

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HASTANESİNDE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNDE
İZONİAZİD VE RİFAMPİSİN DİRENCİNİN YENİ BİR
REVERSE BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ (REBA MTB-
MDR) İLE HIZLI TANISININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Tuba ÖZTÜRK

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 3425-TU1-13 Proje numarası ile desteklenmiştir

ISPARTA-2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimini benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN başta olmak üzere Prof. Dr. Selçuk KAYA, Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN, Yrd. Doç. Dr. Süleyman ÖNAL ve Yrd. Doç. Dr. Ayşe AYNALI hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim sürecinde iyi kötü pek çok şey paylaştığımız birlikte çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve laboratuvarımızda çalışan tüm görevli diğer arkadaşlarıma,

Doktora projemi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Her zaman yanımda olan canım aileme, yoğun çalışma sürecimde her türlü yardım ve desteğini büyük bir sabırla benden esirgemeyen hayat arkadaşım, sevgili eşim Sefa Alperen'e ve biricik oğlumuz Sungur Alp'e

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuba ÖZTÜRK

Isparta-2014

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Mikobakterilerinin Genel Özellikleri	4
2.3. İmmünopatogenez	6
2.4. Dünyada İlaç Direnci.....	8
2.5. Türkiye’de İlaç Direnci	8
2.6. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	9
2.6.1. İlaç Direnci	9
2.6.2. İlaç Direnciyle İlgili Tanımlar	10
2.6.3. İzoniazid Direnci	11
2.6.4. Rifampin Direnci	12
2.6.5. Pirazinamid Direnci	13
2.6.6. Streptomisin Direnci	13
2.6.7. Etambutol Direnci.....	13
2.7. Duyarlılık Testleri	13
2.7.1. Genotipik Yöntemler	16
3. MATERYAL ve METOD	18
3.1. Örneklerin İşlenmesi	18
3.1.1. Homojenizasyon – Dekontaminasyon - Konsantrasyon işlemi	18
3.2. Direkt Mikroskopik İnceleme	19
3.2.1. Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) Yöntemi	19
3.3. Kültür (İzolasyon)	20
3.3.1. Lövenstein-Jensen Besiyerinde Kültür İşlemi	20
3.3.2. BACTEC MGIT 960 Sisteminde Kültür İşlemi	20
3.3.3. TBc ID Testi	21

3.4. BACTEC MGIT 960 Sistemi İle Duyarlılık Testi	22
3.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi	23
3.4.2. Katı Besiyerinden İnokulum Hazırlanması	23
3.5. İlaç Direncinin Moleküler Yöntemle Saptanması	23
3.5.1. DNA İzolasyonu	25
3.5.2. PCR Amplifikasyonu	26
3.5.3. Reverse Blot Hibridizasyon Yöntemi	26
3.5.4. Sonuç Değerlendirme	27
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	29
4. BULGULAR	30
4.1. Suşların Genel Özellikleri	30
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	33
5. TARTIŞMA	38
ÖZET.....	50
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR

A	: Adenin
AIDS	: Kazanılmış İmmun Yetmezlik Sendromu
AİD-TB	: Artmış ilaca dirençli tüberküloz
ARB	: Aside dirençli basil
AST	: Antibiyotik duyarlılık testi
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
bp	: Baz Çifti
CD	: Yüzey Farklılaşma antijeni
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CI	: Confidence Interval
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD-TB	: Çok ilaca dirençli tüberküloz
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ETB	: Etambutol
EZN	: Erlich-Ziehl-Neelsen
G	: Guanin
GI	: Üreme indeksi
GM- CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GU	: Growth Unit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFN γ	: İnterferon gama
IL	: İnterlökin
INH	: İzoniazid
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
LJ	: Löwenstein Jensen
MGIT	: Mycobacteria growth indicator tube
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NALC	: N-Asetil -L-Sistein
NaOH	: Sodyum hidroksit
NK	: Doğal öldürücü hücreler
NPD	: Negatif prediktif değer
Nramp	: Naturel resistance associated macrophage protein
OADC	: Oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz
PANTA	: Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik asit, Trimethoprim, Azlosilin
PAS	: Para-amino salisilik asit
PCR SSCP	: Single-Strand Conformational Polymorphism
PPD	: Pozitif prediktif değer
PRZ	: Pirazinamid
REBA MTB-MDR	: Reverse Blot Hybridization Assay <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Drug Resistance
RIF	: Rifampisin

rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
S	: Sitozin
SIRE	: Streptomisin-İzoniazid-Rifampisin-Etambutol
SM	: Streptomisin
T	: Timin
TB	: Tüberküloz
TGF-β	: Transforming growth factor β
TNF-alfa	: Tümör nekrozis faktör alfa
UPS	: Upstream promotor sekans
WT	: Vahşi tip

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve 7 ml'lik MGIT tüpteki final konsantrasyonları.....	22
Tablo 2. Reverse blot hibridizasyon testinde kullanılan probalar	25
Tablo 3. PCR ana karışımı (master mix) oranları	26
Tablo 4. PCR protokolü.....	26
Tablo 5. REBA MTB-MDR örnek test striplerinin yorumlanması.....	29
Tablo 6. Çalışmaya alınan 55 suşun ait olduğu hastaların yaşlara göre dağılımı.....	30
Tablo 7. Çalışmaya alınan suşların örneklerle göre dağılımı	30
Tablo 8. Çalışılan hastaların tüm test sonuçları.....	31
Tablo 9. Çalışmaya alınan suşların kliniklere göre dağılımı.....	32
Tablo 10. İzole edilen 55 suşun primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları.....	33
Tablo 11. Her bir ilaç için tespit edilen toplam direnç oranları.....	34
Tablo 12. Direnç saptamada kullanılan iki yöntemin ilaçlara göre dağılımı	34
Tablo 13. Çalışılan tüm <i>M. tuberculosis</i> izolatlarının REBA MTB-MDR ile hibridizasyon paternleri ve fenotipik dirençleri	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. TBc ID testi, pozitif, negatif ve geçersiz sonuçlar.....	21
Şekil 2. REBA MTB-MDR örnek test stripleri	28

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>M. tuberculosis</i> kompleks'in LJ besiyerinde görünümü ve TBc ID test ile tanımlanması.....	32
Resim 2. Kalite kontrol suşunun (<i>M. tuberculosis</i> H37Rv) ve negatif kontrolün test stripleri.....	35
Resim 3. Çalışmamızdaki REBA MTB-MDR test stripleri	35
Resim 4. Çalışmamızdaki REBA MTB-MDR test stripleri	36

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünün tüberküloz (TB) etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* basili ile enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık 9 milyon kişinin yeni TB hastası olduğu tahmin edilmektedir (1). Verem Savaşı 2012 verilerine göre; ülkemizde 2010 yılında insidans yüzbin nüfusta 20.6'dır. Son yıllarda giderek artan küresel çabalara rağmen yeni TB olgularının sayısı hızla artmaktadır (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2015 yılındaki hedefi, olası tüm yayma pozitif vakaların en az %70'ine tanı konulması ve en az %85'inin tedavi edilmesidir. 2050 yılındaki hedefi ise TB'ü dünyadan elimine ederek bu halk sağlığı sorununu ortadan kaldırmaktır (1).

1940'lı yılların sonunda ilk antitüberküloz ilaç streptomisin (SM) kullanılmaya başlanmasıyla birlikte ilaç direnci de görülmeye başlanmıştır (3). İzoniazid (INH) ve rifampin (RIF) en az yan etkiye sahip en etkili antitüberküloz ilaçlardır. INH ve RIF'e birlikte direncin olması çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olarak tanımlanır. ÇİD-TB infeksiyonların sayısı 1990'lardan bu yana giderek artış göstermektedir. ÇİD-TB tedavisi zor, komplike, pahalı bir uygulamadır. Bu nedenle tedavinin doğru yönlendirilmesi ve yönetimi dirençli suşlarla bulaşma zincirinin kırılması ve direnç yayılımının önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu uygulama ise deneyimli ve kalifiye sağlık personeli gerektirmektedir (4).

M. tuberculosis basilinin saptanmasının ve kültürde üretilmesinin ardından mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevi öncelikle tedavide ilk seçenek olan primer ilaçlara karşı duyarlılık testi yapılmasıdır. Önerilen, her hastaya ait ilk izolat için duyarlılık testinin yapılması, iki aylık tedaviye rağmen kültürü pozitif olan hastalarda tekrarlanmasıdır (5). Ancak, fenotipik yöntemlerle yapılan ilaç duyarlılık testleri zahmetli ve oldukça zaman alıcıdır. Rutin laboratuvarlarda en sık kullanılan fenotipik yöntem sıvı bazlı ilaç duyarlılık sistemlerinden birisi olan BACTEC MGIT 960 sistemidir. DSÖ, özellikle ilaç direnci olma ihtimali yüksek olan olgularda moleküler hızlı ilaç duyarlılık testlerini önermektedir. Bu sebeple son yıllarda mikobakterilerin tür tanımlaması ve ilaç duyarlılıklarının hızlı tespiti için birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir (6).

Bu çalışmada, laboratuvarımızda BACTEC MGIT 960 sistemi ile ilaç duyarlılık testi yapılan izolatların hızlı moleküler tanı yöntemlerinden olan Reverse Blot Hybridization Assay *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistance (REBA MTB-MDR) testi ile değerlendirilerek, iki yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tarih öncesi çağlardan beri bilinen ve insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan halk arasında verem diye bilinen TB, farklı bölgelerde değişik tarihlerde epidemilere neden olmuştur. Bu salgınlardan sonra hastalığın görülme oranının da ani olarak düşüşler kaydedilmiştir. Bu tür dalgalanmaların oluşmasında, bağışıklık sisteminin, sosyo-ekonomik olayların ve hastalığın doğal seyrinin etkisi olmuştur (7).

“Ölümün Kaptanı” lakabı verilen TB’un patogenezinin anlaşılması, Theophile Laennec’in 19. yüzyıl başındaki çalışmalarıyla başlamıştır. 1865 yılında da Jean-Antoine Villemin’in TB’un bulaşıcılığının ispatıyla ilerletilmiştir. 1882 yılında Robert Koch TB’dan ölen bir hastanın akciğerindeki basili göstermiş, TB’un *M. tuberculosis* ile oluşan bir infeksiyon hastalığı olduğunu kanıtlayarak yeni bir dönem başlatmıştır. 20. yüzyılın başlarında ilk sanatoryumun açılmasıyla TB tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamıştır. Fransız bilim adamları, Albert Calmette ve Camille Guérin gliserin-safra-patates karışımında üreyen TB basilinin virulansını kaybettiğini bulmuşlardır ve çalışmalar sonucunda bu suşu aşı yapımında kullanarak ilk TB aşısını, Bacillus Calmette-Guérin (BCG)’i geliştirmişlerdir. 1921 yılında Fransa’da ilk kez BCG aşısı insanlarda kullanılmaya başlanmıştır. 1930’da Pasteur Enstitüsü’nden getirilen BCG aşısı Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü’nde üretilerek ülkemizde kullanılmaya başlanmıştır. Florence Seibert ve Glenn 1930’lu yıllarda old tüberkülini saflaştırmış ve TB infeksiyonunu saptanmak için kullanmışlardır(7).

1944’de SM, 1952’de INH, 1949’da para-amino salisilik asit’in (PAS) bulunması ile TB’da yeni bir dönem başlamıştır. Kemoterapideki son devrim 1966’da RIF’in kullanıma girmesi olmuştur. Bu keşif şu anda da uygulanmakta olan kısa süreli tedavinin yolunu açmıştır. Kombine tedavinin uygulanmasıyla TB tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. Antibiyotik tedavisinin başlamasından sonra TB özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere sürekli bir düşme eğilimi göstermiştir. Ancak bu eğilim 1985 yılından itibaren değişmiş, TB ve ilaca dirençli olgularının sayısı artmaya başlamıştır. Özellikle halk sağlığı ile ilgili çalışmalarda

yetersizlikler, Kazanılmış İmmun Yetmezlik Sendrom (AIDS)'lu olguların sayısındaki artış ve bozulan sosyoekonomik durum bu artışın başlıca nedenleri olarak öne sürülmüştür (8,9).

2.2. Mikobakterilerinin Genel Özellikleri

Mycobacterium; *Actinomycetales* takımının *Mycobacteriaceae* ailesinde bulunan tek cins olup, diğer mikolik asit içeren cinsler ile ilişkisi vardır. Mikobakteri türlerinin yüksek G (guanin) + C (sitozin) içerikleri (*M.leprae* hariç), diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Corynebacterium* türleri gibidir.

Mycobacterium cinsi içinde bugün 130'dan fazla tür tanımlanmıştır. Konak tropizmlerinde, fenotipik özelliklerinde ve patojenitelerinde büyük farklılıklar olmasına karşın bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbirleriyle yakın ilişkili türler "kompleks" başlığı altında toplanmaktadırlar. *M. tuberculosis* kompleks; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canetti* ve *M. pinnipedii* türlerinden oluşmaktadır. Kompleksin diğer üyeleri insanlarda seyrek olarak hastalığa yol açtığından *M. tuberculosis* cinsin en önemli üyesidir ve günümüzde insanlarda görülen tüberkülozun esas etkenidir (10).

1959'da Ernest Runyon, *M. tuberculosis* kompleks dışında, klinik örneklerden izole edilen diğer mikobakteriler için bir gruplama yapmıştır. Bu sınıflamada her grup değişik türleri içermektedir.

Grup I: Sadece ışıpta sarı-portakal rengi pigment oluşturan fotokromojenik mikobakteriler (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M.asiaticum*, *M. intermedium*, *M.novocastrense*),

Grup II: Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment oluşturan skotokromojenik mikobakteriler (*M.scrofoleceum*, *M.szulgai*, *M.gordoniae*, *M. innterjektum*, *M.herkeshornanse*, *M.tusciae*, *M. kubicae*, *M. gordoniae*, *M. cookie*, *M. hiberniae*),

Grup III: Nonfotokromojenik, yavaş üreyen, S tipi ve krem rengi kolonileri olan mikobakteriler (*M.avium complex*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. malmoensa*, *M.genovensa*, *M.haemophilum*, *M. heidelbergense*, *M. shimoidei*, *M. smiae*),

Grup IV: 25 ve 37 °C’de üremeleri için bir haftadan daha az bir süreye gereksinim duyan hızlı üreyen mikobakterileri (*M.fortuitum-chelonae* kompleks, *M.chelonae*) içermektedir. Runyon gruplandırmasında; pigmentasyon, koloni morfolojisi ve üreme hızı temel alınmıştır (10,11).

Runyon gruplandırmasındaki mikobakteriler “atipik mikobakteriler” olarak adlandırılmışsa da son yıllarda bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve bu grup için “Mycobacteria Other Than Tuberculosis” veya “non-tuberculosis mycobacteria” terimleri kullanılmıştır. Ancak bu terimlerin de mikobakteri türlerini tanımlamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli çeşitli mikobakteri türlerinin oluşturduğu infeksiyonların tedavileri farklı olduğu için tüm mikobakterilerin tür adları ile belirtilmeleri gerekmektedir (11).

Mikobakteriler 0.2-0.6 µm eninde, 1-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Klinik örnekten hazırlanan preparatlarda tek tek, kısa zincirler yapacak şekilde uç uca veya dallanma göstererek durabilirler. İçerdikleri polimetafosfat granüllerine bağlı olarak basil, kendisinden daha koyu boyanmış boncuklu veya ince bantlar içeren şekillerde de görülebilir ve spor, kapsül, flagel veya miçelleri bulunmaz (9,10).

Mikobakteriler aerop veya mikroaerofildirler. %5-10 CO₂’li ortamda üremeleri hızlandırılabilir. Tipik suşların replikasyon zamanı 15-20 saattir. *M. tuberculosis*’in optimal üreme ısısı 37°C’dir (9,10,12).

Mikobakteriler karmaşık bir yapı gösterirler. Bir plazma zarı ile sınırlanan sitoplazma ve bunları çevreleyen lipidten zengin bir hücre duvarına sahiptir. Mikobakterilerin hücre duvarı tabakalardan oluşmuştur. Plazma zarının üzerinde bulunan en iç tabaka peptidoglikandandır. Bu tabaka kısa peptid zincirleri, çapraz bağlarla sıkıca bağlanan uzun polisakkarit zincirleri içerir ve hücrenin sert yapısını sağlar. Peptidoglikan tabakasına fosfodiester köprüleriyle bağlanan ikinci tabaka arabinogalaktan tabakası olup hücre duvarı kitlesinin %35’ini oluşturur. Arabinogalaktanların yan zincirindeki arabinaz birimlerine mikolik asit diye

adlandırılan, uzun zincirli bir grup yağ asiti kovalent olarak bağlanırlar. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehalose gibi şekerlere bağlandığında kord faktörü oluştururlar. Virülansla ilgili olduğu düşünülen bu faktör hücrelerin birbirine dolanmış demetler oluşturarak paralel zincirler halinde üremelerine yol açar (9).

