

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
KLİNİK İZOLATLARINDA İLAÇ DİRENCİNİN
MULTİPLEKS REAL-TİME PCR YÖNTEMİYLE
SAPTANMASI

Fatma Nur AKDOĞAN

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2013

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
KLİNİK İZOLATLARINDA İLAÇ DİRENCİNİN
MULTİPLEKS REAL-TİME PCR YÖNTEMİYLE
SAPTANMASI**

Fatma Nur AKDOĞAN

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Zeynep SARIBAŞ**

ANKARA

2013

Anabilim Dalı :Mikrobiyoloji
 Program :Mikrobiyoloji
 Tez Başlığı :Mycobacterium tuberculosis Klinik İzolatlarında İlaç
 Direncinin Multipleks Real-Time PCR Yöntemiyle
 Saptanması
 Öğrenci Adı-Soyadı :Fatma Nur Akdoğan
 Savunma Sınavı Tarihi :10.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/ tezi olarak kabul edilmiştir.

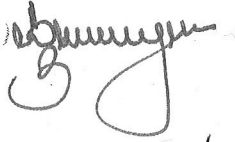
Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Cumhuri Özkuyumcu**
Hacettepe Üniversitesi

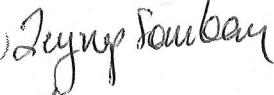
Tez danışmanı: **Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş**
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Prof. Dr. Ayşe Gülşen Hasçelik**
Hacettepe Üniversitesi

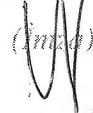
Üye: **Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz**
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Prof. Dr. Murat Özsan**
Ankara Üniversitesi

(İmza) 

(İmza) 

(İmza) 

(İmza) 

(İmza) 

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 (İmza)

Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür 

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasında yardımları, önerileri ve yorumlarıyla destek olan tez danışmanım Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş'a, büyük katkısı, önerisi ve desteği olan Doç. Dr. Alpaslan Alp'e teşekkür ederim.

Doç. Dr. Özgen Eser'e yardım ve yorumlarından dolayı teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Bölümü personelinden Serpil Özyaşar ve Yücel Ocak'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim. İrfan Atmaca'ya DNA izolasyonundaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olan sevgili arkadaşlarım Salime Daş, Leyla Akkaya ve Canan Arslan'a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan annem, babam, ablam ve kardeşime tüm kalbimle teşekkür ederim.

Fatma Nur Akdoğan

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 012D10101001).

ÖZET

Akdoğan, F. N. *Mycobacterium tuberculosis* Klinik İzolatlarında İlaç Direncinin Multipleks “Real-Time PCR” Yöntemiyle Saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013.

Tüberküloz (TB), tüm dünyada hala insan sağlığına en ciddi tehditlerden biridir. İlaç direncinin günden güne artması da bu durumun başlıca nedenlerindedir. İlaça dirençli TB olgularının hızlı saptanması, dirençli suşların bulaşını önlemek ve etkili tedavi rejimine başlanması açısından önemlidir. Bu çalışmanın amacı, *M. tuberculosis* kompleks (MTBK) izolatlarında, rifampisin (RİF), izoniazid (INH) ve etambutol (EMB) direncine neden olan mutasyonların multipleks gerçek-zamanlı PCR ve erime eğrisi analizi ile saptanmasıdır. Bu yöntem kullanılarak, RİF, INH ve EMB direncini saptamak üç PCR uygulamasıyla yaklaşık iki saatte mümkün olabilmektedir. Bu çalışmaya 50 MTBK suşu dahil edilmiştir. Çalışmada bir tüpte RİF direncini saptamak amacıyla, *rpoB* 81bç’lik rifampisin direncini belirleyen bölge için, iki prob kullandık (RpoP1 ve RpoP2). Diğer bir tüpte ise *katG315* ve *inhA* promotor bölgesi için çift işaretli iki prob kullandık. EMB direncini saptamak için ise ayrı bir tüpte bir prob kullandık. Mutasyon çeşitlerini belirlemek amacıyla 16 suşa DNA dizi analizi yapılmıştır. MGIT ve dizi analizi sonucuyla karşılaştırıldığında, real-time PCR’da kullanılan dört proba *rpoB*, *katG* ve *inhA* bölgelerindeki mutasyonların hepsi %100 özgüllük ve %100 duyarlılıkla saptanmıştır. EMB duyarlılığını saptamada ise metodumuz %92 duyarlılık ve %97 özgüllük göstermiştir. Bu yöntem, MTBK suşlarında ilaç direncinin hızlı bir şekilde saptanmasını sağlayan yeni bir yöntemdir. Çalışmamızın diğer bir kısmında, 50 MTBK klinik izolatında pirazinamid (PZA) duyarlılığı MGIT 960 sisteminde çalışılmıştır. Aynı suşların PZA duyarlılığı, 0,5 ml yerine 0,25 ml yarı hacimde inokulum konulmasıyla tekrar edilmiştir. İlk yapılan testin sonuçlarına göre 41 suş PZA dirençli çıkmıştır. Yarı hacimle çalışılan testin sonucunda ise, dirençli olan örneklerden 2 tanesi duyarlı bulunup, kalan 39 tanesi yine dirençli bulunmuştur. MGIT 960 PZA testi %5 farklı pozitif sonuç vermektedir. Sonuçlarımızın desteklenmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, ilaç direnci, multipleks “Real-time PCR”, MGIT 960, rifampisin, izoniazid, pirazinamid, DNA dizi analizi.

Destekleyen kurumlar: H.Ü.B.A.B. Tez Destekleme (012D10101001)

ABSTRACT

Akdogan, F. N. Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates by Multiplex Real-time PCR. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Msc Thesis in Microbiology, Ankara, 2013. Tuberculosis (TB) is still one of the most serious threats to human health around the world. Increasing of the drug resistance is one of the main cause of this state. Early diagnosis of drug-resistant TB cases is urgently needed to prevent the transmission of resistant strains and to optimize treatment regimens. The purpose of this study is to detect the mutations causing resistance to rifampicin (RIF), isoniazide (INH) and ethambutol (EMB) in *M. tuberculosis* complex (MTBC) isolates by using multiplex real-time PCR and melting curve analysis. By using this method, resistance to RIF, INH and EMB can be detected by three PCR assays in just two hours. In this study 50 MTBC strains were included. For detection of RIF resistance we used two probes (*rpoP1* and *rpoP2*) for *rpoB* 81-bp RIF resistance determining region in a tube. For detection of INH resistance, we used two dually labeled probes for *katG315* and *inhA* promoter sides in a tube. For detection of EMB resistance, we used one probe in another tube. For detecting the mutation types, DNA sequencing procedure was performed for 16 isolates. Comparison of the results with MGIT and sequencing data showed that all mutations in *rpoB*, *katG* and *inhA* covered by this four probes were detected with 100% sensitivity and 100% specificity. For detecting EMB resistance, our method showed 92% sensitivity and 97% specificity. This method provided a new way to rapidly detect drug-resistant mutations in MTBC. On the other hand, the susceptibility of 50 clinical isolates of MTBC to pyrazinamide (PZA) was assessed by the MGIT 960 system. Detection of PZA resistance was followed by a repeat testing using a reduced inoculum of 0.25 ml instead of 0.5 ml. According to the first MGIT 960 analysis, resistance was observed in 41 samples. In the reduced inoculum assay, 2 samples turned out to be susceptible and 39 proved to be resistant (5% different results). Further studies are required to confirm our findings.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, drug-resistance, multiplex real-time PCR, MGIT 960, rifampicin, isoniazide, pyrazinamide, DNA sequence analysis.

Supported by: H.Ü.B.A.B. Thesis Grant (012D10101001)

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | ix |
| ŞEKİLLER | xi |
| TABLolar | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Tarihçe | 3 |
| 2.2. Taksonomi | 8 |
| 2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri | 10 |
| 2.4. Tüberküloz | 12 |
| 2.5. HIV-TB İlişkisi | 14 |
| 2.6. Tüberküloz Tanısı | 15 |
| 2.6.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması | 15 |
| 2.6.2. Mikroskopik İnceleme | 16 |
| 2.6.3. Kültür Yöntemleri | 17 |
| 2.6.4. İmmünojenik Tanı Yöntemleri | 21 |
| 2.6.5. Biyokimyasal Testler | 22 |
| 2.6.6. Moleküler Yöntemler | 22 |
| 2.7. Tüberküloz Tedavisi | 29 |
| 2.8. Tüberkülozda İlaç Direnci | 30 |
| 2.9. Antitüberküloz İlaçların Etki ve Direnç Mekanizmaları | 31 |

| | |
|---|----|
| 2.9.1. Rifampisin | 32 |
| 2.9.2. İsoniazid | 33 |
| 2.9.3. Pirazinamid | 33 |
| 2.9.4. Etambutol | 34 |
| 2.9.5. Streptomisin | 35 |
| 2.9.6. Kanamisin, Amikasin, Kapreomisin | 35 |
| 2.9.7. Florokinolonlar | 35 |
| 2.9.8. Rifabutin | 36 |
| 2.9.9. Ethionamid | 36 |
| 2.10. İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi | 36 |
| 2.10.1. Kültüre Dayalı Yöntemler | 37 |
| 2.10.2. Moleküler Yöntemler | 39 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 47 |
| 3.1. MTBK Suşları | 47 |
| 3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar, Besiyerinin Hazırlanması, Suşların Ekimi | 48 |
| 3.3. İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi | 49 |
| 3.3.1. Sıvı Kültür Yöntemi | 49 |
| 3.3.2. “Real-Time PCR” Yöntemi | 52 |
| 3.3.3. DNA Dizi Analizi | 62 |
| 4. BULGULAR | 66 |
| 4.1. MTBK İzolatlarının MGIT 960 ile Saptanan Duyarlılıkları | 66 |
| 4.2. MTBK İzolatlarının Multipleks “Real-Time PCR” Yöntemi ile Saptanan Duyarlılıkları | 69 |
| 4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçları | 75 |
| 5. TARTIŞMA | 77 |
| 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER | 90 |
| KAYNAKLAR | 93 |
| EKLER | |
| Ek-1 Etik Kurul Belgesi | |

SİMGELER ve KISALTMALAR

| | |
|-----------------------|---|
| A | Adenin |
| ARB | Aside dirençli (<i>resistant</i>) basil |
| ATTC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| cfu | <i>colony forming unit</i> |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standart Institute</i> |
| ÇİD | Çok ilaca dirençli |
| DGTS | Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi |
| DNA | Deoksi Ribonükleik Asit |
| dNTP | Deoksinükleotid trifosfat |
| ddNTP | Dideoksinükleotid trifosfat |
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| EMB | Etambutol |
| EST | Erime Sıcaklığı Tepe Değeri |
| FRET | Floresans Rezonans Enerji Transferi |
| G | Guanin |
| GC | <i>Growth Control</i> |
| Gly | Glisin |
| HIV | Human Immuno Deficiency Virus |
| His | Histidin |
| INH | İzoniazid |
| Leu | Lösin |
| LJ | Lowenstein-Jensen |
| Met | Methionin |
| MGIT | <i>Mycobacterium Growth Indicator Tube</i> |
| MGP | Manyetik cam (<i>glass</i>) partikül |
| MİK | Minimum İnhibitör Konsantrasyon |
| <i>M.tuberculosis</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| PCR | Polimeraz Zincir (<i>chain</i>) Reaksiyonu |
| PZA | Pirazinamid |

| | |
|---------------|--|
| Real-Time PCR | Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RİF | Rifampisin |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| S | Sitozin |
| Ser | Serin |
| STR | Streptomisin |
| T | Timin |
| TB | Tüberküloz |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tirozin |
| Val | Valin |
| YİD | Yaygın İlaç Dirençli |

