandzadegan ve ark. (76) *katG* kodon 463 (*katG*463) ve *gyrA* kodon 95 (*gyrA*95)'deki dizi polimorfizmi dikkate alarak *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan basilleri 3 gruba ayırmışlardır.

- Grup 1 içerisinde: *katG*463 CTG (Leu), *gyrA*95 ACC (Thr)
- Grup 2 içerisinde: *katG*463 CGG (Arg), *gyrA*95 ACC (Thr)
- Grup 3 içerisinde: *katG*463 CGG (Arg), *gyrA*95 AGC (Ser)

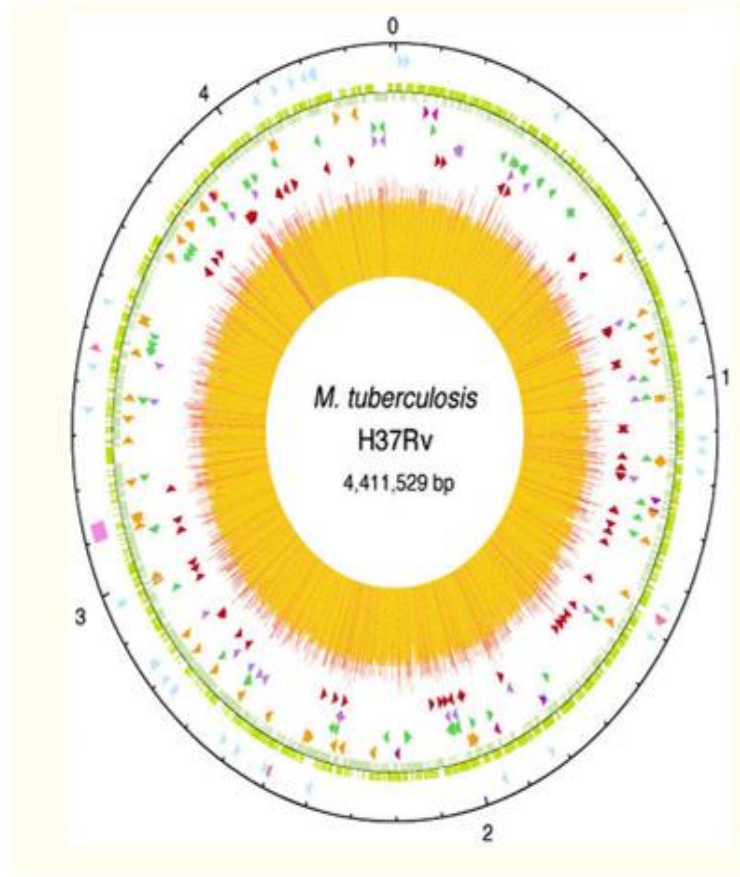
nokta mutasyonuna sahip suşlar bu gruplara ayrılmıştır.

2.7.2. *M. tuberculosis* genomunun tanımı

M. tuberculosis'in en iyi tanımlanmış suşunun tam genom dizisi H37Rv genomudur. Bu genom *M. tuberculosis* patojeninin biyolojisini anlamamız ve yeni profilaktik ve terapötik müdahalelerin anlaşılmasına yardımcı olmak için belirlenmiş ve analiz edilmiştir. *M.tuberculosis* H37Rv genomu, 4.411.529 baz çifti (bp) içerir, yaklaşık 4.000 gen içerir ve yüksek oranda (%65,6) guanin (G) + sitozin (C) içeriğine sahiptir (Şekil 8) (74). *M. tuberculosis* genomu dizisi, bu bakterinin bazı benzersiz özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Kromozom halkasal yapıdadır ve *Escherichia coli* genomu ile yaklaşık aynı büyüklüktedir (77).

M. tuberculosis'in genomu 7 milyon bp'lik kromozomu olan *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen çevresel mikobakteri türlerinden daha kısadır. Bu durum hücre içi ortamdaki genetik izolasyona ve hücre içi ortamda gereksiz olan genlerin kaybına bağlanmaktadır. Genomundaki yüksek G-C içeriğini yansıtacak şekilde *M. tuberculosis* glisin, alanin, prolin ve arjininden zengin proteinler içerirken, A-T'den zengin kodonların kodladığı lizin ve asparajin amino asitleri düşük oranlarda bulunmaktadır. Yüksek G-C içeriği bakterinin aerobik yaşam şekliyle ilişkilidir. Buna karşın, *M. tuberculosis* anaerobik ortamlara da uyum sağlayabilecek metabolik potansiyele sahiptir (6).

M. tuberculosis'i diğer bakterilerden ayırt eden önemli özelliği kodlama kapasitesinin büyük bölümünün lipoliz ve lipogenez ile ilgili enzimlerden ve antijenik varyasyon sağlayan glisinden zengin tekrarlayan protein ailelerinden oluşmasıdır (74). İçerdiği 200'den fazla genin %6'sı yağ asitlerinin metabolizmasını kodlayan enzimler olarak açıklanmıştır. Yağ asitlerini kullanan çok sayıda *M. tuberculosis* enzimi bu patojenin yağ asitlerinin ana karbon kaynağı olduğu enfekte olmuş konakçı dokularında büyüme yeteneği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (74).



Şekil 8. *M. tuberculosis* H37Rv kromozomunun dairesel haritası (74).

2.8. *M. tuberculosis* Bulaşma Yolları

M. tuberculosis basili enfekte hastadan hava yolu ile sağlam kişiye bulaşır. Balgamında ARB pozitif olan, akciğer ve larinks tüberkülozu olan hastaların bulaştırıcılığı en yüksektir. ARB negatif olan hastaların bulaştırma riski çok daha azdır (78). Hasta ile uzun süreli yakın temas bulaşma riskini artırmaktadır. Akciğerde kavite olduğu durumda ve larinks tüberkülozunda, fazla öksürmekle, hapşırmakla ve öksürük yaratan işlemlerle tüberküloz hastası daha fazla basil saçmaktadır (79).

Doğru ve etkili tedavi ile basil sayısı ve öksürük sıklığı hızla azalmaktadır (80). Ortalama 2-3 haftada bulaştırıcılık sona ermektedir. Bu nedenle, tüberkülozla enfekte hastayı hemen izolasyona almak ve etkin tedaviyi başlatmak önemlidir. İlaça dirençli tüberkülozda etkili tedavi bulaştırıcılığı önlemek açısından önemlidir, birinci grup anti-TB ilaçlarıyla tedavi etkisiz kalırsa bulaştırıcılık devam edecektir (81).

Akciğer dışı tüberkülozun genellikle bulaştırıcı olmadığı bilinmektedir ancak doku ile yapılan çalışmalarda ve otopsi sırasında aerosol oluşturulursa bulaşma görülebilmektedir (82).

2.9. Tüberküloz Kliniği

HIV enfeksiyonunun tanımlanmasından önce TB olgularının %80'inin akciğerlerde sınırlı olduğu; HIV enfekte TB'li hastaların ise üçte ikisinde hem akciğer hem de akciğer dışı ya da tek başına akciğer dışı tutulum olabileceği bildirilmektedir (83).

2.9.1. Akciğer Tüberkülozu

Hastada başka nedenlerle açıklanamayan halsizlik, kilo kaybı, ateş ve gece terlemesi varsa TB mutlaka akla getirilmelidir. Akciğer tüberkülozu olan bir hasta tanı konuluncaya kadar gelişmiş ülkelerde yaklaşık 2-3 kişiye, gelişmekte olan ülkelerde ise 3-5 kişiye hastalığı bulaştırmış olacaktır. Bu sebeple özellikle akciğer tüberkülozu olan hastaların doğru ve etkili tedavisine hızlı bir şekilde başlamak hem hastalığın yayılımını hem de hastada hastalığın ilerlemesini önlemek açısından çok önemlidir (84,85).

Primer tüberküloz, tüberküloz basilinin ilk kez bulaştığı hastalarda ortaya çıkan tablodur. Genellikle çocukluk çağlarında meydana gelir, ilerleme göstermedikçe sessiz kalırlar. Akciğere yerleşen basil, plevranın hemen altında "Ghon odağı" adı verilen lezyon oluşturur. Akciğerdeki tek odak ile bölgesel lenf düğümlerinde oluşan odakların oluşturduğu bütüne "Ghon kompleksi" adı verilir. Tablo bu aşamada stabil kalabilir, klinik belirti vermez veya lenf yollarına girerek tüberkülozun tüm organlara yayılmasına neden olabilirler (22,86).

Primer progressif tüberküloz, sosyoekonomik sorunlu toplumlarda ve beslenme sorunları olan çocuklarda daha sık görülen primer tüberküloz odağının aktifleşmiş formudur. Aktifleşme genellikle akciğerin tepe noktasında başlar. Ortasında kazeöz nekroz bulunan bir lezyon ve bu nekroz çevresinde epitelioid hücreler ve Langhans dev hücreleri bulunur; bu yapıya tüberkül adı verilir (22,86). Primer tüberkülozun ilerleyici (progressif) nitelik kazanmasıyla oluşan bu tablonun özellikleri hastanın vücut direncine ve basilin gücüne bağlıdır (86).

Sekonder tüberküloz (reaktivasyon), iyileşme döneminde olan önceden geçirilmiş bir tüberküloz hastalığının alevlenmesi olgusudur. Reaktivasyon ya Ghon odağının aktifleşmesi ya da dışarıdan gelen güçlü bir basilden kökenli yeni bir enfeksiyonun sonucu oluşmaktadır (22,86).

2.9.2. Akciğer dışı tüberküloz

Tüberküloz basilinin akciğer dışındaki tüm organ ve sistemleri tutabilme yeteneğine bağlı gelişmektedir. Vücutta saç ve tırnaklar dışında her bölgede görülebilmektedir. Akciğer dışı tüberküloz vakaları tüm tüberküloz vakalarının yaklaşık %15-25 kadarını oluşturur. Akciğer dışı tüberküloz kişilerde tek başına veya akciğer tutulumu ile birlikte görülebilir (83).

Lenf nodu tüberkülozu; akciğer dışı tüberküloz olgularının %25'inden fazlasını oluşturur ve en sık görülen formdur. Çoğunlukla servikal bölgede ağrı olmadan, sert ve büyük lenf nodülü ele gelir. Kesin tanı biyopsi ve kültürde bakteri üretilmesi ile konur (83).

Plevra tüberkülozu; primer tüberkülozda plevranın tutulumu sık görülür ve birkaç basilin plevral boşluğa geçmesi ile oluşur. Bu bölgedeki mikobakteriyel antijenlere karşı meydana gelen gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonu söz konusudur. Tüberküloz ampiyem ise pulmoner tüberkülozun daha seyrek görülen bir komplikasyonudur (83).

Üst hava yollarının tüberkülozu; larinks tüberkülozu %85 oranında akciğer tüberkülozunun bronkojen yayılımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Larinks ve akciğer tüberkülozu birlikteliği %71- 100 oranlarında bildirilmektedir. Balgam yaymasında ARB sıklıkla pozitif saptanır (83).

Genito-üriner tüberküloz; Tüm akciğer dışı tüberküloz olgularının %15'ini oluşturur. Genito-üriner sistemin herhangi bir yerini tutabilir. Sıklıkla hematojen yayılıma bağlı olarak görülür. Antibiyoterapiye cevap vermeyen idrar yolu enfeksiyonlarında üriner tüberküloz mutlaka akla getirilmelidir (83).

Vertebra tüberkülozu; kemik TB'ları içinde en sık görülen formdur ve hematojen yayılım sonucu oluşmaktadır. Tanı çoğunlukla radyolojik yöntemlerle konur. Vertebra TB'u (Pott hastalığı ya da TB spondilit) sıklıkla iki ya da daha fazla komşu omurga cismini tutar. İlerlemiş hastalıkta omurga cisimlerinin çökmesi kifoza yol açar. Pott hastalığı ilaç tedavisine çok iyi yanıt verir, fakat ağır olgularda cerrahi tedavi gerekebilir (83).

Tüberküloz menenjit; santral sinir sistemi tüberkülozu akciğer dışı tüberkülozun % 5'ini oluşturmaktadır. Lomber ponksiyon tanıda temel dayanaktır. Beyin omurilik sıvısı (BOS) kültürleri %80 pozitifdir. İlaç tedavisine iyi yanıt vermekle birlikte tanı atlandığında tüberküloz menenjitin ölümcül olabileceği unutulmamalıdır (83).

Gastro-intestinal sistem (GİS) tüberkülozu; GİS'in tüm bölümlerinde tüberküloz görülebilir. Terminal ileum ve çekum en sık tutulan alanlardır. Tüberküloz şüphesi olan olgularda parasentez sıklıkla genellikle yetersiz kaldığından laparoskopi ile biyopsi önerilmektedir (87).

Perikard tüberkülozu; sıklıkla düşük tüberküloz prevalansı olan ülkelerdeki yaşlı kişilerin hastalığıdır. Mortalitesi bazı durumlarda %40'a kadar yükselir. Tanısı perikardiyosentez ile konabilmektedir (83).

Miliyer tüberküloz; sıklıkla bebek ve küçük çocukların hastalığıdır. Miliyer tüberküloz; lenfohematojen yayılım sonucu oluşur. Küçük ve aynı boydaki tüberküller tüm akciğerlere yayılır. Tanısında akciğer grafisi görünümü tipiktir. Yaklaşık üçte birinde tabloya tüberküloz menenjit de eklenmektedir. Balgam yayması hastaların %80'inde negatiftir. Tedaviye yanıt iyidir (83).

2.10. Tüberkülozda Korunma ve Kontrol

Tüberküloz kontrol stratejilerinin uygulanmasında dört esas nokta vardır;

1. Basil kaynağı olan aktif hastaların erken tanısı ve tedavisi
2. Temaslı taramaları ile latent TB enfeksiyonu geliştirenlerin saptanması ve tedavisi
3. Yüksek risk grubu olan toplulukların belli aralıklarla taranması
4. BCG aşısı

2.11. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Tüberküloz hastalığı 6 ila 9 ay boyunca çeşitli ilaç kombinasyonları ile tedavi edilebilir. Şu anda ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından TB tedavisi için onaylanmış 10 ilaç bulunmaktadır (88). Onaylanmış ilaçlar arasında, tedavi rejimlerinin özünü oluşturan birinci basamak anti-TB ajanları şunlardır:

- İzoniazid
- Rifampisin

- Etambutol
- Pirazinamid
- Streptomisin

İlacı dirençli TB, en az bir birinci basamak anti-TB ilacına direnç geliştiği durumdur. Çoklu ilacı dirençli TB tanımı, INH ve RIF direncinin birlikte görüldüğü durumlarda kullanılır (89). ÇİD-TB olgularında DSÖ ikinci basamak anti-TB ilaç kullanımını önermektedir. Bunlar;

1. Florokinolonlar- Ofloksasin (OFX), levofloksasin (LEV), moksifloksasin (MOX) ve siprofloksasin (CIP).
2. Enjekte edilebilir antitüberküloz ilaçları- Kanamisin (KAN), amikasin (AMK) ve kapreomisin (CAP).
3. Daha az etkili ikinci basamak antitüberküloz ilaçları- Ethionamide (ETH)/Prothionamide (PTH), Sikloserin (CS)/Terizidon (TZ), P-aminosalisilik asit (PAS).

Yaygın ilacı dirençli tüberküloz (YİD-TB)'de ise RIF ve INH direncine ek olarak bir kinolona ve bir de ikinci basamak anti-TB ilaçlarından en az bir veya bir kaçına direnç göstermesi söz konusudur (89).

2.11.1. Primer anti-tüberküloz ilaçlar

- İzoniazid

İzoniazid, 1952'de piyasaya sürülmesinden bu yana tedavide en etkili ve spesifik antitüberküloz ilaçlarından biridir (90). Yirminci yüzyılın en önemli yüz ilacını inceleyen Amerikan Kimya Derneği, INH'nin insanlık tarihindeki diğer tüm ilaçlardan daha fazla hayat kurtarma potansiyeline sahip olduğunu belirtmiştir (91). INH, tedavinin ilk aşamasında güçlü bakterisidal aktivitesi nedeniyle birinci basamak kombinasyon tedavisinin temel taşı olmaya devam etmektedir (92). INH, nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) ile kendiliğinden reaksiyona giren bir izonikotinoil radikali oluşturmak üzere katalaz-peroksidaz KatG tarafından biyoaktif hale getirilen bir ön ilaçtır. Ortaya çıkan NAD-INH eklentisi, mikobakterilerin kuru hücre ağırlığının %30'unu oluşturan mikolik asitlerin biyosentezi için kofaktör NADH'yi kullanan bir enoil açıl-taşıyıcı protein redüktaz olan InhA'nın rekabetçi bir nanomolar inhibitörüdür (93). INH sadece büyümekte olan tüberküloz basillerine karşı aktiftir ve replike olmayan basillere karşı veya anaerobik koşullar altında aktif değildir. INH, mikobakteriyel hücreye pasif difüzyon yoluyla girer (94).

- **Rifampisin**

Rifampisin semisentetik N-metil-piperazin derivativesidir ve 1957 yılında *S. mediterranei*'den izole edilmiştir. Yarım yüzyıldan fazla bir süredir TB tedavisinde kullanılan bir ilaç olan RIF, TB'ye karşı önemli bir birinci basamak ilaç olmaya devam etmektedir (95). Rifapentin, rifabutin, rifalazil ve rifasinna gibi çeşitli RIF analogları veya türevleri keşfedilmiş olsa da, RIF hala TB tedavisinde en yaygın olarak kullanılan rifamisin türevidir (96). RIF *M. tuberculosis*'in RNA polimerazı (RNAP)'na ile bağlanarak RNA sentezi inhibisyonu ile protein sentezine müdahale ederek bakterisidal etki sağlar (97). RNAP sırasıyla rpoA, rpoB, rpoC ve rpoZ geni tarafından kodlanan α (iki kopya), β , β' ve σ olmak üzere beş alt birimden oluşur (98).

- **Pirazinamid**

Pirazinamid, 1950'lerin başında TB tedavisine dahil edilmiştir ve şu anda hastalığı tedavi etmek için standart birinci basamak rejimin bir parçasını oluşturmaktadır. PZA, nikotinamidin bir analogudur. PZA ayrıca, pncA geni tarafından kodlanan pirazinamidaz/nikotinamidaz enzimi tarafından aktif formu olan pirazinoik aside dönüştürülmesi gereken bir ön ilaçtır (99). Pirazinamidin önerilen etki mekanizması, pirazinamidin bakteriyel membran enerjisini bozan ve membran taşınmasını engelleyen pirazinoik aside dönüştürülmesini içerir. PZA bakteri hücrelerine pasif difüzyonla girer ve pirazinoik aside dönüştürüldükten sonra zayıf bir akış pompasıyla atılır. Asit koşulları altında, protonlanmış pirazinoik asit, verimsiz bir akış pompası nedeniyle hücrede yeniden emilir ve hücre içinde birikerek hücrel hasara neden olur (100).

- **Etambutol**

Etambutol ilk olarak 1966'da TB tedavisinde kullanılmaya başlandı ve hastalığı tedavi etmek için mevcut birinci basamak rejimin bir parçasıdır. EMB bakteriyostatik bir ilaç olarak kabul edilir. EMB'nin etki mekanizması, mikobakteriyel hücre duvarında lipoarabinomannan ve arabinogalaktanın arabinan bileşeninin sentezinin inhibe ederek çoğalan basilleri durdurarak etki eder (101).

- **Streptomisin**

M. tuberculosis tedavisinde ilk bulunan ve parenteral kullanılan ilaçlardandır. *Streptomyces griseus*'dan izole edilmiştir. Keşfedildiği 1940'lı yıllardan günümüze kadar aralıksız olarak tüberküloz kemoterapisinin temel ilaçları arasında yer almıştır. SM, ribozomun 30S alt ünitesine geri dönüşümsüz bağlanarak translasyonu inhibe edip protein sentezini engelleyerek etki göstermektedir.

2.11.2. Sekonder Anti-TB İlaçlar

- **Florokinololar**

Florokinolonların (FQ) etki mekanizması DNA giraz inhibisyonu ile DNA sentezinin engelleyerek bakterisidal etki gösterirler. Ofloksasin, levofloksasin, siprofloksasin ve moksifloksasin *M. tuberculosis*'e etkili kinolonlardır. Mevcut DSÖ kılavuzları, tedavi başarısızlığı veya nüksetme ve ölüm riskinde azalma sağladığı için ÇİD-TB tedavi rejimlerinde LEV veya MOX'un kullanılmasını önermektedir (102). FQ'lar ayrıca birinci basamak ilaçlara karşı aşırı duyarlılık veya toksisite (özellikle hepatotoksisite) olduğunda ilaca duyarlı TB'yi tedavi etmek için kullanılır (103). MOX ayrıca ilaca duyarlı TB'yi 4 ayda etkili bir şekilde tedavi eden çoklu ilaç rejiminin bir parçasıdır (104).

- **Aminoglikozidler ve Kapreomisin**

“İkinci sıra” enjekte edilebilir ilaçlar olan amikasin, kanamisin ve/veya kapreomisinin uygun kullanımı, ÇİD-TB'nin etkin tedavisi ve YİD-TB'nin önlenmesi için kritik öneme sahiptir. Hem AMK hem de KAN, 30S ribozomal alt birimindeki 16S rRNA'ya bağlanır ve protein sentezini inhibe eder. CAP'ın MTB'deki etki mekanizması iyi anlaşılmamıştır, ancak translasyonu engellediği ve mikobakteriyel ribozomlarda fenilalanin sentezini engellediği görülmektedir (105).