2.3. İmmünopatogeneze

Tüberkülozun en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Aynı ortam havasını paylaşan TB'lu bir hastadan, temas halinde olan bir insana *M. tuberculosis*'nin hava yolu ile bulaşma olasılığı; maruziyet süresine ve bakteri yoğunluğuna, konak savunması ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağlıdır (13). Basilin girişinden sonraki inflamatuvar yanıt 4 ayrı evrede özetlenebilir. 1. evre de TB basili alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilir; genel olarak yok edilir ya da yok edilemezse, basil çoğalır ve makrofajı enfekte eder. 2. evre de nötrofiller ve monositler olay yerine gelir fakat basil tamamen öldürülemez. Basil alveolar makrofajların içerisinde logaritmik olarak çoğalır. Bu aşamada hafif doku hasarı meydana gelir. 3. evre de antijene özgü T hücreleri olay yerine gelir, monositleri aktive eder ve epitelioid ve langans tipi dev hücrelere farklılaştırır. Basilin vücuda yayılımı önlenir. Evre 4 granülom evresidir. Bu evre de immün yanıtın başarısız olmasına bağlı dormant basiller aktivasyon gösterir ve kazeifikasyon nekrozu ile karakterizedir (13–16).

Solunum yoluyla alınan basil; dendritik hücreler, alveolar makrofajlar, nötrofiller ve epitelyal hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere tutunmaktadır. *M. tuberculosis*, mannoz reseptör, kompleman reseptörler, toll-like reseptörler, sürfaktan protein reseptörler, scavenger (çöpcü) reseptörler ile etkileşime girerek konak hücrelerine tutunabilirler. Bu reseptörler *M. tuberculosis*'nin komponentleri olan, lipoprotein, DNA, lipoarabinomannan ve fosfatidilinozitol mannozidi tanırlar (13). Basil reseptöre tutunduktan sonra çeşitli sinyal yolları tetiklenirken fagozom içerisine alınır. Basilin trehaloz 2- sülfat ile fagozom-lizozom birleşmesini önlediği ve çok miktarda amonyak salgılayarak hücre içinde canlı kalmasını kolaylaştırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tüberkülozun konak immünitesinden korunmasında birçok mekanizma rol oynar. Salgıladığı süperoksit dismutaz, katalaz enzimleri ve lipoarabinomannan komponenti ile reaktif oksijen derivelerini elimine

eder (13–16). Reaktif oksijen deriveleri ve nitrojen radikalleri tüberküloz basiline karşı savaşı defans mekanizmalarının en önemlilerindendir. IFN- γ , TNF- α ve 1,25 dihidroksi kolekalsiferol (vitamin D₃), varlığında yapımı artan indüklenbilir nitrikoksit sentaz-2 (iNOS-2) enzimi; reaktif nitrojen radikallerinin oluşumunu sağlamaktadır. Naturel resistance associated macrophage protein (Nramp) nitritin hücre içerisinde taşınmasından sorumlu bir proteindir. Üretimindeki defektler mikobakteriye karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir.

İnflamatuvar yanıt ve yapımı tetiklenen pek çok kemokin ve sitokinin varlığı nötrofillerin, doğal öldürücü (NK) hücrelerinin, γ/δ T lenfositlerinin ve α/β T lenfositlerinin inflamasyonun olduğu dokulara göçünü sağlamaktadır. Nötrofiller ürettikleri defensiler gibi moleküllerin yardımıyla makrofajlardan bağımsız olarak mikobakterileri öldürerek ve enfeksiyonun erken fazında TB'dan korumada görev aldığı gösterilmiştir (17–19). *M. tuberculosis*'nin sınırlandırılmasında, fagositik konak hücre aktivasyonu ve hücrel immun mekanizmalar çok önemli role sahiptir. Bu mekanizmalarda problem olması hastalığın prognozunu belirgin şekilde etkilemektedir (20). *M. tuberculosis*'e karşı makrofaj savunmasında potansiyel mekanizma apoptozis denilen programlanmış hücre ölümüdür. *M. tuberculosis* ile ilişkili apoptoz; apoptoz inhibitörü olan *bcl-2*'nin down regülasyonu aracılığı ile gelişmektedir (13,14). NK aktivasyonu tüberküloz kemoterapisine güçlü bir destek oluşturur, NK aktivitesindeki azalma ÇİD-TB ile ilişkilidir. Düşük NK aktivitesi hastalık için sebep değil hastalığın bir sonucudur (16,21).

TB hücrel immun yanıt aracılıklı korunmada klasik bir patojendir. Aktive olan T hücreleri enfeksiyon alanına göç ederler ve antijen sunan hücreler ile etkileşime girerler. Granülomlarda CD4+ ve CD8+ T hücreleri birlikte bulunur, enfeksiyonun granülom içinde sınırlı kalmasına yardımcı olur ve reaktivasyon engellenmiş olur. CD4+ T hücreler *M. tuberculosis*'e karşı korunmada major rol oynar. Primer etkisi INF- γ ve diğer sitokinler ile makrofajı aktive etmek ve nitrojen radikallerinin oluşumunda görev almaktır. *M. tuberculosis*'e özgü CD8+ T hücreleri enfekte makrofaj ve dentritik hücrelerin lizisini sağlayarak hücre içi basil miktarını azaltılmasında rol almaktadırlar (13–15). TB intraselüler bir patojen olduğu için humoral immünitinin katkısı olmadığı düşünülmüş fakat son yapılan çalışmalarda

TB'a karşı B hücreleri tarafından oluşturulan antikor üretiminin koruyucu bir rol oynayabileceğini destekleyen bulgular elde edilmiştir (14).

2.4. Dünyada İlaç Direnci

Primer tüberküloz ilaçlarına direnç tüm dünyada hızla artmaktadır. 136 ayrı ülkeden toplanan verilere göre hazırlanan DSÖ'nün yayınladığı, "Küresel Antitüberküloz İlaç Direnci 2013 Rapor"unda, ÇİD-TB insidansının bugüne kadar rapor edilen en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmektedir. Genel olarak yeni tanı almış olgularda %3.6 (2.1-5.1), önceden tedavi almış olgularda % 20.2 (13.3-27.2) olarak verilmektedir. En yüksek ÇİD-TB oranları Doğu Avrupa ve Orta Asya ülkelerinde izlenmektedir. Bu ülkelerde yeni vakaların %20'sinde, önceden tedavi almış vakaların %50'sinde ÇİD-TB görülmüştür. 2012 yılındaki sonuçlar 2011 yılındaki verilerle karşılaştırıldığında; 2011 yılında 66 bin olan tedavi edilen ÇİD-TB vakası 2012 yılında 94 bin olduğu görülmüştür. 2015 yılında hedeflenen ÇİD-TB olgularının %75'inin tedavi planını 107 ülkeden 34 gerçekleştirmiş olup genel olarak bu vakaları %48 başarılı şekilde tedavi edilmiştir. ÇİD-TB olgularının %9.6'sı aynı zamanda artmış ilaca dirençli tüberküloz (AİD-TB) olgusudur. Afrika'dan bildirim yapılan AİD-TB vakalarında 2009 yılına göre 2012'de %10 artış saptanmıştır (1).

2.5. Türkiye'de İlaç Direnci

"Küresel TB Kontrolü 2011 Rapor"unda; 2008 yılında 200'den fazla ÇİD-TB vakası raporlayan ülkeler içinde tedavi başarısı sıralamasında Türkiye ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye'nin 2008 yılında ÇİD-TB olgu sayısı 263 olup bu hastalarda 24 ay tedavi başarısı oranı %68.4'dür. Verem Savaşı 2012 verilerine göre; ilaç duyarlılık testi yapılan toplam 4965 hastanın sonuçları incelendiğinde; %19.5 en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranlarda direncin %13.3 ile INH'ye karşı geliştiği görülmüştür ve ÇİD-TB oranı %5 tespit edilmiştir. ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2.5 iken, önceden tedavi görmüş olgularda %22.8 olarak saptanmıştır (2).

Isparta'da Verem Savaşı 2012 verilerine göre; 2005 yılında 49, 2006 yılında 50, 2007 yılında 46, 2008 yılında 47, 2009 yılında 48 ve 2010 yılında 50 tüberkülozlu vaka saptanmıştır. 2010 yılındaki vakaların %48'i erkek, %52'si

kadındır. %36'sı akciğer TB'u, %52'si akciğer dışı TB, %12 vakada da birlikte enfeksiyon görülmüştür. Yaş dağılımına bakılacak olursa; 0-4 yaş vaka yoktur, 5-24 yaş 13, 25-44 yaş 12, 45-64 yaş 16, 65 yaş üstü 9 vaka bildirilmiştir. 2010 yılında yeni olgu sayısı 47, nüks 3 vaka da bildirilmiştir (2).

2.6. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Günümüzde TB tedavisinde kullanılan ilaçlar, kabul edilebilir düzeydeki toksisite profili ile birlikte en efektif olan "birinci seçenek" ilaçlar ve genellikle daha az etkili, daha pahalı ve daha çok toksisitesi olan "ikinci seçenek" ilaçlar olarak gruplandırılır. Birinci sınıfta bulunanlar; başta INH olmak üzere, RIF, etambutol (ETB), SM ve pirazinamid (PRZ)'dir. Basiller duyarlı olduğu sürece TB tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır. İkinci sınıfta etionamid, PAS, tiasetazon, sikloserin, siprofloksasin, ofloksasin ve aminoglikozid olan (streptomisin-dışı) viomisin, kapreomisin, kanamisin ve amikasin bulunur. Genellikle birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiği ya da toksik etki meydana geldiği durumlarda kullanılırlar (9,22).

2.6.1. İlaç Direnci

Diğer birçok bakteride olduğu gibi tüberküloz basillerinde de ilaçlara karşı doğal ve kazanılmış direnç mekanizmaları etkili olmaktadır. Doğal direnç; çok katlı hücre duvarına bağlı olarak ilaçların hücre içine alınımının engellenmesi, artmış efluks ve hücre içinde ilacın toksik etkisinin nötralizasyonu şeklinde olmaktadır (3).

Birçok bakteride görülenin aksine *M.tuberculosis*'de plazmit, bakteriyofaj, transpozon veya insersiyon segmentleri aracılığı ile oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. Kazanılmış direnç ise genellikle her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sonucunda olur. Doğal yollarla direncin gelişmesi, bakteri ile ilacın temas oranına ve spontan mutasyonun türüne bağlıdır. Birinci seçenek ilaçların çoğu için mutasyon oranı her hücre bölünmesinde 10'dur. Yani ilacın etkinliği düşük ve bakterinin yoğunluğu fazla ise direnç riski etkin ilaç düşük bakteri yoğunluğundaki temastan daha yüksek olacaktır. Örneğin, RIF için doğal mutasyonel yolla direnç gelişme ihtimali 3.32×10^{-9} , INH için bu ihtimal 2.56×10^{-8} , SM için; 2.29×10^{-8} , ETB için; 1.00×10^{-7} 'dir. Akciğer

tüberkülozunda bir kavite, büyüklüğüne göre ortalama 10^8 basil içermektedir. Bu durumda teorik olarak, kaviter lezyonların içinde çok az sayıda da olsa genetik olarak ilaç direnci olan kökenler bulunabilmektedir, ancak ilaca dirençli basiller duyarlı mikroorganizmalar arasında dilüe olmaktadır. Buna tedavide ilaçların hatalı reçetelenmesi, kullanım sürelerinin iyi planlanamaması, hasta ilaç uyumsuzluğuna bağlı düzensiz antibiyotik kullanımı sonucu duyarlı mikroorganizmaların baskılanması ve ilaca dirençli kökenlerin seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmeleri sebep olmaktadır. Bir basilde hem INH hem de RIF direncinin bir arada olma olasılığının 1.00×10^{-14} olduğu göz önünde bulundurulursa teorik olarak duyarlı bir bakteri topluluğunda spontan mutasyonlarla çoklu ilaç direnci gelişme olasılığının çok düşük olduğu söylenebilir. Çoklu ilaç direnci hemen daima belli bir antibiyotiğe dirençli topluluktaki basillerde yeni mutasyonlarla oluşan mutant kökenlerin antibiyotik baskısıyla seçilip topluluk içinde baskın duruma geçmesi sonucunda oluşmaktadır. Bununla birlikte, bir kısım klinik *M. tuberculosis* izolatındaki direnç, klasik gen mutasyonları ile açıklanamamaktadır (8,23–27).

2.6.2. İlaç Direnciyle İlgili Tanımlar

Primer direnç: Henüz TB ilaçlarını kullanmamış ya da bir aydan kısa süre için ilaç almış yeni tüberkülozlu olguda tedaviye başlamadan önce saptanan ilaç direncidir. Primer direnç, basilin alındığı kaynağa ait olan dirençtir.

Sekonder direnç: Başlangıçta duyarlı olan basillerle enfekte olan TB hastasında, uygun olmayan tedaviye bağlı olarak dirençli basillerin artması sonucunda gelişen dirençtir (28).

Tek ilaca direnç: Bir antitüberküloz ilaca dirençli olmasıdır. En sık INH ve SM'e karşı görülür.

Birden çok ilaca direnç: INH ve RIF dirençli olma koşulu olmaksızın iki ya da daha fazla ilaca dirençli olma durumudur.

Çok ilaca direnç: Diğer antitüberküloz ilaçlara dirençli olsun veya olmasın en azından günümüzde mevcut en güçlü birinci basamak antitüberküloz ilaçlardan olan INH ve RIF'a karşı aynı anda direnç oluşturması durumudur.

Artmış ilaç direnci: *M. tuberculosis* suşunun birinci basamak antitüberküloz ilaçlardan en azından INH ve RIF'e ek olarak ikinci basamak antitüberküloz ilaçlardan herhangi bir florokinolona (ofloksasin, siprofloksasin ve levofloksasin gibi) ve parenteral kullanılan antitüberküloz ilaçlardan (kanamisin, kapreomisin ve amikasin gibi) en azından birine karşı gelişen direnci ifade etmektedir.

Tüm ilaçlara direnç: Birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçların tümüne dirençli olmasıdır (29).

2.6.3. İzoniazid Direnci

İsoniazid, TB tedavisinde kullanılan önemli birinci seçenek ilaçlardan biridir. INH, sadece *M.tuberculosis* ve bazı mikobakteriler üzerine etki etmesi yönü ile dar spektrumlu antitüberküloz ilaçtır. TB tedavisinde ve profilaksisinde uzun yıllardır kullanılıyor olmasına rağmen etki spektrumunu tam olarak anlayamamıştır. Bir ön ilaç olan INH, bakteri tarafından üretilen katalaz peroksidazın katalizlediği oksidasyon reaksiyonu ile aktif hale geçmektedir. Bu işlem *katG* geninin kontrolündedir. INH'ın okside olmuş şekli NADH'nin nikotinamid parçasına kovalent olarak bağlanarak INH-NADH bileşiğini oluşturur. Bu bileşik NADH antimetaboliti olarak etki yapar ve *inhA* geniyle kodlanan enoil redüktaza bağlanmak için yarışır (9). Primer etkisi hücrenin içinde çeşitli biyolojik süreçleri etkileyerek bakteri duvar yapısında bulunan mikolik asidin sentezini inhibe etmektir. Ayrıca NAD metabolizması, enerji metabolizmasını, makromolekül sentezini de bozar.

Katalaz peroksidaz enzimleri gerek INH'ın basil içine alınmasından, gerek aktif metabolitine dönüşümünden sorumludur. Nitekim, INH'a karşı klinik izolatlarda en çok rastlanan direnç katalaz-peroksidaz eksikliğine bağlı gözlenmektedir ve izoniazide dirençli klinik izolatların yaklaşık %50-95'inde katalaz-peroksidazı kodlayan *katG* geninde mutasyonlar saptanmıştır. *katG* geninin değişik bölgelerinde gelişen mutasyonlar, değişen ölçülerde enzim eksikliğine, dolayısıyla değişik oranlarda INH direncine neden olmaktadır. *katG* negatif INH dirençli suşlarda, alkilhidroperoksid redüktazı kodlayan *ahpC* geninde mutasyonlar bulunur. Alkilhidroperoksid redüktazın aşırı ekspresyonu, katalaz peroksidaz eksikliğini kompanse ederek, basili toksik radikallerin etkisine karşı korur (8,9,30,31).

Bir diğerk mekanizma mikolik asit sentezinde rol alan enoil redüktazın fazla ekspresyonuna bağılı olarak gelişen dirençtir. INH'a dirençli klinik izolatların %20-35'i *inhA* geninin promotor bölgesinde mutasyonlar içerir ve buna bağılı olarak enoil redüktaz yapımı artar. Böylece INH'in hedeflediğı biyolojik molekül miktarı, inhibe edebileceğinden daha fazla olmakta ve fazla miktardaki enzim mikolik asit yapımına devam etmektedir.

ahpC ve *kasA* genlerindeki mutasyonlar da INH direncine neden olabilir. Mikolik asit sentezinde rol alan bir enzim olan β -ketoaçıl taşıyıcı protein sentetaz, *kasA* geni tarafından kodlanır. INH direncinde *kasA* ve *ahpC* genindeki mutasyonların da katkı derecesi tam olarak bilinmemekle birlikte rollerinin düşük olduğu düşünülmektedir. Toplam bu dört gendeki (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*) mutasyonlar INH direncinin yaklaşık olarak %90'ından sorumludur (8,9,30).

2.6.4. Rifampin Direnci

Rifampin, bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimerazının potent inhibitörüdür. RNA polimerazın β alt ünitesine bağlanarak mRNA sentezini inhibe etmektedir. RIF özellikle yavaş üreyen intermittant aktivite gösteren *M.tuberculosis* üzerine etkili olup, bu ilaca karşı gelişen direnç tüberküloz tedavisinde başarısızlığının önde gelen nedenidir. *M.tuberculosis*'de sıklıkla RIF direnciyle beraber INH direnci de gözlenir. RIF'e dirençli kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çiftlik (bp) "hot spot" bölgesinde mutasyonların, olduğu gösterilmiştir (8,9,32,33).