ŞEKİLLER

| Şekil | | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 2.1. | Mikobakterilerin taksonomik ağacı | 8 |
| 2.2. | Mikobakteri hücre duvar yapısı | 11 |
| 2.3. | İzoniazid ve ethionamidin moleküler yapıları | 36 |
| 2.4. | 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi olan ve olmayan polimeraz enzimleriyle real-time PCR uygulaması ve erime eğrisi analizi karşılaştırması | 44 |
| 2.5. | Asimetrik PCR uygulaması ile mutasyonu taşıyan DNA tek sarmalının komplementer zincire göre daha fazla amplifiye edilmesi. | 46 |
| 3.1. | <i>rpoB</i> geni üzerinde problemlerin bağlandığı bölgeler | 56 |
| 3.2. | <i>embB</i> geni üzerinde embBF ve embBR primerlerinin ve TaqMan probunun bağlandığı bölgeler | 57 |
| 3.3. | MTBK suşlarından "in-house" PCR yöntemiyle çoğaltılan gen bölgelerinin agaroz jel elektroforeziyle incelenmesi | 64 |
| 4.1. | Mutant suşlar ve H37Ra'nın erime eğrisi analizindeki görünüşleri | 69 |
| 4.2. | Bazı izolatların real-time PCR sonundaki <i>rpoB</i> erime eğrileri | 71 |
| 4.3. | <i>inhA</i> 15 mutasyonu taşıyan MTBK suşlarının erime eğrileri | 72 |
| 4.4. | <i>katG</i> 315 mutasyonu taşıyan MTBK suşunun erime eğrisi | 72 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.5. | INH dirençli MTBK suşlarının multipleks real-time PCR sonucu elde edilen erime eğrileri | 73 |
| 4.6. | Bazı izolatların real-time PCR sonundaki <i>embB</i> erime eğrileri | 74 |
| 4.7. | <i>rpoB</i> gen bölgesi 531. kodonunda mutasyon sonucu TGC►TTG dönüşümü | 75 |
| 4.8. | <i>inhA</i> promotor bölgesi -15. nükleotidinde mutasyon taşımayan MTBK suşunun DNA dizi analizi | 76 |
| 4.9. | <i>embB</i> 306. kodonunda mutasyon sonucu ATG ►ATC dönüşümü | 76 |
| 4.10. | <i>embB</i> 306. kodonunda mutasyon sonucu ATG ►ATA dönüşümü | 77 |
| 4.11. | <i>embB</i> 306. kodonunda mutasyon sonucu ATG ►GTG dönüşümü | 77 |

TABLOLAR

| Tablo | | Sayfa |
|-------|--|-------|
| 3.1. | MGIT Tüplerine Eklenen İlaç Konsantrasyonları | 51 |
| 3.2. | Real-time PCR’da kullanılan primer dizileri | 55 |
| 3.3. | Real-time PCR’da kullanılan prob dizileri | 56 |
| 4.1. | MTBK suşlarının MGIT 960 ve real-time PCR ile elde edilen ilaç duyarlılıkları | 66 |
| 4.2. | Çalışılan 50 izolatın iki yöntemle elde edilen duyarlılıklarının karşılaştırılması | 67 |
| 4.3. | MTBK suşlarının S.İ.R.E. ve PZA duyarlılıkları | 68 |
| 4.4. | Standart yöntem ve modifiye yöntemin PZA direncinde uyumu ve sonuç farkı | 69 |
| 4.5. | <i>M. tuberculosis</i> H37Ra suşlarının tek proba çalışılan Real-Time PCR testlerinde, problemlerin elde edilen ortalama EST değerleri | 70 |
| 4.6. | ÇİD-MTBK suşlarının H37Ra suşlarının ortalama EST değerlerine göre sapma miktarları | 70 |
| 4.7. | MTBK suşlarının Real-time PCR sonuçlarına göre belirlenen ilaç direncine neden olan mutasyonları | 74 |
| 4.8. | Real-time PCR yönteminin MGIT 960 ve DNA dizi analizine göre özgüllük ve duyarlılığı | 75 |

1. GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTBK)'e bağılı gelişen tüberküloz (TB) hastalığı, insanlık tarihi boyunca ve günümüzde hala enfeksiyöz hastalıklar içinde önemli bir yere sahiptir (1). Son yıllarda giderek artan küresel çabalara rağmen yeni TB olgularının sayısı hızla artmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ü MTBK ile enfektedir (2,3). TB, Türkiye'de de çok önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2012 yılında yayınladığı son raporuna göre, 2011 yılında dünya genelinde 5,8 milyonu yeni tanımlanmış olmakla birlikte 8,7 milyon insan TB hastalığına yakalanmış, bu hastaların 1,4 milyonu hayatını kaybetmiştir (4). Ülkemiz verilerine göre ise TB insidansı, 2000 yılında Verem Savaş Dispanserleri'ne kayıtlı hastalarda hesaplandığında yüz binde 27'dir (4,5). Bu oran, 2011 yılı Türkiye Verem Savaşı Raporu'na göre yüz binde 24'e düşmüştür (7).

Öte yandan hastalığın tedavisinde etkili olan ilaçlar 50 yıldan fazla süredir kullanımda olmasına rağmen, dakikada bir kişi MTBK suşlarıyla enfekte olmakta, her 15 dakikada bir kişi tüberkülozdan ölmektedir. Tedavi edilmediği sürece de aktif tüberkülozlu bir hasta, her yıl 10-15 kişiyi enfekte edecektir (8).

Tüm kontrol programlarına rağmen TB hastalığı dünya üzerinde artış göstermektedir. Buna etken olarak ise HIV ile enfekte kişi sayısındaki artış, sosyal durum bozuklukları, evsiz bireylerin sayısındaki artış, kötüleşen halk sağlığı alt yapı sistemi, sağlık tarama programlarının iyi uygulanamaması, uygunsuz enfeksiyon kontrol programları, hasta bireylere doğrudan gözetimli tedavinin uygulanmaması örnek olarak verilebilir (4,7). Tüberkülozun endemik olduğu bölgelerden göçlerle gelişmekte olan ülkelerde TB vakaları artmakta, gelişmiş ülkelerde ise hastalık tekrar gündeme gelmektedir (9). İlaça dirençli suşlar ise hastalığın kontrolünde başarısızlığa, etkisiz tedavi rejimlerine ve dirençli suşların yayılması gibi problemler neden olmaktadır (10,11). Konvansiyonel fenotipik ilaç duyarlılık testleri, üremeleri oldukça yavaş olan MTBK suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde gecikme olmasına neden olmaktadır. MTBK suşlarının ilaç duyarlılıklarının hızlı tanısı, etkili antitüberküloz tedavisine erken dönemde başlanması ve dirençli suşların yayılmasının önlenmesi açısından gereklidir.

MTBK suşları ilaç dirençlerini, spontan gerçekleşen nokta mutasyonlar sonucu kromozomal DNA'nın değişikliğe uğramasıyla kazanmaktadır (12-15). Antitüberküloz ilaçların pek çoğuna dirence neden olan bu spesifik genlerdeki mutasyon bölgeleri tanımlanmıştır (16). İlaç direncine neden olan mutasyonların bilinmesi, ilaca dirençli TB tanısında moleküler yöntemlerin gelişmesine ışık tutmuş, böylelikle dirençli suşların tanısı erken konulmaya başlanmıştır (17).

Moleküler yöntemler arasında "real-time PCR", hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılığı, kontaminasyon riskinin çok düşük olması ve tekrarlanabilirliği nedenleriyle yaygın olarak tercih edilmektedir (18-25). İlaç direncine neden olan mutasyonların belirlenmesinde başlıca "real-time PCR" yöntemlerinden biri olan TaqMan problemleriyle nükleik asit amplifikasyonunda, her PCR döngüsünün sonunda, prob ve hedef dizinin hibridizasyonu ile bir floresan ışığı oluşmaktadır.

"Real-time PCR" testlerinden çoğu, bir mutasyonu ayırt edebilmek için en az 2 farklı florokromla işaretlenmiş problemlere ihtiyaç duymaktadır. Buna bağlı olarak da test fiyatı oldukça yükselmekte ve "real-time PCR" cihazının da çoklu kanallı olması gerekmektedir (24,25). MTBK suşlarında ilaç direnci mutasyonlarının tanısında bu yöntem başarılı bir şekilde uygulanmıştır (20,26-30). Fakat bu yöntemlerin "real-time PCR" uygulamaları için ilave gereksinimleri vardır. Son zamanlarda birkaç yeni prob temelli erime eğrisi analizi teknolojisi, genotiplendirmeler için geliştirilmiştir. Bunların arasında işaretli problemler, çift işaretli problemler ve moleküler firketelerle (*molecular beacon*) çalışan testler de vardır (6,31,32). Fakat bu yöntemlerden MTBK suşlarında ilaç direncini tanımlamaya yönelik sınırlı miktarda çalışma bulunmaktadır (33,34).

Bu çalışmada, MTBK suşlarında rifampisin, izoniazid ve etambutol ilaçlarına dirence neden olan mutasyonları hızlı bir şekilde tanımlayabilecek düşük maliyetli ve yaygın bir şekilde uygulanabilecek olan Luo ve diğ. (1)'nin önerdiği TaqMan problemleriyle çalışan bir "real-time PCR" yöntemi araştırması yapılmıştır. Rifampisin, izoniazid, etambutol için BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) sıvı kültür sisteminde duyarlılık çalışılmıştır. "Real-time PCR" sonuçları, kültür duyarlılık sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Kültür duyarlılık sonuçları ile "real-time PCR" sonuçları uyumsuz olan izolatlar DNA dizi analizi yapılmıştır. Ayrıca bir

diğer antitüberküloz ilaç olan pirazinamid duyarlılığının ise MGIT’de en doğru şekilde saptanabilmesi için çalışmalar yapılmıştır. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) bir MTBK suşunun ilaç duyarlılığı çalışırken, bütün birinci sıra ilaçların duyarlılığının çalışılmasını önermektedir (35). Birinci sıra ilaçlardan biri olan pirazinamidin de duyarlılığının test edilmesi bu açıdan önem kazanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İnsanlık tarihi kadar eski bir tarihi olan TB hakkında ilk bilgiler Milattan üç bin yıl önce Nil nehri kenarındaki Dra Abu-El Naga isimli kasabada yaşamış olan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kızdaki öğrenilmiştir (36). Milattan bin yıl önce yaşamış olan rahip Nesperehan’ın mumyasında Pott apsesi denilen vertebra tüberkülozu görüldüğü ortaya çıkarılmıştır (36,37). Günümüzden 2,500 yıl önce yaşamış olan Hippocrates’in kitabında “erime, tükenme” olarak tanımlanmış olan tüberkülozun daha çok 18-35 yaşlarındaki kişilerde görüldüğü yazılıdır (37).