- **Sikloserin ve Terizidon**

Sikloserin küçük, suda çözünür zayıf bir asittir. TZ, iki sikloserin molekülünün bir ön ilaç görevi gören tereftalaldehit ile kondenzasyon ürünüdür. CS, D-Alanin'in doğal bir ürün analogudur. Alanin rasemaz ve D-alanin-D-alanin ligazın rekabetçi bir inhibitörüdür ve peptidoglikan sentezini bozar (106). CS günümüzde primer anti-TB ilaçlarla yanıt alınamayan akciğer veya akciğer dışı TB'nin tedavisinde diğer bakteriyostatik ilaçlarla birlikte kullanılır (106).

- **Para-aminosalisilik Asit**

Para-aminosalisilik asit, para-aminobenzoik asidin yapısal analogudur. Para-aminobenzoik asitin folik asite dönüşümünü kompetitif olarak bloke ederek MTB üzerinde bakteriyostatik etki gösterir. PAS'ın günümüzde asıl kullanım alanı ÇİD-TB'dir. Ayrıca iki yaş altı çocukların tüberküloz enfeksiyonlarının tedavi kombinasyonlarında yer alır (107,108).

- **Tionamidler (Etionamid, Protionamid)**

Ethionamide ve Prothionamide, nikotinamidin sentetik yapısal analoglarıdır. Her ikisi de mikobakteriyel mono-oksijenaz EthA tarafından aktive edilen ön ilaçlardır ve INH ile aynı enoil-asil redüktaz enzimi inhA'yı hedefleyerek mikolik asit sentezini bozar (106).

- **Klofazimin**

Klofazimin (CFZ) ÇİD-TB tedavisinde yararlı olabileceği bildirilmiş yarı sentetik bir riminofenazindir. Etki mekanizmasının elektron taşınmasının bozulması ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi olduğu varsayılmıştır. Potasyum alım kanallarının inhibisyonu yoluyla membran potansiyelinin bozulması da dahil olmak üzere ek mekanizmalar da önerilmiştir (106).

- **Linezolid**

Linezolid 2000 yılından beri ilaca dirençli Gram pozitif enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Ribozomun 23S alt birimine bağlanan ve başlama kompleksinin oluşumunu sağlayan sentetik bir ribozomal translasyon inhibitörüdür. İn vitro çalışmalarda dirençli izolatlar da dahil olmak üzere farklı mikobakteri türleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Linezolidle başarıyla tedavi edilen ÇİD-TB olguları bildirilmiştir. Direnç, in vitro olarak 23S rRna'nın (rrs geni) peptidil transferaz alanındaki nokta mutasyonları ile ilişkilidir (106).

- **Bedakuilin**

Bedakuilin, mikobakteriyel ATP sentazını inhibe ederek hem aktif olarak çoğalan hem de latent durumda olan mikobakteriler üzerinde etki eden sentetik bir diarilkinolindir (109). İn vitro olarak seçilen atpE genindeki mutasyonlar açıkça yüksek seviye dirençle ilişkilidir (106).

2.12. Antitüberküloz İlaç Dirençleri

M. tuberculosis'te plazmitlerin olmaması ve düşük rekombinasyon sıklığı nedeniyle ilaç direnci esas olarak genetik mutasyonlar tarafından oluşturulur. Direncin bakteriler arasında genetik aktarımı da söz konusu değildir. Dolayısıyla, TB'li olgularda çoklu ilaç kullanılması, direnç gelişiminin önlenmesinde en önemli faktörlerden birisidir.

2.12.1. İzoniazid direnci

İzoniazide dirençli TB vakalarının oranı küresel olarak artmaktadır ve TB tedavisinde önemli bir engel teşkil etmektedir (110). INH direncinin mekanizmasının çok karmaşık olduğu ve nispeten çok sayıda gende mutasyonlar içerdiği bilinmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çok sayıda çalışmalar ile katG, inhA, kasA, ndh, oxyR - ahpC intergenik bölgesindeki mutasyonların INH direncine neden olduğu tespit edilmiştir. Bütün genler arasında katG genindeki mutasyonlar, INH direncine aracılık etmede çok belirgin bir rol oynar (111). KatG geninde en yaygın görülen değişiklik, katG proteininde S315T (AGC'den ACC'ye) olarak temsil edilen, kodon 315'te doğal olarak oluşan Serin ile Treonin'in ikamesi ile sonuçlanan bir nokta mutasyonudur (112). En yaygın S315T ikamesinin, INH'ye orta veya yüksek düzeylerde direnç ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (113). Bu mutasyon ile ÇİD-TB ve YİD-TB'nin iletim dinamikleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu daha önce rapor edilmiştir (114). Dirence neden olan genler arasında inhA'daki mutasyonlar MTB'de düşük seviyeli INH direnci ile ilişkilidir. inhA'nın düzenleyici bölgelerindeki, özellikle de C(-15)T, T(-8)G/A, A(-16)G'deki, inhA proteininin aşırı ekspresyonuna yol açan mutasyonlar, düşük seviyeli INH direncinin en yaygın nedeni olarak gösterilmiştir (111). INH direnci ile ilgili yakın zamanda yapılan bir incelemede gözlemlenen tüm fenotipik INH direncinin sırasıyla %64 ve %19'nun katG 315 ve inhA-15 mutasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (115).

2.12.2. Rifampisin direnci

Uzun süreli RIF tedavisi sonucu gelişen rifampisin direnci (RR), TB kontrolünde önemli bir sorun haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre 2019'da yaklaşık yarım milyon kişi RIF dirençli TB olarak bulunmuştur (116). RIF direnci ile ilgili mekanizma hala tam olarak açık değildir. RIF direnci ile ilgili mutasyonlar çoğunlukla *rpoB* geninde yer alan rifampin direncini belirleyen bölgesinde (RRDR) meydana gelir (117). *rpoB* genindeki mutasyonlar, ilk olarak *Escherichia coli*'de keşfedilen RR'nin birincil mekanizmasıdır (118). Gendeki mutasyonlar, β alt biriminde yapısal değişikliklere neden olup RIF'in RNAP'ın β alt birimine bağlanmasını zorlaştırarak veya tamamen engel olarak RIF direncine neden olmaktadır (119). Çalışmalar, RR-TB izolatlarının yaklaşık % 90-100'ünün *rpoB* mutasyonlarından kaynaklandığını göstermiştir (120). RR mutasyonlarının çoğu, *rpoB*'nin 81bp RRDR'sinde yoğunluktadır ve S531L, H526Y, H526D ve D516V en yaygın görülen mutasyonlardır (121). Bazı araştırmalar, bu mutasyonların oranının, farklı genetik geçmişe sahip farklı *M. tuberculosis* suşlarında değişiklik gösterdiğini bulmuştur; örneğin, S531L Almanya'da esas olarak soy 2'de (Pekin genotipi) bulunur (122), D516V ise Rusya'da soy 4'te daha yüksek bir orana sahiptir (123).

2.12.3. Pirazinamid direnci

Pirazinamid dirençli suşlarda pirazinamidaz aktivitesinde kayıp belirlenmiştir. Dirençli suşların %72-94'ünde bu enzimi kodlayan *pncA* gen bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır (124).

2.12.4. Etambutol direnci

Etambutol, arabinosiltransferaz enzimini inhibe eder ve mikobakteriyel hücre duvarının biyosentezini engeller. Arabinosil transferaz, *embC*, *embA* ve *embB*'nin üç genini içeren *embCAB* lokusu tarafından kodlanır (125). Bunlardan *embA* ve *embB* genleri arabinogalaktan sentezine katkıda bulunurken, *embC*, lipoarabinomannan sentezi için ayrılmıştır. EMB'e karşı bilinen direnç mekanizması, yapılan çalışmaların çoğunda en yaygın olarak *embB* genindeki 306, 406 ve 487 kodonlarındaki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir.

2.12.5. Streptomisin direnci

Streptomisin direnci ribozomal protein S12'yi kodlayan rpsL gen bölgesindeki ve 16S ribozomal RNA'yı kodlayan rrs gen bölgesindeki mutasyonlar sonucu görülmektedir (126,127). rpsL gen bölgesinde en sık rastlanan mutasyon 43. kodondaki AAG→AGG (Lys→Arg) değişimi, daha az rastlanılan ise AAG→ACG (Lys→Thr) değişimi ile sonuçlanan mutasyonlardır. rrs gen nokta mutasyonları ise 530. ve 915. nükleotidlerin çevresinde kümelenmiştir (123).

2.12.6. Aminoglikozidler ve Kapreomisin direnci

Enjektabl ilaçların patojen gen hedeflerine bağlanmasını engelleyen veya ilaçların etki mekanizmasını değiştiren çoğunlukla eş anlamlı olmayan tek nükleotid polimorfizmleri, AMK, KAN ve CAP'ye karşı ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir. Enjekte edilebilir ilaçlara direnç çoğunlukla 16S rRNA'da meydana gelir ve dirence neden olarak bilinen mutasyonlar rrs ve tlyA genlerinde görülmektedir. Bakterinin rrs geni, 16S rRNA'yı kodlar ve tlyA, 16S rRNA'nın 44 sarmalındaki C1409 nükleotidini ve 23S rRNA'nın 69 sarmalındaki nükleotit C1920'yi değiştiren bir 2'-O-metiltransferazı kodlar (128). Dirençli klinik MTB suşlarında özellikle 1401. nükleotidde (A1401G) adenin ve guanin bazlarının yer değiştirmesi baskın olarak görülmektedir (105).

2.12.7. Florokinolon Direnci

Moksifiloksasin ve diğer florokinolonlar, DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerini inhibe eder, ancak MTB'deki tek hedef DNA girazdır. DNA giraz tetramer yapısında ikişer adet A ve B alt birimini içeren bir enzimdir ve alt birimler sırasıyla gyrA ve gyrB genleri tarafından kodlanır. Her iki gende florokinolon ile DNA giraz enziminin birleşmesini sağlayan korunmuş bölgeler yani “kinolon direncini belirleyen bölgeler” vardır. Hem gyrA hem de daha az yaygın olarak gyrB genlerindeki mutasyonlar florokinolon direncinden sorumludur (106). MTB'de kinolon direnci esas olarak gyrA gen bölgesindeki mutasyonlara bağlı geliştiği ve mutasyonun en sık bu genin 94. kodonunda saptandığı gösterilmiştir.

2.13. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı

2.13.1. Örneklerin toplanması ve işlenmesi

Mikobakterilerin mikrobiyolojik tanısının tam ve doğru olarak yapılabilmesi için klinik örnek uygun yerden, doğru zamanda ve yeterli miktarda alınmalı, uygun laboratuvar koşullarında işlemlenmelidir. Mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerin çoğunluğu solunum sistemi kaynaklı (ekspektore veya indüklenmiş balgam, açlık mide sıvısı, bronkoalveoler lavaj, transtrakeal aspirasyon, bronşial fırçalama ve laringeal sürüntü örnekleri) olmakta, idrar, gastrik aspiratlar, dokular, biyopsi örnekleri ile beyin omurilik sıvısı, plevral ve perikardial aspiratlar gibi normalde steril olan vücut sıvıları diğer örnekleri oluşturmaktadır (129).

Mikobakteri şüphesi ile gönderilen balgam örneklerinden yapılan kültürler ilk gün alınan örnek pozitif iken ertesi gün alınan örnek negatif çıkabilir. Bu nedenle, mikobakterileri izolasyonu için, 24 saat aralıklarla ardışık üç gün boyunca örnek gönderilmelidir. Tüm örnekler olabildiğince hızlı olarak laboratuvara iletilip hemen işleme alınmalıdır (130).

Normal flora içeren klinik örnekler ile alınmaları ya da transport işlemleri sırasında sterilizasyon kurallarına uyulmadığı düşünülen klinik örneklerle; organik kalıntılardan arındırmak, diğer bakteri ve mantarları elimine etmek ve mukusu sıvılaştırmak amacıyla dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanır. Dekontaminasyon ajanı ile işlemden sonra kullanılan asit veya alkali ortam nötralize edilir ve karışım, mikobakterileri yoğunlaştırmak amacıyla yüksek hızda santrifüj edilir. Mikobakteri kültürü için gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS), sinovyal sıvı ve normal koşullarda steril olan diğer vücut sıvıları gibi örneklerin, işlem öncesi dekontamine edilmesine gerek yoktur (129).

Günümüzde rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan yöntem N-asetil-L-sistein-sodyum hidroksit (NALC-NaOH) yöntemidir. Bu yöntemde; NALC mukus içindeki mikobakterilerin serbest kalmasını sağlayan mukolitik olarak, NaOH dekontaminant ve konsantrasyon solüsyonu olarak ve sodyum sitrat klinik örnekte bulunabilecek ağır metal iyonlarını bağlayarak NALC'ın inaktive olmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin hacmine eşit miktarda NALC-NaOH eklenip vorteks ile iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dakika beklenmektedir. Bu süre sonunda fosfat tamponu ile nötralizasyon sağlanmaktadır. Konsantre etmek amacıyla uygulanan santrifüj sonrası elde edilen çökeltiden preparatlar hazırlanmakta ve uygun besiyerlerine ekimleri yapılmaktadır (23).

2.13.2. Mikroskopik değerlendirme

Mikobakterilerin hücre duvarları yüksek lipid içeriğinden dolayı, fuksin boyasını bağlama özelliğine sahiptir, bu nedenle boya asit-alkol ile uzaklaştırılmaz. Mikobakterilerin aside dirençli boyanma özelliği, karakteristik morfolojik özellikleri ile birlikte enfeksiyonun erken tespiti ve tedavi izlemi için değerli bir yardımcıdır (130). Mikroskopik değerlendirme en ucuz, kolay ve en sık kullanılan yöntemdir. Yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Mikroskopik incelemede, aside dirençli bakteri görülmesi için örneğin mililitresinde 5.000-10.000 basil bulunması gereklidir. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması tüberküloz tanısında altın standarttır. Mikobakteriler için başlıca iki farklı aside dirençli boyama tekniği kullanılmaktadır (131).

Karbolfuksin boyama:

- Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)
- Kinyoun

Florokrom boyama:

- Auramine O
- Auramine-Rhodamine

Bu yöntemin özgüllüğü yüksektir ancak örneğin türü ve kalitesi, içerdiği basil sayısı ve değerlendirme yapan kişilerin deneyiminden etkilendiği için duyarlılığı %20-85 arasındadır (132). Bir örneği negatif sonuçlandırmak için ışık mikroskobu ile 100'lük objektifte en az 300 alan, floresan mikroskop ile 40'lük objektifte en az 70 alan taranmalıdır. İncelemede pozitiflik görüldüğü zaman *M. tuberculosis* olarak sonuçlandırılmamalı, derecesi belirlenerek ARB pozitifliği olarak raporlanmalıdır. Yayma değerlendirmesi Tablo 2'te gösterildiği gibi yapılır (133).

Tablo 2. Yaymaların değerlendirme kriterleri (133).

	Görülen ARB sayısı		
	Karbol fuksin boyama	Florokrom boyama	
	x1000	x250	x400
Negatif	0	0	0
Şüpheli, tekrar	1-2/300 alan	1-2/30 alan	1-2/70 alan
1+	1-9/100 alan	1-9/10 alan	2-18/50 alan
2+	1-9/10 alan	1-9/1 alan	4-36/10 alan
3+	1-9/1 alan	10-90/1 alan	4-36/1 alan
4+	>9/1 alan	>90/1 alan	>36/1 alan

2.13.3. Kültür yöntemleri

Tüberküloz enfeksiyonunun kesin tanısı basilin kültürde üretilmesi ile konulur. Kültür yöntemleri geç sonuç vermesine rağmen mikobakterilerin tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir. Kültür işlemi sayesinde; tür düzeyinde tanımlama işlemleri için gerekli izolatlar elde edilebilir, bakterilerin canlılıkları doğrudan gösterilebilir ve ilaç duyarlılık testleri yapılarak hastalar doğru tedavi edilebilir. Çoğaltılan izolatlar daha sonraki araştırmalar için saklanarak yeni epidemiyolojik verilerin elde edilebilir olması da çok önemlidir. Aside dirençli basillerin kültürde üretilmesi için örneğin her mililitresinde 10-100 canlı basil olması yeterlidir (67). Mikobakterilerin üremeleri için özel besiyerlerine gereksinimleri vardır. Bu besiyerleri kompleks yapıda olup, katı ve sıvı besiyerleri olarak sınıflandırılırlar.

Katı Besiyerleri

- Yumurta Bazlı
 - Löwenstein-Jensen (LJ)
 - Petragnani
 - American Thoracic Society
- Agar Bazlı
 - Middlebrook 7H10
 - Middlebrook 7H11

Sıvı Besiyerleri

- Middlebrook 7H9

- Dubos Tween albümin

Mikobakterilerin primer izolasyonunda Centers for Disease Control (CDC) klasik katı besiyerleri yanında bir sıvı besiyerinin birlikte kullanılmasını önermektedir. Katı besiyeri olarak ilk izolasyonda yumurta bazlı olan LJ besiyeri yaygın olarak kullanılmaktadır. Yumurta bazlı besiyerlerinin; iyi bir tampon kapasitesine sahip olmaları, +4 C'de uzun raf ömürlerine sahip olmaları ve çoğu mikobakterinin iyi üremesini desteklemeleri önemli avantajlarıdır. Bunun yanında koloni oluşumunun 18-24'üncü günlerden önce saptanamaması ve duyarlılık testleri için ilaç konsantrasyon ayarının yapılamaması dezavantajlarıdır. Yumurta bazlı besiyerlerinin opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerler şeffaftır. Agarlı besiyerlerine göre yumurtalı besiyerlerinin hazırlanması daha zor ama daha ucuzdur ve koloni morfolojisi daha tipiktir. O nedenle tüberküloz prevalansı yüksek olan ülkelerde daha çok yumurtalı besiyerleri tercih edilmektedir. Duyarlılık testleri için agar bazlı besiyerlerinde proporsiyon yöntemi referans yöntem olarak önerilmiştir. Ancak pahalı ve raf ömürlerinin nispeten kısa olması önemli dezavantajlarıdır. Sıvı besiyerleri; mikobakterilerin primer izolasyonu, stok suşların pasajlarının yapılması, ilaç duyarlılık testleri ve diğer in vitro testler için inokulum hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Klasik yöntemlerin dışında *M.tuberculosis* izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri de rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde zengin içerikli besiyerleri kullanılarak hem mikobakterilerin izolasyon şansı arttırılmakta hem de mikobakterilerin üremesi erken dönemde sağlanmaktadır. Bu sistemler;

Cihaz ve bilgisayar ile değerlendirilip değerlendirilmemesine göre:

- Tam Otomatize Sistemler (BACTEC 9000 MB, BACTEC MGIT 960, VersaTREK (Myco-ESP II), BacT/ALERT 3D, TK Kültür Sistemi)
- Yarı Otomatize Sistem (BACTEC 460TB)
- Manuel Sistemler (MGIT, MB redoks, Septi-Chek AFB)

Kullanılan üreme indikatörlerine (O₂ kullanımı ve CO₂ üretimi) göre:

- Radyometrik Sistemler (BACTEC 460TB)
- Florometrik Sistemler (BACTEC MGIT 960, BACTEC 9000 MB)
- Kolorimetrik Sistemler (BacT/ALERT 3D, TK)

Hızlı kültür sistemlerinden BACTEC MGIT 960 sistemi, dünyada en yaygın kullanılan otomatize kültür sistemidir. “Mycobacteria Growth Indicator Tube” (MGIT) olarak adlandırılan tüplerin içerisinde 7 ml modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısmında silikona gömülü oksijen ile bileşik halde floresan madde (fenatrolin rutenyum klorid pentahidrat) bulunmaktadır. Kullanılan besiyerlerinde mikobakteri veya diğer mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin kullanılması sonucunda UV ışınına karşı fluoresans oluşmakta ve oluşan fluoresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir. Sistem, üremenin saptanması ve monitörizasyonuna ek olarak, anti-TB İDT’lerinin yapılmasına da imkân tanımaktadır (134).

2.13.4. İdentifikasyon testleri

Tüberküloz şüphesi ile gönderilen ARB pozitif tüm üremelerde MTBC ve TDM ayırımı yapılmalıdır. Bu amaçla fenotipik yöntemler, genotipik yöntemler, immünokromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler bakterilerin üreme hızına, üreme ısısına, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine dayalı yöntemlerdir. MTBC, 37 °C’de 14-28 günlük inkübasyondan sonra LJ’de pigmentsiz, düzensiz, kuru, deve tüyü rengi koloniler oluşturur. Sıvı kültürden EZN boyama yöntemi ile ARB varlığı ve MTBC lehine olan kord oluşumu incelenir. Kültürde üreyen koloninin niasin birikimi, nitrat redüksiyonu, katalaz enziminin varlığı ya da ortamda paranitrobenzoik asit varlığında basilin üreyememesi gibi biyokimyasal özellikleri test edilerek MTBC’nin tanımlaması yapılabilmektedir. Ancak günümüzde, fenotipik testlere alternatif olarak sıvı/katı besiyerinden çalışılabilen, dakikalar içinde sonuç veren, uygulanması daha kolay ve yüksek duyarlılığa sahip olan BD MGIT TBc ID testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, TB basiline özgü duvar antijeni olan MPT-64 antijeninin saptanmasına dayanan immünokromatografik bir testidir (134).