Yine *rpoB* genini kodlayan bu bölge dışında 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlarda da mutasyonlar gösterilmiştir. RIF dirençli vakalarda en sık *rpoB* geninin 531. kodonunda mutasyon saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyon izlemektedir. Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzeyde rifampisin direncine neden olmaktadır. 514 ve 533. kodon mutasyonları genellikle düşük düzeyde mutasyonlardır. Ayrıca mutasyonların sıklığı ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir (8,32).

2.6.5. Pirazinamid Direnci

Nikotinamid'in sentetik pirazin analogudur. İlaç in vivo olarak bakterisidal etkisini, makrofaj fagolizozomları gibi asidik hücre içi bölümlerinde bulunan semidorman *M. tuberculosis*'e göstermektedir. Bir öncü ilaç olan pirazinamid, mikobakteri hücre duvarından diffüze olduktan sonra pirazonoik aside çevrilir, bu ilacın aktif formudur. Dirençli suşlarda pirazinamidaz aktivitesinde kayıp belirlenmiştir. Dirençli suşların %72-94'ünde bu enzimi kodlayan *pncA* gen bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır (9).

2.6.6. Streptomisin Direnci

Streptomisin, bakterinin 30S ribozomuna irreversible olarak bağlanıp protein yapımını inhibe ederek etki gösterir. İlaça karşı dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %80'inde iki tür mutasyon saptanmıştır; ribozomal S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde oluşan nokta mutasyon ve 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* geninde oluşan mutasyondur. Ribozomlardaki bu değişiklikler ilacın bakteriye bağlanmasını azaltarak dirence katkıda bulunur (9).

2.6.7. Etambutol Direnci

Etambutol, hücre duvarı sentezini inhibe ederek etki eden bakteriyostatik bir ilaçtır. Hedefi arabinol transferaz enzimidir. Duvar sentezini bozması yanında duvarın permeabilitesini arttırarak diğer ilaçların bakteri içine girmesini kolaylaştırır. Etambutol direnci saptanan suşların %70'inde *embB* geninde mutasyonlar gösterilmiştir (9).

2.7. Duyarlılık Testleri

Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı riskini ve antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimini arttırmaktadır. Ülkemiz ve TB insidansının yüksek olduğu ülkelerdeki önemli sorunlardan biri direnç belirleme testlerinin düzenli olarak yapılamaması veya test sonuçlarının uzun sürede alınmasıdır. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ün ön gördüğü koşullar; tedaviye başlamadan önce her hastaya ait ilk *M.tuberculosis* izolatu için, 2-3

aylık tedaviye rağmen kültürü pozitif olan hastalarda veya klinik olarak tedaviye yanıt gözlenemeyenlerde birinci seçenek ilaçlara karşı duyarlılık testi yapılmasıdır (34). *M.tuberculosis*'in antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır.

Fenotipik Yöntemler

Klasik Kültür Yöntemleri

- Orantı (proporsiyon) Yöntemi
- Mutlak Konsantrasyon (Absolu Konsantrasyon) Yöntemi
- Direnç Oranı Yöntemi

Hızlı Kültür Yöntemleri

- Radyometrik Kültür Sistemi
- Floresan Kültür Sistemi
- Kolorimetrik Kültür Sistemi
- Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem
- E-test

Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

- Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi (LRP)
- Biyoluminesans Yöntemi (hücrel ATP ölçümü)
- Flow Sitometri Yöntemi

Genotipik Yöntemler

- DNA Dizi Analizi
- Ters Hibridizasyon
- RNA/RNA *Mismatch* Analizi
- PCR SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism)
- Heterodupleks Analiz
- Real Time PCR

- DNA Microarray

TB basillerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının saptanmasında direnç oranı, mutlak konsantrasyon ve proporsiyon yöntemleri gibi konvansiyonel fenotipik yöntemler yıllardır kullanılmaktadır. Bunlardan ilk ikisi standardizasyon zorluğu, yoğun işlem gerektirmeleri ve hata oranlarının yüksek olması nedeniyle sınırlı merkezlerde çalışılabilmektedir.

Proporsiyon yöntemi; katı ve sıvı besiyerleri için gerekli standardizasyon çalışmaları yapılmış ve güvenilirliği onaylanmış referans bir yöntemdir. Fenotipik yöntemlerin en önemli dezavantajı kültürdeki üremeden sonra otomatize sıvı besiyerlerinde yapılan duyarlılık testlerinin 7-12 gün, Lowenstein Jensen (LJ) gibi katı besiyerlerinde yapılan testlerin ise 21-42 gün kadar sürede sonuçlanabilmesidir. Ayrıca bu testler kontaminasyonlara çok açıktır. Konvansiyonel duyarlılık testlerinde yaşanan süre sıkıntısını gidermek amacıyla yeni fenotipik yöntemlere yönelme olmuştur. Ancak bunlarla ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır (35).

M. tuberculosis'de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra hızlı ilaç direnci saptamaya yönelik moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Moleküler direnç saptama testlerinin çoğu RIF ve INH direncini saptamak için kullanılmaktadır ve en büyük avantajı hızlı olmalarıdır. Moleküler testler basilin canlılığının devamı için gerekli olan özel örnek saklama ve transfer koşullarına gereksinim duymazlar. Testlerin uygulaması kolay olmakla birlikte, sonuçlarının yorumlanmasında eğitimli uzman görüşüne ihtiyaç vardır. Ayrıca kullanılan yöntem direncin seviyesi hakkında bilgi verebilmektedir. Örneğin; *katG*'deki mutasyonun yüksek düzey INH direnç ile *inhA*'daki mutasyonun ise düşük düzey dirençle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu bölgelerdeki mutasyonların tanımlanması, hekime yüksek doz INH'la tedaviye devam edebilme konusunda yararlı bilgi sunmaktadır (35,36).

Moleküler yöntemlerin majör dezavantajları; yüksek maliyet, bütün ilaçlara karşı dirençten sorumlu moleküler mekanizmaların henüz tam olarak açıklanamaması, klinik olarak dirence yol açan bakteri topluluğu içindeki dirençli suşların duyarlılara oranının kesin olarak belirlenememesi, saptanan mutasyonların (sessiz mutasyonlar) her zaman ilaç direnciyle ilişkili olmaması, solunum yolu dışı

klirik örneklerdeki performansları hakkında sınırlı verilerin olması olarak sayılabilir (36).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin 2011 yılında güncellenen raporuna göre moleküler ilaç direnç testleri, direnç tespitinde konvansiyonel testlerin yapılmasındaki gerekliliği ortadan kaldırmamıştır. Nedenler şöyle sıralanmıştır:

a. Bu testler, *M. tuberculosis* kompleks saptamada kültürden daha duyarlı değildir.

b. Moleküler duyarlılık testleri RIF için çok yararlı, INH için daha az etkindir. Üzerinde çalışmalar olmakla birlikte diğer ilaçlar için henüz tatminkar sonuçlar alınamamaktadır.

c. Moleküler direnç testleri, dirençli ve duyarlı bir bakteri karışımındaki dirençli bakterilerin oranını saptamada kültüre dayalı proporsiyon testi kadar duyarlı değildir.

d. Yalancı pozitif ve negatif moleküler direnç testi sonuçları olmaktadır. Klinik örneklerde bulunabilecek inhibitörler nedeniyle solunum yolu örneklerinde %2,5 oranında yalancı negatif sonuç alınabilmektedir.

e. Moleküler direnç testi ve konvansiyonel test sonuçları arasında uyumsuzluk olduğunda, uyumsuzluk çözülünceye kadar konvansiyonel test sonucu dikkate alınmalıdır.

f. Yurt dışı hesaplamalarda kit maliyeti yeni valide edilmiş moleküler direnç tetlerinde \$ 8-30/örnek arasında değişmektedir (37).

2.7.1. Genotipik Yöntemler

M. tuberculosis'de ilaç direncinin saptanması için önceki yıllarda üzerinde çalışılan RNA/RNA 'Mismatch' analizi, PCR-SSCP ve Heterodubleks analizi gibi yöntemler rutin uygulamada yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Yaygın olarak kullanılan yöntemler PCR-reverse hibridizasyon yöntemi olmak üzere Real-time PCR, DNA dizi analizi ve 'microarray' dir. Kullanılan moleküler yöntemlerin çoğunda üç ana aşama vardır: klinik örneklerden nükleik asitin ekstraksiyonu,

gendeki dirençten sorumlu spesifik bölgenin amplifikasyonu, çoğaltılan gen bölgesi üzerindeki mutasyonların saptanmasıdır. Uygun primerlerle amplifiye edilen hedef DNA'daki mutasyonlar yöntemlerden herhangi birisi ile saptanmaktadır.

DNA dizi analizi mutasyonları saptamak için en dolaysız ve güvenilir yöntemdir. Bilinen mutasyonlar yanında, önceden bilinmeyen mutasyonların saptanmasına izin verir. Ancak, 1-2 gün içerisinde sonuç vermesi ve fazla manüplasyon işlemlerinin olması nedeniyle rutin uygulanan bir yöntem değildir. Genellikle diğer moleküler test sonuçlarını doğrulama ve araştırmalar için kullanılmaktadır (35).

DNA strip testleri, katı fazda ters hibridizasyon esaslı yöntemlerdir. Inno-LiPA RIF TB (Innogenetics, Ghent, Belgium), GenoType MTBDR/MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) ve REBA MTB-MDR(YD Diagnostics, Korea) gibi farklı ticari kitler bulunmaktadır. Kullanım kolaylığı nedeniyle en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemde dirençten sorumlu genler biyotinle işaretli primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilir, ardından işaretlenmiş PCR ürünleri denatüre edilerek nitroselüloz şerit üzerine yerleştirilmiş özgül problarla (vahşi tip ve mutant problar) hibridize edilir. Oluşan hibridler alkelen fozfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat eklenerek saptanır. Elde edilen bant paternlerine göre test edilen mikroorganizmanın duyarlı veya dirençli olduğu belirlenir. Bu testler *M. tuberculosis* izolatlarında RIF direncine neden olan mutasyonların çoğunluğunu, INH direncine neden olan mutasyonların büyük bir kısmının tespit edilmesini sağlamaktadır. Yapılan birçok çalışmada da referans yöntemlerle uyumlu olarak bulunmuştur (6,33).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, 2008-2013 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarında TB ön tanılı hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 55 *M. tuberculosis* kompleks suşu ile yapılmıştır. Suşların primer antitüberküloz ilaç duyarlılıkları önce BACTEC MGIT 960 sistemiyle belirlendikten sonra INH ve RIF duyarlılıkları moleküler bir yöntem olan REBA MTB-MDR testi ile araştırılmıştır. Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 25 Aralık 2012 tarihli ve 02 sayılı etik kurul izni alınmıştır.

3.1. Örneklerin İşlenmesi

Balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL) gibi steril olmayan veya steril şartlarda alınmayan örnekler homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden sonra; beyin omurilik sıvısı (BOS), periton-plevra sıvısı, biyopsi materyali gibi steril vücut örnekleri de dekontamine edilmeden, bakteri yoğunluğunu arttırmak için soğutmalı satirfujde 3000g'de 15-20 dk santrifuj edildi ve işleme alındı (5).

3.1.1. Homojenizasyon – Dekontaminasyon - Konsantrasyon işlemi

Klinik örneklerin dekontaminasyon ve homojenizasyonu için N-Asetil -L-Sistein (NALC) + Sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi hazır ticari kit (Mycoprosafe Dekontaminasyon ve Konsantrasyon kiti, Salubris A.Ş., İstanbul) kullanıldı. Klinik örnek, içinde 40mg NALC ve 4 mm çapında cam boncuklar bulunan, 50 ml'lik polipropilen, dibi konik, burgulu kapaklı steril tüplere (Falkon tüpü) aktarıldı ve üzerine klinik örneğin miktarı kadar NaOH (%4'lük) ve trisodyum sitrat (0.1 M, %2.94) karışımı ilave edildi. Miktarı 10ml'den fazla olan örnekler için karışımı ilave etmeden önce tüpler 3000g'de 15 dk santrifuj edildi ve üst sıvı dezenfektan içeren bir kaba döküldükten sonra kalan 5ml'lik örnekten işleme devam edildi. Örnek + NALC-NaOH karışımı içeren tüpler 30 sn geçmeyecek şekilde vortekslendi. Tüpler oda ısısında, 15dk bekletildi. Süre tamamlandığında nötralizasyon amacı ile falkon tüpünün 50ml işaretine kadar 0.067 M fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edilip, dekontaminasyon işlemi durduruldu. Fosfat tamponu ilave edilmiş tüpler, bakteri

yoğunluğunu arttırmak için soğutmalı satirfüjde 3000g'de 15-20 dk santrifüj edildi. Süpernatant, içinde dezenfektan içeren bir kaba boşaltıldı. Elde edilen sediment 1-2ml fosfat tamponu ile süspanse edildi Elde edilen işlemlenmiş örnek süspansiyonu mikroskopik inceleme ve kültür için kullanıldı. Tüm işlemler biyolojik güvenlik kabininde yapıldı (5,38).

3.2. Direkt Mikroskopik İnceleme

Örneklerden direkt ve homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi sonrası olmak üzere ikişer adet yayma preparat hazırlandı. Direkt yayma için örnekler öze veya pipet kullanılarak bir miktarı lama transfer edildi. Yoğunlaştırılmış yayma; homojenizasyon-dekontaminasyon-konsantrasyon işlemleri uygulanan örneklerin sedimentinden bir damla alınıp, bir lam üzerinde ince tabaka halinde (1.5-1.5 cm) yayıldı. Preparatlar biyolojik güvenlik kabininde kurumaya bırakıldı. Örneklerden hazırlanan preparatlar Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak mikroskopik inceleme yapıldı (38).

3.2.1. Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) Yöntemi

Hazırlanan yayma preparatlar alevden üç kez geçirilerek fiks edildi. Boyama ızgarasına yerleştirilen preparatlar karbol fuksin ile kaplandı. Buhar çıkıncaya kadar lam alttan yavaşça kuruma ve kaynamaya izin vermeden aralıklı ısı ile 3-5 dk ısıtıldı. Preparatlar soğumaya bırakıldı ve su ile yıkandı. %3'lük asit-alkol ile renk akmayana kadar yaklaşık 2dk yıkanarak dekolorizasyon işlemi uygulandı. Preparatlar su ile yıkandı ve zıt boya olarak metilen mavisi ile 20-30 sn boyandı. Preparatlar tekrar su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Her boyamada bir negatif kontrol (*Escherichia coli*), bir pozitif (*M.tuberculosis*) kontrol boyamaya dahil edildi (5,38).

Boyanan preparatlar, immersiyon objektifiyle, x1000 büyütmede ortalama 300 alan gezilerek değerlendirildiler. Bunun için, lamın uzun kenarı boyunca birbirine paralel en az 3 hat incelendi. Metilen mavisiyle mavi renkte boyanan zeminde, karbol fuksin ile kırmızı boyanan ince basillerin saptanmasıyla, aside dirençli basil (ARB) pozitif olarak değerlendirildiler (38).

3.3. Kùltür (İzolasyon)

Tüberküloz kuşkuu hastalardan alınan, çeşitli klinik örnekler MGIT sistemi ve LJ besiyerinde (Becton Dickinson, USA) üretici firma önerilerine uygun olarak kùltürü yapıldı. Tüm inokulasyon işlemleri biyolojik güvenlik kabininde yapılmıştır.

3.3.1. Lövenstein-Jensen Besiyerinde Kùltür İşlemi

Tüm örneklerden LJ katı besiyerine 0.2 ml ekim yapıldı ve örneğin besiyeri yüzeyine yayılması sağlandı. Ekim yapılan besiyerleri kapakları gevşek şekilde etüvde 1-2 gün yatık konumda, daha sonra kapakları sıkılarak, dik konumda 37 °C'de CO₂'li ortamda inkübe edildi. Haftada bir gün üreme kontrolü yapıldı. Kuşkuu kolonilerden yayma preparat hazırlandı ve EZN yöntemi ile boyanarak incelendi. ARB pozitif bulunan kolonilerin tür düzeyinde tanımlanması yapıldı. Üreme olmadığı takdirde 8 haftanın sonunda kùltür sonucu negatif olarak değerlendirildi (5,38).

3.3.2. BACTEC MGIT 960 Sisteminde Kùltür İşlemi

MGIT sisteminde besiyeri olarak kullanılan tüplere (Mycobacterium Growth Indicator Tube, MGIT 7ml) ekimden önce zenginleştirici ve antimikrobiyal olarak Oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC) + PANTA çözeltisi hazırlandı. PANTA solüsyonu sulandırıldıktan sonra antibiyotik konsantrasyonları şu şekilde; Polimiksin B 50 ünite/ml, Azlosilin 10µg/ml, Nalidiksik asit 20 µg/ml Trimetoprim 5.0 µg/ml, Amfoterisin B 5.0 µg/ml elde edildi. Çeşitli antibiyotikleri içeren bu çözelti kùltür işleminden önce, besiyeri şişelerinin ağzı %70'lik alkolle silinerek, her tüpe 0.8 ml eklendi. Tüplere daha sonra işlenmiş örneklerden 0.5 ml ekim yapıldı. Tüpler inkübasyon ve üreme takibi için firma önerilerine göre MGIT cihazına yerleştirildi.