TB hastalığının kliniğini ilk olarak Roma İmparatorluğu döneminde hekimlik yapmış olan iki kişiden öğrenmekteyiz (36,38). Aretaus Cappadocian isimli doktor hastaları, şu şekilde tarif etmiştir; “Sesleri kısık, boyunları hafif bükük ve sert; parmakları silindirik fakat eklemleri şiş, bedenleri iyice erimiş olduğu için kemikleri belirginleşmiş, tırnakları eğri, yassılaştı ve kırılabilir; burunları keskin ve silindirik, yanakları belirgin derecede pembeleşmiş, gözleri iyice çukura çekilmiş fakat parlaklığını kaybetmemiş, yüzü kadavra gülüşü haline gelmiş, kol ve bacak kasları erimiş... Kaburgalarının başladığı ve sonlandığı yerler eklemleri net bir şekilde seçiliyor, skapulalar kuşkanadı halini almış.” Dr. Aretaus, intermittant ateş ve terleme ile birlikte, genel bitkinliğin de mevcut olduğuna işaret etmektedir.

Roma döneminin hekimi Bergama’lı Galen, veremi az bulaşıcı bir hastalık olarak niteleyerek, ateş, terleme ve hemoptizi belirtilerini sıralamıştır. Tedavisi içinde “...perhiz ve egzersiz yapmak, seyahat etmek yeterlidir”, demiştir. İlaç önermemiştir.

TB hastalığına birçok isim verilmiştir. İnsanları eriterek öldürdüğü için “tükenme hastalığı” anlamındaki *consumption*, hastaları soldurarak yok ettiği için “beyaz ölüm” veya “beyaz veba” ve pek çok insanın yaşamını sonlandırdığı için de “ölümün kaptanı” (*Captain of the Death*) olarak anılmıştır. Romalılar ise bu hastalığa, hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle balgam atma anlamındaki “*phthisis*” adını vermişlerdir (36-40). Bizim dilimizde ise “ince hastalık” en çok kullanılan tanımıdır.

Üç yüz milyon yıldan beri soyunu sürdüren TB mikrobu, doğada her yerde, örneğin sularda, otlaklarda, çamurda, toprakta otta bol miktarda bulunur. İnsanlarda hastalık yapması sığırların ehlileştirilmesiyle başlamıştır. Büyük baş hayvanları ile yaşamaya başlayan insanlar, hayvanların sütü ve etiyle ilk kez sığır tipi TB basili olan *Mycobacterium bovis* ile karşılaşmışlardır. Önceleri bu türün lenf bezlerinde ve kemiklerde yaptığı TB hastalığı görülmekteydi. İnsanlara bulaşan bu tür, sonradan değişerek en çok akciğerlerde TB hastalığı yapmaya başlamıştır. İnsanlardaki bu türün sonradan değişerek insan tipi TB mikrobu *Mycobacterium humanus* haline geldiği belirtilmiştir (39,40). Ancak yeni yapılan çalışmalarda *Mycobacterium tuberculosis*'in insanlardan sığırlara bulaştığı, insanların bulaştan sorumlu enfeksiyon kaynağı olduğu gösterilmiştir (41,42).

“Beyaz Veba” isimli kitabın yazarı Thomas Domandy veremin ortaya çıkmasında sadece basilin yetmediğini, kötü barınma koşulları, yetersiz beslenme, aşırı nüfus artışı, göç ve hava kirliliğinin de katkısı olduğunu belirtmektedir (36).

TB tarihi hakkında araştırma yapanlar, İsa'nın doğumundan önceki ve sonraki asırlarda tüberkülozun belirli dalgalanmalar yaptığını ortaya çıkarmışlardır. M.Ö. 1500-500; 500-0 yıllarında Nil Nehri vadisinde, iki büyük TB epidemisi olduğunu göstermişlerdir. Bu salgınlarda belirli bir süreç içinde hastalık en yüksek seviyeye çıkmış ve sonradan ani olarak azalmıştır. M.S. 500-1500 yılları arasında Kuzey Amerika'da; 1000-2000 senelere arasında da Avrupa'da tüberküloz epidemisi belirtilmiştir (36-38). Bu tür epidemilerin oluşmasında, bağışıklık sistemi, sosyo-ekonomik olaylar ve hastalığın doğal seyrinin etkisi olmuştur. Bunlar arasında nüfus artışı, göçler, yoksulluk ve sanayi devrimi önemli etkiler göstermiştir.

Tüberkülozun kavite ve skar dokusuna sebep olduğunu gösteren ilk hekim olan Padua Üniversitesinden Giovanni Battista Morgagni (1682-1771), tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğuna inandığı için tüberkülozdan ölenlere otopsi yapmak istememiştir (36).

XIX. yüzyılın başlarında Avrupa nüfusunun %70'inin veremli olduğu biliniyordu. Manchester fabrikalarında çalışan, göçmen İrlandalıların birçoğu genç yaşta veremden ölmüşlerdir (38).

Kırsal alanda yaşamayı tercih eden Amerikan yerlileri, buffalo denilen yabancı sığırlardaki hastalık yapması düşük atipik mikobakterilerin sağladığı bağışıklık sebebiyle vereme tutulmazken, beyazların Avrupa'dan getirdiği gerçek verem mikrobuna bağışıklıkları olmadığı için kısa sürede hastalanmış ve ağır kayıplar vermişlerdir. Aynı durum, Güney Afrika ve Yeni Zelanda'da yaşayan Maoriler'in de başına gelmiştir.

Orta Çağ ve sonrasında "King's Evil" olarak bilinen lenf bezi tüberkülozu, çok yaygın olarak görülmekteydi. İngiltere Kralı Edward VI, Fransa Kralı Charles IX, bu hastalıktan ölmüşlerdir (43).

XIX. yüz yılın sonlarında ve XX. yüzyılda veremli hastaların izolasyonu düşünülerek bunun için dağlık yerlerde sanatoryumlar yapılmaya başlanmıştır. O dönemde fakir olan hastalar kötü koşullarda kalıyorlardı. Zengin olanlar İsviçre'nin Davos ve St. Moritzde şehirlerinde yapılan sanatoryumları tercih etmekteydiler (36-39). Bu sayede, bu ülkede yeni doğmuş olan ilaç sanayi de hızla gelişmişti.

Verem hastalığının tanınması, sebebinin öğrenilmesi ve tedavisinde ileri adımların atılması Paris'teki Necker hastanesinde çalışanlar gibi kendisi de veremli olan Rene Laennec'in çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. Akademisyen, bilim adamı, editör ve çok iyi bir klinisyen olan Laennec, tüberkülozun bütün klinik formlarını gün yüzüne çıkarmıştır. Bu bilim adamı, başta akciğer olmak üzere, karaciğer, dalak ve diğer organlarda kabarcıkların bulunduğunu tarif etmiştir. Otopsi yaparken 7 kez parmağı ölüden kaynaklanan mikroorganizma ile enfekte olmuştur. XIX. yüz yılın ikinci on yılında sağlığı bozulmuş ve kendi tabiriyle "paraxysms asthma" diye değerlendirdiği sağlık sorunu üzerine, daha sonra da ateş yükselmesi eklenince,

reenfeksiyon tipi TB olduğu anlaşılmıştır. Laennec 1826 yılında üzerinde çok çalıştığı tüberkülozdan ölmüştür. Yakın arkadaşı olan Boyle 39 yaşında, Marie Francois-Xavier Bichat ise aynı hastalıktan henüz 31 yaşındayken ölmüşlerdir. Bu iki klinik araştırmacı içinde 900 otopsi raporu olan tüberkülozlu hastaların bulgularını “Recherchez sur la phythisic pulmonaire” isimli kitabı yayınlamışlardır (43).

Mikroskobik canlıların hastalık oluşturabileceği gösterildikten sonra, tüberkülozda da etken mikroorganizma gösterilmeye çalışılmış ve bu amaçla çeşitli hayvan deneyleri ile hayvanlarda TB oluşumu incelenmiştir. Dr. Robert Koch 1882 yılında TB basilini göstermiş ve bu türe “*Mycobacterium tuberculosis*” adını vermiştir. Koch ayrıca, *M. tuberculosis*'i inceleyebilmek amacıyla boyama teknikleri geliştirmiş ve basilin kültürü için katı besiyeri kullanmayı ilk kez denemiştir (44). 1930 yılında William Wells ise TB basilinin insanlara inhalasyon yoluyla bulaştığını keşfetmiştir (45).

Tüberkülozun tanımlanıp, hastalık etkeni olan *M.tuberculosis*'in laboratuvarında izolasyonunun yapılmasından sonra tedavide başarı sağlama yolları aranmıştır. Bu amaçla daha önce de bahsedildiği üzere XX. yüzyıl başlarında TB hastalarının tedavisi için dağ eteklerine sanatoryumlar kurulmuştur. Hastalara burada tedavi amacıyla bol gıda verilmiş, temiz havada egzersizler yaptırılmıştır. Tedavi sonunda ise sadece hafif vakaların tedavi edildiği gözlenmiştir (46).

Osmanlıda veremin etkisi, Topkapı ve Dolmabahçe Sarayları'nda görülmüştür. III. Selim'den itibaren haremde yaşayan pek çok kadın bu hastalığa yakalanmıştır(47). II.Mahmut'un ise akciğer tüberkülozundan öldüğü belirtilmektedir. Ona annelik eden Nakşidil Hatun'un da akciğer tüberkülozundan ölmesi, padişahın da tüberkülozdan öldüğü görüşünü desteklemektedir.

Osmanlı'da yapılan nüfus sayımlarına göre XX.yüz yılda İstanbul'un nüfusu 1.2 milyonu. Yılda 2.800 kişinin akciğer vereminden öldüğü bildirilmiştir (Bu genel ölümlerin %15.8'idir). İzmir'in nüfusu 200.000 iken, 1892-1914 yılları arasında ölen 92.942 kişinin 14.700'ü veremden ölmüştür. Genel ölümlerin %15.8'i tüberkülozdu (48,49). Verem ve kuduz hastalığı ile savaşı II. Abdülhamit başlatmıştır. 1882 yılında Robert Koch verem basilini bulduktan sonra, 1885 yılında İstanbul'da balgam boyama ile verem basili gösterilmiştir. Robert Koch'un

öldürülmüş verem mikrobu atıklarından elde ettiği tüberkülini aşı olarak denemiştir. 1890 yılında Berlin'den getirilen tüberkülin aşı olarak İstanbul'da da kullanılmaya başlanmışsa da başarılı sonuç alınamamıştır. Bu gerçeği Berlin'den dönen Türk doktorları İstanbul'da aşı olarak tüberkülini kullananların olumlu sonuç vermediğini Gazete "Medicale D'Orient"te yayınlamışlardır.