2.13.5. Moleküler testler

Fenotipik ve immünokromatografik yöntemlerin yanı sıra, hızlı sonuç vermesinden dolayı Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve ters hibridizasyon gibi moleküler yöntemler de identifikasyon amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden doğrudan klinik örnekten ya da üremiş kültürden tanımlama yapan testler mevcuttur. Doğrudan klinik örneklerden, özellikle mikroskopide ARB pozitif pulmoner örneklerden yüksek duyarlılıkla MTBC tanımlaması ve *rpoB* gen bölgesi aracılığıyla da RIF direnci tespiti yapabilen GeneXpert MTB/RIF testi, WHO tarafından kullanımı onaylanan ve önerilen bir hasta başı testtir (20). Üremiş kültürden tanımlama amacıyla PZR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Spoligotiplendirme, MIRU-VNTR (Variable Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) gibi yöntemler mevcuttur. Bunların yanı sıra, ticari olarak temin edilebilen DNA prob hibridizasyon esaslı ürünler, DNA dizi analizleri ve DNA mikroarray teknolojileri ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemlerden PCR tabanlı ters hibridizasyon (line prob assay) esasına dayanan GenoType MTBDR plus testi, günümüzde en çok kullanılan ticari moleküler testlerden biridir (135).

2.13.6. İlaç duyarlılık test yöntemleri

Çoklu ilaca dirençli TB suşlarının ortaya çıkması nedeniyle MTBC izolatlarının hızlı ve doğru antitüberküloz duyarlılık testlerine gereksinim vardır. Duyarlılık testi, her hastadan izole edilen ilk MTBC izolatına yapılmalı ve eğer kültür pozitifliği devam ediyorsa üç ay sonra tekrarlanmalıdır. Başlangıçta INH, RIF, EMB ve PZA dahil tüm birincil ilaçları içermelidir (130).

M. tuberculosis kompleks için antitüberküloz ilaç duyarlılık testinde INH, RIF ve EMB için Middlebrook 7H10 besiyerinin kullanıldığı agar proporsiyon yöntemi referans kabul edilmektedir. PZA duyarlılık testi için ise referans olarak BACTEC 460 TB sistemi kullanılmaktadır Bununla birlikte modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin kullanıldığı BACTEC MGIT 960 hızlı ticari sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır ve referans yöntemle uyumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir (54,136). Eğer izolat rifampisin ya da birincil ilaçların herhangi ikisine dirençli ise veya RIF ve INH ilaçlarının ikisine aynı anda direnç görüldüyse ikinci kuşak ilaçlar test edilmelidir.

- **Agar proporsiyon yöntemi**

Yavaş üreyen mikobakterilerin İDT'si için agar proporsiyon yöntemi, 1960'ların başında G. Canetti tarafından geliştirilmiştir. Agar proporsiyon yönteminde temel olarak 7H10 ve 7H11 agarlı besiyeri kullanılır. Bu yöntem dört bölmeye ayrılmış petri kablarında gerçekleştirilir. Üreme kontrolü için ilk bölmeye antibiyotik koyulmaz diğer üç bölme test edilecek ilacın değişik konsantrasyonlarını içerir. Agar proporsiyon yöntemi aynı zamanda kağıt disk ile de yapılabilir. Bu durumda her bölmeye ilaç içermeyen agarlı besiyeri dağıtılır ve belli miktarda antibiyotik içeren kağıt diskler ayrı bölmelere yerleştirilir. Üç haftalık inkübasyon sonunda ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen besiyerindeki koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını gösterir (136).

- **Otomatize ve yarı otomatize hızlı kültür yöntemleri**

Antitüberküloz ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde; BACTEC 460 TB, BACTEC MGIT 960 ve VersaTREK hızlı tanı sistemleri FDA onayına sahiptir ve CLSI tarafından kullanımları önerilmektedir (136).

1. Radyometrik Proporsiyon Yöntemi

M. tuberculosis kompleks için kullanılan ilk sıvı bazlı antimikrobiyal duyarlılık testi, radyometrik proporsiyon yöntemi ile çalışan BACTEC TB 460 sistemi olmuştur. BACTEC TB 460 testinin esasları klasik yöntemlerle aynı temele dayanmaktadır. Bu yöntemde 1-(14C) palmitik asit içeren 7H12 sıvı besiyerinden, bakteri metabolizması sonucu salınan 14C'nin radyometrik olarak saptanmasına dayanmaktadır (130). Ancak, radyoaktif madde kullanımı bu yöntemin önemli bir dezavantajıdır. Bu yüzden ülkemizde ve dünyada artık kullanılmamaktadır.

2. Florometrik Proporsiyon Yöntemi

Florometrik proporsiyon yöntemi esasına dayanan, tam otomatik MGIT 960 sistemi FDA tarafından 2002 yılında INH, RIF, EMB, PZA ve ikincil ilaç SM'ye karşı MTBC'nin duyarlılık testi onaylanmıştır (130). Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanılır, tüplerin dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon bulunur. Floresan bileşik, besiyerinde çözünen oksijen varlığına duyarlıdır. Aktif olarak solunum yapan mikroorganizmalar çözünmüş oksijeni kullandıkça floresans açığa çıkar ve oluşan floresans miktarı 365 nm UV transiluminatör yardımı ile saptanır (137).

MGIT ilaç duyarlılık test seti, bir ilaç içermeyen üreme kontrol tüpü ve ilaç içeren tüpleri kapsamaktadır. Üreme kontrolünün üreme indeksi (Growth index, GI) 4 ile 13 gün içinde 400'e ulaştığı zaman sistem testin tamamlandığını işaret eder. Sonuçların yorumlanmasında; ilaç içeren tüpte $GI > 100$ ise izolat ilaca dirençli, $GI < 100$ ise duyarlı kabul edilir (130).

- **Moleküler yöntemler**

İlaca dirençli basillerin ortaya çıkmaya başlaması ile birlikte, direnç tespitin hızla yapılması ve doğru ilaçlarla tedaviye başlanması gerekliliği önem kazanmıştır. Kültüre dayalı yöntemlerle İDT'lerin uzun sürmesinden dolayı, günümüzde kısa sürede ve yüksek doğrulukta sonuç vermesi ve dirençli ilişkili mutasyonun saptanması amacıyla çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler pozitif kültürleri veya ARB yayma pozitif örnekleri test etmek için kullanılır.

Moleküler yöntemlerde prob temelli olanlar; moleküler işaretlerin kullanıldığı GeneXpert MTB/RIF testi ve line problemlerin kullanıldığı HAIN'ın MTBDR plus ve MTBDR sl testini içermektedir. Dizi analizine dayalı olanlar ise Sanger dizilemesi ve pirodizilemedir. Dizi analizine dayalı yöntemler ile vahşi tip izolatların ya da mutantların dizileri elde edilirken prob temelli yöntemler ile mutasyon olup olmadığı tespit edilir (130).

1. Real-time PCR

Real-time PZR, floresan boya ile işaretli prob teknolojileri sayesinde hasta örneklerindeki MTBC varlığını ve anti-TB ilaçlara karşı gelişen mutasyonları saptamaktadır. Bu sistemde, MTBC'ye spesifik gen bölgeleri ve mutasyonların görülmesi beklenen ilaç direnç genleri PZR ile çoğaltılır ve DNA'nın çoğalması floresan boya ile işaretli DNA problemlerinin kullanılması ile saptanır. Mutasyon saptama, kendi üzerine katlanabilen ve tavaya (beacon) benzer şekil oluşturan, alıcı ve verici floresan boyaların aynı zincir üzerinde bulunduğu problemler ile yapılabilmektedir. Ayrıca mutant ve mutant olmayan diziye özgül, Taq polimeraz enzimi tarafından parçalanan (Taqman), floresan boyalarla işaretli problemler ile de mutasyonlar saptanabilmektedir (135,138,139).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından da kullanımı önerilen bir moleküler yöntem olan GeneXpert MTB/RIF moleküler temelli bir real-time PZR'dır ve prob ile hedef dizi arasında hibridizasyon gerçekleştiğinde floresan sinyal yayılımı olur. Bu sistemde klinik örnek bir kartuş içerisine konup üzerine iki karışım eklenir ve cihaza yerleştirilir. Cihaz bu kartuş içerisinde hem DNA saflaştırmayı gerçekleştirir, hem de real-time PZR yaparak, bir yandan MTB varlığını saptarken diğer yandan RIF direncine yol açan mutasyonları belirler. Bu yöntemin avantajları, yaklaşık iki saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesi, hasta başında basit bir şekilde uygulanabilir olması ve kapalı kartuş sistemi sayesinde çapraz reaksiyonların engellenmiş olmasıdır. Dezavantajları ise, özgün hedef bölge dışındaki mutasyonların tespit edilememesi (yalancı duyarlılık), hedef bölgesinde sessiz mutasyon bulunan suşların dirençli olarak (yalancı dirençlilik) bildirilmesi ve pahalı olmasıdır (135,140).

2. Ters Hibridizasyon Yöntemi (PCR Tabanlı Line Probe Assay)

Ters hibridizasyon yönteminde mutasyon araştırılacak gen bölgesine ait dizileri içeren proplar, bir nitrosetüloz kâğıt üzerine çizgiler halinde yapıştırılmıştır. Proplar içerisinde hem normal diziye, hem de mutant dizilere özgöl olanlar bulunur. Hedef nükleik asit içeren DNA, biotin ile işaretli primerler ile amplifiye edilirler. PZR ürünleri, nitrosetüloz banttaki yakalayıcı proplara hibridize edilir. Alkalın fosfataz-streptavidin kompleksi içeren konjugat eklenir. Konjugat, bir önceki adımda oluşan komplekse bağlanır. 5- bromo-4-chromo-3-indolfosfat ve Nitro Blue Tetrazolium içeren kromojenik substrat eklenir. Substratın, konjugata bağlanması ile alkalın fosfataz enzimi aktivasyonu sonucunda nitrosetüloz bant üzerinde kromojenik bant oluşur. DNA'nın, normal veya mutant dizileri taşıyan proplara bağlanması sonucunda kromojenik bant oluşumuna göre ilaç direncinin varlığı saptanır (135,140).

Hibridizasyon temelli testlerden INNO-LİPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics, Belçika), sadece RIF direnci tespiti ile birlikte 16 tür (MTBC+TDM) tayini de yapabilmektedir. Bir diğer test olan GenoType MTBDR plus (Hain LifeScience GmbH, Almanya), MTBC tayini ile RIF ve INH direncini tespit ederken, GenoType MTBDR sl kiti ise MTBC tayini yanında sekonder ilaçlar için direnç tespiti yapabilmektedir. Bunların yanında GenoType Mycobacterium CM/AS kiti ile de 30 TDM tür tayini yapılabilmektedir. Ters hibridizasyon yöntemleri, ilaç dirençlerini hızlı ve doğru tespit edebilen yöntemlerdir. En önemli kısıtlılıkları, dirence sebep olan mutasyonlarla direnç oluşturmayan sessiz mutasyonların birbirinden ayırt edilememesi ve yeni gelişen mutasyonların tespit edilememesidir. Bu testlerle yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde, testlerin duyarlılıklarındaki farklılıklar, INH ve RIF direncine yol açan mutasyonların bölgelere göre farklılık göstermesiyle kısmen açıklanabilir (135,141).

3. DNA dizi analizi

DNA dizileme, doğrudan bakterinin genom dizilimi ortaya çıkarılarak tanımlama yapılan bir yöntemdir. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin tek nükleotid polimorfizmlerini, karşılaştırmalı genomikleri ve bulaşma dinamikleri ile ilgili çeşitli yönleri belirlemede de faydalı olduğu bulunmuştur (142). Bu teknikler, mikobakteriyel suşların tanımlanmasını ve direnç analizini yapmakla birlikte, filogenetik ve evrimsel özelliklerini belirlemede de moleküler epidemiyoloji alanında da kolaylık sağlar. Tüm genom dizileme yönteminin klinik mikrobiyoloji ve halk sağlığında birbiriyle örtüşen iki ana kullanımı vardır:

1. İlaça dirençli fenotipi tahmin etmek için genotiplerin tanımlanması
2. Potansiyel salgın senaryolarında bulaşma zincirlerini tanımlayabilen genetik ilişkinin belirlenmesi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Sağlık Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 18.10.2021 tarih ve 2021/218 sayılı kararla alınan onay ve Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden sağlanan destek (proje no: 2022.04.01.1277) ile gerçekleştirildi

Çalışmamızda Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarımıza 2004-2021 yılları arasında gönderilen klinik örneklerde izole edilen ve tanımlanan *M. tuberculosis* kompleks suşlarındaki genel direnç durumu incelenerek RIF dirençli bulunan bütün izolatlar ayrıldı. Bu izolatlarda GenoType MTBDR plus testi ile genotipik olarak RIF direnci ve bu dirence neden olan gen paterni araştırıldı. Daha sonra RIF dirençli izolatlar içindeki ÇİD-TB suşları seçildi ve bu izolatlara GenoType MTBDR sl testi ile genotipik olarak ikinci nesil ilaç dirençlerine neden olan gen paterni incelendi. Bu şekilde fenotipik olarak RIF dirençli bulunan suşların genotipik olarak direnç oranları saptandı. Ayrıca RR-TB'deki RIF direncine neden olan gen paterni ile ÇİD-TB'deki RIF direncine neden olan gen paterninin karşılaştırılması yapıldı

3.1.Gereçler

3.1.1. Kullanılan Besiyeri, Boya ve Kimyasallar

1. Erlich- Ziehl-Neelsen Boyama kiti (Aside Dirençli Boyama, ARB)
2. Löwenstein-Jensen Besiyeri (LJ) (Becton Dickinson, ABD)
3. Middlebrook 7H11 Agar (Becton Dickinson, ABD)
4. Mycobacteria Growth Indicator Tube BD (MGIT) (Becton Dickinson, New Jersey -ABD)

3.1.2. PCR ve Ters Hibridizasyon testleri için kullanılan cihaz ve ekipmanlar

1. Thermal cyclers (Bio Rad IQ5 – Anatolia geneworks)
2. Twincubator (Hain Lifescience, Nehren Almanya)
3. Geno Type MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)
4. Geno Type MTBDR plus (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)
5. Geno Type MTBDR sl VER 2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Almanya)
6. Sınıf II güvenlik kabini (firma adı)
7. DNA ekstraksiyon kiti (GenoLyse veya GXT DNA/RNA Ekstraksiyon Kiti)

3.2. Çalışma Suşları

Çalışmamıza, Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Tüberküloz Laboratuvarına 2004-2021 yılları arasında çeşitli kliniklerden izole edilen MTBC kökenleri dahil edildi. Bu isolatlar çalışma yapılınca kadar stok besiyerlerinde -20°C’de ve MGIT besiyerlerinde +4°C’de saklandı. Fenotipik olarak rifampisine direnli olduğu saptanan toplam 21 MTBC suşu ile 12 ÇİD-TB suşu moleküler olarak incelendi. Çalışmaya alınan bütün suşların GenoType MTBC testi ile MTBC alt tür tayini yapıldı ve GenoType MTBDR plus testi ile RIF direnci için rpoB gen mutasyonu, yüksek seviyeli INH direnci için katG geni, düşük seviyeli INH direnci için inhA geninin promotör bölgesi analiz edildi. Bu isolatların içindeki 12 ÇİD-TB suşuna Geno Type MTBDR sl VER 2.0 ile genotipik olarak ikinci basamak ilaç direnç paternine bakıldı.

Çalışmaya alınan suşların izole edildiği örnekler laboratuvarında aşağıda tanımlanan işlemler uygulanarak değerlendirildi. Mikobakteriyoloji Birimi’ne gelen örneklerden, akciğer örnekleri ve steril olmayan klinik örneklerin homojenizasyon ve dekontaminasyonu N-asetil-L-sistein ve %4’lük sodyum hidroksit kullanılarak yapıldı. Steril olduğu kabul edilen örneklere dekontaminasyon işlemi uygulanmadı.

Hazırlanan örnekler, katı besiyeri olarak LJ besiyeri (Becton Dickinson, ABD) ve sıvı besiyeri olarak MGIT (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak üretici talimatlarına göre ekim yapıldı. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar EZN yöntemi ile boyanarak ARB varlığı açısından ışık mikroskopunda değerlendirildi. LJ besiyerlerinde üremeler sekiz hafta boyunca haftada bir kez kontrol edildi. Sıvı besiyerleri ise BACTEC MGIT 320 (Becton Dickinson, ABD) sistemi ile 37°C’de, altı hafta süre ile inkübe edildi. Bu süre sonunda üreme olmayan örnekler negatif olarak değerlendirildi. Üreme olan besiyerlerinden EZN boyama ile hazırlanan yayma preparatların mikroskopik incelemesinde ARB görülmesi durumunda MTBC ile tüberküloz dışı mikobakteri ayrımı amacıyla, MTBC’ye ait MPT64 antijenini saptamaya yönelik bir test olan “TBC Identification Test” (Becton Dickinson, ABD) kiti uygulandı ve üretici talimatlarına göre yorumlandı. MTBC olarak tanımlanan izolatların ilaç duyarlılığı BACTEC MGIT 320 SIRE yöntemi (Becton Dickinson, ABD) ile üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Bütün suşlar moleküler çalışma yapılana kadar yağsız sütlü stok besiyerinde sub kültürleri yapılarak -20°C’de saklandı. Eş zamanlı üreme saptanan pozitif MGIT tüpleride +4°C’de saklandı.

Çalışmaya başlamadan suşları canlandırmak amacıyla saklanan pozitif MGIT şişelerinden ve süt stok besiyerlerinden LJ besiyerine ekim yapılarak 37°C’de inkübe edildi. Eş zamanlı olarak MGIT sıvı besiyerine ekim yapılarak BACTEC MGIT 320 cihazına yerleştirildi. Haftalık üreme kontrolleri yapıldı. Üremesi gözlenen suşların PZR işlemi için DNA izolasyonu yapıldı.

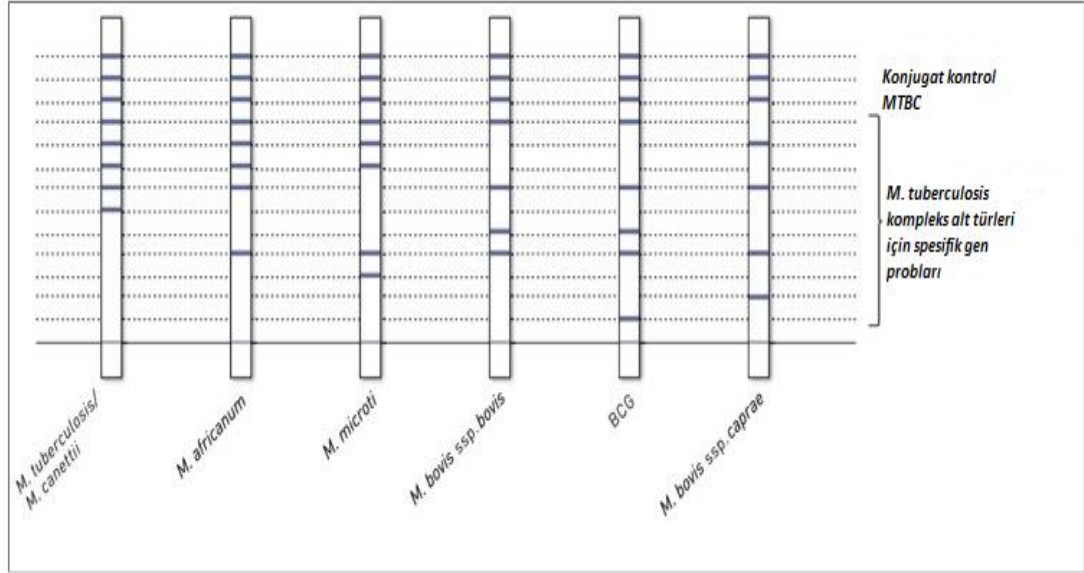
M. tuberculosis kompleks olduğu bilinen suşların moleküler düzeyde incelemeleri aşağıdaki sırayla yapılmıştır;

1. Bütün suşlara GenoType MTBC testi ile kompleks alt tür tayini yapıldı.
2. Bütün suşların GenoType MTBDR plus testi ile RIF ve INH direnç genleri tespit edildi.
3. ÇİD olduğu belirlenen suşlara GenoType MTBDR sl VER 2.0 testi ile ikinci jenerasyon ilaç direnç genleri tespit işlemi yapıldı.

3.3. GenoType MTBC (HAIN Lifescience, Germany)

GenoType MTBC testi, *M. tuberculosis* kompleksine ait türlerin/suşların ayrımı için kültürde üretilmiş mikobakterilerden yapılan kalitatif bir testtir.

GenoType MTBC testi, *M. tuberculosis* kompleksine özgü 23S ribozomal DNA parçası, gyrB DNA dizisi polimorfizmlerine ve *M. bovis* BCG'nin RD1 silinmesine dayanır. Bu dizileri hedefleyen spesifik oligonükleotitler, membran şeritleri üzerinde hareketsiz hale getirilir. Bir multipleks PZR'den türetilen ampliconlar, hibridizasyon sırasında bu problemlerle reaksiyona girer (143).