MGIT sisteminde kullanılan tüpler Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dip kısımlarında oksijene duyarlı rutenyum metal kompleksi içeren silikon içermektedir. Kullanılan besiyerlerinde herhangi bir üreme olmadığında oksijen varlığına bağlı olarak silikon tabakaya gönderilen UV ışınına karşı floresans oluşmazken mikobakteri ve diğer mikroorganizmalar ürediğinde oksijenin kullanılması

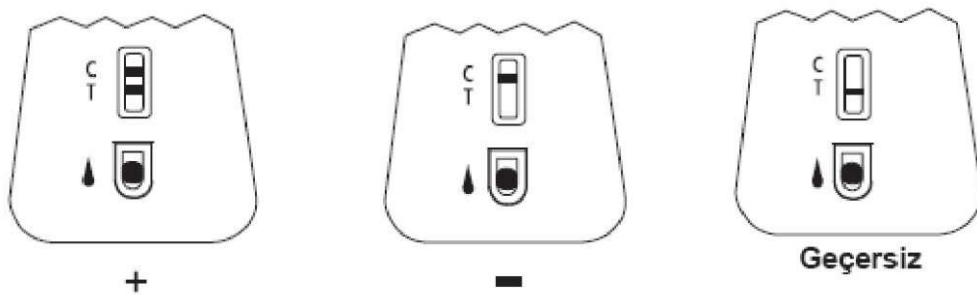
sonucunda gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresans vermekte ve oluşan floresans miktarı üreme indeksi olarak değerlendirilmektedir.

Cihazda üremenin varlığına ve oluşan floresansa bağlı olarak pozitif sinyal alınan MGIT tüpünden preparat hazırlandı ve EZN yöntemi kullanılarak boyama yapıldı, üreyen mikroorganizmaların ARB olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca aynı tüpten kanlı agar plağına da kontaminasyon kontrolü için ekim yapıldı. ARB pozitif bulunan ve kontamine olmayan tüplerden TBc ID testi ile tanımlama yapıldı. Altı hafta sonunda cihazda üreme sinyali bulunmayan örnekler negatif kültür olarak sonuçlandırıldı (5,38,39).

3.3.3. TBc ID Testi

TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test), yayma sonuçları pozitif kültürlerin MGIT tüplerinden alınan *M. tuberculosis* kompleks'in kalitatif tespiti için kullanılan immünokromatografik hızlı bir testtir. Bu test *M.tuberculosis* kompleks'e özgü mikobakteriyel bir antijen olan MPT64'ü tespit eder.

Pozitif sıvı besiyerlerinden, TBc ID test cihazına 100 µl eklendi ve reaksiyonu tespit etmek için 15 dk beklendi. 15 dk'nın sonunda okuma penceresinde iki çizgi (kontrol "C" + test "T") olan izolatlar pozitif olarak kabul edildi, okuma penceresinde tek çizgi (C) olan izolatlar negatif olarak kabul edildi ve kaydedildi. Okuma penceresinde kontrol "C" konumunda pembe-kırmızı çizgi görülmezse veya arka plan rengi test yorumunu engellerse test geçersiz sayıldı. Geçersiz izolatların TBc ID testi tekrar edildi (40,41). (Şekil 1)



Şekil 1. TBc ID testi, pozitif, negatif ve geçersiz sonuçlar

3.4. BACTEC MGIT 960 Sistemi İle Duyarlılık Testi

MGIT SIRE kiti kültürde izole edilen *M.tuberculosis*'i test etmek için 4-13 günde sonlanan nonradyometrik bir duyarlılık testidir. Kullanılan besiyerleri BBL MGIT 7 ml MGIT tüp mikobakterilerin üremesini ve saptanmasını sağlayan modifiye Middlebrook 7H9 besiyerini içerir. Katı besiyerinde veya MGIT tüpünde üremiş saf kültürden inokulum hazırlanabilir. Dört adet antibiyotikli (S,I,R,E) ve bir adet kontrol tüpü (K) hazırlanır. Üretici firma önerilerine göre test yapıldıktan sonra antibiyotik duyarlılık testi (AST) set taşıyıcısına uygun sırayla (K, S, I, R, E) yerleştirilir. Bundan sonra artık inkübasyon da, üreme kontrolü de cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir. Kontaminasyon kontrolü için de kanlı agara ekim yapılır. Antibiyotik içeren tüpün floresansı kontrol tüpünün floresansı ile karşılaştırılır. Antibiyotik içeren tüp ve üreme kontrol tüpü arasındaki relatif üreme oranı, bilgisayar yazılım algoritmaları tarafından yorumlanır; sonuçlar veri rapor formlarında otomatik olarak listelenir.

Antibiyotik stok solüsyonlarının hazırlanması için, MGIT SIRE kiti olarak, liyofilize halde üretici firma tarafından sağlanan antibiyotik şişelerinin kapağı alkollü pamuk ile silindi. Her antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su eklendi ve tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Liyofilize haldeki antibiyotiklerin dilüsyon şeması ve MGIT 7 ml besiyerindeki final konsantrasyonları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. MGIT liyofilize antibiyotiklerinin dilüsyon şeması ve 7 ml'lik MGIT tüpteki final konsantrasyonları

Liyofilize antibiyotik	Sulandırım (steril distile su)	Sulandırıldıktan sonraki ilaç konsantrasyonu	MGIT tüpe eklenen miktar	MGIT tüpteki final konsantrasyon
SM	4 ml	83 µl /ml	100 µl	1.0 µl /ml
INH	4 ml	8,3 µl /ml	100 µl	0.1 µl /ml
RIF	4 ml	83 µl /ml	100 µl	1.0 µl /ml
ETB	4 ml	415 µl /ml	100 µl	5.0 µl /ml

Her suş için 5 adet 7 ml MGIT tüpü hazırlandı. İlk tüp kontrol tüpü olacak şekilde sırasıyla SM, INH, RIF ve ETB şeklinde işaretlendi. Her birine aseptik şartlarda 0.8 ml MGIT SIRE Supplement (Becton Dickinson, USA) (Oleic acid, dextros, catalase, bovine albumin, polyoxethylene stearate) eklendi. Aseptik koşullar

altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solusyonlarından 100'er µl alınarak daha önce işaretlenmiş olan uygun tüplere eklendi. Kontrol tüpü hazırlamak için yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan inokulumdan 0.1 ml alınarak 10 ml steril serum fizyolojik içinde 1/100 dilüe edildi. Bu süspansiyondan 0.5 ml, ilaç konulmamış kontrol tüpüne ekim yapıldı. İlaçlı tüplere ise inokulumdan 0.5 ml eklendi. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak AST seti ile cihaza yüklendi (38,39).

3.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Antibiyotik içeren tüplerin değerlendirmesi kontrol tüpünde Üreme İndeksi 400 Growth Unit'e (GU) ulaşıldığında yapıldı. Antibiyotik içeren tüplerde üreme gözlenmesi durumunda bakteri o antibiyotiğe dirençli kabul edildi. Kontrol tüpünde 4 günden önce 400 GU üreme gözlenmesi kontaminasyon varlığı veya bakteri miktarının fazlalığı şeklinde yorumlandı. Bu durumda ilgili izolat için antibiyogram tekrarı yapıldı. On üç günden sonra üreme gözlenmeyen (<400 GU) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirilerek ilgili izolatın subkültürü yapılarak veya LJ'de üremelerinden antibiyogram tekrarı yapıldı (38,39).

3.4.2. Katı Besiyerinden İnokulum Hazırlanması

LJ besiyerinde üretilen ve 14 günden eski olmayan suşlar, steril bir öze ile, 8-10 adet cam boncuk içeren 4 ml Middlebrook 7H9 Broth (BBL, Difco) besiyerine alındı. Bu işlem sırasında katı besiyeri alınmamasına ve bakteri bulanıklığının 1 McFarland standardını (10^7 cfu/ml) geçmesine dikkat edildi. Bakteri süspansiyonunu homojenize etmek amacıyla 2-3 dk vortekslendi. Süspansiyon 20 dk beklemeye bırakıldı. Üstte kalan kısım başka bir steril tüpe aktarıldı. Sedimentin alınmamasına dikkat edildi. Tekrar 15 dakika bekletilerek, üstte kalan kısım başka bir steril tüpe aktarıldı. Bu süspansiyon 0.5 McFarland standardına ayarlandı. Süspansiyondan 1 ml alınarak 4 ml steril serum fizyolojik ile 1/5 dilüsyon yapıldı ve inokulum olarak kullanıldı (38).

3.5. İlaç Direncinin Moleküler Yöntemle Saptanması

Bu amaçla çalışmamızda revers hibridizasyon esasına dayalı, DNA strip teknolojisi ile hazırlanan ticari bir ürün olan REBA MTB-MDR kullanılmıştır. Bu

testle RIF ve INH ilaçlarına karşı oluşan mutasyonların bir kısmını tespit etmek mümkündür. Testin aşamaları; kültür ortamında elde edilen ve direnç geni araştırılacak her izolat için PCR ile çoğaltma işlemi gerçekleştirildi. Takiben dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri nitrosellülöz stripler üzerinde bulunan dirençten sorumlu gen bölgesine ait vahşi ve mutant dizileri içeren proplar ile hibridizasyona bırakıldı (Tablo 2). Hibridizasyon sonrası mutant dizilere bağlanma durumu (bant oluşumu) direnç varlığı olarak yorumlandı (42).

REBA MTB-MDR Kit İçeriği:

Türe özgü proplarla kaplı membran stripleri

PCR Premix: Kullanıma hazır

Pozitif/ Negatif kontrol: Kullanıma hazır

DNA extraction solüsyon, 8-MOPP: Kullanıma hazır

MTB-MDR Primer karışım: Primer nükleotid karışımı. Kullanıma hazır

AP konjugat: Konsantre konjugat. Dilüe edilerek kullanılır

NBT/BCIP stok solüsyon: Konsantre substrat. Dilüe edilerek kullanılır

DS: Denatürasyon sıvısı. Kullanıma hazır

HS: Hibridizasyon sıvısı. Kullanıma hazır

CDS: Konjugat dilüsyon sıvısı. Kullanıma hazır

WS: Yıkama sıvısı. Kullanıma hazır

SS: Boyama solüsyonu. Substrat dilüenti içermektedir.

Tablo 2. Reverse blot hibridizasyon testinde kullanılan probalar (33)

Prob	Sekans (5'-3')	WT ve MT Yerleşimi
Myc	GACGTCGTCGCCACCATCGA	Mikobakteriyel prob
MTB	AAACATGTCGGCGAGCCC	<i>M. tuberculosis</i> prob
<i>rpoB</i> WT1	AGCCAGCTGAGCCAATTC	<i>rpoB</i> kodonları 509-514 WT
<i>rpoB</i> WT2	ATGGACCAGAACAACCCG	<i>rpoB</i> kodonları 515-520 WT
<i>rpoB</i> WT3	CCGCTGTCGGGGTTGACC	<i>rpoB</i> kodonları 521-525 WT
<i>rpoB</i> WT4	TTGACCCACAAGCGCCGA	<i>rpoB</i> kodonları 524-529 WT
<i>rpoB</i> WT5	CTGTCGGCGCTGGGGC	<i>rpoB</i> kodonları 530-534 WT
<i>rpoB</i> MT1	CTGTTGGCGCTGGGGC	<i>rpoB</i> kodon 531 (TCG-TTG)
<i>rpoB</i> MT2	AAATGTCGGCGCCGGGGCC	<i>rpoB</i> kodon 533 (CTG-CCG)
<i>rpoB</i> MT3	TTCATGTACCAGAACAACCCG	<i>rpoB</i> kodon 516 (GAC-TAC)
<i>katG</i> 315 WT	CACCAGCGGCATCGAG	<i>katG</i> kodon 315 AGC WT
<i>katG</i> 315 MT	ATCACCACCGGCATCGAG	<i>katG</i> kodon 315 (AGC-ACC)
<i>inhA</i> 15UPS WT	CGCGGCGAGACGATAGG	<i>inhA</i> UPS -15 WT
<i>inhA</i> 15UPS MT	CGCGGCGAGATGATAGG	<i>inhA</i> UPS -15 (CAT)
<i>inhA</i> 8UPS WT	AAAGATAGGTTGTCGGGGTGACT	<i>inhA</i> UPS -8 WT
<i>inhA</i> 8UPS MT	GACGATAGGCTGTCGGGG	<i>inhA</i> UPS -8 (T-C)
<i>ahpC</i> WT1	GCCGATAAATATGGTGTGATATCA	<i>ahpC</i> -60, -38 WT
<i>ahpC</i> WT2	CCTTTGCCTGACAGCGACTT	<i>ahpC</i> -38, -18 WT
<i>ahpC</i> WT3	CACGGCACGATGGAATGTC	<i>ahpC</i> -17, +2 WT
<i>ahpC</i> WT4	GCAACCAAATGCATTGTCCGC	<i>ahpC</i> +3, +23 WT
<i>ahpC</i> WT5	TTTGATGATGAGGAGAGTCATGC	<i>ahpC</i> +24, +44 WT

*UPS: Upstream promotor sekans; MT: Mutasyon; WT: Vahşi (Wild) tip

3.5.1. DNA İzolasyonu

Steril bir öze ile LJ besiyerindeki koloniden bir parça alındı. 1 ml steril distile su içinde çözülüp 1dk vorteks ile karıştırıldı. 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant tamamen atıldı. 1ml steril distile su içinde resuspanse edilip vorteks ile iyice karıştırılarak 13000 rpm'de 10dk santrifüj edildi. Süpernatant tamamen atıldı ve 400-500 µl steril distile su içinde resuspanse edilerek ve vorteks ile iyice karıştırılarak kaynama ısısına gelmiş su banyosunda 10 dk bekletildi ve oda ısısında 13000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Üst fazdan DNA alınıp başka temiz bir tüpe aktarıldı. Süpernatandan 5 µl alınarak direkt PCR da kullanıldı (42). Hemen çalışılmayan örnekler için süpernatant başka bir tüpe aktararak -80 °C'de saklandı.

3.5.2. PCR Amplifikasyonu

PCR master miksi PCR laboratuvarı temiz oda bölümünde aşağıdaki gibi hazırlandı ve örnekler örnek işleme odasında misklere eklendi (Tablo 3). PCR amplifikasyonu termal döngüde (Creacon T-Cy) Tablo 4'de verilen protokole göre gerçekleştirildi.

Tablo 3. PCR ana karışımı (master mix) oranları

Reaktif	Miktar (1 tüp için)
2x PCR Premix	25 µl
REBA MTB-MDR Primer mixure	4 µl
Distile su	16 µl
Örnek	5 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 4. PCR protokolü

Predenatürasyon	94°C	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	15 döngü
Bağlanma	60 °C	30 saniye	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	45 döngü
Bağlanma	54 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

Negatif kontrol hazırlanırken PCR miksi içine örnek yerine 5µl steril distile su kullanıldı. Pozitif kontrol için kitin içinden çıkan pozitif kontrol kullanıldı (42).

3.5.3. Reverse Blot Hibridizasyon Yöntemi

Öncelikle su bazlı orbital çalkalayıcı 50 °C'ye ayarlandı. HS ve WS solüsyonları cihaza yerleştirildi. Bu solüsyonlar kullanılmadan önce HS 50 °C, WS 60 °C'ye getirildi. PCR ürününün denatürasyonu için 45 µl DS ile 45 µl PCR ürünü örneklerin çalışılacağı kuyucuklarda pipetlenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Örneklerin konulduğu kuyucuklara dikkatlice önceden ısıtılmış 1ml HS konuldu ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı ve hibridizasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Bir pens yardımıyla her bir örnek için bir strip alındı ve striplerin işaretli ucu numaralandırıldı. Stripler dikkatlice kuyucuklara yerleştirildi. Stripler yerleştirilirken marker line kısmı yukarıda olacak şekilde

kondu ve tamamen sıvıya batmış olmaları sağlandı. Tray, su bazlı orbital çalkalayıcıda 50 °C'de 60-80 rpm'de 30 dk çalkalanarak inkübe edildi. Hibridizasyon solüsyonu Pasteur pipeti kullanılarak tamamen kuyucuklardan boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 1 ml WS eklendi ve 10 dk 60°C'de inkübe edildi. İşlem iki kez tekrarlandı.

Yıkama işlemi sona ermeden önce 1 µl AP konjugat solüsyonu 1:2500 oranında CDS içerisinde dilüe edilerek hazırlandı. Bu basamaktan itibaren oda sıcaklığında çalışıldı. Yıkama solüsyonu tamamen boşaltıldı. Kuyucuklardaki striplerin üzerine 1 ml sulandırılmış AP konjugat solüsyonu eklendi ve 30 dk çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası konjugat dökülerek boşaltıldı ve her bir strip 2 kez çalkalanarak 1ml CDS solüsyonu ile membran stripler yıkandı. Daha sonra CDS solüsyonu uzaklaştırıldı ve önceden hazırlanmış NBT/BCIP/SS, her bir strip üzerine 1 ml eklendi ve çalkalamadan 5 dk bant oluşumu takip edilerek inkübe edildi. Bant oluşma işlemi stripler iki kez distile su ile yıkanarak sonlandırıldı. Son olarak, stripler kuyucuklardan alındı, kurutma kağıdının arasında kurutuldu ve değerlendirme aşamasına geçildi (42).