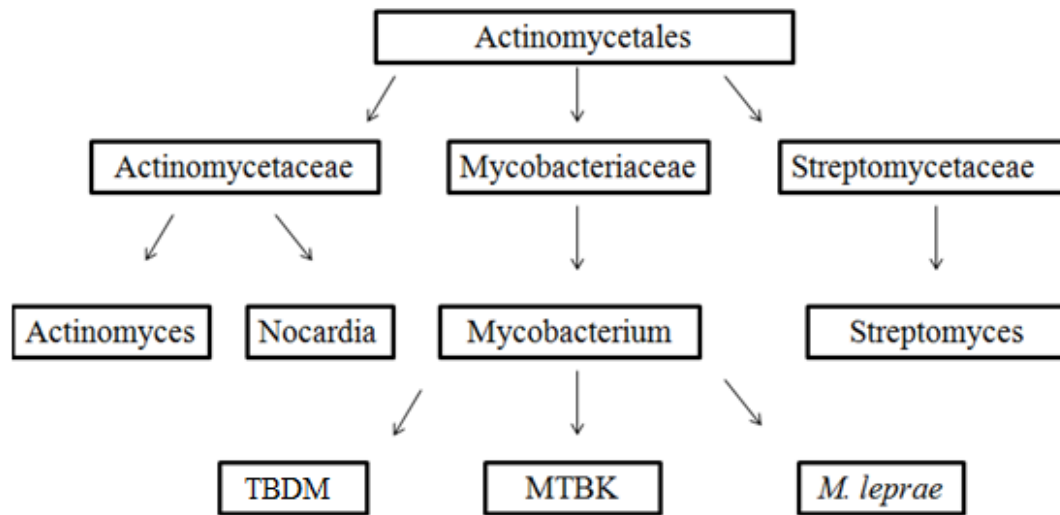
Türkiye'de ilk çocuk verem hastanesi 1906 yılında Şişli'de baş tabib İbrahim Bey'in emrinde Etfal Hastanesi'nde faaliyete geçmiştir. İstanbul'da yayınlanan Cemiyet-i Tıbbiye-i Şahane Dergisi'nde, veremin bulaşıcı olduğu yazılmış ve korunma yollarını Gazete "Medicale D'Orient"te yayınlamıştır. Veremli hastalara tükürük hokkası verilerek, sokak ve kışlada yere tükürmesi yasaklanmıştır.

Hastalığın tedavisinde etkili olan ilk antitüberküloz ajan streptomisin (STR)'in 1944 yılındaki keşfinden sonra yeni antitüberküloz ajanlar üzerinde çalışmalar başlatılmıştır. Bunu takiben de 1952'de izoniazid (INH) ve pirazinamid (PZA) keşfedilip kullanıma geçmiştir. Bu alandaki ilaç çalışmaları 1970'de rifampisin (RİF)'in keşfi ile devam etmiştir. İlaçların keşfedildiği bu dönemde TB olgularında azalma kaydedilmiştir. Ancak 1985 yılından sonra özellikle AIDS olgularının yaygınlaşması, immünoşüpresif tedavilerin artması ve sağlık tarama programlarının iyi çalışmaması gibi nedenlerle TB olgularının sayısında yeniden bir artış başlamıştır (50-52).

Türkiye'de TB ile mücadele Osmanlı Dönemi'nden sonra tedavide etkili ilaçların bulunmasıyla 1950'lerde başlamıştır. Bu amaç doğrultusunda 1960 yılında Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Tüm dünyada ve ülkemizde TB tedavisinin etkin bir şekilde uygulanmasıyla birlikte *Mycobacterium bovis* BCG aşısının kullanımının yaygınlaşmasına bağlı olarak da TB morbidite ve mortalite oranlarında düşüş gözlenmiştir. Ancak yine ülkemizde ve dünyada kötü sosyo-ekonomik koşulların olması ve AIDS'in ortaya çıkmasıyla TB olgularında yeniden artış meydana gelmiştir (53).

2.2. Taksonomi

“Actinobacteria” şubesinin “Actinomycetales” takımı içinde yer alan Mikobakteriler, Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsidir. Bu cins, 130’dan fazla tür içerir; ancak bu türlerin azınlığı patojendir.



Şekil 2.1. Mikobakterilerin taksonomik ağacı. TBDM: Tüberküloz dışı mikobakteriler, MTBK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

Aside dirençlidirler. DNA’ları yüksek oranda (%61-70) guanin ve sitozin içerir. 60-90 karbonlu mikolik asit zincileri vardır. Benzer şekilde aside direnç gösteren *Rhodococcus* ve *Nocardia*’lara göre daha yoğun boyanırlar (45,54). Mikobakterilerin sınıflandırılması koloni özelliklerine, mikroskopik özelliklerine, üreme hızlarına ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılmaktadır. Bu cinsin üyeleri genel olarak patojen, patojen olmayan (saprofit) ve fırsatçı patojen mikobakteriler olarak 3 gruba ayrılır. Patojen mikobakteriler grubunda yer alıp, TB etkeni olan ve MTBK grubuna dahil olan türler, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti* ve *M. pinnipedi*’dir (55). *Mycobacterium lepra* ise bu gruba dahil olmayan bir diğer patojen mikobakteri türüdür.

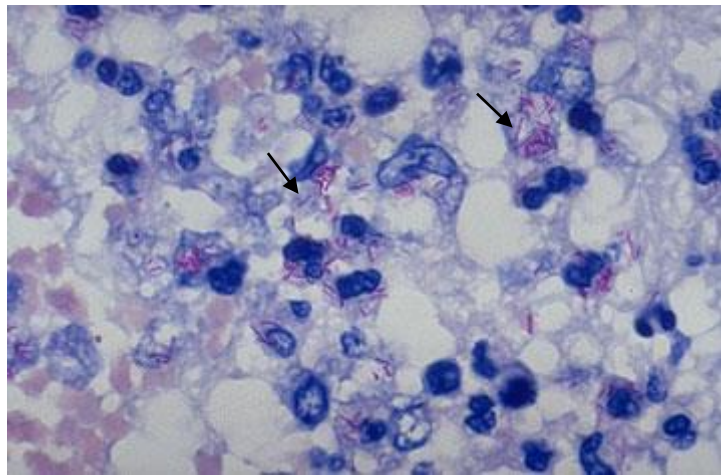
Patojen olmayan saprofit mikobakteriler ile çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı mikobakteriler, “TB dışı mikobakteriler (TBDM)” veya “atipik mikobakteriler” grubunda bulunurlar (56). Fırsatçı mikobakterilere örnek olarak, *Mycobacterium avium-intracellulare* kompleksi, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium marinum* ve *Mycobacterium ulcerans* verilebilir. Saprofitik mikobakterilere örnek olarak ise, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei* ve *Mycobacterium gordonae* verilebilir (57).

Atipik mikobakteriler, Ernest Runyon tarafından üreme hızlarına ve pigment özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırmaya göre atipik mikobakteriler 4 gruba ayrılır (58). Runyon grup I, fotokromojen mikobakterileri içerir. Bunlar, ışık varlığında pigment oluşturan mikobakterilerdir. *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium genavense* ve *Mycobacterium asiaticum* grubun üyeleridir. Runyon grup II, skotokromojenik mikobakterileri içerir. Bunlar karanlıkta pigment üretirler. *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium gordonae* ve *Mycobacterium flavescens* bu grupta yer alırlar. Runyon grup III, kromojenik olmayan mikobakterileri içerir. Bu mikobakteriler, pigment oluşturmazlar. Grup üyeleri, *Mycobacterium avium-intracellulare* kompleksi, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium triviale* ve *Mycobacterium shimoidae* türleridir. Runyon grup IV, hızlı üreyen mikobakterilerden oluşur. Grup üyeleri, katı besiyerinde 5 günde üreyebilmektedirler. *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* ve *Mycobacterium thermoresistibile* bu grupta yer alır (56,59). Mikobakteriyolojik araştırmalar sonucu hücre duvar yapıları, fenotipik ve genotipik özellikleri hakkında yapılan çalışmalar arttıkça Runyon’un klasik sınıflaması güncelliğini yitirmiş bulunmaktadır (58).

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

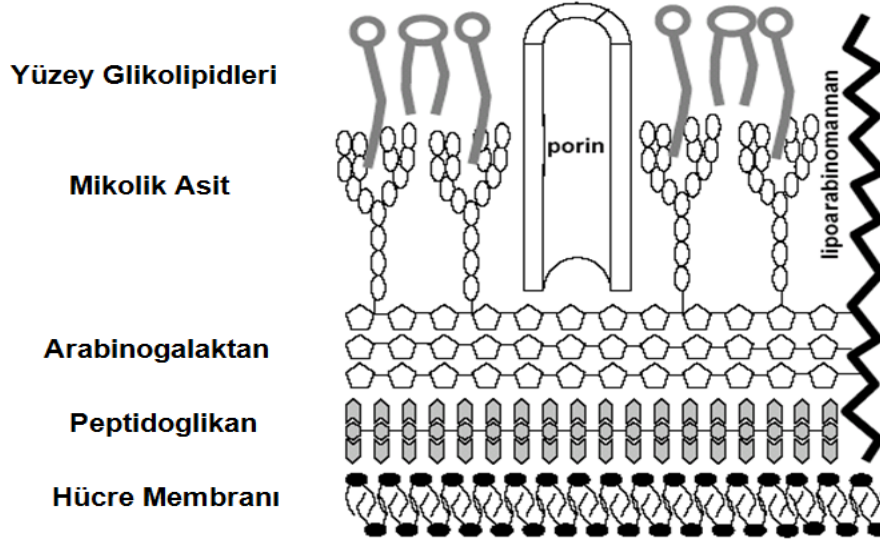
Mikobakteriler, basil şeklinde, zorunlu aerob, hareketsiz, kapsülsüz, spor oluşturmeyen bakterilerdir. 1-10 µm uzunluğunda, 0.2-0.6 µm genişliğinde hafif kıvrımlı veya düz basillerdir. 12-18 saatte bölünüp, yavaş ürerler (45). Eski kültürlerden ve kazeöz lenf bezlerinden hazırlanan preparatlarda dallanmış, filamentöz veya kokoidal formda görülebilirler. Klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda ikili, üçlü gruplar halinde birbirine paralel veya X,V harfleri oluşturacak şekilde bir arada bulunurlar. Hücre duvarları lipit içeriği bakımından zengindir. Bu nedenle alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterirler.

“*Mycobacterium*” adı, Yunanca fungus (*myces*) ve küçük çubuk (*bakterion*) kelimelerinden türetilmiştir. İsmi fungus kısmı, bu mikroorganizmanın sıvı besiyerlerinde üreme özelliklerinin küflere benzemesinden kaynaklanmaktadır. Gram boyası ile boyanmazlar. Ancak aside dirençli boyama yöntemleri olan fenol içinde çözdürülen bazik fuksinin farklı konsantrasyonda eriyiklerini içeren Ehrlich-Ziehl-Neelsen(EZN) veya Kinyoun yöntemleri ile boyandıklarında, aldıkları boyayı %3'lük asit alkolle dekolore edildikleri halde geri vermezler. Bu güçlü aside dirençlilik özelliklerinden dolayı aside dirençli bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar. Aside dirençlilik özellikleri, laboratuvar tanısında kullanılan önemli bir kriterdir. EZN veya Kinyoun boyama yönteminde renk giderme işleminden sonra zeminin boyanabilmesi için zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır ve hazırlanan preparatlarda mikobakteriler, mavi zeminde kırmızı basiller halinde görülürler (56).