Şekil 9. GenoType MTBC stripleri (144).

Test Prosedürü Esasları

GenoType MTBC testi, DNA strip teknolojisine dayanmaktadır. Tüm prosedür üç adıma bölündü:

1. Kültürde üretilmiş materyalden DNA ekstraksiyonu
2. Biyotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak yapılan multipleks amplifikasyon
3. Ters hibridizasyon

DNA Ekstraksiyonu

Löwenstein Jensen ve MGIT besiyerinde üretilen mikobakteriler, DNA ekstraksiyonu için başlangıç malzemesi olarak kullanıldı. Çalışma alanının, kontamine edici DNA'dan arınmış olmasına dikkate edildi.

Aşağıdaki hızlı protokol kültürde izole edilen mikobakterilerin DNA'ları ekstraksiyonu için kullanıldı.

1. Ekstarksiyon için sıvı ve katı besiyerindeki izolatlar kulanıldı.

1a. LJ besiyerinde üremiş bakteri kullanıldığında bir öze dolusu bakteri, 100 µl lys buffer (F-LYS) içerisinde çözülerek vortekslendi.

1b. MGIT besiyerinde üreyen bakterileri kullanırken, doğrudan 1 ml örnek alınarak class II güvenlik kabininde bulunan aerosol önleyici rotorlu santrifüj ile 10000X g'de 15 dakika çevrildi. Süpernatant atılarak örnekler FluoroLyse kitinin içinden çıkan 100 µl lys buffer (F-LYS) ile çözülerek vortekslendi.

2. Elde edilen bakteriler 95-100 derecede kaynayan su içerisinde 5 dk bekletildi.

3. Santrifüj de kısa bir spin yapılarak kapakta oluşan su buharlarının vida kapaklı tüpün dibine inmesi sağlandı.

4. Fluoro Lyse kitinin içinden çıkan 100 µl nötralizasyon buffer (F-NB) eklendi ve vortekslendi.

5. En yüksek devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısımdan (Süpernatant) 100 µl alındı.

Amplifikasyon (PZR)

Polimeraz ve primerler gibi amplifikasyon için gerekli tüm reaktifler, A ve B amplifikasyon karışımlarına (AM-A ve AM-B) dahil edilip ve bu test için optimize edildi. Reaktifler buzluktan çıkarılarak çözüldükten sonra, AM-A ve AM-B'yi kısaca spin yaparak yukarı ve aşağı doğru pipetleyerek dikkatlice karışması sağlandı. DNA'dan arındırılmış bir odada her örnek için 45 µl amplifikasyon karışımı hazırlandı ve DNA örnekleri ayrı alanda eklendi. Her örnek için;

- 10 µl AM-A
- 35 µl AM-B
- 5 µl DNA solution
- Final hacmi: 50 µl

Çalışılacak örneklerin sayısı belirlendi. (analiz edilecek örnek sayısı + kontrol örnekleri). Negatif kontrolde örnek yerine 5 µl izolasyon aşamasında beraber yürütülen negatif kontrol konuldu. Gerekli tüp sayısı hazırlandı. Örnek sayısına göre AM-A ve AM-B içeren bir ana karışım hazırlanarak dikkatlice karıştırıldı (vorteks yapılmadı). Hazırlanan PZR tüplerinin her birine 45 µl ilave edildi. Ayrı bir çalışma alanında, 45 µl AM-A ve AM-B karışım içeren tüplerin içerisine 5 µl DNA ekstraksiyonu eklenerek, Thermal cycler cihazına yerleştirildi. Kite uygun PCR

programı yüklenerek amplifikasyon başlatıldı. PCR programı çalışma süreci Tablo 3’da gösterildi.

Tablo 3. Genotype MTBC için PCR çalışma döngüsü

Sıcaklık (°C)	95°C	95°C	58 °C	95°C	53 °C	70 °C	70 °C
Süre	15	30	2	25	40	40	8
(dakika/saniye)	dakika	saniye	dakika	saniye	saniye	saniye	dakika
Döngü sayısı	PCR	10			20		PCR
	öncesi	döngü			döngü		sonrası

Hibridizasyon

Ön İşlemler

Hibridizasyon için bir çalkalamalı su banyosu kullanıldı.

- Su banyosunun ısısı 45 ± 1 °C’ye ayarlandı
- Hibridizasyon (HYB) ve Stringent (STR) solüsyonları kuru ısı bloğunda 37-45 °C’ye kadar ısıtıldı.
- Konjugat (CON-C) ve Substrat (SUB-C) +4 °C’de korunurken diğer tüm solüsyonlar oda ısısında bekletilerek ısıtıldı.
- Falkon tüpleri içinde CON-C ve SUB-C konsantreleri kendi sulandırma solüsyonları ile 1:100 oranında sulandırıldı.

• • CON-C, CON-D ve

• • SUB-C, SUB-D ile

Her bir strip için; 10 µl konsantre + 1 ml (1000 µl) sulandırma solüsyonu

1. 20 µl denatürasyon (DEN) solüsyonu her tray’in (striplerin yerleştirildiği plak) örneklerin çalışılacağı kuyucukların köşelerine pipetlendi.

2. 20 µl PZR ile çoğaltılmış örnekler DEN solüsyonuna pipetlenerek karıştırılıp ve oda sıcaklığında 5 dak. inkübe edildi.

3. Tray’in örneklerin konulduğu kuyucuklarına dikkatlice önceden ısıtılmış 1 ml HYB solüsyonu konulup, homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı.

4. Stripler dikkatlice trayin kuyularına yerleştirildi.

5. Tray önceden hazırlanan su banyosunda 45 °C’de 30 dak. inkübe edildi.

6. HYB solüsyonu pasteur pipeti kullanılarak tamamen kuyucuklardan boşaltıldı.

7. Her bir kuyucuğa 1 ml STR solüsyonu eklendi ve 15 dak. 45 °C'de çalkalanarak inkübe edildi.

8. STR solüsyonu, kuyucuklardan tray atık kabına komple şekilde dökülerek boşaltıldı ve kuyucuklar içinde kalan bir miktar sıvı da yine tray ters çevrilerek üst ucu kurutma kağıdına emdirilerek uzaklaştırıldı.

NOT: Bu basamaktan itibaren oda sıcaklığında çalışıldı.

9. Her bir kuyucuktaki strip üzerine 1 ml Rinse solüsyonu (RIN) eklenerek 1 dak. çalkalanarak yıkandı. Daha sonra tray ters çevrilerek sıvı döküldü.

10. Kuyucuklardaki striplerin üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış CONC eklendi ve 30 dak. çalkalamalı olarak inkübe edildi.

11. CON-C boşaltıldı ve her strip 2 kez 1 ml RIN solüsyonu ile 1 kez de distile su ile 1'er dakika çalkalanarak yıkandı.

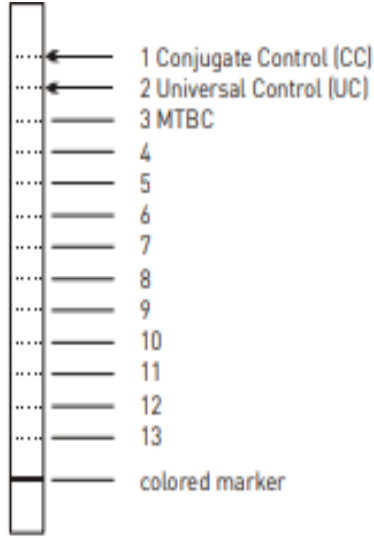
12. Her strip üzerine 1 ml daha önceden sulandırılmış Substrat solüsyonu eklendi ve karanlıkta, bantların oluşmasına göre 3 - 20 dak. arasında çalkalamadan inkübe edildi.

13. Bant oluşma işlemi, striplerin distile su ile iki kez yıkanması ile sonlandırıldı.

14. Son olarak, stripler kuyucuklardan alınarak kurutma kâğıdının arasına konularak kurutulup, değerlendirme aşamasına geçildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması

Şeritler değerlendirme sayfasına yapıştırıldı ve ışıktan koruyarak saklandı. Daha sonra kitle birlikte verilen değerlendirme sayfasına göre değerlendirildi. Bu değerlendirme sayfasını kullanırken CC ve UC bantları, değerlendirme kartında bulunan CC ve UC çizgileriyle hizalandı ve test şeritinde oluşan diğer bantlar değerlendirildi. Son sütundaki pozitif bantların varlığı not edildi. Yorumlama tablosu yardımıyla türler belirlendi ve son sütuna tespit edilen türlerin adı girildi. Her şeritte toplam 13 reaksiyon bölgesi vardı ve incelendi (Şekil 10).



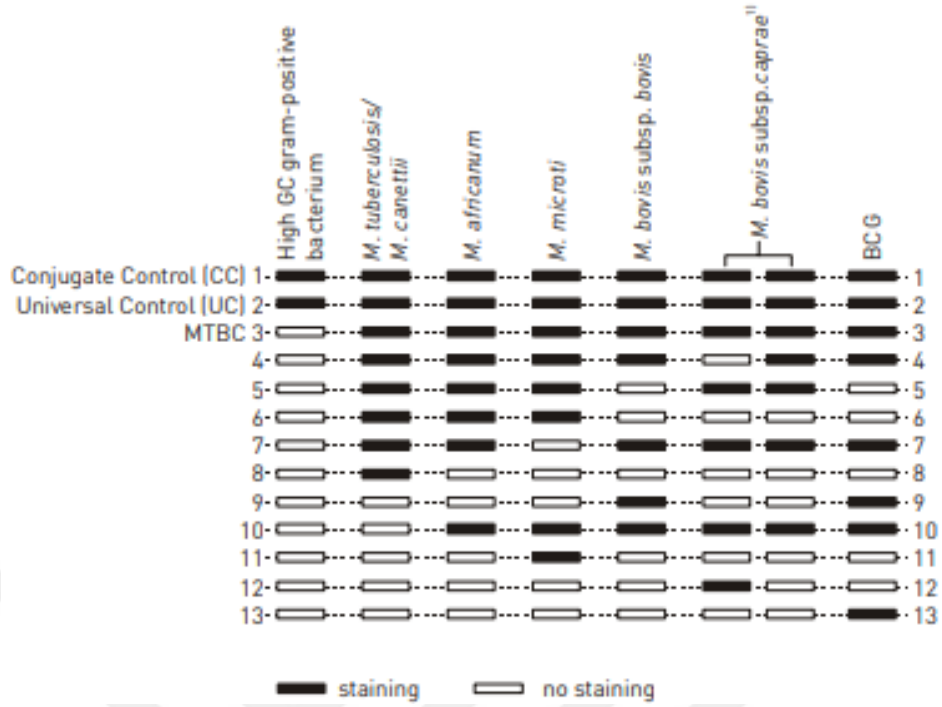
Şekil 10. GenoType MTBC testi için değerlendirme şeritleri (145).

Konjugat Kontrolü (CC): Bu bölgede, konjugat bağlanmasının ve substrat reaksiyonunun etkinliğini belgeleyen bir çizgi gelişmelidir. Hibridizasyonun gerçekleşmiş olması bu bölge ile kontrol edilir ve bu bölgede bant oluşmaması değerlendirmenin yapılamayacağını gösterir.

Universal Kontrol (UC): Bu bölge, bilinen tüm mikobakterileri ve yüksek G+C içeriğine sahip Gram-pozitif bakteri grubunun üyelerini tespit eder. Eğer bu bölge ve konjugat kontrol bölgesi boyası pozitif ancak herhangi bir mikobakteriye özgü bant bölgeleri oluşmamış ise bu bakteri türünü tanımlamada farklı yöntemler kullanılmalıdır.

MTBC: Bu bölge, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin tüm üyelerinden üretilen ampliconlarla hibritleşir.

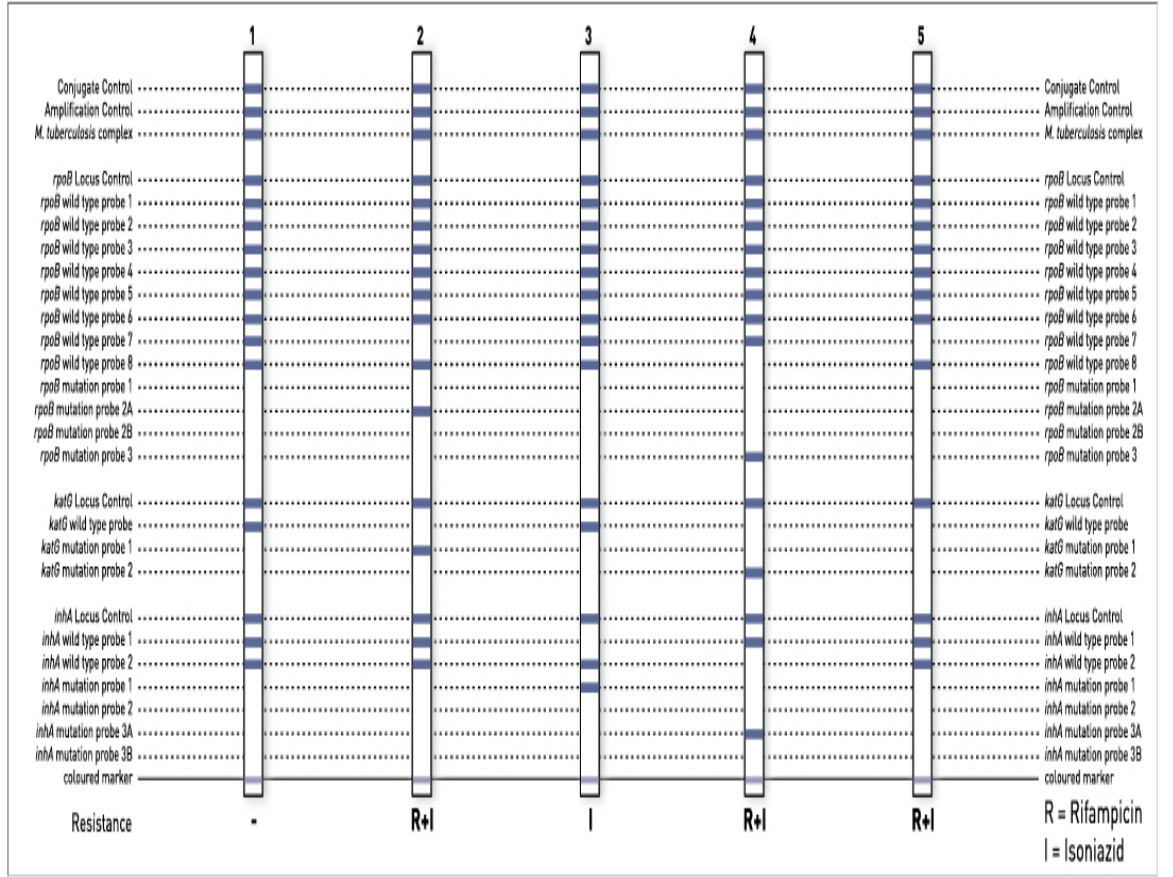
Diğer bantlar: Oluşan spesifik bantları değerlendirme için yorum tablosuna bakıldı. Bir şeridin tüm bantları aynı sinyal gücünü göstermek zorunda değildi. Yalnızca, yoğunlukları Evrensel Kontrol bölgesinin (UC) yoğunluğu kadar veya ondan daha güçlü olan bantlar dikkate alındı. Çok miktarda amplicon kullanılmışsa, ek bantlar oluşabileceği göz önünde bulunduruldu.



Şekil 11. Geno Type Mycobacteria MTBC kiti ile çalışılan mikobakteri bant bölgeleri (145).

3.4. GenoType MTBDR *plus* (Hain Lifescience)

GenoType MTBDR *plus* testi, pulmoner hasta numunesinden ve kültür materyalinden hızlı bir sonuç alınmasını sağlayan, bir nitroselüloz membran üzerinde ters hibridizasyon ile birleştirilmiş multipleks polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı bir line prob testidir. Bu test ile *rpoB* geninin en önemli mutasyonlarının saptanması ve RIF direncinin tanımlanması yapılır. Yine bu test ile yüksek düzey INH direncini test etmek için *katG* geni incelenir. Aynı şekilde düşük seviyeli INH direncini test etmek için de *inhA* geninin promotör bölgesi analiz edilir.



Şekil 12. GenoType MTBDR plus kiti ile çalışılan MTBC direnç gen bölgeleri (146).

Prosedür Esasları

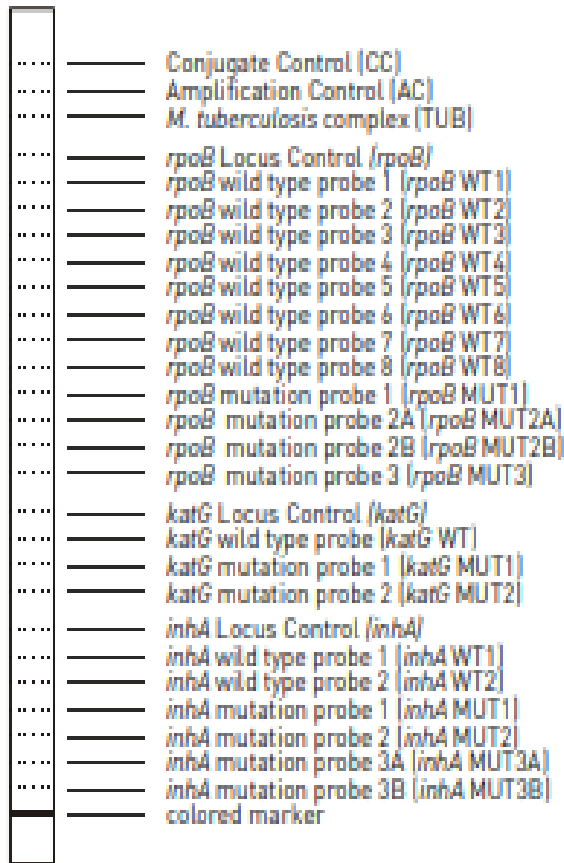
GenoType MTBDR plus kiti prosedürü, GenoType MTBC prosedür esaslarında anlatıldığı gibidir. DNA ekstraksiyonu, hibridizasyon aşamaları aynı şekilde uygulandı. PZR çalışma aşamaları ise aşağıdaki tabloda gösterildi şekildedir (Tablo 4).

Tablo 4. Geno Type MTBDR plus için PZR çalışma döngüsü

Sıcaklık (°C)	95 °C	95 °C	65 °C	95 °C	50 °C	70 °C	70 °C
Süre	15	30	2	25	40	40	8
(dakika/saniye)	dakika	saniye	dakika	saniye	saniye	saniye	dakika
Döngü sayısı	PZR	10			20		PCR
	öncesi	döngü			döngü		sonrası

Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması

Kit içerisinde kitle birlikte verilen bir değerlendirme sayfası bulunmaktadır. Şeritler değerlendirme sayfasına yapıştırıldı ve ışıktan koruyarak saklandı. Daha sonra kitle birlikte verilen bu değerlendirme sayfasına göre sonuçlar değerlendirildi. Bu değerlendirme sayfasını kullanırken, CC ve AC bantlarını sayfadaki ilgili çizgilerle hizalandı ve test şeritinde oluşan diğer bantlar değerlendirildi. Direnç durumu varlığı değerlendirme sayfasına göre belirlendi ve ilgili sütuna not edildi. Her şeritte toplam 27 reaksiyon bölgesi vardı ve incelendi (Şekil 13).



Şekil 13. GenoType MTBDR *plus* kiti değerlendirme içi şeritteki gen bölgeleri (147).

Konjugat Kontrolü (CC): Bu bölgede, konjugat bağlanmasının ve substrat reaksiyonunun etkinliğini belgeleyen bir çizgi gelişmelidir.

Amplifikasyon Kontrolü (AC): Test doğru bir şekilde yapıldığında, amplifikasyon kontrol bölgesine bir kontrol amplikonu bağlanacaktır. Pozitif bir test sonucu olması durumunda, amplifikasyon kontrol bölgesinin sinyali zayıf olabilir veya hatta tamamen kaybolabilir. Bu durumda, test doğru bir şekilde yapılmıştır ve

tekrarlanması gerekmez. Yalnızca CC ve AC bantları geliştiğinde, bu durum negatif bir sonucu gösterir. Negatif bir test sonucu ise, eksik bir AC bandı, kurulum ve/veya amplifikasyon reaksiyonunun performansı sırasındaki hataları veya amplifikasyon inhibitörlerinin varlığını gösterir. Bu durumda test sonucu geçerli değildir ve test ilgili numune ile tekrarlanmalıdır.