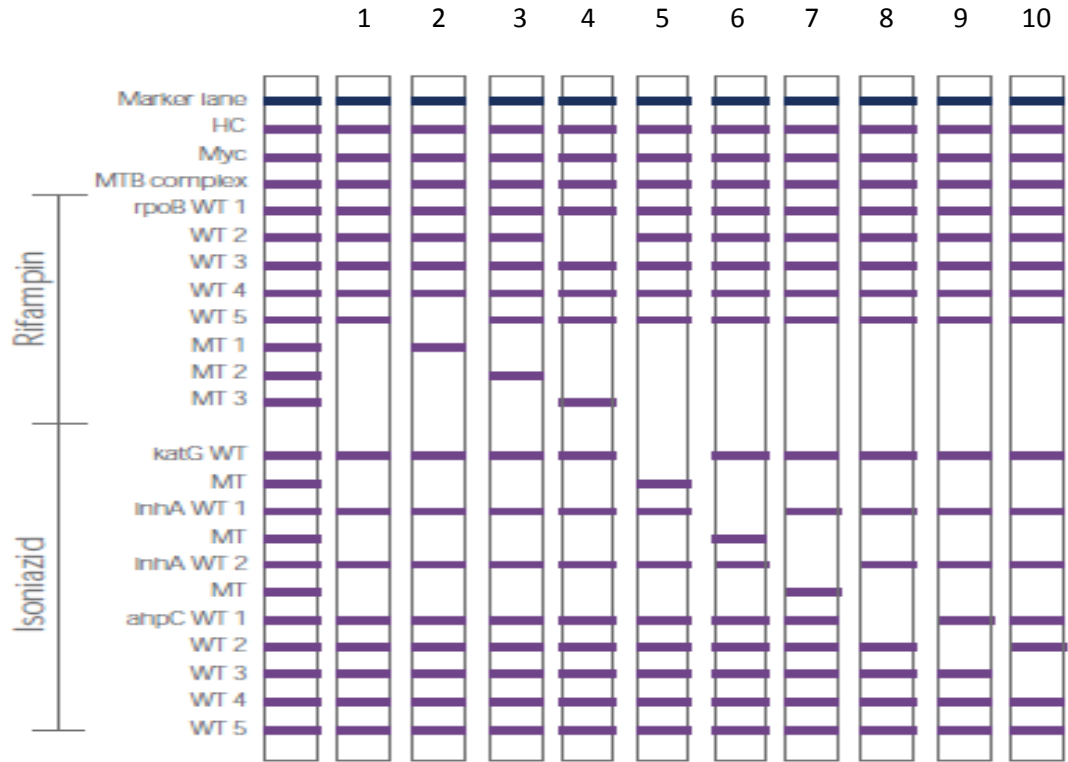
3.5.4. Sonuç Değerlendirme

Çalışmanın kabul edilebilir olması için aşağıdaki koşulların sağlanması gerekmektedir (42). Oluşan bantların yorumu;

- 1) Marker line: Stribin en üst çizgisini gösterir.
- 2) HC: Strip üzerinde konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun verimliliğini göstermektedir. Bu bandın oluşması gerekmektedir.
- 3) Myc bandı: Herhangi bir mikobakteri genotipi varsa oluşur.
- 4) *M. tuberculosis* kompleks bandı: *M. tuberculosis* kompleks üyelerinden oluşan amplikonların varlığında band patterni oluşur. Bu bölgede band oluşmamışsa test edilen bakteri *M. tuberculosis* kompleks'e ait değildir ve bu sistemle değerlendirilemez.
- 5) Herbir WT bandı: İlgili gen bölgelerini (*rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*) göstermektedir. Wild tip bölgesinde oluşan bandlar duyarlılığı, mutasyon bölgelerinde oluşan bandlar ilaç direncini belirlemektedir. Wild tip

bölgesinde bant gözlenmeyen herhangi bir pattern çalışılan örneğin dirençliliğini göstermektedir.

- 6) *rpoB*, *katG*, *inhA* MT bandları: Örnek, RIF ve/veya INH'e dirençli ise herhangi bir mutant bölge bandı oluşur. Herhangi bir vahşi tip bölge oluşmaz ise de örnek dirençlidir (Şekil 2, Tablo 5).



Şekil 2. REBA MTB-MDR örnek test stripleri (42)

Tablo 5. REBA MTB-MDR örnek test striplerinin yorumlanması (42)

Prop		Strip									
Rifampin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
rpoB	WT1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WT2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	WT3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WT4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WT5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	M1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	M2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	M3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
İzoniazid											
katG	WT	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	M	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
InhA	WT1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	M1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	WT2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	M2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	WT1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ahpC	WT2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	WT3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	WT4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	WT5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Yorum		RIF ^S	RIF ^R	RIF ^R	RIF ^R	RIF ^S	RIF ^S	RIF ^S	RIF ^S	RIF ^S	RIF ^S
S:Duyarlı		INH ^S	INH ^S	INH ^S	INH ^S	INH ^R	INH ^R	INH ^R	INH ^R	INH ^R	INH ^R
R:Dirençli											

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler MSEXcel ve SPSS for Win. Ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programı kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı. Ortalama değer “aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma” olarak gösterildi. İki yöntemin karşılaştırılmasında duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) hesaplandı. Analiz sonuçları % 95 güven aralığında (% 95 CI: Confidence Interval) değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Suşların Genel Özellikleri

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2008-2013 yılları arasında gönderilen klinik örneklerden kültür sonucu elde edilen 55 *M. tuberculosis* kompleks izolatı çalışmaya dahil edildi. Aynı hastadan sadece bir örnek değerlendirmeye alındı. Çalışmaya alınan hastaların 37'si (%67.3) erkek, 18'i (%32.7) kadın, 48'i (%94.1) yeni tanı almış, 3'ü (%5.9) daha önce tanı konulmuş ve tedavi almış hastalardı. Dört hastanın klinik bilgilerine ulaşılamamıştır. Hastaların yaş ortalaması 53±20.2 (19-90 yaş)'dir (Tablo 6). Çalışmaya alınan suşların çoğunluğu solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir (%83.6) (Tablo 7).

Tablo 6. Çalışmaya alınan 55 suşun ait olduğu hastaların yaşlara göre dağılımı

Yaş grupları	Sayı	Yüzde (%)
16-25	7	12.8
26-35	8	14.6
36-45	5	9
46-55	7	12.8
56-65	12	21.8
65+	16	29

Tablo 7. Çalışmaya alınan suşların örneklere göre dağılımı

Hasta örneği	Sayı	Yüzde (%)
Balgam	41	74.6
BAL	6	11
Doku	3	5.4
Plevra sıvısı	2	3.6
Periton sıvısı	2	3.6
BOS	1	1.8

Klinik örneklerden EZN yöntemi ile ARB varlığı değerlendirildikten sonra iki farklı kültür yöntemi ile (LJ + MGIT) incelendiler. Kültürde üreyen örneklerde MGIT sisteminde ve REBA MTB-MDR testi ile INH ve RIF direnci araştırıldı. Çalışılan testlerin kalite kontrolü *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşuyla yapıldı. Çalışılan tüm örneklerin test sonuçları Tablo 8'de görülmektedir.

Tablo 8. Çalışılan hastaların tüm test sonuçları

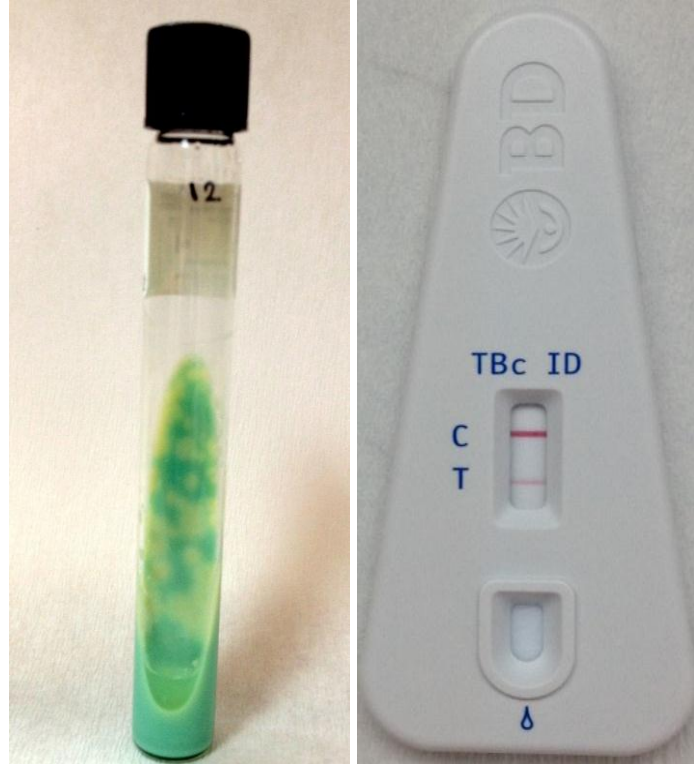
No	ÖRNEK TÜRÜ	EZN	TEDAVİ DURUMU	DUYARLILIK			
				MGIT		MTB-MDR	
				INH	RIF	INH	RIF
1	BALGAM	-		S	S	S	S
2	BALGAM	-		S	S	S	S
3	BALGAM	-		S	S	S	S
4	BALGAM	+	H	S	S	S	S
5	BALGAM	-	H	S	S	S	S
6	ABSE	-	H	S	S	S	S
7	BALGAM	+	H	S	S	S	S
8	BALGAM	-	H	S	S	S	S
9	BALGAM	-	H	S	S	S	S
10	BALGAM	-	H	S	S	S	S
11	DOKU	+	E	S	S	S	S
12	BAL	-	H	S	S	S	S
13	BALGAM	-	E	S	S	S	S
14	BAL	-	H	S	S	S	S
15	BALGAM	-		S	S	S	S
16	BALGAM	-	H	S	S	S	S
17	BALGAM	-	H	S	S	S	S
18	BAL	-	H	S	S	S	S
19	BALGAM	-	H	S	S	S	S
20	BALGAM	-	H	S	S	S	S
21	BALGAM	-	E	S	S	S	S
22	DOKU	-	H	S	S	S	S
23	BALGAM	+	H	S	S	S	S
24	BALGAM	-	H	S	S	S	S
25	BALGAM	-	H	S	S	S	S
26	PARASENTEZ	-	H	S	S	S	S
27	BALGAM	+	H	S	S	S	S
28	BALGAM	-	H	S	S	S	S
29	BALGAM	-	H	S	S	S	S
30	BAL	-	H	S	S	S	S
31	BAL	-	H	S	S	S	S
32	TOROSENTEZ	-	H	S	S	S	S
33	BALGAM	-	H	S	S	S	S
34	TOROSENTEZ	-	H	S	S	S	S
35	BALGAM	-	H	S	S	S	S
36	BALGAM	-	H	S	S	S	S
37	BALGAM	+	H	S	S	S	S
38	BALGAM	-	H	S	S	S	S
39	BOS	-	H	R	S	-	-
40	BALGAM	-	H	R	S	R	S
41	BALGAM	+	H	S	R	S	R
42	BALGAM	-	H	R	R	S	S
43	BALGAM	-	H	R	S	S	S
44	BALGAM	-	H	R	S	S	S
45	BALGAM	+	H	R	S	S	S
46	BALGAM	-	H	R	S	S	S
47	BALGAM	-	H	R	R	S	S
48	BALGAM	-	H	R	S	S	S
49	BAL	-	H	R	R	R	S
50	BALGAM	-	H	S	S	-	-
51	BALGAM	+	H	S	S	R	S
52	BALGAM	+	H	S	S	-	-
53	PARASENTEZ	-	H	S	S	-	-
54	BALGAM	+	H	S	S	-	-
55	DOKU	-	H	S	S	-	-

Çalışmaya alınan suşların gönderildiği kliniğe göre dağılımı Tablo 9’da verilmiştir. Kültürde üreme saptanan 55 örneğin 12’sinde (%21.8) EZN boyama yöntemi ile ARB pozitif saptanmıştır. Bunların 11’i balgam 1 tanesi doku örneğidir.

Tablo 9. Çalışmaya alınan suşların kliniklere göre dağılımı

Klinikler	Sayı	Yüzde
Göğüs Hastalıkları	41	74.6
Dahiliye	7	12.8
Genel Cerrahi	2	3.6
İnfeksiyon	2	3.6
Nöroloji	2	3.6
Pediyatri	1	1.8

Klinik örneklerin hepsinde MGIT kültür yöntemi ile üreme saptanmıştır. Bu örneklerin 49’u (%89) LJ besiyerinde de üretilirken, 6 örnek yalnızca MGIT ile üretilmiştir. LJ’de görülen tüm üremeler koloni morfolojisi ve pigment oluşumu açısından incelendiğinde *M. tuberculosis* kompleks ile uyumluydu (Resim 1; Açık krem renkli, kuru, ekmek kıvrıntısı görünümünde koloniler).Yapılan EZN boyama ile ARB pozitifliği doğrulandı. MGIT besiyerlerinden, TBc ID test ile suşların hepsi *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlandı.



Resim 1. *M. tuberculosis* kompleks’in LJ besiyerinde görünümü ve TBc ID test ile tanımlanması

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

İlaç direnç dağılımını değerlendirdiğimizde 7 suşda tek ilaca karşı, 4 suşda iki ilaca, 3 suşda ise üç ilaca direnç tesbit edilmiştir. MGIT yöntemi ile 2008-2013 yılları arasında izole edilen suşların primer antitüberküloz ilaçlara karşı tek tek ve kombine direnç oranları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. İzole edilen 55 suşun primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları

	İlaçlar	Sayı	Yüzde(%)
Tek ilaca direnç	SM	1	1.8
	INH	3	5.5
	RIF	1	1.8
	ETB	2	3.6
	Toplam tek ilaca direnç	7	12.7
İki ilaca direnç	INH+RIF	1	1.8
	INH+ETB	1	1.8
	INH+SM	2	3.6
	Toplam iki ilaca direnç	4	7,2
Üç ilaca direnç	SM+INH+ETB	1	1.8
	SM+INH+RIF	2	3.6
	Toplam birden fazla ilaca direnç	7	12.7

Suşların 41'i (%74.6) primer antitüberküloz ilaca duyarlı bulunmuştur. Her bir ilacın toplam direnç oranları; SM için 6 suş (%10.9), INH için 10 suş (%18), RIF için 4 suş (%7.3), ETB için 4 suş (%7.4) olarak tespit edilmiştir. ÇİD-TB oranı %5.6 (3/55) olarak belirlenmiştir (Tablo 11).

Bu çalışmada 13 (%23.6) olguda primer direnç, sadece SM dirençli bir (%1.8) olguda ise sekonder direnç tespit edilmiştir. Primer ilaç direnci INH için %18, RIF için %7.3, ETB için %7.4, SM için %9.1, sekonder ilaç direnci sadece SM'de %1.8 tespit edilmiştir.

Tablo 11. Her bir ilaç için tespit edilen toplam direnç oranları

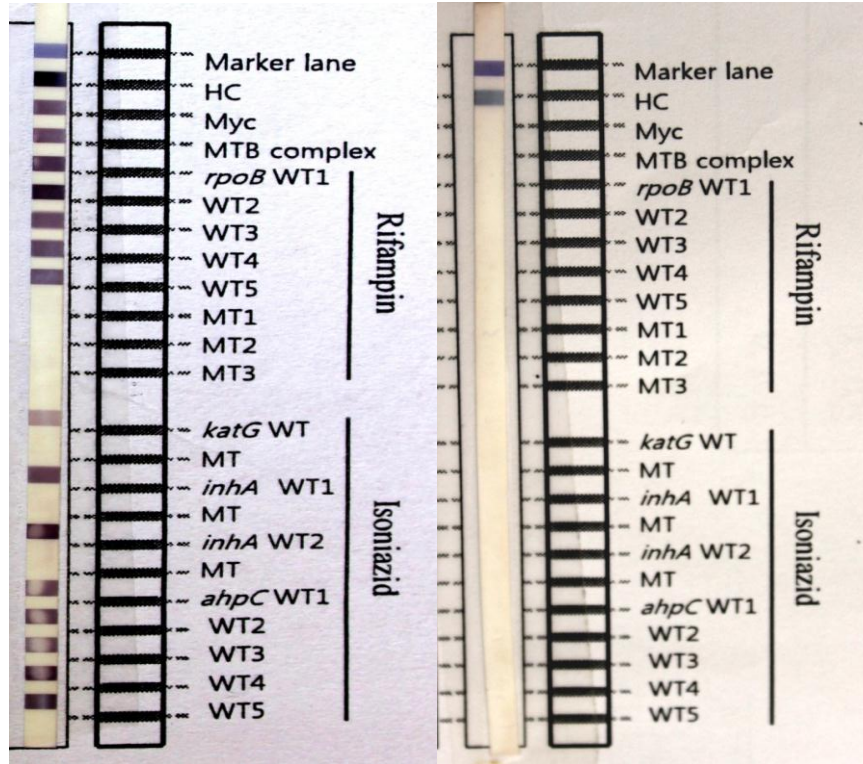
İlaçlar	Direnç	
	Sayı	Yüzde(%)
SM	6	10.9
INH	10	18
RIF	4	7.3
ETB	4	7.4
ÇİD (INH+RIF)	3	5.6

REBA MTB-MDR yöntemi ile ilaç direnci saptamada 6 örnekte DNA amplifikasyonu yetersiz olup soluk boyanma saptandığından dolayı iki testin karşılaştırılmasında bu suşlar dahil edilmemiştir. 49 örnekte INH ve RIF direncini saptamada kullandığımız iki yöntemi birbiriyle karşılaştırdığımızda MGIT’da RIF direnci belirlenen 4 örneğin 3’ünde REBA MTB-MDR ile direnç saptanmadı. Bir örnekte ise her iki yöntemle de direnç saptandı. MGIT ’da 9 INH direnci belirlenen örneğin 7’sinde REBA MTB-MDR ile direnç saptanmadı. 2’sinde her iki yöntemle de direnç saptandı (Tablo 12).