Resim 1. EZN boyama ile boyanan *Mycobacterium*

Sadece bu yöntemlerle boyanabilmelerinin nedeni, mikobakterilerin alışagelmış bakteri hücre duvar yapısından farklı olarak lipitten zengin, oldukça kompleks bir hücre duvarına sahip olmalarıdır. Hücre duvarının bu şekilde lipitten zengin olmasıyla, bakteri yüzeyi hidrofobik özellik kazanmaktadır. Bu sayede bakteri, pek çok dezenfektan ve boyaya karşı direnç kazanmaktadır (58,60).



Şekil 2.2. Mikobakteri hücre duvar yapısı

Hücre membranının dışında, Gram pozitif bakterilerdeki gibi bir peptidoglikan tabakaya sahiptirler. Peptidoglikan tabakası bakteriyeye şekil ve dayanıklılık verir. Bu tabakanın üzerinde arabinogalaktan adı verilen polisakkarit katman bulunmaktadır. Hücre duvarına tipik özelliğini katan arabinogalaktan tabakaya bağlı ve dallanmış yağ asitlerinden oluşan, 60-90 karbonlu mikolik asit tabakasıdır. Mikolik asit ve yüksek lipid oranı, hücre duvarına kompleks bir özellik katıp, boyalara ve dezenfektanlara dirençli hale getiren kısımlardır. Ayrıca bakteriyeye tipik immünolojik özellikler kattığı gibi en önemli olarak da ilaç moleküllerinin hücre içine girişini engellerler. Total lipid miktarının %11'i mikolik asit olup hücre duvar kalınlığından da sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz şekerlere bağlanarak "kord faktörü"nü oluştururlar. Virulans ile ilgili olan bu faktör, hücrelerin birbirine dolanmış demetler oluşturarak, paralel zincirler halinde üremelerine neden olur. Mikroskopik incelemede ise basiller, paralel kordlar halinde görünürler. Ayrıca fagositlerin göçünü engelleyip granülom oluşmasını sağlar (61,62). Mikolik asit tabakası ile bakteride doğal direnç gelişimi ve zorlu koşullara dayanıklılığı

sağlanmaktadır (61,63). Mikobakterilere etki edecek olan ilaçlar öncelikle bu tabakayı geçebilmelidir (64).

Hücre duvarının en dış tabakasında ise lipoarabinomannan, lipomannan, sülfolipidler ve fosfatidilinozitol mannozid gibi proteinler yer almaktadır. Dış proteinler ve lipid yapısı, hücre duvarının çözünebilen bileşikleridir. Bu proteinler, bağışıklık sistemi ile etkileşimleri olduğu bilinen ve mikobakterilerin sinyal ileten efektör molekülleridir (64).

MTBK'nın üremesi yavaş olup replikasyon süresi yaklaşık 15-20 saattir. Gözle görünür koloni büyümesi için geçen süre en az 3 hafta genellikle standart kültür ortamlarında 3-6 haftadır (65,66). Löwenstein-Jensen besiyerinde optimal 35-37°C sıcaklıkta, pH 7.0±0.2'de, %5-10 CO₂'li ortamda çoğalırlar (35). MTBK olumsuz koşullara oldukça dayanıklı olup bu koşullarda uzun süre canlı kalabilir. +4°C'de haftalarca, -70°C'de yıllarca canlılığını korur (65).

2.4. Tüberküloz

TB sözcüğü eski bir terim olup küçük, yumru (tüber) yapan anatomik lezyonları tanımlamaktadır. Hastalığın TB olarak resmen isimlendirilmesi 1839 yılında Johann Lukas Schoenlein'e atfedilmektedir (67,68). MTBK'nın neden olduğu TB, enfekte kişilerden damlacık yoluyla bulaşan ve başlıca akciğerler olmak üzere pek çok organı enfekte eden sistemik bir hastalıktır. MTBK'in enfektif dozu oldukça düşüktür. Birkaç damlacığın üzerinde taşınan 1-10 basil, insanda tüberküloza neden olabilmektedir. DSÖ 2012 raporuna göre, 2011 yılında dünya genelinde 5,8'i yeni tanımlanmış olmakla birlikte 8,7 milyon insan TB hastalığına yakalanmış, bu hastaların 1,4 milyonu hayatını kaybetmiştir (4). Ülkemiz verilerine göre ise TB insidansı, 2000 yılında Verem Savaş Dispanserleri'ne kayıtlı hastalarda hesaplandığında yüz binde 27'dir (4,5). Bu oran, 2011 yılı Türkiye Verem Savaşı Raporu'na göre yüz binde 24'e düşmüştür (7).

TB, dünyada AIDS'ten sonra erişkinlerde en sık ölüme neden olan ikinci enfeksiyon hastalığıdır (69). Enfekte kişilerin %90'ı hastalığı latent olarak geçirmektedir. Normal kişide aktifleşme oranı hayatı boyunca %2-23 iken, HIV

pozitif kişilerde yıllık %5-10'dur. Bu oranlar hücrel immünitenin tüberküloza karşı bağışıklıkta çok büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir (70).

Vücudun her bölgesinde görülebilen TB, başlıca akciğerlerde görülürken, daha az olarak lenf düğümü, plöral, genitoüriner bölgede, kemik-eklemde ve merkezi sinir sisteminde görülebilmektedir. Ayrıca abdominal TB, perikard tüberkülozu ve dissemine TB da görülmektedir (71). TB basili, inhalasyon ile vücuda girdikten sonra ilk olarak akciğerlerin orta veya alt kısımlarına yerleşir ve buralarda çoğalmaya başlar. Akciğer tüberkülozunda çok çeşitli belirtiler olmakla birlikte, en bilinen başlangıç bulgusu öksürüktür. Kuru öksürükle başlayan hastalık, daha ileri zamanlarda öksürükle beraber balgam çıkarma olarak devam eder. Bunları takiben de kanlı balgam, göğüs ağrısı, nefes darlığı, iştahsızlık ve halsizlik görülebilir. Tüm bu bulguların hastalığın tanısında yardımcı olmasına rağmen, tüberkülozun kesin tanısı için laboratuvarında TB basilinin gösterilmesi gerekir (71).

TB 90'dan fazla antijene ve değişik virülans faktörlerine sahip MTBK basili ile konağın mononükleer fagositleri ve T lenfositlerinin ilişkisine bağlı olarak gelişen kronik bir enfeksiyon hastalığıdır.

Primer enfeksiyon, bireyin enfeksiyöz damlacıkları inhale etmesiyle meydana gelen enfeksiyondur. Soluma yoluyla alınan damlacıkların bir kısmı alt solunum yoluna inmeden üst solunum yolunda lokal koruyucu mekanizmalarla tutulmaktadır. Alveollere kadar ulaşan basiller ise alveolar makrofajlar tarafından hücre içine alınır. Basilin lipoarabinomannanı, makrofajın içerisindeki fagositik yıkımı önler. Bu sayede makrofajlar içinde canlı basil korunmuş olur. Bu dönemde mikobakterilerin yıkılarak yok edilmesi alınan mikobakterilerin virulansı ve konak fagositlerinin mikrobisidal kapasitelerine bağlıdır. Başlangıçta hücre içi yıkımdan kaçabilen mikobakteriler çoğalıp makrofajların parçalanmasına yol açmaktadır. Basiller, hücre debris, konak kemotaktik faktörleri ile dolaşımdan monositleri ve lenfositleri bu bölgeye çeker. Bölgeye gelen monositler, makrofajlara dönüşür; bunlar basilleri daha kolay fagosite eder ama tahrip edemez. Bu devrede mikobakteriler logaritmik olarak çoğalır, monositler birikmeye devam eder. Basiller lenf yoluyla komşu lenf bezlerine taşınır; kan akımına karışan basiller kemik iliği, dalak, böbrek, karaciğer, kemik, merkezi sinir sistemine yayılır. Bu sırada akciğerlerin alt kısımlarında ve bölgesel lenf

nodlarında inflamasyon meydana gelir. Fibrinle çevrelenmiş granülomlar içinde basillerin olduğu “tüberkül”ler oluşur. Böylelikle primer enfeksiyon gelişmiş olur (72). Olayın başlangıcından 2-4 hafta sonra kendilerine sunulan antijen ile aktive olan CD4+ T hücreleri bölgeye gelir ve erken lezyonlarda çoğalırlar. Bu yardımcı T hücreleri saldıkları değişik sitokinlerle makrofajları aktive edip basilleri öldürebilme yeteneği kazandırır. Bu devrede basillerin logaritmik çoğalması durur. Bu primer lezyonlardaki merkezi solid nekroz mikobakterilerin hücre dışı üremesini inhibe eder. Sonuçta basiller dormant hale gelir, sonraki dönemlerde immun sistem herhangi bir nedenle zayıflarsa yeniden aktive olur (73).

Sekonder enfeksiyon ise primer enfeksiyon sonrasında yeterli immün cevap oluşuktan sonra ya reaktivasyonla ya da yeni basil inhalasyonuna bağlı gelişen reenfeksiyonla oluşmaktadır (72). Oksijenin daha çok olduğu akciğerin üst loblarında meydana gelir. Burada oluşan tipik lezyon kazeifikasyon nekrozudur. Hastalığın çok ileri evresindeyken eğer kazeifikasyon nekrozu denilen lezyonlar bir bronşa denk gelmişse, bronş duvarı parçalanmaktadır. O kavitenin içeriği olan bütün basiller, bronşa aktarılmaktadır. Böylelikle hasta en tehlikeli durum olan ekspirasyonla milyarlarca basili havaya saçmaya başlamaktadır. Hastada oluşan kaviteye bağlı solunum zorluğu olduğu gibi, kavitenin olduğu bölgedeki kapillerler ve kan damarları zarar gördüğünde kanlı balgam ortaya çıkmaktadır (57).

2.5. HIV-TB İlişkisi

HIV’le enfekte kişilerin TB hastası olma olasılığı yüksektir (74). HIV’le enfekte kişilerin tüberküloza yakalanma olasılığının 20-40 kat fazla olduğu ve her HIV’le enfekte 4 kişiden birinin TB nedeniyle öldüğü belirtilmektedir (53). 1980’lerde HIV epidemisinin başlaması, pek çok ülkede TB vakalarının artmasına, buna bağlı olarak da morbidite ve mortalitenin de artmasında neden olmuştur (75). Bu durum özellikle Güney ve Doğu Afrika’da 1990’lardan 2004’e kadar böyle devam etmiştir (4). DSÖ, 2011 yılında dünya genelinde 8.7 milyon TB hastasının 1.1 milyonunun (%13) HIV pozitif olduğunu belirtmektedir. HIV pozitif olan TB vakalarının da %79’u Afrika bölgesinde yaşamaktadır. Dünya genelinde ise yaklaşık 400.000 kişinin HIV ve TB ko-enfeksiyonundan öldüğü belirtilmektedir (4). Türkiye’de ise bu oran hala düşüktür (5).