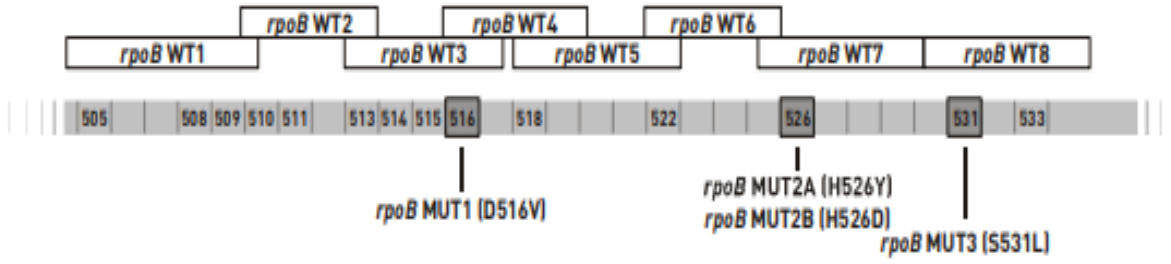
M. tuberculosis kompleksi (TUB): Bu bölge, *M. tuberculosis* kompleksinin tüm üyelerinden üretilen ampikonlarla hibridize olmaktadır. Bir direnç modeli gelişmemişken TUB bölgesi negatifse, test edilen numune *M. tuberculosis* kompleksine ait bakteri içermez ve bu test değerlendirilemez. Nadir durumlarda, bir direnç modeli gelişirken TUB bölgesi negatif olabilir. Bu durumda, *M. tuberculosis* kompleksine ait bir suşun varlığından şüphelenilmeli ve test tekrarlanmalıdır.

Lokus Kontrolleri (rpoB, katG ve inhA): Lokus kontrol bölgeleri, ilgili lokus için spesifik bir gen bölgesini tespit eder. Pozitif bir test sonucu olması durumunda lokus kontrol bantlarının sinyalleri zayıf olabilir.

Wild tip bantları: Wild tip (WT) bantlar, ilgili genlerin en önemli direnç bölgelerini içerir (Şekil 14). Tüm wild tip bantların pozitif saptanması, incelenen gende saptanabilir bir mutasyon olmadığını gösterir. Bu, test edilen suşun ilgili antibiyotiğe duyarlı olduğunu gösterir. Bir mutasyon durumunda, ilgili ampikon karşılık gelen proba bağlanamaz ve wild tip bant oluşmaz. Wild tip bantlar en az biri için pozitiflik olmaması, test edilen suşun ilgili antibiyotiğe direncini gösterir. Bantlar değerlendirilirken yoğunlukları en az amplifikasyon kontrol bölgesindeki (AC) bantlar kadar kuvvetli bantlar dikkate alınır.

Mutasyon problemleri: Mutasyon bantları en yaygın direnç mutasyonlarından bazılarını tespit eder. Oluşan diğer bantlarla karşılaştırıldığında, mutasyon problemleri rpoB MUT2A ve MUT2B'nin pozitif sinyalleri daha düşük bir sinyal gücü gösterebilir. Nadir durumlarda, rpoB MUT3 bandı pozitif olduğunda, rpoB WT8 bandında negatif olarak kabul edilecek zayıf boyama tespit edilebilir.

Wild tip modelden sapan her model, test edilen suşun bir direncini gösterir. rpoB problemleri ile elde edilen bantlama modeli, test edilen suşun RIF direnci, katG ve inhA bantlama modeli hakkında bir INH direnci hakkında bir sonuca varılmasını sağlar.



Şekil 14. Direnç bölgeleri ve yaygın dirence aracılık eden mutasyonlar (147).

3.5. Geno Type MTBDR sl VER 2.0

Bu test *M. tuberculosis* kompleksinin tanımlanması ve ikinci nesil anti-TB ilaçlara karşı direncin varlığını belirler. Ayrıca bu dirence neden olan gen bölgesini tespit etmek amacıyla kullanılan ve DNA-şerit teknolojisine dayanan bir yöntemdir.

İkinci basamak antitüberküloz ilaçlara direncin erken tespiti, ÇİD-TB yönetimi için önemlidir. GenoType MTBDR sl sürüm VER 2.0 hat prob tahlili, florokinolonların (FLQ) (*gyrA* ve *gyrB* genleri) ve ikinci basamak enjekte edilebilir ilaçların (SLID) (*rrs* ve *eis* genleri) direnç sağlayan mutasyonlarının moleküler tespiti için yeniden tasarlanmıştır (148).

GenoType MTBDR sl VER 1.0 ikinci basamak anti-TB ilaçlara dirençlerin saptanması için kullanılan ilk ticari nükleik asit testi idi. GenoType MTBDR sl'nin ikinci versiyonu florokinolonlara karşı direncin yanı sıra enjekte edilebilir ilaçlara dirençle ilgili mutasyonların saptanmasını da sağlar.

Prosedür Esasları

GenoType MTBDR sl VER 2.0 prosedürü, yukarıda GenoType MTBDR plus prosedür esaslarında anlatıldığı gibidir. DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon ve hibridizasyon aşamaları aynı şekilde uygulanmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması

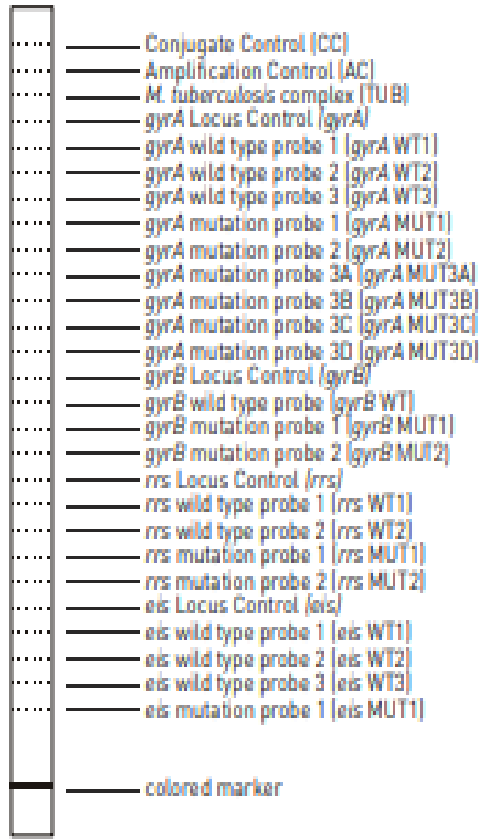
Kit içerisinde bir değerlendirme sayfası bulunmaktadır. Bu değerlendirme sayfasını kullanırken, oluşturulan şeritleri, CC ve AC bantlarını sayfadaki ilgili çizgilerle hizalandı ve test şeritinde oluşan diğer bantlar değerlendirildi. Direnç durumunu belirlendi ve ilgili sütuna not edildi. Her şeritte toplam 27 reaksiyon bölgesi vardı bu bölgeler incelendi (Şekil 15).

Konjugat Kontrolü (CC): Bu bölgede, konjugat bağlanmasının ve substrat reaksiyonunun etkinliğini gösteren bir çizgi gelişmelidir.

Amplifikasyon Kontrolü (AC): Test doğru bir şekilde yapıldığında, amplifikasyon kontrol bölgesine bir kontrol ampikonu bağlanacaktır. Yalnızca CC ve AC bantları geliştirildiğinde, bu negatif bir sonucu temsil eder. Negatif bir test sonucu olması durumunda eksik bir AC bandı hataları gösterir amplifikasyon kurulumu sırasında veya amplifikasyon inhibitörlerinin varlığını gösterir. Bu durumda test sonucu geçerli değildir ve ilgili numunenin tekrarlanması gerekir.

***M. tuberculosis* kompleksi (TUB):** Bu bölge, *M. tuberculosis* kompleksinin tüm üyelerinden üretilen ampikonlarla hibritleşir. TUB bölgesi negatif ise, test edilen numune *M. tuberculosis* kompleksine ait bakteri içermez ve bu izolatlar bu testicin kullanılmaz.

Lokus Kontrolleri (gyrA, gyrB, rrs, eis): Lokus kontrol bölgeleri, ilgili lokus için spesifik gen bölgelerini tespit eder. Pozitif bir test sonucu olması durumunda, lokus kontrol bantlarının sinyalleri zayıf olabilir.



Şekil 15. Geno Type MTBDR sl VER 2.0 kiti ile çalışılan MTBC direnç gen bölgeleri (149).

3.6. İstatistiksel Analiz

Analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL) 22 paket programında değerlendirilmiştir. Çalışmada kategorik veriler sayı (n), yüzde (%) değerleri, sürekli verilerde ise ortalama±standart sapma (Ort±SS) değerleri ile gösterilmiştir. Gruplar arası kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-kare testi uygulanmıştır. Analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

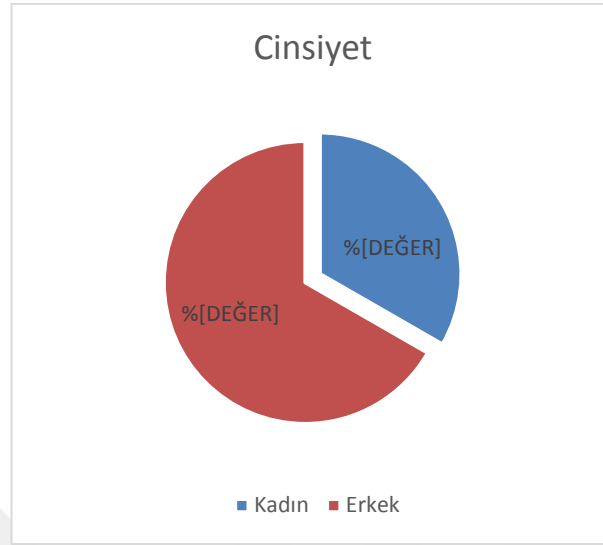
4. BULGULAR

Çalışmamızda Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarımıza 2004-2021 yılları arasında gönderilen klinik örneklerden izole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarındaki genel direnç durumu değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılık testi yapılan 854 MTBC suşunun 24'ünün (%2,8) RIF dirençli olduğu tespit edildi. Bu suşlardan 14'ünün (%1,6) RIF+INH direnci birlikte görülen ÇİD-TB olduğu belirlendi.

Rifampisin dirençli 24 MTBC suşunun üçü pasajlarla canlandırılmadığı için 21'i çalışmaya alınmıştır. MTBC suşlarının izole edildikleri hastaların 7'si (%33,3) kadın ve 14'ü (%66,7) erkek olup, yaş ortalaması $45,0 \pm 17,1$ (min=18-maks=77) yıl şeklindedir (Tablo 5, Şekil 16).

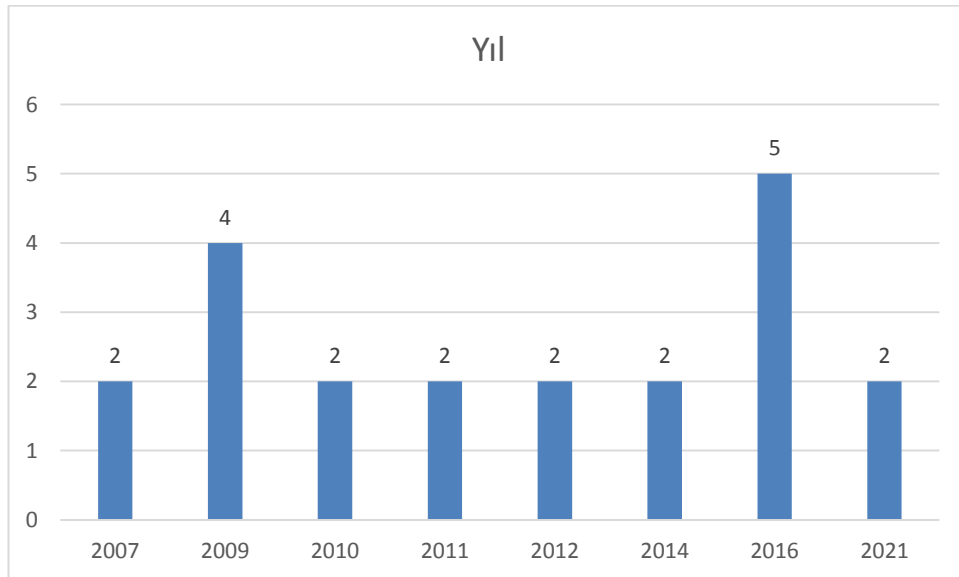
Tablo 5. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının izole edildikleri hastaların demografik özellikleri.

Cinsiyet	Sayı	%
Kadın	7	33,3
Erkek	14	66,7
Toplam	21	100



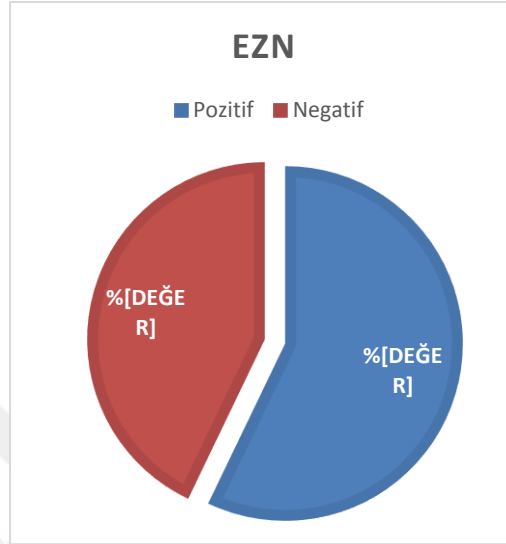
Şekil 16. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının izole edildikleri hastaların cinsiyet dağılımları

Çalışmaya alınan suşların yıllara göre dağılımı incelendiğinde 2'sinin (%9,5) 2007 yılında, 4'ünün (%19) 2009 yılında, 2'sinin (%9,5) 2010 yılında, 2'sinin (%9,5) 2011 yılında, 2'sinin (%9,5) 2012 yılında, 2'sinin (%9,5) 2014 yılında, 5'inin (%23,8) 2016 yılında ve 2'sinin (%9,5) 2021 yılında olduğu görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının yıllara göre dağılımı.

Rifampisin dirençli MTBC izole edilen hastaların 12'sinde (%57,1) EZN boyama ile pozitifliği var iken dokuzunda (%42,9) EZN boyamada mikroorganizma saptanmamıştır (Şekil 18).



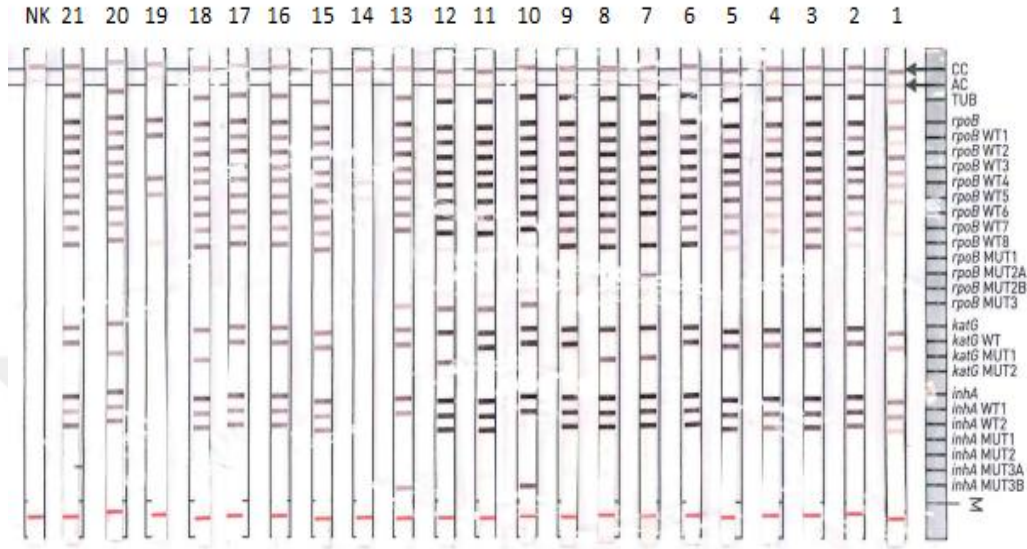
Şekil 18. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının EZN pozitifliği.

Çalışmaya alınan rifampisin dirençli MTBC suşlarının dokuzu (%42,9) streptomisine dirençli yedisi (%33,3) etambutola dirençli saptanmıştır. İzolatların dokuzu (%42,9) yalnızca RIF dirençli iken, RIF+INH birlikte direnç görülen suş sayısı 12 (%57,1) olarak saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 6. Rifampisin dirençli MTBC suşlarının MGIT SIRE yöntemiyle ilaç duyarlılık sonuçları.

Anti tüberküloz ilaç	(n)	Dirençli	
		n	%
Streptomisin	(21)	9	42,9
Etambutol	(21)	7	33,3
Yalnızca RIF dirençli	(21)	9	42,9
RIF+INH dirençli	(21)	12	57,1

GenoType MTBDR plus yöntemi ile 21 MTBC suşunun genotipik ilaç duyarlılıkları araştırıldı. Duyarlılığı araştırılan 2 suş bu testin değerlendirme kriterlerine uymadığı için yorumlanamadı. (Şekil 19).



Şekil 19. GenoType MTBDR plus test sonuçları

Çalışmaya alınan ve MGIT SIRE yöntemiyle fenotipik olarak RIF dirençli saptanan 19 suşun Genotype MTBDR plus kiti ile genotipik direnç varlığı araştırıldı. Bu suşların yedisi (%36,8) RIF'e genotipik olarak dirençli bulundu. Dirençli olan bu izolatların dördünde (%57,1) WT8 bölgesinde silinme ve rpoBMUT3 mutasyonu birlikte olduğu belirlendi. Diğer izolatların ise birinde (%14,3) WT8 ve WT6 bantlarında, birinde (%14,3) WT8 bandında silinme tespit edildi. Bir (%14,3) tanesinde WT7 bandında silinme ve rpoB MUT2A mutasyonu birlikte olduğu görüldü.

Araştırmaya alınan suşların yedisi (%36,8) Genotype MTBDR plus kiti ile INH'a genotipik olarak dirençli iken, 12'si (%63,2) duyarlı olarak bulundu. Dirençli olanların beşinde (%71,4) katG WT bandında silinme ve katGMUT1 mutasyonu birlikte olup, ikisinde (%28,6) inhA MUT3B mutasyonu görüldü (Tablo 7).

Tablo 7. Genotype MTBDR plus test sonuçları.

MTBDR ilaç adı/Direnç gen-mutasyon bölgesi		Sayı	%
Genotype MTBDR-plus-RIF	Dirençli	7	36,8
	Duyarlı	12	63,2
Pozitif WT bant	WT8/WT6	1	14,3
	WT8	1	14,3
	WT7/ rpoBMUT2A	1	14,3
	WT8/ rpoBMUT3	4	57,1
Genotype MTBDR-plus-INH	Dirençli	7	36,8
	Duyarlı	12	63,2
Pozitif WT bant	katGWT/ katGMUT1	5	71,4
	inhAMUT3B	2	28,6

Değerlendirebilen 19 kökenin sekizinde (%42,1) streptomisin direnci saptandı, bunların ikisinde Genotype MTBDR plus ile genotipik olarak RIF direnci görüldü. Streptomisin direnci olan kökenlerin üçünde (%37,5) Genotype MTBDR plus ile genotipik olarak INH direnci görüldü. Streptomisin direncinin varlığı açısından genotipik olarak RIF ve INH test sonuçları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Genotype MTBDR plus test sonuçlarının MGIT ile Streptomisin sonucuna göre karşılaştırılması.

Duyarlılık profilleri		Streptomisin dirençli		Streptomisin duyarlı		p *
		Sayı	%	Sayı	%	
Genotype MTBDR-plus-RIF	Dirençli	2	25	5	45,5	0,633
	Duyarlı	6	75	6	54,5	
Pozitif WT bant	WT8/WT6	-	-	1	20	0,714
	WT8	-	-	1	20	
	WT7/rpoBMU T2A	1	50	-	-	
	WT8/rpoBMU T3	1	50	3	60,0	
Genotype MTBDR-plus-INH	Dirençli	3	37,5	4	36,4	0,960
	Duyarlı	5	62,5	7	63,6	
Pozitif WT bant	katGWT/ katGMUT1	2	66,7	3	75	0,809
	inhAMUT3B	1	33,3	1	25	

*Kikare analizi yapılmıştır.

İzolatların altı (%31,5) tanesinde etambutol direnci saptandı ve bunların bir tanesinde Genotype MTBDR plus kiti ile genotipik olarak RIF direnci görüldü. Etambutol direnci olan altı kökenin iki tanesinde Genotype MTBDR plus ile genotipik olarak INH direnci görüldü. Etambutol direncinin varlığı açısından test sonuçları arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$)(Tablo 9).

Tablo 9. Genotype MTBDR plus test sonuçlarının MGIT ile Etambutol sonucuna göre karşılaştırılması

Duyarlılık profilleri		Etambutol dirençli		Etambutol duyarlı		p*
		Sayı	%	Sayı	%	
Genotype MTBDR-plus-RIF	Dirençli	1	16,7	6	46,2	0,333
	Dirençli değil	5	83,3	7	53,8	
Pozitif WT bant	WT8/WT6	-	-	1	16,7	0,831
	WT8	-	-	1	16,7	
	WT7/ rpoBMUT2A	-	-	1	16,7	
	WT8/ rpoBMUT3	1	100	3	50	
Genotype MTBDR-plus-INH	Dirençli	2	33,3	5	38,5	0,829
	Dirençli değil	4	66,7	8	61,5	
Pozitif WT bant	katGWT/ katGMUT1	1	50,0	4	80	0,427
	inhAMUT3B	1	50,0	1	20	

*Kikare analizi yapılmıştır.