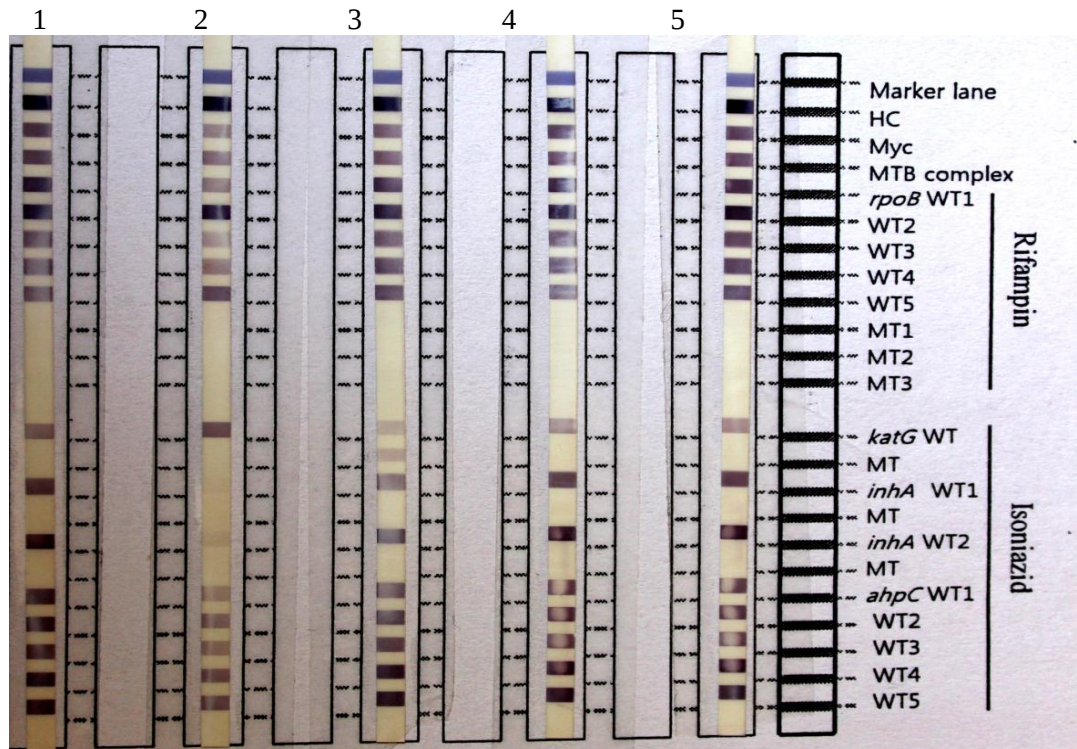
Tablo 12. Direnç saptamada kullanılan iki yöntemin ilaçlara göre dağılımı

	MGIT +		MGIT -	
	REBA +	REBA -	REBA +	REBA -
RİF	1	3	-	45
İNH	2	7	1	39

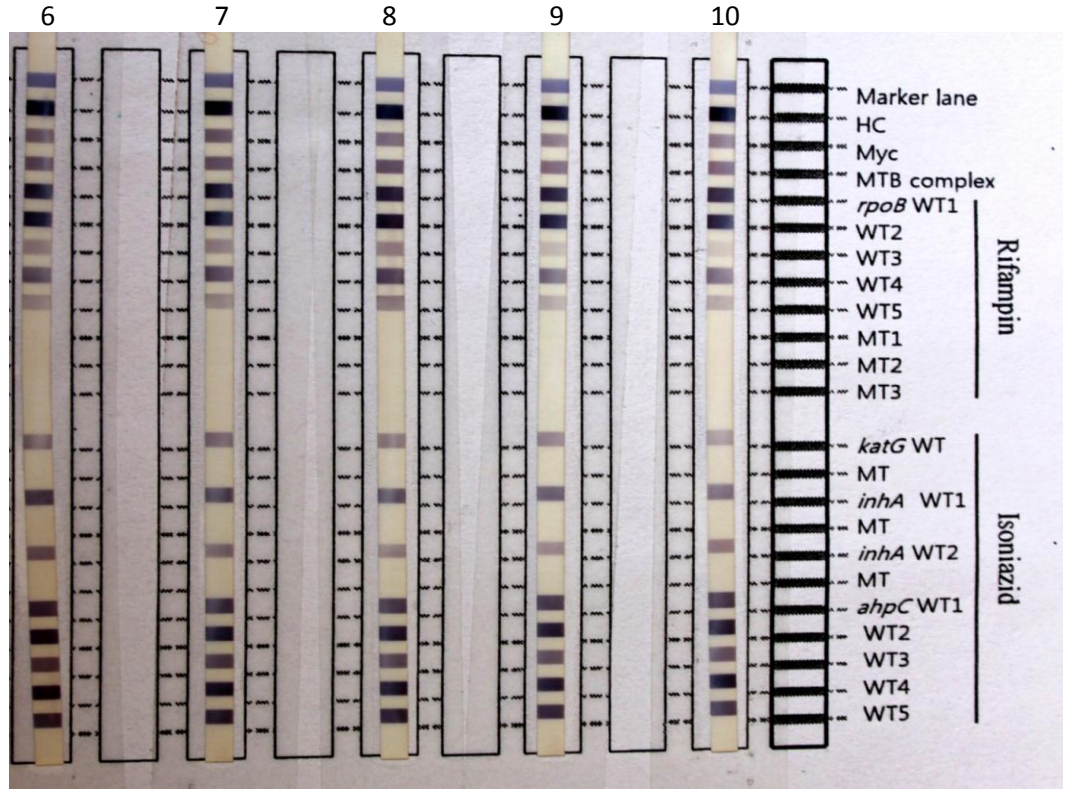
RIF direncini saptamada MGIT ile REBA MTB-MDR karşılaştırıldığında duyarlılık %25 (CI 4.12-79.6), özgüllük %100, PPD %100, NPD %93.7 olarak belirlendi. INH direncini saptamada MGIT ile REBA MTB-MDR karşılaştırıldığında duyarlılık %22.2 (CI 3.47-59.9), özgüllük %97.5, PPD %66.6, NPD %84.7 olarak belirlendi. Çalışmamızdaki kalite kontrol suşunun, negatif kontrolün ve 10 örneğin REBA MTB-MDR test stripleri Resim 2, 3, 4,’de gösterilmiştir. Tablo 13’de fenotipik ve genotipik test sonuçları karşılaştırılmaktadır.



Resim 2. Kalite kontrol suşunun (*M. tuberculosis* H37Rv) ve negatif kontrolün test stripleri



Resim 3. Çalışmamızdaki REBA MTB-MDR test stripleri; **1, 4, 5. stripiler:** RIF+ INH direnci yok, **2. strip:** RIF direnci yok + *inhA* WT1 kaybına bağlı INH direnci, **3. strip:** RIF direnci yok + *katG* mutasyonuna bağlı INH direnci



Resim 4. Çalışmamızdaki REBA MTB-MDR test stripleri; **6, 7, 8, 9, 10. stripler:** RIF+ INH direnci yok

Tablo 13. Çalışılan tüm *M. tuberculosis* izolatlarının REBA MTB-MDR ile hibridizasyon paternleri ve fenotipik dirençleri

MGIT		RIF ^R INH ^R	RIF ^S INH ^S	RIF ^S INH ^R	RIF ^R INH ^S	RIF ^R INH ^R	RIF ^S INH ^R	RIF ^S INH ^S
rpoB	WT1	+	+	+	+	+	+	+
	WT2	+	+	+	+	+	+	+
	WT3	+	+	+	-	+	+	+
	WT4	+	+	+	+	+	+	+
	WT5	+	+	+	+	+	+	+
	MT1	-	-	-	-	-	-	-
	MT2	-	-	-	-	-	-	-
	MT3	-	-	-	-	-	-	-
katG	WT	+	+	+	+	+	+	+
	MT	+	-	+	-	-	-	-
inhA 15 UPS	WT1	+	-	+	+	+	+	+
	MT1	-	-	-	-	-	-	-
inhA 8UPS	WT2	+	+	+	+	+	+	+
	MT2	-	-	-	-	-	-	-
ahpC	WT1	+	+	+	+	+	+	+
	WT2	+	+	+	+	+	+	+
	WT3	+	+	+	+	+	+	+
	WT4	+	+	+	+	+	+	+
	WT5	+	+	+	+	+	+	+
İzolot sayısı		1	1	1	1	2	5	38
Mutasyon Yerleşimi		<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>rpoB</i>	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Mutasyon yok

5. TARTIŞMA

Tüberküloz, modern tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de en önemli sağlık problemlerinden birisidir. DSÖ, 1993 yılında TB konusunda acil durum ilan etmiş ve bütün ülkelerde “Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi”ni (DGTS) önermiştir. Bu stratejide amaçlar; hükümetlerin politik kararlılık göstermesi, balgamın mikroskopik muayenesinin yaygınlaştırılması, gerekli tüberküloz ilaçlarının kesintisiz ve ücretsiz temini, standart kısa süreli tedavi rejimlerini direkt gözetim altında uygulamak ve standart kayıt ve rapor sistemi ile TB kontrol programının değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir (43).

Dünya genelinde TB hastalığının artışı konusunda DSÖ, dört önemli unsur üzerinde durmuştur:

1. Hükümetlerin hastalığı ihmal etmeleri sonucunda TB kontrol sistemleri kötüleşmiş ve hatta birçok yerde kaybolmuştur.
2. Kötü yönetilen veya doğru yaklaşımların uygulanmadığı TB kontrol programları, hastalığın artışı yanında ilaca dirençli tüberkülozun artışına yol açmıştır.
3. TB ve HIV’in birlikte olduğu hallerde, HIV’in endemik olduğu yerlerde TB patlayıcı artış yapmıştır.
4. Nüfus artışı, TB olgularının sayılarında artışa yol açmıştır. Hastalık insidansının yüksek olduğu ülkelere göçlerle gelen TB olguları, sanayileşmiş ülkelerde artış nedenlerinden birisini oluşturmaktadır (44).

DSÖ, 1997 yılından itibaren tüberkülozun kontrolüne dair yıllık rapor yayınlamaktadır. Raporun ana amacı, TB epidemisinin geniş kapsamlı ve güncel bir değerlendirmesini yapmak ve TB tedavi ve kontrolündeki küresel, bölgesel ve ülkeler seviyesindeki ilerlemeyi görmektir.

Tüberküloz tedavisinde 1940’lı yılların sonlarında ilk antitüberküloz ilaç SM’nin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte ilaç direnci de görülmeye başlanmıştır. İlerleyen yıllarda diğer ilaçların da devreye girmesi ile kombine tedavi protokollerine geçilmiş ve bu sayede direnç oluşumunun önüne geçilemese de nöksler önemli miktarda azaltılabilmektedir. Ancak, yetersiz kontrol programları, ilaçların hatalı reçete

edilmesi, kullanım sürelerinin iyi planlanamaması, hasta ilaç uyumsuzluğuna bağlı düşük doz ve sürede ilaç kullanımı, ilaca, tanı merkezlerine ulaşmadaki zorluklar, TB'la savaşta kaynak yetersizliği gibi nedenlerle ilaç direnci giderek artış göstermiştir. İlaç direnci ilk defa, 1992 yılında New York şehrinde TB hastalarının %12'sinin ÇİD-TB'lu olduğu fark edildiğinde büyük bir problem olarak görülmeye başlanmıştır (3).

DSÖ'nün yayınladığı 136 ayrı ülkeden toplanan verilere göre hazırlanan, "Küresel Antitüberküloz İlaç Direnci 2013 Rapor"unda, ÇİD-TB insidansının bugüne kadar rapor edilen en yüksek seviyeye ulaştığı, genel olarak yeni tanı almış olgularda %3.6 (2.1-5.1), önceden tedavi almış olgularda %20.2 (13.3-27.2) oranında karşılaşıldığı bildirilmektedir. En yüksek ÇİD-TB oranları Doğu Avrupa ve Orta Asya ülkelerinde izlenmektedir. Bu ülkelerde yeni vakaların %20'sinde, önceden tedavi almış vakaların %50'sinde ÇİD-TB görüldüğü bildirilmiştir. ÇİD-TB olgularının %9.6'sının aynı zamanda AİD-TB olgusu olduğu görülmüştür (1).

DSÖ'ne göre, bir ÇİD-TB hastasının yalnızca ilaçlarının maliyeti duyarlı bir TB hastasının ilaç maliyetinden 50-200 kat daha fazladır. 2010-2015 yılları arası, 27 yüksek ÇİD-TB olgu yükü olan ülkelerde, 1.3 milyon ÇİD TB vakasının tedavisi için tahmin edilen maliyet 16,2 milyar dolardır. TB, tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen ÇİD-TB'de kür oranları çok düşüktür ve ölümcül olabilir. ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci seçenek ilaçlar daha az etkili, daha çok yan etkiye sahip ve daha pahalı ilaçlardır (4).

DGTS'nin de ÇİD-TB prevalansının yüksek olduğu bölgelerde başarısız olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, bu bölgelerde DGTS'nin başarıyla uygulanmasına ek olarak ilaç duyarlılık testlerinin yapılmasını ve ikinci seçenek TB ilaçlarının kullanılmasını içeren DGTS-Artı (DOTS- Plus) uygulamasına geçilmiştir. DSÖ, daha önce tedavi almış veya ÇİD-TB olma ihtimali bulunan hastalara mutlaka ilaç duyarlılık testlerinin yapılmasını önermektedir. Ayrıca, özellikle HIV'li ve mikroskopisi pozitif hastalara mutlaka moleküler yöntemlerle ilaç duyarlılık testi yapılmasını önermektedir (44,45).

Resmi verilere göre Türkiye, TB insidansının orta düzeyde olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. TB insidansının 1965'de yüzbinde 172, 1980'de yüzbinde

52.2, 1990'da yüzbinde 43.8 olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde 2005 yılından itibaren verem savaş dispanserlerine kayıtlı her bir hastanın verisi bireysel olarak toplanmakta ve analiz edilerek raporlanmaktadır. Verem Savaşı 2012 verilerine göre; 2005 yılında insidans yüzbin nüfusta 26.0, 2006 yılında 25.4, 2007 yılında 25.2, 2008 yılında 23.4, 2009 yılında 22.0, 2010 yılında 20.6'dır. Görüldüğü gibi tüberküloz insidansı hala yüksek olmasına rağmen, yıllar içerisinde düşüş göstermektedir (2,43).

Verem Savaşı 2012 raporuna göre; 2010 yılında ilaç duyarlılık testi yapılan hastaların sonuçları incelendiğinde; %19.5 en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranlarda direncin %13.3 ile INH'e karşı geliştiği görülmüştür. RIF, ETB, SM'e karşı direnç oranları ise sırasıyla %6.8, %5.2, %9.1'dir. ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2.5, önceden tedavi görmüş olgularda %22.8 olarak, toplam %5 olarak saptanmıştır (2).

Türkiye'de TB ilaç direncini ortaya koymak için çok merkezli bir çalışma yoktur. Yapılan çeşitli çalışmalarda direnç oranları farklı belirlenmiştir. Ülkemizde direnç durumunu yansıtan en kapsamlı yazı Yolsal ve ark., 1984-1989 ve 1990-1995 yılları arasında yayınlanmış makalelerden, karşılaştırmalı ilaç direnci analizleri yapmışlardır. 1984-1989 yılları arasına ait primer ilaç direnç oranları INH, RIF, SM ve ETB için sırasıyla %14.4, %5.7, %8.8, %2.2'dir. 1990-1995 arası primer direnç oranları INH, RIF, SM ve ETB için sırasıyla %8.8, %8.9, %10.1, %3.0 olarak bulunmuştur. Sekonder ilaç direnci oranları ise, 1984-1989 arası, INH için %34.1, RIF için %23.1, SM için %24.6, ETB için %13.3 olarak belirlenmiştir. 1990-1995 yılları için, sekonder direnç oranları, INH'da %30.1, RIF'de %31.9, SM'de %17.7, ETB'de %13.7'dir. 1984-1989 arası toplam direnç oranları, INH'da %27.8, RIF'de %22.3, SM'de %22.5, ETB'de %7.8 olarak tespit edilmiştir. 1990-1995 dönemine ait toplam, INH direnci %23.8, RIF direnci %22.1, SM direnci %17.9, ETB direnci %7.7 çıkmıştır. Araştırmacılar, farklı kaynaklarca verilen direnç oranlarının bir homojenlik göstermediğini belirtmişlerdir. Ancak, bulgular her ne kadar tartışmalı olarak değerlendirilse de, Türkiye'de direnç oranlarının gelişmiş ülkelerle kıyaslanmayacak ölçüde yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (46).

Arseven ve ark., Doğu Karadeniz bölgesinde yaptıkları çalışmada, 1985-1990 yılları arasında tespit edilen 1388 hastada INH direnci %29.6, RIF direnci %17.1, SM direnci %23.3 ve ETB direnci %8.8 olarak bulunmuştur. ÇİD-TB oranı ise %9.1'dir. 1993-1994 yıllarında saptanan 333 hastanın INH direnci %34.8, RIF direnci %25.2, SM direnci %29.4 ve ETB direnci %10.5 olarak belirlenmiştir. ÇİD-TB oranı ise %22.5 olarak bulunmuştur (47).