TB, HIV pozitif kişilerde diğer fırsatçı enfeksiyonlara oranla daha erken oluştuğu için, hasta örneğinden hazırlanan yaymalar ARB açısından genellikle negatif olur. Bu durumun yanı sıra atipik radyografik bulgular, akciğer dışı TB prevelansının yüksek olması ve diğer fırsatçı akciğer enfeksiyonlarına benzerlik göstermesi nedeniyle HIV ve TB ko-enfekte kişilerde TB tanısı koymak oldukça zordur (76,77). HIV, latent tüberkülozun reaktif olma olasılığını artırır. Aktif tüberkülozun ise ağır seyretmesine neden olur. HIV enfeksiyonunun, immün sistem üzerine olan etkileri nedeniyle aktif tüberkülozun tanısı zorlaşıp gecikmektedir (78).

2.6. Tüberküloz Tanısı

TB tanısı klinik belirti ve bulgular, radyolojik görünüm, klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda mikobakteri görülmesi ve besiyerinde üretilmesiyle yaygın olarak konulmaktadır. İmmünolojik temele dayanan tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi ve interferon gama salınım testleri ile moleküler yöntemler de TB tanısında kullanılmaktadır (47,48,49).

2.6.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Kültür işlemleri öncesinde BOS ve idrar gibi steril klinik örneklerden MTBK izolasyonu yapmak için, örnek santrifüj edilip, oluşan çökelti kısmından alınarak ekim yapılabilmektedir. Ancak balgam gibi steril olmayan klinik örneklerden MTBK izolasyonu yapabilmek için örneklere dekontaminasyon-homojenizasyon işlemi uygulanması gerekmektedir. Örneklerin işlenmesi aşaması, gerek mikroskopik inceleme, gerekse kültür yöntemleri için duyarlılık belirleyici bir aşamadır. Ne kadar duyarlılığı yüksek ve son teknoloji ürünü kültür veya boyama yöntemi kullanılsa da bunların öncesinde yapılan örnek işleme aşaması yetersiz ise, sonraki işlemlerden elde edilen sonuçların kalitesi düşük olmaktadır (80). Bu nedenle bu basamakta kullanılacak farklı yöntemleri içeren birçok çalışma yapılmıştır (81-83). Günümüzde pek çok yeni yöntem çalışmaları olsa da, dünya genelinde TB laboratuvarlarında en yaygın olarak kullanılan ve CLSI'n önerdiği homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemi olan, N-asetil-L-sistein-sodyum hidroksit yöntemidir (35,80,81,84).

Örnekleri işlerken, kontaminant normal flora organizmalarından arındırmak için toksik bir dekontaminasyon ajanı olan sodyum hidroksit (NaOH) kullanılır. Örnek içerisinde bulunan olası TB basillerinin konsantre hale getirilmesi ve balgam gibi yoğun kıvamdaki örneklerin homojen bir hale getirilmesi için mukolitik bir ajan olan N-asetil-L-sistein (NALC) kullanılır. NALC balgamın mukus yapısını çözer ve homojen hale gelmesini sağlar (45). NALC-NaOH yöntemi yanı sıra sodyum hipoklorid, oksalik asit, setilpiridinyum-sodyum hidroksit yöntemi gibi yöntemler de örneklerin işlenmesi amacıyla kullanılabilir (85,86).

Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemlerinin örnek içindeki TB basillerine zarar vermeden ve canlı TB basili sayısı çok azaltılmadan izole edilmesi gerekir. Kullanılan örnek işleme yönteminde bu hassas dengenin çok başarılı bir şekilde kurulabilmesi, bunu takip edecek olan mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin duyarlılığının artmasına yardımcı olacaktır (80).

2.6.2. Mikroskopik İnceleme

Mikroskopik inceleme basit, hızlı, ucuz ve özgül bir yöntem olması nedeniyle özellikle tüberkülozun endemik olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde, mikroskopik inceleme duyarlılığının %20-80 arasında değişebildiği gözlenmektedir (80,87,88). Dünya genelinde, yeni yayma-pozitif TB olgularının saptanmasında mikroskopik incelemenin rolü büyüktür (89). Direkt incelemede ARB görülmesi tanıyı kesinleştirmez, çünkü yaymada görülen ARB atipik bir mikobakteri türü olabilir. Bunun yanı sıra boyama işlemleri sırasında distile su kullanılmamışsa musluk suyu ile yıkamayla preparat üzerinde atipik mikobakteriler görülebilir. Bundan dolayı kesin tanı koyabilmek için de etkenin mutlaka kültürde üretilmesi ve tanımlanması gerekmektedir (57).

Balgamın mikroskopik olarak incelenmesi, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde en önemli pulmoner TB tanı yöntemidir. Bu ülkelerde genellikle homojenizasyon-dekontaminasyon uygulanmamış balgam örneği direkt olarak Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile boyandıktan sonra mikroskopik inceleme yapılmaktadır (4).

Mikroskopik incelemede aside dirençli basilin (ARB) görülebilmesi için örneğin mililitresinde en az 5.000-10.000 kadar bakteri bulunması gerekmektedir. Duyarlılık oranlarındaki farklılıklar genel olarak, kullanılan boyama yöntemi ve kullanılan mikroskobun kalitesiyle değişmekle birlikte, örneğin türü, yaymanın kalınlığı, boyama sırasında dekolorizasyon süresi ve incelemeyi yapan kişinin bu konudaki tecrübesi de çok büyük önem taşımaktadır (80).

Mikroskopik inceleme öncesinde uygulanan boyama yöntemleri içinde en sıklıkla kullanılanlar Ehrlich Ziehl-Neelsen boyama yöntemi, Kinyoun boyama yöntemi ve auramin-rodamin floresan boyama yöntemidir (45). TB tanısında altın standart tanı aracı olan kültür sonuçlarının elde edilmesi birkaç haftayı bulabileceğinden, pozitif bir mikroskopik inceleme sonucu çok değerlidir. Bu nedenle, aslında duyarlılığı çok yüksek olmayan bu yöntem, yıllar boyunca gelişen teknoloji karşısında vazgeçilemeyen bir tanı aracı olarak kalabilmiştir.

2.6.3. Kültür Yöntemleri

Günümüzde kültür yöntemleri, TB tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla yumurta bazlı veya agar içerikli katı besiyerleri kullanılabilir gibi, sıvı besiyerleri de kullanılabilir. Hızlı tanı sağlayabilmek amacıyla sıvı besiyerlerinin yarı otomatize cihazlarda kullanıldığı çeşitli sistemler mevcuttur. Kültür yöntemlerinin en önemli avantajları, mikobakteri canlılığını doğrudan gösterebilmeleri ve bakteri izolatu ile duyarlılık tespiti gibi ek testler yapılabilmesine imkan sağlamalarıdır (80). Mikobakteri kültür yöntemleri, klasik kültür yöntemleri ve hızlı kültür sistemleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Klasik Kültür Yöntemleri

Katı besiyerleri yumurta ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılır:

a)Yumurta Bazlı Besiyerleri: LJ, Petragani, American Trudeau Society(ATS) ve Ogawa'dır (90) .TB kültürü amacıyla günümüzde en yaygın olarak kullanılan katı besiyeri Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeridir (91). LJ besiyeri, laboratuvar şartlarında kolayca hazırlanabilmesi ve ucuz olması nedeniyle birçok merkez tarafından tercih edilmektedir. Bu besiyeri, mikobakterilerin iyi üremesini

sağlar. Yumurta, patates nişastası, gliserol, asparajin, besiyeri tuzları olan KH_2PO_4 , magnezyum sülfat, magnezyum sitrat ve malaşit yeşili içerir. Malaşit yeşili diğer bakterilerin üremelerini engellemesi için eklenmektedir. Bu nedenle LJ, seçici bir besiyeridir. Dondurulmaya ve kurumaya dayanıklı olan bu besiyerinde, üreme genellikle 3-6 hafta içinde gerçekleşir. Ancak besiyerinin katılaştırılması için gereken ısı ve içerdiği albümin, antimikobakteriyel ilaçları inaktive edebileceği için, duyarlılık testleri için uygun görülmemektedir (45,92). LJ besiyerinde üreyen mikobakteriler, krem renginde, kuru, pigmentsiz, granüler ve kenarları düzensiz koloniler oluştururlar (57). Ogawa besiyeri ise, içerik olarak LJ besiyeriyle benzerlik göstermektedir; ancak daha ekonomiktir. Bu nedenle kısıtlı imkanlara sahip laboratuarlarda kullanılabilir bir besiyeridir (45).

b) Agar Bazlı Besiyerleri: Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar en çok tercih edilenleridir. Bu besiyerlerine katkı solüsyonu olarak oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz, NaCl (OADC) eklenmektedir. Besiyerleri şeffaf olduğundan ekim yapıldıktan 10-12 gün sonra mikrokoloniler görülebilir. Dezavantajları ise pahalı ve raf ömürlerinin nispeten kısa olmasıdır (45,92). Middlebrook 7H11 besiyeri nazlı ve izoniazid dirençli MTBK suşlarını üretmek amacıyla kullanılmaktadır (35).

Middlebrook katı ve sıvı besiyerleri, hazırlanmaları daha zor olduğundan ve hazır satın alınmaları durumunda da daha pahalı olduklarından, daha az sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, özellikle duyarlılık testlerinde LJ besiyerine göre daha güvenilir ilaç konsantrasyonları sağladıklarından, tercih edilmektedir (80). CLSI MTBK suşlarının duyarlılık çalışmalarında Middlebrook kullanılmasını önermektedir (35).

Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan sıvı besiyerleri, Middlebrook 7H9 ve Dubos tween albumin besiyerleridir. Mikobakteriler, sıvı besiyerlerinde katı besiyerlerine göre daha hızlı üremektedirler. Bu nedenle sıvı besiyerleri genellikle duyarlılık testlerinde, inokulum hazırlanmasında ve suşların subkültürlerinin yapılmasında kullanılırlar. Middlebrook sıvı besiyerleri, BACTEC 9000 MB ve BACTEC 460 BACTEC MGIT 960 gibi hızlı kültür sistemlerinde kullanılmaktadır (94).

Hızlı Kültür Sistemleri

BACTEC 460 TB Sistemi

Kültür amacıyla günümüzde en yaygın olarak kullanılan sıvı besiyeri sistemi BACTEC 460 TB radyometrik sistemidir (80). BACTEC 460 TB radyometrik sistemi hızlı ve güvenilir tanı sağlaması nedeniyle kabul görmüş ve çalışmalarda yer almış bir sıvı besiyeri sistemidir (35,45,95,96). BACTEC TB sisteminde zenginleştirilmiş Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri kullanılır (45,97). Kontaminasyonu önlemek amacıyla, besiyerine 5 farklı antibiyotik içeren PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) solüsyonu ilave edilir. Bu sistemde, homojenizasyon–dekontaminasyon işleminden geçirilmiş örnek, BACTEC şişesindeki besiyerine ekilir, 35⁰C’de inkübasyona bırakılır. Besiyerinde bulunan ¹⁴C ile işaretli palmitik asit, substrat olarak kullanılır. Böylelikle mikobakteriler BACTEC şişesi içindeki atmosfere ¹⁴CO₂ salınımı yaparlar. Bu sistemin esası, üreyen mikobakteriler tarafından ortama salınan ¹⁴CO₂ miktarının ölçümüne dayanır. Bu sistemle, en düşük miktarlardaki ¹⁴CO₂ bile saptanabildiği için, mikobakteriyel üreme daha kısa sürede saptanır. MTBK üremesinin ortalama saptanma süresi bu sistemde 7-10 gündür (96).