Fenotipik olarak 19 kökenden sekiz tanesinde izole RIF direnci, 11 tanesinde RIF+INH direnci belirlendi. İzole RIF direnci saptanan suşlarının iki tanesinde Genotype MTBDR plus kiti ile genotipik olarak RIF direnci saptandı. Fenotipik olarak RIF+INH direnci saptanan 11 kökenin beş tanesinde Genotype MTBDR plus kiti ile genotipik olarak RIF direnci saptandı.

Fenotipik olarak izole RIF direnci olan sekiz kökenin birinde GenoType MTBDR plus kiti ile genotipik olarak INH direnci saptandı. Fenotipik olarak RIF+INH direnci olan 11 kökenin altısında Genotype MTBDR plus kiti ile genotipik olarak INH direnci görülmüştür. RIF ve INH direncinin varlığı arasında test sonuçları açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0,05$)(Tablo 10)

Tablo 10. GenoType MTBDR plus test sonuçlarının MGIT-RIF+INH sonucuna göre karşılaştırılması

Duyarlılık profilleri		Yalnızca RIF direnci		RIF+INH direnci		p*
		Sayı	%	Sayı	%	
Genotype MTBDR-plus-RIF	Dirençli	2	25	5	45,5	0,633
	Duyarlı	6	75	6	54,5	
Pozitif WT bant	WT8/WT6	-	-	1	20	0,714
	WT8	1	50,0	0	0	
	WT7/rpoBMUT2A	0	-	1	20	
	WT8/rpoBMUT3	1	50	3	60	
Genotype MTBDR-plus-INH	Dirençli	1	12,5	6	54,5	0,147
	Duyarlı	7	87,5	5	45,5	
Pozitif WT bant	katGWT/katGMUT1	1	100	4	66,7	0,495
	inhAMUT3B	-	-	2	33,3	

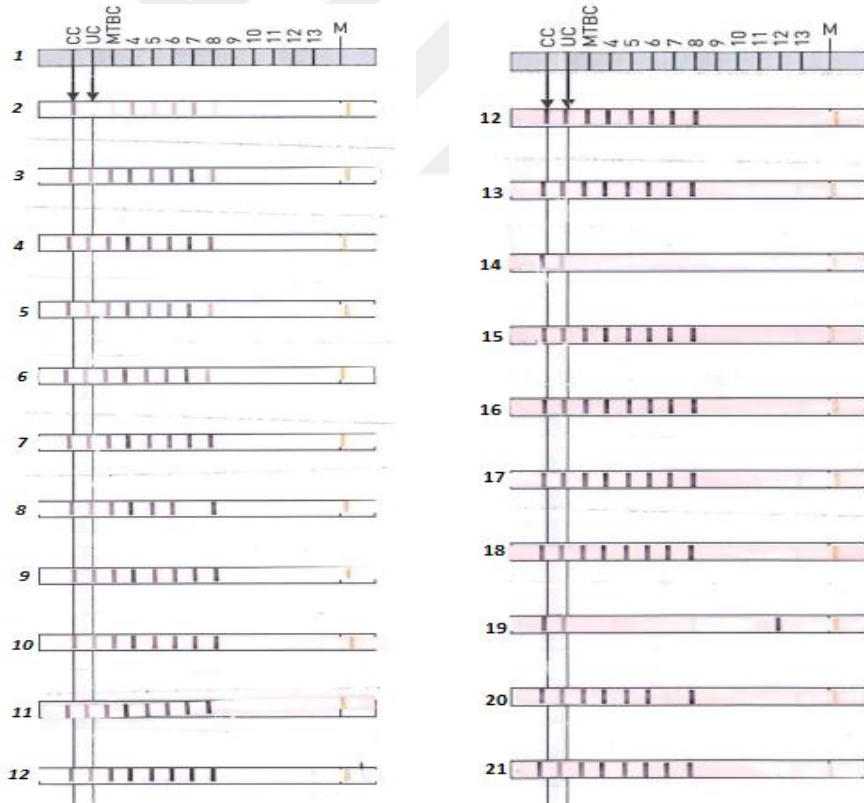
*Kikare analizi yapılmıştır.

Fenotipik olarak INH+RIF dirençli olup teste dahil edilen 10 suşun dokuzunda Genotype MTBDR sl ver 2.0 yöntemi genotipik olarak ikinci nesil ilaçların hiçbirine karşı direnç saptanmadı. Bu kökenlerden bir tanesi ise testin değerlendirme kriterlerine uymadığı için yorumlanamadı. (Şekil 20).



Şekil 20. Genotype MTBDR sl ver 2.0 test sonuçları.

Rifampisin dirençli 21 izolat Genotype MTBC yöntemi değerlendirildiğinde 19'u (%90,4) *M. tuberculosis/canetti* olarak sonuçlandı, ikisi bu testin yorumlama kriterlerine uymadığı için değerlendirilemedi (Şekil 21) .



Şekil 21. GenoType MTBC test sonuçları

5. TARTIŞMA

Tüberküloz her yıl yaklaşık 9 milyon insanı enfekte eden ve yaklaşık 2 milyon insanın ölümüne sebep olan ve Mycobacterium cinsi bakteriler tarafından oluşturulan bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu hastalığın oluşumundan %97-99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur. Mycobacterium cinsinde yaklaşık 250 tür bulunmakta olup insanlar açısından en sık enfeksiyon etkeni olanlar *M. tuberculosis kompleks* (MTBC) içinde yer alır.

Tüberküloz mikrobiyolojik olarak tespit edildikten sonra ilaç direncini test etmek gereklidir. Böylece en etkili tedavi rejiminin en kısa sürede başlanması amaçlanmaktadır. İlaça dirençli tüberkülozda etkili tedavi bulaştırıcılığı önlemek açısından önemlidir. İlaçlarla yapılan tedavi etkisiz olursa bulaştırıcılık devam edecektir. *M. tuberculosis*'te klinik açıdan ilaç direnci primer ya da sekonder olarak gelişebilir.

İlaça dirençli tüberküloz dünyada ve ülkemizde önemli bir halk sağlığı tehdidi olmaya devam etmektedir. İsoniazid ve rifampisin en etkili birinci basamak ilaçlardır ve ikisine karşı gelişen direnç TB için büyük endişe kaynağıdır. Her iki ilaca karşı birlikte gelişen direnç ÇİD-TB olarak tanımlanır. Tüberküloz sağaltımında en güçlü antitüberküloz ilaç rifampisindir. Rifampisine dirençli kökenlerin %90'dan fazlası aynı zamanda isoniazid direnci de taşımaktadır. Bu sebeple rifampisin direncinin gösterilmesi ÇİD-TB olgularının tanısı için belirleyici olmaktadır. Hem ÇİD-TB hem de izole rifampisine dirençli TB, ikinci nesil ilaçlarla tedavi gerektirir.

Dünyada, ilk kez TB tanısı konan vakaların ÇİD-TB ya da RR-TB olma oranı %3-4 arasında, daha önce TB tedavisi görenlerde ise yaklaşık %18-21 arasında olduğu gösterilmiştir (19). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yılda yaklaşık 440.000 RR-TB / ÇİD-TB vakası ve 25.000 YİD-TB vakasının ortaya çıktığı ve bunlardan her yıl 150.000 ÇİD-TB vakasının öldüğü tahmin edilmektedir (19). Türkiye verem savaş raporuna göre İDT yapılan olgularda ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,6 iken, önceden tedavi görmüş olgularda %9,9 olarak saptanmıştır. 2018 yılındaki 176 ÇİD-TB olgusunun sekizi (%4,5) YİD-TB olgu olarak tespit edilmiştir (21).

Yazıcı ve ark. Akdeniz Üniversitesi'nde 974 MTBC izolatının 68'inin (%7) ÇİD-TB olduğunu bildirilmiştir (150). Yılmaz ve ark. Erzurum'da 419 MTBC suşunu değerlendirdikleri bir çalışmada ÇİD-TB oranını %3,6 olarak bulmuşlar ve sonuçlarını Türkiye ortlaması içinde değerlendirmişlerdir. Ancak aynı çalışmada buldukları bu oranın aynı bölgede yapılan bir başka çalışmaya göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir (151). Çalışmamızda 854 MTBC izolatını değerlendirdik ve 24 (%2,8) RR-TB vakasının 14'ünün (%1,6) ÇİD-TB olduğu görüldü. Dünya ve ülkemizdeki oranlara göre laboratuvarımızdaki ÇİD-TB tanısı konma oranının daha düşük olduğu belirlendi.

Tüberküloz genel olarak erkeklerde daha sık görülen bir hastalıktır (19). Ancak RR-TB ve ÇİD-TB'nin gelişmesinin cinsiyetler arasında anlamlı farkı olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur. McQuaid ve ark. yaptığı bir çalışmada 106 ülkede ÇİD-TB ve RR-TB geliştirmesi açısından kadın erkek arasındaki farka bakmışlardır. Adı geçen çalışmada ülkelerin %81'inde her iki cinsiyetin de ÇİD/RR-TB riski altında olduğuna dair bir kanıt olmadığı ve E/K risk oranı 1,04 olduğunu göstermişler. Erkeklerde TB gelişme sıklığı daha fazla olmasına rağmen ÇİD-TB gelişme sıklığı kadın ve erkekte benzer olduğu görülmüştür (152). Münir ve ark. 91 ÇİD-TB'li hastayı dahil ettikleri çalışmalarında, 65 hastanın erkek ve 26 hastanın kadın, %47,25'nin 11-25 yaş arasında olduğunu göstermişler (153). Soeroto ve ark. ÇİD prevalansının yüksek olduğu Endonezya'da yaptıkları çalışmada 492 vakayı incelemişler ve <45 yaşta ÇİD-TB'nin daha sık görüldüğünü tespit etmişlerdir (154). Liu ve ark. Çin'de 139 ÇİD-TB vakasını demografik olarak incelemişler ve 99'unu (%71,4) erkek, 40'ını (%28,6) kadın hasta ve ortalama yaşı 51 (35,8–60,0) olarak göstermişler. Aynı çalışmada ÇİD-TB örneklerinin yayma incelemesinde 138'inin (%99,2) EZN pozitif, birinin (%0,7) negatif olduğunu göstermişler (155).

Çalışmaya dahil ettiğimiz 21 RR-TB suşunun izole edildikleri hastaların yedisi (%33,3) kadın ve 14'ü (%66,7) erkek olup yaş ortalaması $45,0 \pm 17,1$ yıl şeklindedir. RR-TB olarak izole edilen 21 örneğin 12'sinde (%57,1) EZN pozitifliği saptanırken, dokuzunda (%42,9) EZN boyama sonucu negatif olarak belirlendi. Araştırmamızda saptadığımız 12 ÇİD-TB suşunun dördü (%33,3) kadın, sekizi (%66,7) erkek, ortalama yaş 43 olarak bulunmuştur. ÇİD-TB'nin izole edildiği örneklerin dokuzu (%75) EZN pozitif, üçü (%25) EZN negatif olarak belirlendi. Saptadığımız verilerle literatür kıyaslaması yaptığımızda ÇİD-TB görülme yaşının benzer olduğu görülmüştür. Ancak bulgularımız ÇİD-TB vakalarının erkeklerde daha sık izole edildiği göstermiştir. Araştırmamızda EZN pozitifliğinin literatür tarama sonuçlarına göre düşük seviyede olması, mikroskopik değerlendirmenin bireysel sonucu olarak kabul edilmiştir.

Streptomisin, TB tedavisinde kullanılan ilk antibiyotiktir ve aynı zamanda *M. tuberculosis* tarafından ilk direnç geliştirilen antitüberküloz ilaçtır. Streptomisinin halen TB tedavisinde daha az kullanılmasına rağmen, SM'ye dirençli suşlar, dünya çapında farklı *M. tuberculosis* soyları arasında hala yaygın ve Avrupa dahil olmak üzere dünyanın farklı yerlerinde sık olarak görülmektedir (156). SM direncinin ÇİD/YİD-TB gelişimine olası katkısını vurgulayan bir dizi çalışma ile yüksek ÇİD ve YİD-TB yükü olan ortamlarda daha sık ortaya çıktığı gösterilmiştir. Tüm genom temelli bir çalışma, SM direncini TB'de ÇİD'in öncülerinden biri olarak göstermiştir (156). İslam ve ark. Güney Çin'de yaptıkları bir çalışmada ÇİD-TB izolatlarının %68,3'ünün SM'ye dirençli olduğunu göstermişlerdir (157). Al Mutairi ve ark. yaptıkları bir çalışmada 60 ÇİD-TB suşunun 40'ını (%66,7) SM'ye dirençli 20'sinin (%33,3) duyarlı olduğunu göstermiştir (158).

Yapılan bazı çalışmalarda rpoB'deki ile 1106Thr polimorfizminin ve rpoA'daki çeşitli polimorfizmin SM direnci ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde rpoB ve rpoA'daki amino asit değişiklikleri ayrıca RIF direncinin gelişmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (159). Bu mutasyonların hem SM hem de RIF direncinde etkili olabilmesi ÇİD-TB izolatları arasındaki yüksek SM direnci sıklığını açıklayabilir (160). Yaptığımız çalışmada 21 RR-TB izolatında dokuzu (%42,9) SM dirençli, 12'si (%57) SM duyarlı idi. rpoB gen paterni pozitif olan yedi RR-TB suşunun ikisinde (%28,5) SM direnci mevcut olup bu suşların ikisi de ÇİD-TB idi. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile literatüre kıyasla SM direnç oranının daha az olduğunu fakat yine de ÇİD-TB ve RR-TB'lerde SM direncinin yüksek olduğu görülmüştür.

Etambutol, birinci basamak antitüberküloz tedavi rejiminin önemli bir bileşenidir. Ayrıca mycobacterium izolatlarına karşı duyarlılığı gösterildiği durumlarda ÇİD-TB tedavisi için ikinci basamak tedavi rejimlerine dahil edilmesi gereken önemli bir ilaçtır. Bununla birlikte özellikle ÇİD-TB'de EMB direnci varlığı endişe verici derecede yüksektir. Çin'de yapılan bir çalışmada daha önce tedavi edilen vakalarda EMB direnç oranı %17,2'ye kadar çıktığı ve artış eğiliminde olduğu ve ÇİD-TB vakalarının %51,3-%66,7'sinin EMB'ye dirençli olduğu gösterilmiştir (161).

Münir ve ark. Pakistan'da 91 ÇİD-TB izolatında yaptığı çalışmada EMB direncini 54 hasta da göstermişlerdir (153). Rahman ve ark. Bangladeş'te ÇİD-TB'de EMB direncini araştırdıkları çalışmalarında %80'inin fenotipik olarak EMB'ye dirençli bulmuşlardır (162). Yaptığımız literatür taramasında ülkemizde ÇİD-TB kökenlerinde EMB direncini araştıran çalışmaların varlığına rastlanmamıştır. Bu yönüyle bulgularımızın literatüre katkısı anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz fenotipik olarak dirençli 12 ÇİD-TB suşunun üçü (%25) EMB dirençli bulundu. Bu kökenlerden rpoB direnç geni paterni gösteren yedi izolatın ise bir tanesinde EMB direnci saptandı ve bu bir izolat aynı zamanda ÇİD-TB idi. ÇİD-TB kökenlerindeki EMB direnci arasındaki ilişkiye baktığımızda çalışmamızda EMB direnci literatüre göre daha düşük oranda bulunmuştur.

INH'ye dirençli TB vakalarının oranı küresel olarak artmaktadır ve bu durum TB tedavisinde önemli bir engel teşkil etmektedir. INH direncinin mekanizmasının çok karmaşık olduğu ve nispeten çok sayıda gende mutasyonlar içerdiği bilinmektedir. Bütün genler arasında katG genindeki mutasyonlar, INH direncine aracılık etmede çok belirgin bir rol oynar (111). En yaygın görülen S315T direnç paterninin, INH'ye orta veya yüksek düzeylerde direnç ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (113). Bu mutasyon ile ÇİD-TB ve YİD-TB'nin iletim dinamikleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu daha önce rapor edilmiştir (114). INH direnci üzerine yakın zamanda yapılan sistemik bir incelemede tüm INH direncinin sırasıyla %64'ünün katG 315 ve % 19'unun inhA-15 mutasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (115).

Şimdiye kadar duyarlılık testlerini araştıran çalışmalar, her durumda fenotipik ve genotipik testler arasında tam bir uyum göstermemiştir. Hazbon ve ark. geniş bir popülasyonda yaptıkları bir çalışmada fenotipik olarak INH dirençli izolatların yaklaşık % 34'ünde herhangi bir genotipik direncin olmadığını bildirmiştir (163). Javed ve ark. Pakistan'da 53 ÇİD-TB izolatında yaptığı çalışmada Genotype MTBDR plus yöntemi ile 38 (%71,7) izolatta INH'ye direnç tespit etmişler. Bunlardan biri hariç hepsinde (37/53; %69,8) katG geninde S315T (MUT1) gen paterni saptamış olup, bunların 21'inde (%39,6) WT bandı silinmesi ek olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada dört (%7,5) izolat inhA promotöründe mutasyona sahip olup bunların üçünde (%5,6) C-15T (MUT1-WT), birinde (%1,9) C-15T ve T-8C (MUT1-MUT3A) olmak üzere iki patern tespit edilmiştir (164). Sağlık ve ark. yaptıkları bir çalışmada 84 MTBC izolatın 14 (%16,6)'ünde INH direnci saptamışlardır. Fenotipik olarak dirençli bu izolatların sekizinde (%57,1) Genotype MTBDR plus testi ile de genotipik olarak direnç tespit etmişlerdir. Genotipik olarak INH'ye dirençli izolatların tümü katG MUT1 mutasyonuna ve WT bant silinmesiyle oluşan S315T1 gen paternine sahip olduğu bildirmişlerdir (165).

Çalışmamızda fenotipik olarak rifampisin direnci saptanan 19 MTBC suşuna, Genotype MTBDR plus yöntemi ile RIF ve INH'a karşı genotipik direnç varlığı araştırıldı. Bunların 12'si fenotipik olarak ÇİD-TB olarak tespit edildi ancak iki kökenin direnç durumu yorumlama kriterlerine uymadığından bu test ile değerlendirilemedi. Fenotipik olarak çoklu ilaç direnci saptanan 10 suşun INH direncini incelediğimizde 6'sında (%60) genotipik olarak da INH direnci görüldü. Bunların dördü (%40) katG WT bantında silinme ve katG MUT1 gen mutasyonu gösteren S315T1 gen paternine sahipti. İzolatlardan kalan ikisinde (%20) inhA-MUT3B gen mutasyonuna sahip T8-A gen paterni saptandı. Fenotipik olarak INH direnci olmayan bir suşta genotipik olarak katG gen bölgesinde INH direnci saptandı. Araştırmamızda ÇİD-TB suşlarındaki hem fenotipik hemde genotipik INH direncinin oranları ve genotipik direncin çoğunlukla S315T1 paterni olarak görülmesi literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda bir suşta fenotipik olarak direnç olmamasına rağmen genotipik olarak direnç paterni gözlenmesi iki test arasındaki uyumsuzluğu göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca bu durum sessiz mutasyon olabileceğini düşündürmektedir.

Rifampisin önemli bir birinci basamak anti tüberküloz ilacıdır. Rifapentin , rifabutin, rifalazil ve rifasinna gibi birkaç RIF analogu veya türevi keşfedilmiş olmasına rağmen RIF hala TB tedavisinde en yaygın olarak kullanılan rifamisin türüdür. RIF direnci tedavi rejimini belirlemede ve TB'nin prognozunun seyrinde önemli bir faktördür. Bu nedenle rifampisin direnç mekanizmalarına daha fazla dikkat edilmektedir (96). Bununla birlikte, uzun süreli RIF tedavisi ile RR-TB gelişmesi, TB kontrolünde önemli bir sorun haline gelmiştir. Rifampisin direnci; TB tedavi başarısızlığı, uzun süreli tedavi ve yeniden tedavi oranlarında artış gibi ciddi olumsuz sonuçlara neden olabilir.

M. tuberculosis'de RIF ilaç direncini saptamak için başlıca iki tip yöntem vardır. Biri kültüre dayalı fenotipik İDT, diğeri ise ilaç direncine bağlı mutasyonların saptanmasına dayalı genotipik İDT'dir. RIF direnci ile ilgili mutasyonlar çoğunlukla rpoB geninin rifampisin direncini belirleyen bölgesinde (RRDR) yer alır. Bu da RIF'in genotipik bazlı ilaç duyarlılık testlerini uygulamada diğer ilaçlara göre daha avantajlı hale getirir. Rifampisine karşı dirençten sorumlu olan en yaygın mutasyonlar rpoB geninin 516, 526 ve 531. kodonlarındaki mutasyonlardır.

GeneXpert MTB/RIF ve Genotype MTBDR plus DSÖ tarafından hızlı genotipik RIF duyarlılık testleri olarak onaylanmış testlerdir (96). Bu testlerle RIF direncine neden olan ilgili gen bölgesi hızlı bir şekilde saptanabilmektedir. Ancak fenotipik ilaç direnci her zaman genotipik mutasyon olduğunu göstermeyebilir. Bazen de genotipik olarak direnç var olup fenotipik olarak direnç oluşmamış olabilir.