Talay ve ark. 1997-2000 yılları arasında 135'i daha önce hiç tedavi almamış 185 vaka üzerine yaptıkları bir çalışmada, primer ilaç dirençleri INH, RIF, SM, ETB için sırasıyla %8.9, %3.0, %13.3, %2.2 olarak bulunmuştur. Sekonder ilaç direnç oranları ise INH için %22.2, RIF için %22.2, SM için %18.5, ve ETB için %13.9 olarak bulunmuştur. Toplam ilaç direnç oranları ise INH'da %12.7, RIF'de %8.5, SM'de %14.8, ETB'de %5.3'dür. ÇİD-TB açısından incelendiğinde ise primer ÇİD-TB oranı %2.9, sekonder ÇİD-TB oranı %16.6, toplam oran ise %6.8 olarak bulunmuştur (48).

Durmaz ve ark. 2000 yılında 88 yeni tüberküloz hastası üzerine yaptıkları bir araştırmada, tek ilaca direnç oranlarını INH için %10.22, RIF için %0.0, SM için %7.95, ETB için %4.54 olarak bulmuşlardır. Yalnızca iki hastada (%2.26) birden fazla ilaca direnç tespit etmişlerdir (28). Durmaz tarafından çeşitli bölgelerden yapılan çalışmaların analizinde, ÇİD-TB oranının yeni hastaların izolatlarında %1.3-4.8, tedavi görmüş tüberküloz hastalarında ise %4.4-16.6 arasında bir dağılım gösterdiği belirtilmiştir (49).

Isparta yöresinde Yaylı ve ark., 2003 yılında 108 *M. tuberculosis* izolatında yaptığı çalışmada, %83.3'ünün tüm ilaçlara duyarlı olduğunu ve INH, RIF, SM, ETB dirençleri sırasıyla %13.88, %1.85, %1.85 ve %0.92 olarak belirlemişlerdir. ÇİD-TB oranını ise %2.77 olarak saptamışlardır (50).

Dündar ve ark. 2007 ve 2008 yıllarını kapsayan çalışmasında, 157 *M. tuberculosis* izolatının duyarlılık testleri MGIT 960 sistemi ile test edilmiştir ve %66'sı tüm primer ilaçlara duyarlı bulunmuştur. Tek ilaca direnç oranı her iki yılda %21, ÇİD-TB oranı 2007'de %5, 2008'de %4 oranında bulunmuştur. İki yılın ortalaması olarak en az bir ilaca direnç oranı %34; tek başına INH direnci %13, SM

direnci %4, ETB direnci %3 bulunurken, tek başına RIF direnci gösteren izolata rastlanmamıştır (51).

Uçar ve ark., Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Referans ve Araştırma Laboratuvarına gönderilen ülkemizin 7 farklı bölgesinde yer alan 62 ildeki hastalara ait örneklerden izole edilen 1091 suşun direnç oranlarını retrospektif olarak değerlendirmiştir. Suşların %14.2'si test edilen ilaçlardan en az birisine dirençli bulunmuştur. INH, RIF, SM, ETB'e karşı direnç oranları sırasıyla %12.3, %10.1, %15.8 ve %6 olarak saptanmıştır. ÇİD-TB oranı %10 olarak belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek ÇİD-TB oranı %39.3 ile Akdeniz bölgesinde saptanırken, en düşük oran %4.3 ile Ege bölgesinde saptanmıştır. Birbirine benzer coğrafi ve demografik özellikler gösteren bu iki bölge arasındaki farklılığın, bölgelerden elde edilen suş sayıları arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği sonucuna varmışlardır (52).

Öz ve ark'nın 2004-2011 yılları arasında Eskişehir'de yaptıkları çalışmada 284 suş incelenmiş ve tüm izolatların %17.6'sı test edilen antitüberküloz ilaçlardan en az birine dirençli olarak tespit edilmiştir. Toplam ilaç direnci INH için %14.4, RIF için %7, SM için %2.1, ETB için %2.8 ve ÇİD-TB oranı %4.6 olarak bildirilmiştir (53).

Artan ve ark., 2009-2012 yılları arasında 275 örnekte yaptıkları çalışmada suşların %74.5'ini primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı , %25.5 'ini ise en az bir ilaca dirençli bulmuştur. Antitüberküloz ilaçların toplam direnç durumu INH, RIF, SM, ETB için sırasıyla %14.9, %6.2, %9.5, % 7.9 olarak saptanmıştır (54).

Çalışmalara bakıldığında Türkiye'de direnç oranları INH için %12.7 ile %29.6, RIF için %0 ile %22.3, SM için %1.9 ile %29.4, ETB için %0.9 ile %10.5 arasında bildirilmektedir. Türkiye'de saptanan direnç oranlarının farklı değer aralıkları, hasta sayıları, seçilmiş hasta grupları, çalışmaların yapıldığı bölge ve zaman dilimi ile kullanılan çalışma yöntemlerinin farklı olmalarının bir sonucu olabilir.

Bu çalışmada ilaç duyarlılığı fenotipik yöntem olan MGIT sistemi ile test edilmiştir. MGIT sistemi tam otomatize ve kolay uygulanabilir olması, 4-13 gün gibi kısa sürede sonuç verebilmesi açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Uzun

dönemde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda MGIT sistemi ile alınan sonuçlar referans yöntemlerle alınan sonuçlar ile uyumlu bulunmuş, bu sistem CLSI tarafından fenotipik antitüberküloz ilaç duyarlılık testleri için önerilen testler arasında bildirilmiştir (34,55,56).

Çalışmamızda test edilen 55 izolatın 41'i (%74.6) primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı, 14'ü en az birine dirençli (%25.4) bulunmuştur. Her bir ilacın toplam direnç oranları; INH için %18, RIF için %7.3, SM için %10.9, ETB için %7.4 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda en yüksek ilaç direnci INH için belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda genel olarak INH ve SM dirençlerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu durumun INH ve SM'nin tedavi ve profilakside en fazla kullanılan ilaçlar olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Dirençte görülen artış her yeni TB vakasının primer antitüberküloz ilaçlara dirençli olma olasılığının arttığı anlamına gelmektedir. Tedavi planlanırken bunun dikkate alınması gerekmektedir. Bu çalışmadaki INH direnç oranı geçmişte bildirilmiş oranlara benzer olmakla birlikte Verem Savaşı 2010 verilerine (%13.3) göre Türkiye ortalamalarının üstünde çıkmıştır. Diğer ilaçların direnç oranları ise Türkiye ortalamalarına yakın bulunmuştur.

Bu çalışmada 13 (%23.6) olguda primer direnç, sadece SM dirençli bir (%1.8) olguda ise sekonder direnç tespit edilmiştir. Primer ilaç direnci INH için %18, RIF için %7.3, ETB için %7.4, SM için %9.1, sekonder ilaç direnci sadece SM'de %1.8 tespit edilmiştir. İlaç kullanan hastalarda direncin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada sekonder ilaç direncinin düşük olması tedavi alan hastaların sayısının az olması ile açıklanabilir. ÇİD-TB oranı çalışmalarda uyumlu olarak %5.6 olarak belirlenmiştir.

TB basilinin saptanmasının ve kültürde üretilmesinin ardından mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevi öncelikle tedavide ilk seçenek olan primer ilaçlara karşı duyarlılık testi yapılmasıdır. Her ne kadar geliştirilen fenotipik yöntemler *M. tuberculosis* kompleks suşlarının üreme ve ilaç duyarlılık testleri zamanını oldukça azaltmış olsa da hala ilaç direncinin belirlenmesi için gerekli sürenin kısaltılmasına ihtiyaç vardır. DSÖ, özellikle ilaç direnci olma ihtimali yüksek olan olgularda, moleküler hızlı ilaç duyarlılık testlerini önermektedir. Bu sebeple son yıllarda

mikobakterilerin tür tanımlanması ve ilaç duyarlılıklarının hızlı tespiti için birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir. Moleküler teknikler bir iş günü içinde *M. tuberculosis* kompleks suşlarının tanısını ve ilaç direncinin tahmin edilmesini sağlamaktadır (6,34,49).

M. tuberculosis'in ilaç direncinin moleküler temeli yeni hızlı tanısal testlerin ortaya çıkarılmasını olanaklı hale getirmiştir. Kullanım kolaylığı nedeniyle en çok tercih edilen moleküler yöntemlerden birisi katı faz hibridizasyon yöntemidir. Bu yöntem ile bir yüzeye bağlanmış mutasyonlara özgü probler kullanılarak, amplifiye edilen bakteri kromozomundaki ilaç direncine yol açan değişimler saptanabilmektedir. Inno- LiPA RIF TB ve GenoType MTBDR/MTBDRplus DNA strip testleri ticari olarak temin edilen hızlı testler olup, multipleks PCR (wild tip ve spesifik mutasyona uğramış suşları ayırımını yapan) ve ters hibridizasyon esasına dayanmaktadır (6). Inno- LiPA RIF TB testi son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu test ile sadece *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonların varlığı değerlendirilebilmektedir. Birinci kuşak GenoType MTBDR testi *rpoB* ve *katG* gen bölgelerindeki nokta mutasyonlarının varlığını tespit edebilmektedir. Bu test *rpoB* geninin 81 bp'lik "hot spot" bölgesindeki en sık ortaya çıkarılan kodon 516, 526, 531'deki dört farklı mutasyonu ve *katG* gen bölgesi kodon 315'deki iki farklı mutasyonu tespit edebilmektedir. Bu sebeple Genotype MTBDR testi RIF ve INH'e karşı direnci aynı anda tespit edebilme avantajına sahiptir. Genotype MTBDR yönteminin bir üst versiyonu olan Genotype MTBDRplus yöntemiyle, RIF direncini belirleyen *rpoB* bantlarının sayısı artırılarak testin RIF direncini belirleme duyarlılığı arttırıldığı gibi, INH direncini belirlemek için *inhA* gen bölgesini içeren bant paternleri de DNA striplerine yerleştirilmiştir. Bu sayede ikinci kuşak GenoType MTBDRplus tekniği ile düşük ve orta düzey INH direncine neden olan *inhA* gen bölgesindeki mutasyonları da saptanabilmektedir (6,24,57).

DNA strip testlerinden en yenisi REBA MTB-MDR ticari kitidir. Diğer kitlerden farklı olarak bu testte *rpoB*, *katG*, *inhA* promotor bölgesine ek *ahpC* intergenik bölge analizine imkan vermektedir. Bu test, *rpoB* geninin 81 bp'lik "hot spot" bölgesindeki 531,533,516 üç farklı mutasyonu ve *katG* gen bölgesindeki en sık rastlanan kodon 315'deki bir mutasyonu, *inhA* promotor bölgesindeki iki mutasyonu tespit edebilmektedir. Bu test diğer srip testlerinden farklı olarak 526. kodondaki iki

mutasyon yerine 533. kodondaki mutasyon probunu içermektedir. Çünkü 526. kodon oldukça polimorfizm göstermektedir ve 533 kodondaki mutasyon genellikle fenotipik duyarlılık testleri ile kaçırılan klinik olarak önemli düşük düzey RIF direnci ile ilişkilidir (33,58)

Hillemann ve ark 103'ü ÇİD-TB ve 40 INH ve RIF duyarlı toplam 143 suş ile yaptıkları çalışmalarında DNA sekans analizi ve Genotype MTBDR testini kıyaslamışlar, 103 ÇİD izolatın 102'sinde *rpoB* gen bölgesinde bir mutasyona rastlamışlardır. En sık kodon 531'de direnç paterni saptanmıştır. 103 örneğin %88.4'ünde *katG* kodon 315'de direnç görülmüştür. Duyarlı suşların hiç birinde mutasyon paterni bulunmamıştır. Genotype MTBDR'nin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla RIF için %99, %100; INH için %88, %100 olarak bulmuşlardır (59).

Çavuşoğlu ve ark. proporsiyon metodu ile 37'si ÇİD-TB 41 RIF dirençli bulunan izolatlar üzerinde Genotype MTBDR testini sekans analizi ile karşılaştırmışlardır. RIF dirençli izolatların, %53.7'sinde bu yöntemle mutasyon problemleriyle hibridizasyon gözlenmiştir. 41 RIF dirençli izolatın 17'sinde (%41.5) en az WT *rpoB* problemlerinden birinde negatif sinyal gözlenmiştir. En sık rastlanan mutasyon kodon 531'de (%56.1) görülmüştür. İki RIF dirençli izolat Genotype MTBDR ile RIF duyarlı olarak tespit edilmiştir. 41 izolatın 39 tanesinde RIF direncini tespit eden Genotype MTBDR yönteminin, RIF direncini belirleme oranı %95.1 olarak bulunmuştur. 37 INH dirençli izolatın 27'sinde (%73) kodon 315'de mutasyon tespit edilmiştir. Bu izolatlardan sadece 31 tanesi yüksek düzey INH direnç paterni taşıdığından dolayı, Genotype MTBDR yönteminin yüksek düzey INH direncini belirleme oranı %87.1 (27/31) olarak tespit edilmiştir (60)

Miotto ve ark. 2002-2005 yılları arasında İtalya'da yaptığı çalışmada, proporsiyon metodu ile 139 ÇİD-TB, 37 bir veya çok ilaca dirençli ve 30 duyarlı izolatta Genotype MTBDR yöntemini test etmiştir. Bu yöntemin duyarlılığı, RIF, INH direnci ve ÇİD-TB suşlar için sırasıyla %91.5, %67.1, %69.8 olarak, özgüllüğünü ise yine aynı sırayla, %99.3, %100, %99.3 olarak hesaplanmıştır (6) .

Aslan ve ark., MGIT 460 sistemi ile RIF direnci saptanan 1, INH direnci saptanan 15 ve ÇİD-TB saptanan 10 *M. tuberculosis* suşunda Genotype MTBDR yöntemini test etmişlerdir. RIF'e dirençli izolatların %36.3 *rpoB* bölgesinde 531.

ve %9.1 516. kodonda mutasyon bulunduğu gözlenmiştir. %36.4 WT hibridizasyon probunda hibridizasyon gözlenmemesi ile ortaya çıkarılan mutasyonlar da mevcuttur. İzolatların %81.8'ini Genotype MTBDR yöntemiyle RIF'e dirençli olarak tespit etmişlerdir. INH dirençli izolatların %64'ü doğru olarak tespit edilmiştir. Bu izolatların %56'sında katG T1 mutasyon probunda, S315T1 mutasyon tipini taşıdığı saptanmıştır. Genotype MTBDR testi ile fenotipik duyarlılık testi arasındaki uyum oranı RIF için %81, INH için % 64 olarak belirlenmiştir (61).

Güney'in 2011 yılında Bactec 460 yöntemiyle testini karşılaştırdığı çalışmada, Genotype MTBDR'nin RIF dirençli ve ÇİD suşlar için duyarlılığı %100, özgüllüğü %100 olarak tespit edilmiştir. INH direnci belirlemek için ise duyarlılığı %78.6 ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır (62).

Genotype MTBDR yönteminin RIF direncini belirlemede büyük bir duyarlılığa sahip olduğu ancak INH direncini belirlemede bazı dezavantajları olduğu ve INH direncine neden olan farklı gen bölgelerini de (düşük düzey dirençten sorumlu) içerecek şekilde bir yapılanmanın, testin duyarlılığını ve güvenilirliğini daha da arttıracak düşünülmemektedir. Nitekim Hillemann ve ark. yaptığı çalışmada, 75 ÇİD, 50 duyarlı toplam 125 suшта Genotype MTBDR ve Genotype MTBDRplus testleriyle direnç araştırmışlardır. Duyarlı 50 suшта her iki test tarafından WT problemleri gösterilmiş ve mutasyon saptanmamıştır. 75 ÇİD suşun 65 (%86.7)'inde her iki testin sonuçları DNA sekans analizi ve fenotipik DST ile aynı tespit edilmiştir. 74 (%98.7) örnekte her iki test RIF direnci tespit etmiş fakat 1 tane RIF direnci saptanamamıştır, bu örnekteki mutasyonun *rpoB* "hot spot" bölge dışında olduğu bildirilmiştir. Her iki test 65 örnekte INH direncini doğru yakalamıştır. MTBDR testi 3 (%4) suşu INH'e duyarlı tespit etmiştir. Oysa ki MTBDRplus testi bu suşlarda *inhA*'daki mutasyona bağlı olarak INH'e dirençli tespit etmiştir. MTBDR testi 7 (%9.3) suшта INH direncini tespit etmekte yanılmıştır. Bunlardan 2 tanesinde *ahpC* gen mutasyonu gösterilmiştir. Altın standart olarak bilinen konvansiyonel testlere göre değerlendirildiğinde, MTBDR testinin duyarlılığı RIF için %97.8, INH için ise %88'dir. MTBDRplus duyarlılığı INH için %92'dir. Her iki testin özgüllüğü INH için %100 dür. Bu çalışmada eklenen problemlerin INH direncini saptama oranını %3 arttırdığını belirlemişlerdir (63).

Lacoma ve ark. 62 klinik örneğin değerlendirilmesinde Bactec 460 sistemiyle Genotype MTBDRplus yöntemini karşılaştırmıştır. INH ve RIF duyarlılığını sırasıyla %73 ve %91.7 olarak belirlemiştir. INH'deki yanlış negatifliğin çeşitli izolatlarda direncin *katG* bölgesi dışındaki bir bölgeden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Genotype MTBDRplus yönteminde yeni bantların eklenmesiyle testin RIF direncini belirlemede duyarlılığının %8.4, INH direncini belirlemede de %31.4 oranında artış gösterdiği belirtilmektedir (64).