Dünyada yapılan çalışmalara baktığımızda Campbell ve ark.'nın 2011 yılında 314 klinik örnek ile yaptıkları çok merkezli araştırmada fenotipik olarak RIF dirençli olduğu bilinen 174 suşun %97'sinde ve fenotipik olarak RIF duyarlı olduğu bilinen 140 suşun ise %6,5'inde rpoB gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır. Saptanan mutasyonlar RRDR bölgesi olarak tanımlanan 507-533. kodonlar arasında bulunmuştur (166).

Javed ve ark. Pakistan'da ÇİD-TB'li toplam 53 kökende yaptıkları çalışmada Genotype MTBDR plus testi ile 42 (%79,2) izolatın genotipik olarak RIF dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Bunların içinde en yaygın mutasyon, 34 (%64,1) izolatta rpoMUT3 mutasyonu ile birlikte görülen S531L paterni olarak saptanmış. Bu 34 izolatın 32'sinde (%60,3) WT8 bandında silinme, bir (%1,8) tanesinde WT3/WT4 bantlarında silinme ve bir (%1,8) tanesinde de tüm WT bantlarında silinme olmuş. Diğer izolatlardan beşinde (%9,4) WT3/WT4 bandı silinmesi ile rpoMUT1 mutasyonu görülmüş. İki (%3,7) izolatta WT7 bandında silinme bulunmuş. Bir (%1,8) izolat ise WT5/WT6 bandında silinme ile farklı mutasyon paternleri tespit edilmiş (164).

Sağlam ve ark. Uludağ Üniversitesi'nde yaptığı bir çalışmada fenotipik olarak RIF dirençli toplam 13 suşun 11'inde (%84,6) rpoB geninde mutasyon saptamışlar (167). Öztürk ve ark. yaptığı çalışmada ise RIF dirençli bulunan dört izolatın sadece birinde rpoB gen bölgesinde direnç göstermişler (168). Benzer şekilde Münir ve ark. yaptıkları çalışmada ÇİD-TB'lerde RIF için en yüksek mutasyon rpoB geni bölgesinde 531. kodonda bulunduğunu tespit etmişlerdir (153). Sağlık ve ark. yaptığı çalışmada RIF dirençli yedi izolatın altısı (%85,7) Genotype MTBDR plus ile genotipik olarak dirençli bulmuşlar. Bunlardan üçünün rpoB gen bölgesinde WT5 bantında silinme ve bu üç taneden ikisinin ise hem WT5 bant silinmesi hemde rpoB MUT3 mutasyonu ile S531L gen paternine sahip olduğunu, diğer üç izolatta ise rpoB WT2 bant silinmesi varlığını bildirmişlerdir (165).

Çalışmamızda fenotipik olarak RIF'e dirençli 19 izolatin yedisi (%36,8) Genotype MTBDR plus testi ile de RIF'e genotipik olarak dirençli saptanmıştır. Genotipik olarak RIF direnci belirlenen bu yedi izolatin altısında (%85,7) WT8bant bölgesinde silinme belirlenmiştir. Bunların da dördünde (%57,1) rpoB MUT3 gen bölgesinde mutasyon görülmüş olup, bu durum 530-533. kodondaki S531L gen paternine sahip olduğu bulunmuştur. Bir (%14,2) izolatta WT8 ile birlikte WT6 bandında silinme gözlenmiştir. Genotipik olarak RIF direnci belirlenen yedi izolatin birinde (%14,2) ise W7 bandında silinme ile birlikte rpoB MUT2A gen bölgesinde mutasyon gözlenmiş olup 526-529. kodondaki H526Y gen paternine sahiptir. Ülkemizde ve dünyada yapılan çeşitli çalışmalarla kıyasladığımızda çalışmamızda saptadığımız RIF direnci genotipik olarak daha düşük bulunmuştur. Bulduğumuz direncin en sık S531L bölgesinde saptanması literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızdaki fenotipik olarak 10 ÇİD-TB izolatinın beşinde (%50) genotipik olarak da RIF direnci gözlenmiştir. Fenotipik olarak izole RR-TB'lerde dokuz izolatin ikisinde (%22,2) ise genotipik direnç görülmüştür. Bu durum ÇİD-TB izolatlarıdaki genotipik RIF direncinin, izole RR-TB'ye kıyasla daha çok gen mutasyonuna bağlı olarak gelişebileceğini düşündürmüştür.

İlaça dirençli TB'yi etkin bir şekilde kontrol etmek ve tedavi etmek için ilaç direnci mekanizmasının araştırılması, hızlı ve etkili tespit yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Bu amaçla özellikle olarak gen bölgesini tespit edecek moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Halen GeneXpert MTB/RIF ve Genotype MTBDR plus DSÖ tarafından hızlı genotipik RIF duyarlılık testleri olarak onaylanmıştır (169,170). Yapılan bir meta-analizde RR-TB tespiti için bu yöntemlerin duyarlılığının ve özgüllüğünün %90'ın üzerinde olduğunu gösterilmiştir (171,172). Bu yöntemlerin en büyük avantajı, *M. tuberculosis* patojenlerini ve RIF duyarlılığını aynı anda ve saatler içinde tespit ederek zamandan tasarruf sağlamasıdır. Dirence yol açan RRDR mekanizması dışında hücre duvarı sentezinde yer alan birçok gen ve protein, RIF dışı akış pompası geninin RIF direnci ile ilişkili bulunmuştur. Bahsedilen bu yöntemlerin en büyük dezavantajı ise RRDR dışında kalan farklı mekanizmalarla oluşan RIF direncini tespit edemeyecek olmasıdır.

Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan Genotype MTBDR plus testi ile ÇİD-TB suşlarında RIF ve INH direnci araştırılmaktadır. Genotype MTBDR plus testi, MTBC'nin RIF ve INH direncine sebep olan rpoB'nin 81-bp sıcak nokta bölgesindeki, katG geninin kodon 315'indeki ve inhA promotör bölgesindeki mutasyonları tespit etmektedir (173). Yapılan bir çalışmada mikroskopisi pozitif 536 balgam örneği üzerinde RIF ve INH direncini araştırmada Genotype MTBDR plus kitinin performansı geleneksel duyarlılık test yöntemleriyle karşılaştırılmış, MTBDR plus ile örneklerin %97'sinde 1-2 günde yorumlanabilir sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (174). Aynı çalışmada; Genotype MTBDR plus testinin RIF ve INH dirençli suşları saptamadaki duyarlılığını sırasıyla %98,9 ve %94,2; özgüllüğünü ise %99,4 ve %99,7 olarak bulunmuştur. Çok ilaca dirençli suşlar da ise %98,8 duyarlılık ve %100 özgüllükle saptanabilmiştir. Yöntemin mikroskopisi pozitif olan klinik örneklerde kullanılabilirliği ile ilgili bir değerlendirmede de; INH dirençli olanların %84,2'si ve RIF dirençli olanların %96,2'sinde dirence yol açan mutasyonlar doğru olarak saptanabilmiştir (175). Genotype MTBDR testi ile yapılan başka bir çalışmada; kültürde üretilmiş *M. tuberculosis* suşlarındaki RIF ve INH direncine yol açan mutasyonları saptamada yöntemin duyarlılığı sırasıyla %99 ve %84 olarak bulunmuş, bu sonuçların dizi analizi ile %100 uyum gösterdiği belirtilmiştir.

Hilleman ve ark. yaptıkları çalışmada, 125 suшта Genotype MTBDR plus testi ile altın standart olarak bilinen geleneksel testleri karşılaştırmışlar ve Genotype MTBDR plus duyarlılığını RIF için %97,8, INH için %92 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada her iki testin özgüllüğünü INH için %100 olarak bildirmişlerdir. (176). Lacoma ve ark. Bactec 460 sistemiyle Genotype MTBDR plus yöntemini karşılaştırmış, INH ve RIF duyarlılığı sırasıyla %73 ve %91,7 olarak belirlemiş ve INH'deki yanlış negatifliğin, çeşitli izolatlarda direncin katG bölgesi dışında bir bölgeden kaynaklanabileceği bildirmişlerdir (177).

Yaygın ilaca dirençli MTBC suşları için geleneksel İDT, kültür ve birinci basamak ilaç testi ile başlayan ve çoklu ilaç direnci durumunda daha fazla ilaç testine ilerleyen iki aşamalı bir prosedür sırayla gerçekleştirilir. İkinci basamak anti-TB ilaç direncini saptamak için piyasada bulunan tek moleküler test olan Genotype MTBDR sl'yi değerlendirmek amacıyla yapılan sistematik bir incelemede, FQ'lara, amikasin ve kapreomisine ilaç direncini saptamada iyi bir doğruluğa sahip olduğu ancak zayıf duyarlılık nedeniyle kanamisin ve etambutol için uygun bir seçim olmadığı gösterilmiştir (178).

Ejo ve ark. yaptıkları çalışmada Genotype MTBDR sl yöntemi ile 413 ÇİD-TB hastasının 389'u (%94,2) FQ'ya duyarlı, yedisi (%1,7) FQ'ya dirençli bulunmuş ve 17'si (%4,1) değerlendirilememiştir. İkinci basamak enjekte edilebilir anti tüberküloz ilaçlar için 372'si (%90,1) duyarlı, beşi (%1,2) dirençli bulunmuş ve 36'sı (%8,7) değerlendirilememiştir (179). Ülkemizde YİD-TB aranması için yapılan bir çalışmada 44 ÇİD-TB suşunda ikisinin (% 4,5) yalnız siprofloksasine, birinin (%2,3) de yalnız amikasin dirençli olduğu bulunmuştur (180).

Çalışmamızda fenotipik olarak 10 ÇİD-TB suşunun dokuzu Genotype MTBDR sl testi ile ikinci nesil antitüberküloz ilaçlara duyarlı bulunmuştur. Bir köken ise bu testin yorumlama kriterlerine uymadığı için değerlendirilememiştir. Ülkemizde YİD-TB oranının düşük olduğunu (21) göz önüne aldığımızda sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ancak farklı ülkelerden yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda ise belirlediğimiz YİD-TB oranı daha düşük saptanmıştır. Bu durumun ülkemizdeki tüberküloz takip sisteminin daha verimli olduğunu düşündürmüştür.

MTBC genetik olarak oldukça homojen bir gruptan oluşur. Bu grupta insanlarda en sık tüberküloz yapan tür *M. tuberculosis subsp. tuberculosis* ve ikinci sırada ise *M. bovis subsp. bovis* ile birlikte *M. bovis subsp. caprae*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti* olduğu bilinmektedir (181). Tüberküloza neden olan MTBC soylarının ve alt soylarının dağılımı ve sıklığı dünyanın farklı yerlerinde değişiklik gösterir. Diğer MTBC üyelerinden *M. bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)*, çoğunlukla bağışıklığı baskılanmış bireylerde lokal veya yayılmış enfeksiyona neden olabilen ve canlı zayıflatılmış aşılar da kullanılabilen bir kökendir. Shannon ve ark. Hindistan'da 2018-2020 yılları arasında 19 şüpheli izolat üzerinde yaptıkları multipleks PCR çalışması sonucu bu izolatların 10'unu *M. bovis* BCG, dokuzunu diğer MTBC üyeleri olarak tanımlamışlardır (182). *M. canettii*, Afrika boynuzu ile temasları olduğu bildirilen düzinelerce tüberküloz hastasında spesifik olarak teşhis edilen MTBC'nin tuhaf bir üyesidir (183). İnsanların *M. africanum* ile enfeksiyonu çok nadirdir. *M. africanum* Batı Afrika'ya özgüdür ve soyu *M. tuberculosis*'e göre filogenetik olarak daha eski kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2004-2013 yılları arasında genotipik tanımlama yapılan 73.290 TB vakasının 315'ine (%0,4) *M. africanum* neden olmuştur (184). *M. microti* ile enfeksiyonlar insanlarda, evcil ve serbest dolaşan vahşi hayvanlarda giderek daha fazla rapor edilmektedir. Ghielmetti ve ark. Batı Avusturya ve Güney Almanya'dan serbest dolaşan kızıl geyiklerde üç *M. microti* enfeksiyonu vakası bildirilmiştir (185). *M. caprae*, insan ve hayvanlarda tüberküloza neden olur ve insan TB vakalarında çok düşük bir oranda (%0,3) görüldüğü bildirilmektedir. *M. caprae*, *M. bovis* ile epidemiyolojik olarak benzer özellikleri taşır ancak evrimsel olarak daha eski olmakla birlikte zoonotik TB'nin daha küçük bir yükünü oluşturur ve esas olarak Avrupa ülkeleriyle sınırlıdır (186).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 19 MTBC izolatının, Genotype MTBC testi ile kökenleri incelenmiş ve bunların tamamı *M. tuberculosis* olarak saptanmıştır. Araştırmalar incelendiğinde *M. tuberculosis* dışı MTBC üyelerinin insanda az görülüyor olması, dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde ve hayvanlarda özellikle olarak görülüyor olması, sonucumuzun ülkemiz ve bölgemiz ile uyumlu olduğunu düşündürmüştür. Klinik olarak, TB'ye neden olan ajanının erken tanımlanması önemlidir çünkü intrinsik direnç için bir belirteç olarak fayda sağlayabilir veya enfeksiyon kaynağı hakkında klinisyeni yönlendirici olabilir Örneğin, *M. bovis*'te pirazinamide intrinsik direnç genellikle olabilir ve enfeksiyon için kaynak bir insan değildir (187).

GenoType MTBC testi, MTBC üyeleri olan *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae* ve *M. bovis* BCG suşlarını tiplendirmekte kullanılan ters hibridizasyon esasına dayalı moleküler bir yöntemdir. Bu test, tüberküloza neden olan ajanları ayırt etmek için en eski ve muhtemelen en yaygın kullanılan ticari testtir (188). Tüberküloz tanısında Genotype MTBC testi ile geleneksel kültür yöntemlerini karşılaştıran bir çalışmanın sonuçlarına göre, Genotype MTBC'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %95,7, %100, %100 ve %99,1 olarak gösterilmiştir. GenoType MTBC'nin *M. tuberculosis*'in saptanması için kültür yöntemlerine faydalı bir yardımcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (189).

Safianowska ve ark. GenoType MTBC testini değerlendirdikleri bir çalışmada, bu testin *M. tuberculosis* kompleksini kesin olarak tanıdığını, HPLC yöntemine kıyasla GenoType MTBC testinin *M. tuberculosis* türünü belirlemede %100 uyumlu olduğunu ve klinik izolatlarda tüberküloz mikobakterilerin tespitinde HPLC'nin yerini alabileceğini göstermişlerdir (190). Bulgularımız ile MTBC suşlarının tanımlanmasında kullanılan Genotype MTBC testinin literatür ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, Genotype MTBC, Genotype MTBDR plus ve Genotype MTBDR sl testlerinin uygulanması ve yorumlanması kolay ve rutin bir tanısal mikobakteriyoloji laboratuvarının iş akışına kolayca dahil edilebilen hızlı bir yöntem olduğu görülmüştür.

Dünya ve ülkemizdeki oranlara göre ÇİD-TB tanısı konma oranının laboratuvarımızda daha düşük olduğu belirlendi

Saptadığımız verilerle literatür kıyaslaması yaptığımızda ÇİD-TB görülme yaşının benzer olduğu görülmüştür. Ancak bulgularımız ÇİD-TB vakalarının erkeklerde daha sık izole edildiği göstermiştir.

Araştırmamızda EZN pozitifliğinin literatüre göre düşük seviyede olması, mikroskopik değerlendirmenin bireysel sonucu olarak kabul edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile SM direnç oranının literatüre göre daha az olduğunu fakat yine de ÇİD-TB ve RR-TB’lerde SM direncinin yüksek olduğu görülmüştür.

Yaptığımız literatür taramasında ülkemizde ÇİD-TB kökenlerinde EMB direncini araştıran çalışmaların varlığına rastlanmamıştır. Bu yönüyle bulgularımızın literatüre katkısı anlamlı kabul edilmiştir. ÇİD-TB kökenlerindeki EMB direncine baktığımızda, çalışmamızda EMB direnci literatüre göre daha düşük oranda bulunmuştur.

Araştırmamızda ÇİD-TB suşlarındaki hem fenotipik hemde genotipik INH direncinin oranları ve genotipik olarak direnç genlerinin çoğunlukla S315T1 paterniyle uyumlu olması literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda bir suşta fenotipik olarak direnç olmamasına rağmen genotipik olarak direnç paterni gözlenmesi iki test arasındaki uyumsuzluğu göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca bu durum sessiz mutasyon olabileceğini düşündürmektedir.

Ülkemizde ve dünyada yapılan çeşitli çalışmalarla kıyasladığımızda çalışmamızda saptadığımız genotipi olarak RIF direnç oranı daha düşük bulunmuştur. Direncin en sık S531L bölgesinde saptanması literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca ÇİD-TB izolatlardaki genotipik RIF direncinin, izole RR-TB'ye kıyasla daha çok gen mutasyonuna bağlı olarak direnç gelişebileceğini düşündürmüştür.

Ülkemizde YİD-TB oranının düşük olduğunu göz önüne aldığımızda sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ancak farklı ülkelerden yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda ise belirlediğimiz YİD-TB oranı daha düşük saptanmıştır. Bu durumun ülkemizdeki tüberküloz takip sisteminin daha verimli olduğunu düşündürmüştür.

Bulgularımız sonucunda MTBC suşlarının tanımlanmasında kullandığımız Genotype MTBC testinin literatür ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Rothman S. Thomas Dormandy, *The white death: a history of tuberculosis*, London and Rio Grande, Hambledon Press, 1999, pp. xiv, 433, illus., £25.00 (1-85295-169-4). *Med Hist.* 2001 Jan;45(1):140–1.
2. Ziskind B, Halioua B. [Tuberculosis in ancient Egypt]. *Rev Mal Respir.* 2007 Dec;24(10):1277–83.
3. Aceves-Avila FJ, Báez-Molgado S, Medina F, Fraga A. Paleopathology in osseous remains from the 16th century. A survey of rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 1998 Apr;25(4):776–82.
4. Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? *Lancet* (London, England) [Internet]. 1984;2(8410):1015—1016. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91110-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91110-3)
5. Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med.* 1997 Mar;18(1):65–77.
6. Brosch R, Gordon S V, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar;99(6):3684–9.
7. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep;94(18):9869–74.
8. Daniel TM. *Captain of death: the story of tuberculosis*. New York: University of Rochester Press; 1997.
9. Roberts C, Buikstra J. *The Bioarchaeology of Tuberculosis: A Global View On a Reemerging Disease*. 2008 Jan 1;
10. Sakula A. BCG: who were Calmette and Guérin? *Thorax.* 1983 Nov;38(11):806–12.
11. Daniel TM. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union against Tuberc Lung Dis.* 2005 Sep;9(9):944–5.
12. Lissant Cox G. Sanatorium treatment contrasted with home treatment: After-

- histories of 4,067 cases. Br J Tuberc [Internet]. 1923;17(1):27–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0366085023800631>
13. Hjaltested O, Törning K. Clinical aspects of pneumothorax therapy as illustrated by the results obtained in 191 cases of completed treatment. Br J Tuberc [Internet]. 1939;33(1):4–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036608503980028X>
 14. (1859-1923) HMB. behind the frieze. London School of Hygiene & Tropical Medicine.;
 15. CEA W. The life of Hermann M. Biggs. Philadelphia: Lea & Feiberger; 1929.
 16. K. G. Kova su džiova. 1939.
 17. EK. O. Osmanlı İmaratorluğunun son 40 yılında Türkiyenin Tüberkloz Tarihçesi. Cerr Tıp FakDerg. 1879;10:273–84.
 18. Genel Müdürlüğü THS. Türkiye’de Veremle Mücadelenin Tarihi ve Dünden Bugüne Daire Başkanlığımız. 2017.
 19. Organization WH. Global Tuberculosis reports. Geneva: World Health Organization; 2021.; 2021.
 20. World Health Organization. 2020.
 21. Müdürlüğü TSBHS. TÜRKİYE’DE VEREM SAVAŞI 2020 RAPORU. Ankara; 2021.
 22. Robert J. Mason, MD, V.Courtney Broaddus, MD, Thomas R Martin, Talmadge E King, Jr., MD, Dean Schraufnagel, John F. Murray, MD, DSc(Hon), FRCP and Jay A. Nadel, MD, DSc(Hon) DI. Murray and Nadel’s Textbook of Respiratory Medicine , 5th Edition. 2011.
 23. MURRAY, ROSENTHAL P. Tıbbi Mikrobiyoloji. ELSEVIER; 2016. 235 p.
 24. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev. 2006;19(4):658–85.
 25. SCOTT’S B&. Diagnostic Microbiology. 524 p.
 26. Çiftçi F. Tüberküloz, Taksonomi. İstanbul;
 27. Orgeur M, Brosch R. Evolution of virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2018;41:68–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527417300796>

28. TIMPE A, RUNYON EH. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med.* 1954 Aug;44(2):202–9.
29. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Aug;12(8):550–62.
30. Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol.* 2004 Feb;6(2):105–16.
31. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008 Mar;72(1):126–56, table of contents.
32. Becker K, Sander P. Mycobacterium tuberculosis lipoproteins in virulence and immunity - fighting with a double-edged sword. *FEBS Lett.* 2016 Nov;590(21):3800–19.
33. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Nov;5(11):883–91.
34. 21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Samsun; 2003. 414 p.
35. Raffetseder J. Interplay of human macrophages and Mycobacterium tuberculosis phenotypes. 2016.
36. McNeil MR, Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol.* 1991 May;142(4):451–63.
37. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet (London, England).* 2011 Jul;378(9785):57–72.
38. Ly A, Liu J. Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun;21(11).
39. Koneman EW, Allen SD, Janda WM SP. Mycobacteria. In *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 1997. 893–946 p.
40. Schwander SK, Torres M, Sada E, Carranza C, Ramos E, Tary-Lehmann M, et al. Enhanced responses to Mycobacterium tuberculosis antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.*

- 1998 Nov;178(5):1434–45.
41. Ustaçelebi S CA. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. 419–455 p.
 42. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2001 Jul;167(2):910–8.
 43. Sable SB, Plikaytis BB, Shinnick TM. Tuberculosis subunit vaccine development: Impact of physicochemical properties of mycobacterial test antigens. *Vaccine*. 2007;25(9):1553–66.
 44. Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet*. 2008;372(9633):164–75.
 45. Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*. 2012 May;11(5):469–80.
 46. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996 Mar;178(5):1274–82.
 47. Brodin P, Eiglmeier K, Marmiesse M, Billault A, Garnier T, Niemann S, et al. Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect Immun*. 2002 Oct;70(10):5568–78.
 48. Houben D, Demangel C, van Ingen J, Perez J, Baldeón L, Abdallah AM, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol*. 2012 Aug;14(8):1287–98.
 49. Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, Leary JA, Bertozzi CR, Cox JS. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May;100(10):6121–6.
 50. Özbal Y. TÜBERKÜLOZ İMMÜNOLOJİSİ. *Erciyes Tıp Derg (Erciyes Med Journal)* 28 025-034,. 2006;25–32.
 51. H. Ç. *Mycobacterium tuberculosis*’ e ait ESAT-6 VE CFP-10 proteinlerinin ekspresyonu, farklı hasta gruplarında IFN- γ VE IL-10 yanıtlarının saptanması.

İzmir; 2007.

52. Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, et al. Mycobacterium tuberculosis gene expression profiling within the context of protein networks. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):747–57.
53. Escombe AR, Moore DAJ, Gilman RH, Pan W, Navincopa M, Ticona E, et al. The Infectiousness of Tuberculosis Patients Coinfected with HIV. *PLOS Med* [Internet]. 2008;5(9):1. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050188>
54. WHO/HTM/TB/. World Health Organization (WHO). 2008.
55. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jul;12(8):581–91.
56. Lazarevic V, Nolt D, Flynn JL. Long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection is mediated by dynamic immune responses. *J Immunol.* 2005 Jul;175(2):1107–17.
57. Meena LS, Rajni. Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEBS J.* 2010 Jun;277(11):2416–27.
58. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:353–84.
59. Koch A, Mizrahi V. Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol.* 2018 Jun;26(6):555–6.
60. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell.* 2014 Dec;159(7):1497–509.
61. Van Rhijn I, Moody DB. CD1 and mycobacterial lipids activate human T cells. *Immunol Rev.* 2015 Mar;264(1):138–53.
62. McClean CM, Tobin DM. Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathog Dis.* 2016;74(7).
63. Arora P, Foster EL, Porcelli SA. CD1d and natural killer T cells in immunity to Mycobacterium tuberculosis. *New Paradig Immun to Tuberc.* 2013;199–223.
64. Court N, Vasseur V, Vacher R, Frémond C, Shebzukhov Y, Yeremeev V V, et al. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger

- receptors, and C-type lectins for the long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2010 Jun;184(12):7057–70.
65. Bowdish DME, Gordon S. Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function. *Immunol Rev.* 2009 Jan;227(1):19–31.
 66. Bowdish DME, Sakamoto K, Kim M-J, Kroos M, Mukhopadhyay S, Leifer CA, et al. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2009 Jun;5(6):e1000474.
 67. Li J, Chai Q-Y, Liu CH. The ubiquitin system: a critical regulator of innate immunity and pathogen-host interactions. *Cell Mol Immunol.* 2016 Sep;13(5):560–76.
 68. de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Front Pediatr.* 2019;7:350.
 69. Monin L, Griffiths KL, Slight S, Lin Y, Rangel-Moreno J, Khader SA. Immune requirements for protective Th17 recall responses to *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Mucosal Immunol.* 2015 Sep;8(5):1099–109.
 70. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Microbiol Spectr.* 2016 Oct;4(5).
 71. Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding C V, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol.* 2001 Sep;167(5):2734–42.
 72. Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1998 Jun;160(11):5448–54.
 73. Graham F, Hatfull WRJ. *Molecular Genetics of Mycobacteria.* Washington; 2000.
 74. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 Jun;393(6685):537–44.

75. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* 2002 Oct;184(19):5479–90.
76. Arjomandzadegan M, Titov LP, Surkova LK, Farnia P, Sheikholeslami F, Owlia P, et al. Determination of principal genotypic groups among susceptible, MDR and XDR clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Belarus and Iran. *Tuberk Toraks.* 2012;60(2):153–9.
77. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (80-). 1997;277(5331):1453–62.
78. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* (London, England). 1999 Feb;353(9151):444–9.
79. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, et al. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 1998 Mar;338(10):633–9.
80. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1980 Jun;121(6):939–49.
81. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 1993 Apr;328(16):1137–44.
82. Hutton MD, Stead WW, Cauthen GM, Bloch AB, Ewing WM. Nosocomial transmission of tuberculosis associated with a draining abscess. *J Infect Dis.* 1990 Feb;161(2):286–95.
83. Raviglione MC ORJ. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, Tüberküloz. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2014. 1. cilt 1024-1036.
84. . C.Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıkların ihbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi,. Ankara; 2005.

85. T.C.Sağlık Bakanlığı Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. ANKARA; 2011.
86. Aster VKAAJ. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier; 2014.
87. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This stateme. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Apr;161(4 Pt 1):1376–95.
88. TB T of. Centers for Disease Control and Prevention.
89. TB D-R. Centers for Disease Control and Prevention.
90. BERNSTEIN J, LOTT WA, STEINBERG BA, YALE HL. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. Am Rev Tuberc. 1952 Apr;65(4):357–64.
91. Wang P, Pradhan K, Zhong X, Ma X. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. Acta Pharm Sin B. 2016;6(5):384–92.
92. Organization WH, Organization) STBI (World H. Treatment of tuberculosis: guidelines. World Health Organization; 2010.
93. Hegde P, Boshoff HIM, Rusman Y, Aragaw WW, Salomon CE, Dick T, et al. Reinvestigation of the structure-activity relationships of isoniazid. Tuberculosis [Internet]. 2021;129:102100. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979221000500>
94. Bardou F, Raynaud C, Ramos C, Lanéeelle MA, Lanéeelle G. Mechanism of isoniazid uptake in Mycobacterium tuberculosis. Microbiology. 1998 Sep;144 (Pt 9:2539–44.
95. Maggi N, Pasqualucci CR, Ballotta R, Sensi P. Rifampicin: a new orally active rifamycin. Chemotherapy. 1966;11(5):285–92.
96. Xu G, Liu H, Jia X, Wang X, Xu P. Mechanisms and detection methods of Mycobacterium tuberculosis rifampicin resistance: The phenomenon of drug resistance is complex. Tuberculosis [Internet]. 2021;128:102083. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979221000330>
97. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. J Antibiot (Tokyo). 2014;67(9):625–30.
98. Stefan MA, Ugur FS, Garcia GA. Source of the fitness defect in rifamycin-

- resistant *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase and the mechanism of compensation by mutations in the β' subunit. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(6):e00164-18.
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. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc lung Dis*. 2003;7(1):6–21.
 101. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2014 Jul;3(3):317–40.
 102. Chakaya J, Khan M, Ntoumi F, Aklillu E, Fatima R, Mwaba P, et al. Global Tuberculosis Report 2020 – Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. *Int J Infect Dis [Internet]*. 2021; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971221001934>
 103. Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, et al. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016 Oct;63(7):e147–95.
 104. Dorman SE, Nahid P, Kurbatova E V, Phillips PPJ, Bryant K, Dooley KE, et al. Four-Month Rifapentine Regimens with or without Moxifloxacin for Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2021 May;384(18):1705–18.
 105. Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(3):e33275.
 106. Peloquin CA, Davies GR. The Treatment of Tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther*. 2021 Dec;110(6):1455–66.
 107. Silva, P.A., Ainsa JA. İlaç ve İlaç Etkileşimleri, *Tüberküloz 2007*. Eds.: Yüce A, Sürücüoğlu, S., Uzun, M., Özyurt, M., Sar NS, editors. İstanbul: Sim Matbaacılık,; 2009. 415–443 p.
 108. Köksal D. Antitüberküloz İlaçlar, *Tüberküloz, Toraks Kitapları*,. Eds.: Özkara,

- Ş., Kılıçaslan Z, editor. İstanbul: Aves Yayıncılık,; 2010. 425–454 p.
109. Chang K-C, Nuermberger E, Sotgiu G, Leung C-C. New drugs and regimens for tuberculosis. *Respirology*. 2018 Nov;23(11):978–90.
 110. Cattamanchi A, Dantes RB, Metcalfe JZ, Jarlsberg LG, Grinsdale J, Kawamura LM, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with isoniazid-monoresistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2009;48(2):179–85.
 111. Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2016 Nov;45:474–92.
 112. Slayden RA, Barry III CE. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2000;2(6):659–69.
 113. van Soolingen D, de Haas PEW, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis*. 2000;182(6):1788–90.
 114. Ano H, Matsumoto T, Suetake T, Nagai T, Tamura Y, Takamatsu I, et al. Relationship between the isoniazid-resistant mutation *katGS315T* and the prevalence of MDR-/XDR-TB in Osaka, Japan. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(11):1300–5.
 115. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119628.
 116. WHO G. Global tuberculosis report 2020. *Glob Tuberc Rep*. 2020;2020.
 117. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(3):154–60.
 118. Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov V V, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF, et al. Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the β subunit gene of the rifampicin resistant *rpoB* 255 mutant. *Mol Gen Genet MGG*. 1981;184(3):536–8.

119. Unissa AN, Hassan S, Kumari VI, Revathy R, Hanna LE. Insights into RpoB clinical mutants in mediating rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Graph Model*. 2016;67:20–32.
120. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1138–51.
121. Nguyen QH, Contamin L, Nguyen TVA, Bañuls A. Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Evol Appl*. 2018;11(9):1498–511.
122. Hillemann D, Kubica T, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(3):1229–31.
123. Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(6):620–6.
124. Kiraz N. ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ MEKANİZMALARI ve YENİ İLAÇLAR. In Eskişehir: KLİMİK; 2012.
125. Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(11):2484–9.
126. Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol*. 2004 Dec;155(10):830–4.
127. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Apr;40(4):1024–6.
128. Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB, Douthwaite S. Capreomycin binds

- across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. Mol Cell. 2006;23(2):173–82.
129. N. Ö. 21. YÜZYILDA TÜBERKÜLOZ SEMPOZYUMU II. TÜBERKÜLOZ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ KURSU. samsun; 2003.
 130. Gary W. Procop EWK. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2017. 1221 p.
 131. D SN. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. samsun; 2003.
 132. 01.01.2014 T/ M/ B no: U-3 / S 1. . / . Ulusal Mikrobiyoloji Standartları.
 133. Bakanlığı TCS, Başkanlığı THSK. ULUSAL TÜBERKÜLOZ TANI REHBERİ (UTTR). Ankara; 2014.
 134. Gürsev Ç. Tüberküloz Basillerinin İzolasyonunda, İdentifikasyonunda ve Antimikrobiyal Direncin Saptanmasında BACTEC MGIT 960 VE BACTEC 460TB Kültür Sistemlerinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi,. Celal Bayar Üniversitesi; 2011.
 135. Kocagöz T. Tüberküloz. Özkara, Ş., Kılıçaslan Z, editors. 2010.
 136. Edition. AS-S. CLSI, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Pennsylvania; 2011. Vol. 26 No.23;
 137. Becton Dickinson S. BACTEC MGIT 960 System, User's Manuel,,. Maryland, USA; 2004.
 138. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2000 Sep;38(9):3194–9.
 139. Kocagoz T, Saribas Z, Alp A. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2005 Dec;43(12):6015–9.
 140. Kalokhe AS, Shafiq M, Lee JC, Ray SM, Wang YF, Metchock B, et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing. Am J Med Sci. 2013 Feb;345(2):143–8.
 141. Martin, A., Portaels F. Tüberküloz. Yüce E., A., Sürücüoğlu, S., Uzun, M., Özyurt, M., Sar NS, editors. İstanbul,: Sim Matbaacılık,; 2009. 444–461 p.

142. Desikan S, Narayanan S. Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in Mycobacterium tuberculosis. Indian J Med Res. 2015 Jun;141(6):761–74.
143. Richter E, Weizenegger M, Fahr A-M, Rüscher-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 Sep;42(9):4303–6.
144. Hain Lifescience. Geno Tipi MTBC VER 1.X [Internet]. Available from: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtldrplus.html>
145. Lifescience H. Geno Type Mycobacteria MTBC Instructions for Use.
146. Lifescience H. GenoType MTBDR plus [Internet]. Available from: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtldrplus.html>
147. Lifescience H. Geno Type MTBDR plus VER 2.0 Instructions for Use.
148. Gardee Y, Dreyer AW, Koornhof HJ, Omar S V, da Silva P, Bhyat Z, et al. Evaluation of the GenoType MTBDRsl Version 2.0 Assay for Second-Line Drug Resistance Detection of Mycobacterium tuberculosis Isolates in South Africa. J Clin Microbiol. 2017 Mar;55(3):791–800.
149. Lifescience H. Geno Type MTBDR sl VER 2.0 Instructions for Use.
150. Yazısız H, Hırçın Cenger D, Yazısız V, Kılıç L AS. Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarında birinci basamak anti-tüberküloz ilaçlara direnç trendleri: Türkiye’den üçüncü basamak bir hastane çalışması. Tuberk Toraks. 2019;67(92):101.
151. YILMAZ A, AFŞİN D. Investigation of the Sensitivity of Mycobacterium Tuberculosis Strains Isolated from Various Clinical Samples in Eastern Turkey to Major Anti-tuberculosis Drugs. J Contemp Med. 2021 Jan 30;11:92–6.
152. McQuaid CF, Horton KC, Dean AS, Knight GM, White RG. The risk of multidrug- or rifampicin-resistance in males versus females with tuberculosis.

- Eur Respir J. 2020 Sep;56(3).
153. Munir S, Mahmood N, Shahid S, Khan MI. Molecular detection of Isoniazid, Rifampin and Ethambutol resistance to *M. tuberculosis* and *M. bovis* in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients in Pakistan. *Microb Pathog.* 2017 Sep;110:262–74.
 154. Soeroto AY, Pratiwi C, Santoso P, Lestari BW. Factors affecting outcome of longer regimen multidrug-resistant tuberculosis treatment in West Java Indonesia: A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2021;16(2):e0246284.
 155. Liu Q, Lu P, Martinez L, Yang H, Lu W, Ding X, et al. Factors affecting time to sputum culture conversion and treatment outcome of patients with multidrug-resistant tuberculosis in China. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018;18(1):114. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3021-0>
 156. Manson AL, Cohen KA, Abeel T, Desjardins CA, Armstrong DT, Barry CE, et al. Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance. *Nat Genet.* 2017;49(3):395–402.
 157. Islam MM, Tan Y, Hameed HMA, Chhotaray C, Liu Z, Liu Y, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Streptomycin-Resistant Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Southern China. *Microb Drug Resist.* 2020 Jul;26(7):766–75.
 158. Al-Mutairi NM, Ahmad S, Mokaddas E. Molecular Screening Versus Phenotypic Susceptibility Testing of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates for Streptomycin and Ethambutol. *Microb Drug Resist.* 2018 Sep;24(7):923–31.
 159. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(1):13–21.
 160. Rocha DMGC, Viveiros M, Saraiva M, Osório NS. The Neglected Contribution of Streptomycin to the Tuberculosis Drug Resistance Problem. Vol. 12, *Genes* . 2021.
 161. Wang T, Jiao W, Shen A. Progress on mechanism of ethambutol resistance in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Yi chuan = Hered.* 2016 Oct;38(10):910–7.
 162. Rahman SMM, Nasrin R, Rahman A, Ahmed S, Khatun R, Uddin MKM, et

- al. Performance of GenoType MTBDRsl assay for detection of second-line drugs and ethambutol resistance directly from sputum specimens of MDR-TB patients in Bangladesh. *PLoS One*. 2021;16(12):e0261329.
163. Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Aug;50(8):2640–9.
164. Javed H, Bakula Z, Pleń M, Hashmi HJ, Tahir Z, Jamil N, et al. Evaluation of Genotype MTBDRplus and MTBDRsl Assays for Rapid Detection of Drug Resistance in Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Pakistan. *Front Microbiol*. 2018;9:2265.
165. Saglik I, Oz Y, Kiraz N. Evaluation of the GenoType MTBDR assay for detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2014;32(3):318–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255085721004424>
166. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):2032–41.
167. SAĞLAM DS. *Mycobacterium tuberculosis* SUŞLARINDA ANTI-TÜBERKÜLO İLAÇLARA DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI. Uludağ Üniversitesi;
168. ÖZTÜRK1 T, , Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN2 ESÇ. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİ KLİNİK İZOLATLARINDA İZONİAZİD VE RİFAMPİSİN DİRENCİNİN HIZLI TANISI İÇİN ‘REVERSE BLOT HYBRIDIZATION ASSAY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE’ YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI. *SDÜ Tıp Fak Derg*. 2019;26(4):444–51.
169. Organization WH. Rapid Communication: Molecular assays as initial tests for the diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance. Cenevre, İsviçre; 2020.

170. Organization WH. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin. 2020.
171. Bai Y, Wang Y, Shao C, Hao Y, Jin Y. GenoType MTBDR plus Assay for rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150321.
172. Zong K, Luo C, Zhou H, Jiang Y, Li S. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of rifampicin resistance in different regions: a meta-analysis. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):1–21.
173. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):3699–703.
174. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Apr;177(7):787–92.
175. Palomino J, Ritacco VRV. *Tuberculosis 2007; from basic science to patient care*. 2007. 635–87 p.
176. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2635–40.
177. Lacoma A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Rosés S, et al. GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3660–7.
178. Feng Y, Liu S, Wang Q, Wang L, Tang S, Wang J, et al. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using genotype MTBDRsl assay: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(2):e55292.
179. Ejo M, Van Deun A, Nunn A, Meredith S, Ahmed S, Dalai D, et al. Effectiveness of GenoType MTBDRsl in excluding TB drug resistance in a

- clinical trial. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union against Tuberc Lung Dis*. 2021 Oct;25(10):839–45.
180. Yarar E. ÇUKUROVA BÖLGESİNDE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MYCOBACTERIUM tuberculosis KOMPLEKS (MTBK) SUŞLARINDA ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ (ÇİD) İLE BERABER İKİNCİ SEÇENEK ANTİ-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DA KARŞI GELİŞEN YAYGIN İLAÇ DİRENCİNİN (YİD) FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLA. Çukurova Üniversitesi; 2014.
181. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Int Des Epizoot*. 2001;20(1):21–54.
182. Duffy SC, Venkatesan M, Chothe S, Poojary I, Verghese VP, Kapur V, et al. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Mycobacterium bovis BCG and Validation in a Clinical Laboratory. *Microbiol Spectr*. 2021 Oct;9(2):e0109821.
183. Aboubaker Osman D, Bouzid F, Canaan S, Drancourt M. Smooth Tubercle Bacilli: Neglected Opportunistic Tropical Pathogens. *Front public Heal*. 2015;3:283.
184. Sharma A, Bloss E, Heilig CM, Click ES. Tuberculosis Caused by Mycobacterium africanum, United States, 2004-2013. *Emerg Infect Dis*. 2016 Mar;22(3):396–403.
185. Ghielmetti G, Kupca AM, Hanczaruk M, Friedel U, Weinberger H, Revilla-Fernández S, et al. Mycobacterium microti Infections in Free-Ranging Red Deer (Cervus elaphus). *Emerg Infect Dis*. 2021 Aug;27(8):2025–32.
186. Prodinger WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E. Mycobacterium caprae infection in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Dec;12(12):1501–13.
187. Köser CU, Feuerriegel S, Summers DK, Archer JAC, Niemann S. Importance of the genetic diversity within the Mycobacterium tuberculosis complex for the development of novel antibiotics and diagnostic tests of drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6080–7.
188. Loiseau C, Brites D, Moser I, Coll F, Pourcel C, Robbe-Austerman S, et al.

- Revised Interpretation of the Hain Lifescience GenoType MTBC To Differentiate *Mycobacterium canettii* and Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jun;63(6).
189. Kurtoglu MG, Ozdemir M, Kesli R, Baysal B. Comparison of the GenoType(®) MTBC Molecular Genetic Assay with culture methods in the diagnosis of tuberculosis. *Arch Med Sci [Internet]*. 2012/06/28. 2014 May 12;10(2):315–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24904667>
190. Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P, Chazan R, Grubek-Jaworska H. [Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifesciences, Germany) for identification of tuberculous mycobacteria]. *Pneumonol Alergol Pol*. 2009;77(6):517–20.