Cho ve ark. tarafından yapılan çalışmada 198'i ÇİD-TB, 17'si RIF dirençli ve 200 duyarlı toplam 492 *M. tuberculosis* izolatında fenotipik yöntem ile REBA MTB-Rifa testi karşılaştırılmıştır. RIF dirençli 215 izolatın 211'i bu test ile dirençli saptanmıştır. Direnç belirlenemeyen 4 suşun 3 tanesinde DNA dizi analizi ile mutasyonların *rpoB* "hot spot" bölgesi dışında olduğu bildirilmiştir. Bu testin duyarlılığı %98.1, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. En sık 531. kodonda ve 516-531. kodonların birlikte görüldüğü mutasyon paternleri tespit etmişlerdir. Bu mutasyon oranlarının Avrupa, Afrika ve Amerika verilerinden biraz yüksek olduğunu ve görülen mutasyon farklılıklarının ırk farklılığına, ülkeler arasında değişik tedavi protokollerine ve hastaların tedaviye uyumuna bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (58).

Bizim çalışmamızda kullanılmış olan REBA MTB-MDR yöntemi ile yapılmış literatürde ulaşabildiğimiz tek çalışma olan Bang H ve ark.'nın çalışmasında 134 ÇİD, 40 sadece INH dirençli, 2 sadece RIF dirençli, 64 duyarlı toplam 240 suş test etmiştir. RIF dirençli 136 izolatın, 132 (%97) tanesinde bu yöntemle direnç tespit etmişlerdir. En sık rastlanan mutasyon kodon 531'de görülmüştür. 104 RIF duyarlı izolatın tamamı da bu testle duyarlı bulunmuştur. 174 INH dirençli izolatın 141'inde (%81) bu yöntemle direnç tespit edilirken çoğunluğunda *katG* geninde kodon 315'de mutasyon tespit etmişlerdir. 10 (%5.8) izolatta sadece *oxyR-ahpC* intergenik bölgede mutasyon saptanmıştır. 66 INH duyarlı suşu bu yöntemle de duyarlı bulmuşlardır. 134 ÇİD suşun 107'sinde direnç, 64 RIF ve INH duyarlı izolatta herhangi bir direnç saptamamışlardır. REBA MTB-MDR testi fenotipik ilaç duyarlılık testi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %79.8, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplanmıştır. Testin INH direncini saptamayı %5.7 ve ÇİD-TB saptamasını %6.8 arttırdığı belirtilmiştir. Artış nedeninin teste *oxyR-ahpC* intergenik

bölge probunun eklenmesi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu testin ÇİD-TB tanısını daha hızlı koymasına için prospektif klinik çalışmaların devam etmekte olduğu bildirilmiştir (33).

Çalışmamıza 1 RIF dirençli, 7 INH dirençli, 3 ÇİD ve 44 tane bu iki ilaca duyarlı toplam 55 suş dahil edilmiştir. 6 suş pozitif hibridizasyon bandı olmasına rağmen, bazı problemlerin renklerinde belirsiz solmalar nedeniyle PCR aşamasında sorun olduğu düşünülüp değerlendirme yapılmamıştır. RIF dirençli 4 izolatın sadece birinde *rpoB* bölgesinde WT3’de negatif hibridizasyon sinyali alınmıştır, mutasyon tespit edilmemiştir. INH dirençli 9 izolatın birisinde *katG* mutasyonu birinde de *inhA* WT1 probunda negatif hibridizasyon sinyali alınmıştır. INH duyarlı bir suшта *inhA* WT1 probunda negatif hibridizasyon sinyali alınmıştır. RIF direncini saptamada MGIT ile REBA MTB-MDR karşılaştırıldığında duyarlılık %25 (CI 4.12-79.6), özgüllük %100, PPD %100, NPD %93.7 olarak belirlendi. INH direncini saptamada ise duyarlılık %22.2 (CI 3.47-59.9), özgüllük %97.5, PPD %66.6, NPD %84.7 olarak belirlendi.

Bizim çalışmamızdaki duyarlılık oranları literatürdekilerden oldukça düşük bulunmuştur. Bunun nedeni bu testlerde sadece yaygın mutasyonların hedeflenmesi ve çalışılan izolat sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışma, Isparta yöresinde yapılan TB ilaç direncini saptamaya yönelik ilk moleküler çalışma olmasından dolayı bölgemizde ilaç direncine neden olan mutasyon paternleri bilinmemektedir. Bu testle saptanan gen mutasyonları dışında veya başka mekanizmalar dirence neden olabilir. Türkiye’de ilaç direncine neden olan mutasyonların ve mekanizmaların belirlenmesi için çok merkezli daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. REBA MTB-MDR testi yeni kullanıma giren bir yöntemdir. Bu yöntemle yapılan çalışma sayısı çok kısıtlıdır. Bu testin güvenilirliğini değerlendirecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızda fenotipik ilaç duyarlılık yöntemi olarak BACTEC MGIT 960 sistemi kullanılmıştır. MGIT 960 sistemi dahil tüm ilaç duyarlılık testlerinde yöntemin validasyonu ve verifikasyonu için sürekli iç ve dış kalite kontrol programları ile denetlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda teknik ve maddi olanaksızlıklar nedeniyle DNA dizi analizi ve ilaç duyarlılık testlerinde altın standart kabul edilen konvansiyonel yöntemlerle direnç tespiti yapılamamıştır. Sonuçların daha doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için bu yöntemlerle birlikte yapılan ve izolat sayısının yüksek olduğu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak hiçbir laboratuvar testi %100 güvenilir değildir. TB tanısında mevcut durum göz önüne alındığında, mikroskopik inceleme, fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemler gibi birden fazla testin kombinasyonu, güvenilir ve doğru sonuçların alınması için gereklidir. Ayrıca ÇİD-TB'nin yaygın olduğu bölgelerde hızlı moleküler duyarlılık testlerinin kullanımı erken tedavi ve bulaşın önlenmesinde faydalı olacaktır. Ancak, hiçbir moleküler yöntemin klasik kültür bazlı ilaç duyarlılık testlerinin yerini tamamen alamayacağı unutulmamalıdır.

ÖZET

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksinde İzoniazid ve Rifampisin Direncinin Yeni Bir Reverse Blot Hibridizasyon Yöntemi (REBA MTB-MDR) ile Hızlı Tanısının Araştırılması

Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarının hızlı tespiti, erken ve uygun tedavinin planlanmasında en önemli basamaktır. REBA MTB-MDR (YD Diagnostics, Korea), klinik izolatlarda *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* gen mutasyonlarının hızlı tespiti için tasarlanan ve ticari olarak temin edilen reverse blot hibridizasyon esaslı bir DNA strip testidir.

Bu çalışmada, fenotipik ilaç duyarlılık testi olan BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) ile INH direnci saptanan 7, RIF direnci saptanan 1, INH + RIF direnci (ÇİD) saptanan 3, bu iki ilaca duyarlı 44 olmak üzere toplam 55 *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatının INH ve RIF direnci ile ilişkili mutasyon tiplerinin REBA MTB-MDR testi ile belirlenmesi ve testin tanısal performansının BACTEC MGIT 960 ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışılan 55 izolatın fenotipik yöntemle 41'i (%74.6) primer antitüberküloz ilaca duyarlı, 14'ü dirençli (%25.4) bulunmuştur. Her bir ilacın toplam direnç oranları; INH için %18, RIF için %7.3, SM için %10.9, ETB için %7.4 ve ÇİD oranı %5.6 olarak tespit edilmiştir.

REBA MTB-MDR MGIT 960 ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde RIF direncini saptamada duyarlılık %25 (CI 4.12-79.6), özgüllük %100, PPD %100, NPD % 93.7 olarak, INH direncini saptamada ise duyarlılık %22.2 (CI 3.47-59.9), özgüllük %97.5, PPD %66.6, NPD %84.7 olarak belirlendi.

Literatürle birlikte değerlendirildiğinde DNA strip testinin, dirençli *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında en yaygın görülen mutasyonların hızlı tespitinde faydalı olabileceği ve uygun tedaviye başlamada hız kazandıracağı kanısına varılmıştır. Ancak bu testin sık görülmeyen mutasyonları belirlemedeki kısıtlılığından ve ilaç direncine neden olan başka mekanizmalardan dolayı rutin klinik laboratuvarlarda konvansiyonel duyarlılık testleri ile beraber kullanılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, ilaç direnci, REBA MTB-MDR, *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*

SUMMARY

Investigation of rapid diagnosis of Isoniazid and Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Clinical Specimens in Suleyman Demirel University using a new Reverse blot hybridization assay, REBA MTB-MDR

Rapid diagnosis of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex is the most important step in planning of early and appropriate treatment. REBA MTB-MDR (YD Diagnostics, Korea) is a commercially available DNA strip test designed for the rapid detection of *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* gene mutations in clinical isolates based on reverse blot hybridization.

The aim of this study was to determine INH and RIF resistance-associated mutation types of 55 *M. tuberculosis* complex clinical isolates using REBA MTB-MDR test and to compare diagnostic performance of REBA MTB-MDR test with BACTEC MGIT 960. Of the study isolates, 7 were resistant only to INH, one was resistant only to RIF, 3 were resistant to both INH + RIF (MDR), while 44 were sensitive to both drugs as determined by BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) phenotypic drug susceptibility test.

Of tested 55 isolates 41 (74.6%) were determined as primary antituberculosis drug-susceptible and 14 were resistant (25.4%) by phenotypic method. The total resistance of each drug ratio was determined as 18% for INH, 7.3% for RIF, 10.9% for SM, 7.4% for ETB and MDR rate was 5.6%. When REBA MTB-MDR was evaluated in comparison with MGIT 960, sensitivity of this method was %25 (CI 4.12-79.6) , specificity was %100, PPV was %100, NPV was % 93.7 for the detection of RIF resistance. For the detection of INH resistance, its sensitivity was 22.2% (CI 3.47 to 59.9), specificity was 97.5%, PPV was 66.6% and NPV was 84.7%.

When considered together with the literature, it is concluded that DNA strip test may be useful in the rapid detection of the most common mutations for resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis* complex and may speed up the start of appropriate treatment. However, the test needs to be used with conventional susceptibility testing in routine clinical laboratories due to limitations in detecting uncommon mutations and other mechanisms leading to drug resistance.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* complex, drug resistance, REBA MTB-MDR, *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*

KAYNAKLAR

1. WHO, Global tuberculosis report 2013 [Internet]. [cited 2014 May 25].
2. Türkiye’de Verem Savaşı 2012 Raporu [Internet]. Ankara; 2013. Available from: <http://tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr>
3. Loddenkemper R, Hauer B. Drug-resistant tuberculosis: a worldwide epidemic poses a new challenge. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Jan;107(1-2): 10–9.
4. Jain A, Dixit P. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? *J Biosci.* 2008 Nov;33(4): 605–16.
5. CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
6. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical strains isolated in Italy. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul;44(7): 2485–91.
7. Barış İ.Y. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. Tüberküloz. İstanbul: AVES Yayıncılık; 2010: 1–17.
8. Almeida Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jul;66(7): 1417–30.
9. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover J.C., Tenover F.C. Medical Microbiology. 9 th edition. Washington DC; 2007: 1224-47
10. Patricia M.T. B&S’s Diagnostic Microbiology. 13 th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2014: 484-512.
11. Ustacelebi S. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 1999: 419-37
12. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Fakülteler Kitapevi; 2000: 439-89.
13. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirol Carlton Vic.* 2010 Apr;15(3): 433–50.
14. Sreedharan A. Immunology of tuberculosis [Internet]. 2013. Available from: <http://www.slideshare.net/dramithsreedharan/immunology-of-tuberculosis>
15. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004 Oct;120(4):213–32.
16. Zhang Q, Sugawara I. Immunology of tuberculosis. *World J Exp Med.* 2012 Aug; 2(4): 70–4.
17. Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI, Ganz T, Lehrer RI, Catanzaro A. Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare. *Infect Immun.* 1992 Nov;60(11): 4720–5.
18. Sugawara I, Udagawa T, Yamada H. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect Immun.* 2004 Mar;72(3): 1804–6.
19. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 May;94(10): 5243–8.

20. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 393–422.
21. Esin S, Batoni G, Pardini M, Favilli F, Bottai D, Maisetta G, et al. Functional characterization of human natural killer cells responding to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Immunology*. 2004 May;112(1): 143–52.
22. Çilli A. Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Ofset Basım; 2003. 163–72.
23. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis*. 1998;79(1): 3–29.
24. Ramaswamy SV, Reich R, Dou S-J, Jasperse L, Pan X, Wanger A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Apr;47(4): 1241–50.
25. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993 Mar;341: 647–50.
26. Köksal F. *Mycobacterium tuberculosis*'te direnç problemi. I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı. Antalya; 2011: 92–4.
27. Çavusoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis*'de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 2.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Ofset Basım; 2003: 369–86.
28. Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, Gunal S, Senoglu A, Evliyaoglu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. *Microbial Drug Resist*. 2003;9(4): 361–6.
29. WHO, Global tuberculosis control, epidemiology, strategy, financing [Internet]. [cited 2014 May 25].
30. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Nov;13(11): 1320–30.
31. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, et al. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1996 Jun 14;272: 1641–3.
32. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12): 4435–8.
33. Bang H, Park S, Hwang J, Jin H, Cho E, Kim DY, et al. Improved rapid molecular diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis using a new reverse hybridization assay, REBA MTB-MDR. *J Med Microbiol*. 2011 Oct;60: 1447–54.
34. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. Pennsylvania: NCCLS document M24-A; 2003.
35. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında direncin belirlenmesinde moleküler yöntemler/son gelişmeler. *ANKEM Derg*. 2010;24(2): 64–70.

36. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Apr;24(2): 314–50.
37. CDC, TB. Report of Expert Consultations on Rapid Molecular Testing to Detect Drug-Resistant Tuberculosis in the United States [Internet]. [cited 2014 May 25].
38. VI. Tüberküloz Sempozyumu/ IX. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. İzmir/Manisa: Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu; 2011.
39. BACTEC MGIT 960 System, User's Manuel. Sparks, Maryland, USA: Becton Dickinson; 2004.
40. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, de Rijk P, Hernández-Neuta I, Del Portillo P, et al. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *J Microbiol Methods.* 2011 Feb;84(2): 255–7.
41. BD MGIT TBc Identification Test, User's Manuel. Sparks, Maryland, USA: BD and Company; 2009.
42. MolecuTech REBA MTB-MDR, User's Manuel. Korea: YD Diagnostics; 2012.
43. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye'de Tüberküloz. *ANKEM Derg.* 2007;21: 76–80.
44. Bilgiç H. Türkiye'de tüberkülozun durumu ve eradikasyon (kontrol) programı. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Ofset Basım; 2003: 18–23.
45. WHO, Treatment of Tuberculosis: guidelines for national programmes [Internet]. [cited 2014 May 26].
46. Yolsal N, Malat G, Dişçi R, Örkün M, Kılıçaslan Z. Türkiye'de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta Analiz. *Klimik Derg.* 1998;11: 6–9.
47. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y, Sepkin C, Kalaycıoğlu A, Özmenoğlu M, et al. Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. *Klimik Derg.* 1995;8(2): 63–7.
48. Talay F, Altın S, Karasulu L, Kümbetli Ş. İstanbul Eyüp Verem Savaş Dispanserinde 1997-2000 yıllarında belirlenen ilaç direnç oranları. *Van Tıp Dergisi.* 2003;10(1): 10–5.
49. Durmaz R. Mycobacterium tuberculosis'de Direnç Sorunu. *ANKEM Derg.* 2005;19(2): 107–10.
50. Yaylı G, Sözen H, Ağalar C. Isparta yöresinde izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2003;33: 24–30.
51. Dündar D., Sönmez-Tamer G. Mycobacterium tuberculosis kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Klimik Derg.* 2009;22(2):52–4.
52. Uçar E, Kılıç A, Ceyhan İ, Yılmaz S, Kılıç S. Ülkemizde yedi farklı bölgesinde 2003-2006 yılları arasında izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının major antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44: 11–9.
53. Öz Y, Aslan M, Akşit F, Durmaz G, Kiraz N. Solunum yolu örneklerinden izole edilen Mycobacterium tuberculosis kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. *ANKEM Derg.* 2012;26(1): 20–4.

54. Artan C, Deniz E, Biraderoğlu H, Atan A, Artan M. Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. *ANKEM Derg.* 2013;27(4): 179–83.
55. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5): 2321–5.
56. Adjers-Koskela K, Katila M-L. Susceptibility Testing with the Manual *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) and the MGIT 960 System Provides Rapid and Reliable Verification of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar;41(3): 1235–9.
57. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10): 3659–64.
58. Cho E, Shamputa IC, Kwak H-K, Lee J, Lee M, Hwang S, et al. Utility of the REBA MTB-rifa(R) assay for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium Tuberculosis*. *BMC Infect Dis.* 2013 Oct;13: 478.
59. 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.
60. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul;44(7): 2338–42.
61. Aslan G, Tezcan S, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında rifampisin ve isoniazid direncinin hızlı tespitinde “Genotype MTBDR” testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2009;43: 217–26.
62. Güney T, Yılmaz M. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında isoniazid ve rifampin direncinin belirlenmesinde Genotype MTBDR yönteminin kullanılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. 2011.
63. Hillemann D, Rüsch-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.
64. 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.