BACTEC sistemiyle, MTBK, atipik mikobakterilerden ayırt edilebilmektedir. Bunun için BACTEC 460 cihazında NAP testi çalışılır. NAP (p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofenon) kloramfenikol sentezinde bir ara üründür. MTBK grubundaki bakterileri inhibe eder. Ancak atipik mikobakterilere inhibitör etkisi yoktur. Üç gün içinde üreme olmaması, bakterinin MTBK grubunda olduğunu gösterir (98).

Tüm avantajlarına rağmen, inokülasyon öncesi şişenin ön okutma işlemi ve haftada üç kez rutin okutma işlemleri nedeniyle iş yükünün fazla olması, kültür şişeleri arasında çapraz kontaminasyon riski, radyoaktif materyallerin kullanımına ve yok edilmesine ilişkin problemler, cihaz içinde okutmalar sırasında aerosol oluşma riski, koloni morfolojisinin belirlenememesi, karışık kültürlerin tanımlanmasında zorluk çekilmesi ve enjektörlerin yoğun kullanımına bağlı olarak laboratuvar çalışanlarının iğne kazaları bakımından sürekli risk altında bulunmaları, sistemin en önemli dezavantajlarıdır (45,80,92,95-97).

BACTEC MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*) 960 Sistemi

Bactec MGIT 960, günümüzde en yaygın olarak kullanılan sistemlerden biridir (99). Otomatize bir mikobakteri tanı sistemi olan MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sisteminin olumsuz yönlerini azaltabilmek amacıyla üretilmiştir. Radyometrik olmayan bu sistem, floresan veren bir indikatörün bulunduğu tüplerde bakterilerin üretilmesi esasına dayanmaktadır (98,100). Tüplerin dibinde silikonlara gömülü floresan indikatörleri bulunmaktadır. Homojenizasyon-dekontaminasyon işleminden geçirilen örnekler, MGIT tüplerine ekilir. Kontaminasyonu önlemek amacıyla, besiyerine 5 farklı antibiyotik içeren PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) solüsyonu ilave edilir, cihaz içine yerleştirilip inkübasyona bırakılır. Mikobakteriler üredikçe tüpteki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak tüpün dip kısmından indikatör serbest kalmakta ve floresan açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan floresan cihaz tarafından otomatik olarak ölçülmekte ve sonuçlar verilmektedir. MTBK üremesinin ortalama saptanma süresi bu sistemde genellikle 9-13 gündür (96,101). MGIT 960 sisteminin kısa sürede sonuç vermesinin yanında en önemli avantajları, iğne veya benzeri riskli gereçlere ihtiyaç duyulmaması ve radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Bu nedenle bu sistem günümüzde BACTEC 460 TB radyometrik sisteminin yerine kullanılmaya başlanmıştır (45,92,96).

MB/BacT ALERT sistemi

MB/BacT ALERT sistemi, radyometrik olmayan, kolorimetrik bir yöntemdir. Besiyerindeki CO₂ miktarının kolorimetrik olarak saptanır (102). Her şişenin tabanında bulunan silikona gömülü kolorimetrik algılayıcı, besiyerinde bulunan mikobakterilerin oluşturduğu çözülmüş karbondioksit değişimine ve bunun sonucunda değişen pH'ya duyarlıdır. Böylece üremenin gerçekleşmesi durumunda pH değişikliği sonucunda kolorimetrik algılayıcı renk değiştirir. Algılayıcının koyu yeşilden sarıya dönmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir ve bakteriler canlılığını yitirse bile bu renk değişimi geriye dönmez. Bu sistemin avantajı, radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Ancak kontaminasyon riskinin biraz daha fazla olması ve BACTEC sistemine göre saptama zamanının biraz daha uzun olması dezavantajlarıdır (45,80,103).

MYCOLOR TK Sistemi

Hızlı bir tüberküloz tanı sistemi olan TK kültür sistemi, yeni geliştirilmiş olan bir tanı yöntemidir. Bu sistemde izolasyon için kullanılan TK besiyeri, çoklu renk indikatörleri kimyasından yararlanılarak hazırlanmış, mikobakterilerin üremesini erken saptayan bir besiyeridir (101). TK besiyerleri, hem sıvı hem de agar bazlı bifazik besiyerleridir. Sistemde hem izolasyon hem de antitüberküloz ilaçlara duyarlılık belirlemede kullanılan tüm besiyerleri, kullanıma hazırdır. Kullanıcı isteğe bağlı sıvı veya bifazik TK besiyeri kullanabilmektedir. Ekilen örnekte mikobakteri bulunması durumunda, inkübasyon süresince mikobakterilerin ürettiği metabolitlere ve enzimlere bağlı olarak TK besiyerinin orijinal kırmızı rengi sarıya döner. Kontaminantlar ürediğinde ise besiyeri rengi yeşile dönmektedir (101). Bifazik besiyerinde koloni morfolojileri görülebilmektedir (94). Renk değişimi, kolonilerin görünür hale gelmesinden çok daha önce gerçekleşmektedir. Renk değişimi hem gözle hem de otomatik kültür sistemi MYCOLOR TK ile izlenebilmektedir (80). Bu sayede TK besiyerlerinin laboratuvar olanakları kısıtlı ancak tüberkülozun yaygın olduğu ülkelerde de kullanılabilmesi düşünülmektedir (99). Bu kültür sisteminde TK besiyeriyle hızlı sonuç alınması, radyoaktif madde içermemesi ve koloni morfolojilerinin görülebilmesi yöntemin avantajlarıdır. TK kültür sistemi TB tanısında rutin olarak kullanılacak pratik, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (80,101).

2.6.4. İmmünolojik Tanı Yöntemleri

Tüberkülin deri testi: Bu test, PPD (*purified protein derivative*) denilen, mikobakterinin protein yapısının saflaştırılıp hastanın ön kol deri altına ince bir enjektörle verilmesine dayanmaktadır. *M. tuberculosis* ile oluşan enfeksiyonu göstermede kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Hücresel tipte ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonudur. Birincil enfeksiyonun ikinci-üçüncü haftasından sonra gelişir. Enjeksiyondan 48-72 saat sonra enjeksiyon bölgesinde endurasyon çapı değerlendirilir. 10-15 mm'den büyük ise hasta PPD pozitifdir, yani hasta TB basiliyle ya o anda ya da önceden karşılaşmıştır (79). Bu testin Türkiye'de tanısal değeri azdır. Çünkü Türkiye'de tüberküloza karşı BCG aşılama programı uygulanmaktadır ve tüberküloz aşısı yapılmış kişilerde de pozitif sonuç alınmaktadır (57). *M. bovis*

BCG suşundan etkilenmeyen interferon gama salınım testleri de bu amaçla kullanılan yeni testlerdir. Yıllardan beri kullanılmakta olan tüberkülin deri testinin tanısal kullanımı, BCG aşısından etkilenmesi nedeniyle sınırlı kalmıştır (57,80).

Interferon gama salınım testleri: BCG aşısından etkilenmeyen ve son yıllarda kullanım alanı bulmaya başlayan interferon-gama (IFN- γ) salınım testleri (İGST), bu açığı kapatabilmek amacıyla geliştirilmiş T hücre temelli yöntemlerdir. Bu yöntemler kullanılarak, önceden duyarlı hale gelmiş lenfositlerin *M. tuberculosis*'e özgü ESAT-6 (early secretory antigenic target protein-6) ve CFP-10 (culture filtrate protein-10) proteinleri ile karşılaştığında ürettiği IFN- γ kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu iki protein *M. tuberculosis*'in RD1 bölgesi (region of difference 1) tarafından kodlanır ve *Mycobacterium bovis* BCG suşu ile atipik mikobakterilerin çoğunda (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium flavescens* hariç) yoktur. Farklı İGST yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin kıyaslandığı çeşitli meta-analiz çalışmalarında rutin uygulamada tek başına kullanılacak düzeyde olmadıkları sonucuna varılmıştır. Çünkü İGST ile aktif hastalıkla latent efeksiyonu birbirinden ayıramamaktadır (80,86,104,105).

2.6.5. Biyokimyasal Testler

Katalaz testi, aril sülfataz testi, kristal violesiz Mac Conkey agarda üreme, demir alımı, niasin birikimi, nitrat indirgenmesi, pirazinamidaz testi, sodyum klorid tolerans testi, tiyofen -2-karboksilik asit hidrazid ile inhibisyon, tellürit indirgenmesi, Tween 80 hidrolizi, üreaz aktivitesi mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testlerdendir. Mikobakterilerin üreme özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel biyokimyasal yöntemlerle tanımlanması yaklaşık 3-6 hafta, hatta bazen daha uzun sürebilmektedir. Bu nedenle günümüzde mikobakterilerin tanımlanmasında biyokimyasal testler kullanılmamaktadır (92).

2.6.6. Moleküler Yöntemler

Gelişen teknolojiye paralel olarak gerçekleştirilen birçok yöntemle rağmen, günümüzde tüberkülozun laboratuvar tanısında altın standart olarak kabul edilen yöntemler halen kültür yöntemidir. Özellikle sıvı bazlı yarı otomatize veya tam otomatize kültür sistemleri, geleneksel kültür yöntemlerine göre daha kısa sürede

sonuç verebildikleri için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak TB tanısının 1-2 gün gibi kısa bir sürede konabilmesi büyük önem taşımaktadır. Yavaş üreyen bu mikroorganizmaların tanısının güvenilir ve hızlı bir yöntemle koyulmasına duyulan ihtiyaç devam etmektedir. Konvansiyonel fenotipik ilaç duyarlılık testleri, MTBK suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde çok fazla gecikme olmasına neden olmaktadır. MTBK suşlarının ilaç duyarlılıklarının hızlı tanısı, biran önce etkili antitüberküloz tedavisine başlanması ve dirençli suşların yayılmasını önlemek için çok gereklidir (1). Moleküler yöntemler bu ihtiyacı karşılayabilmek amacıyla olası adaylar olarak geliştirilmişlerdir (1,80).

Günümüzde mikobakterilerin hızlı tanısında kullanılan moleküler yöntemlerle, direkt olarak klinik örnekten veya kültürden izole edilen mikobakteriler tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. Moleküler yöntemler tanımlamanın yanı sıra ilaç dirençlerinin saptanmasında da kullanılmaktadır (1). Herhangi bir testin rutin uygulamada kullanılıp kullanılmayacağına en önemli göstergesi, testin özgüllük ve duyarlılığıdır. TB tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllükleri, yapılan birçok çalışmada yüksek bulunmuştur. Duyarlılık konusunda ise, uygulanan teste göre, oldukça değişik sonuçlar elde edilebilmektedir. Klinik örneklerden MTBK suşlarının saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler başlıca nükleik asit hibridizasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olarak ikiye ayırmaktadır (106).

Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemleri

1987 yılında kullanılmaya başlayan nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri ile örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve böylece tanı konmaktadır. Sıvı veya katı besiyerlerinde üreyen mikobakterilerden yaklaşık 2 saat gibi bir sürede sonuç alınabilmekte olup bu yöntem geleneksel biyokimyasal yöntemlere bir alternatif oluşturmaktadır. Yüksek özgüllüklü, düşük duyarlılıklılırlar. İnhibitörlerden etkilenmeyen, kontaminasyon riskinin çok düşük olduğu yöntemlerdir (106).

Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Polymerase chain reaction*=PCR)

Nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test sistemidir. Bu yöntem hedef DNA'nın seçici olarak amplifikasyonuna ve birkaç saatte bir milyondan fazla DNA sekansının elde edilmesi esasına dayanır. Böylece klinik örneklerde bulunan etken, kısa sürede gösterilip, tanımlanıp, moleküler olarak tiplendirilip ve hatta ilaç direnci saptanabilmektedir (107). PCR yönteminin Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmasından sonra hızla tanı laboratuvarlarına girmiştir. Hızlı sonuç vermesi, konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor ya da imkansız mikroorganizmaları saptayabilmesi ve yüksek duyarlılığı nedeniyle klinik mikrobiyoloji alanında önemli bir tanısal yöntem haline gelmiştir.

Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın nükleik asitlerinin varlığının saptanmasıdır. Bu amaçla canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir. Bakteri hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin işlevleri, farklı sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirilir.

Bakteri replikasyonunun başlayabilmesi için ilk basamak, DNA çift zincirlerinin birbirinden ayrılmasıdır. Bu aşamaya denatürasyon denir. Bakterilerde bu işlem helikaz enzimi tarafından gerçekleştirilirken, PCR yönteminde 94°C ısı uygulanarak, çift zincirin birbirinden ayrılması sağlanır. İkinci aşama, bağlanma (*annealing*)dır. Bakterilerde primaz enzimi ile gerçekleştirilen DNA üzerinde polimerazın bağlanacağı RNA dizisi yerine, PCR'da kullanılan primerler, sentetik olarak oluşturulmuş yaklaşık 20 nükleotit uzunluğundadır (108). Hedef bölgenin her iki ucunda komplementer oldukları bölgeleri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin PCR karışımındaki konsantrasyonları çok yüksek olduğu için ve boyları küçük olduğu için, denatüre olan DNA tek zincileri birbirlerine yeniden bağlanmadan önce hedef bölgeye bağlanırlar. Primerlerin bağlanabilmesi için gerekli sıcaklık 50-70°C'dir. Sıcaklık değerinin değişken olması, kullanılan primerin nükleotid içeriğine ve uzunluğuna göre değişir. PCR'da üçüncü aşama sentez yada polimerizasyondur. Normal bakteriyel replikasyon, uygun çalışma sıcaklığı 37°C olan DNA polimeraz enzimi tarafından yapılırken, PCR yönteminde yüksek

sıcaklıklarda çalışabilen *Taq* polimeraz enzimi kullanılır. *Taq* polimeraz enziminin optimum çalıştığı sıcaklık 72°C'dir. Sentez aşamasıyla birlikte, *Taq* polimeraz, hedef DNA'ya tutunmuş olan primerlerin 3' ucundan itibaren zincire yeni nükleotidler ekleyerek komplementer zincir sentezine başlar. Her iki primerden itibaren 5'-3' yönünde komplementer DNA sentezine devam edilir. Her yeni eklenen nükleotidin 3' hidroksil ucu açıktadır. Bir sonraki nükleotid bu uca bağlanır. Bu işlem, hedef DNA'nın her iki tek zincirinde de gerçekleşir. Bu nedenle sentez, 5'-3' yönünde diğer uçtaki primer bağlanma bölgesini de geçerek devam eder. Oluşan bu yeni DNA parçalarına uzun ürün adı verilir. Uzun ürünler, primer bağlanma bölgelerini içerdiğinden, bir sonraki döngüde kalıp DNA görevi görebilirler. Bir döngü tamamlandıktan sonra, yine aynı döngüye en başından başlanır. İkinci döngü sonunda elde edilen DNA dizileri, iki primerin bağlanma bölgeleri arasındaki bölge olur. Buna kısa ürün denilir. Kısa ürünler, asıl çoğaltmak istediğimiz hedef DNA dizileridir.

PCR'da üç aşamanın birbiri ardına tekrarlanmasıyla hedef bölge, geometrik olarak çoğalır. Döngü sayısı "n" olan bir PCR reaksiyonu sonunda 2^n sayıda uzun ürün, 2^n sayıda hedef bölge kopyası elde edilmiş olur. 40-50 döngü yapılan PCR sonunda hedef bölgenin milyarlarca kopyası elde edilmiş olur (45,92,106).

Buradan anlaşılacağı gibi PCR'in gerçekleşmesi için reaksiyon tüpünde aranan mikroorganizmaya özgül primer dizileri, DNA zincir sentezinde kullanılacak nükleotitler (A, G, C, T), nükleotitlerin komplementer bağlanması için bir yardımcı faktör olan Mg^{+2} iyonları, *Taq* polimeraz enzimi ve enzimin tamponu bulunmalıdır (108). Buna ek olarak içinde nükleik asit aranacak örnek de eklenmelidir. In vitro DNA çoğaltması için gerekli sıcaklık kontrolü "thermal cycler" denilen otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir.

Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yapılır. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA dizileri etidyum bromür gibi çift zincirli DNA boyaları ile boyanarak morötesi ışık altında görüntülenir. Konvansiyonel PCR'in avantajları olduğu gibi, dezavantajları da vardır. En önemli dezavantajlarından biri olan elektroforez aşamasının ortadan kaldırılması için 1990'ların ikinci yarısında çeşitli

teknolojik ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu sayede otomatize PCR sistemleri ve “real-time PCR” yöntemleri geliştirilmiştir.

Cobas Amplicor

Elektroforez aşamasının ortadan kaldırılarak işlem süresinin kısaltılması ve PCR’ın kapalı bir sistem içinde daha az kontaminasyon riskine maruz bırakılması amacıyla yarı otomatize Cobas Amplicor sistemi geliştirilmiş ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemde cihaz içinde işaretli primerler ile gerçekleştirilen PCR sonrası çoğaltılan ürünler ELISA formatıyla saptanmaktadır.

Konvansiyonel PCR ve PCR+ELISA formatlarında yapılan kantitasyon “end-point kantitasyon” şeklindedir. Bu yöntem ilk örnekteki mikroorganizma miktarını saptamakta çok sağlıklı bir yaklaşım değildir (108).

“Real-time (Gerçek Zamanlı) PCR”

Sağlıklı kantitasyon yapmak, kontaminasyonu en aza indirmek, hızla sonuca ulaşmak, özgüllüğü yükseltmek ve çok sayıda klinik örneği çalışabilmek için “real-time PCR” formatı geliştirilmiştir. “Real-time PCR” yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır. “Real-time PCR”da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir.

Syber Green Boyası Kullanılarak “Real-time PCR” ile Amplifikasyonun Saptanması:

Özgül olmayan çift zincirli DNA boyalarının kullanıldığı bir yöntemdir. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I’dir. Primerlerin bağlanmasını takiben

gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu için gerçekleştiği, yoksa özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılır (106,108).

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Probları Kullanılarak “Real-time PCR” ile Amplifikasyonun Saptanması:

Çoğaltılan hedefin özgül olarak saptanması amacıyla işaretli problemlerin kullanıldığı yöntemlerden biridir. Özgül problemlerden biri 3' ucundan floresan boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlidir. Bu tür problemlere dual hibridizasyon problemleri adı verilir ve uzunlukları 30 nükleotide kadar olabilir. Lineer hibridizasyon problemleri kullanılarak “real-time PCR” ile amplifikasyonun saptanması, direkt hibridizasyon esasına dayanır. Bağlanma sonrasında ikinci problemin 5' ucundan sentez olmaması için bu uca bir fosfat bağlanmıştır. Problemler hedef bölge üzerinde birbirine yakın yere (1-5 nükleotid uzaklıkta) bağlanır ve işaretli uçlar yanyana gelmiş olur. İki boyanın yanyana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci problem üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan oluşumuna neden olur. Oluşan floresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine yani PCR ile oluşan ürün miktarına bağlı olarak artar. Her PCR döngüsünün düşük sıcaklık basamaklarında problem hedef DNA'ya bağlanarak ışımaya sağlar, yüksek sıcaklık basamaklarında hedeften ayrılır. Her döngüde, problemlerin bağlanabileceği hedef DNA miktarı arttığı için, sinyal miktarı da artar (92,108,109).

TaqMan Problemleri Kullanılarak “Real-time PCR” ile Amplifikasyonun Saptanması (5' ekzonükleaz aktivitesi):

Bu sistemde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli TaqMan problemleri kullanılır. Bu problemlere çift işaretli (*dual labelled probe*) problemler denilmektedir. Problemin 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunur. Problem, tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Problem ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması,

3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan miktarında artma gözlenir. Bu yöntemde ışımaya probun DNA'ya bağlanmasıyla değil, probun kırılarak ayrılmasını sağlayan 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile oluşur. Bu nedenle bu tür problemlere hidroliz problemleri adı verilir (106,108).

Moleküler Firkete (*Molecular Beacon*) ve Diğer Konformasyonel Problemler Kullanılarak "Real-time PCR" ile Amplifikasyonun Saptanması:

Konformasyonel problemlerle PCR ürününün saptanması, DNA'ya bağlandıktan sonra meydana gelen yapısal değişiklik sonucunda ışımaya oluşması esasına dayanır. "Molecular beacon" yapıları, TaqMan problemlerinden geliştirilmiştir. Bu nedenle kimyasal yapısı, 5' ve 3' uçlarında raportör ve baskılayıcı florokrom bulunması nedeniyle 5' nükleaz aktivitesinde kullanılan problemlere benzerdir. Ancak saptama aşaması, probun kırılmasıyla ışımaya oluşması esasına dayanmaz. Bu yapılar 5' ve 3' uçları bir firketenin iki ucunu oluşturacak şekilde, bükülmüş bir yapıda dizayn edilmişlerdir. Raportör ve baskılayıcı moleküllerin komşuluğunda birbirine komplementer diziler vardır. "Molecular beacon" yapısının komplementer olduğu hedef DNA'ya tam olarak bağlanabilmesi için, bu yapının doğrusal olarak açılması ve bu şekilde bağlanması gereklidir. Bu yapılar bağlanma sonucunda iki florokrom birbirinden uzaklaşır ve baskılayıcı etki ortadan kalktığı için ışımaya oluşur (108).

Nükleik Asit Üzerinde Özgül Problemlerin Çoğaltılması

LCR (Ligase Chain Reaction)

Prob hibridizasyon-ligasyon yöntemi olan LCR, DNA saptanması amacıyla geliştirilmiş yöntemlerden biridir. Bu sistemde termostabil ligaz enzimi kullanılır ve bu enzim sayesinde primerlerden amplikon üretmek yerine, problemler çoğaltılır. Normal PCR döngülerinin yapıldığı ısı döngü cihazında reaksiyon gerçekleştirilir. Bu yöntem ile sadece iki primer boyu kadar uzunlukta amplikonlar elde edilir. Kalıp

DNA denatüre olup tek sarmallar haline geldikten sonra, hedef bölge üzerindeki dizilere proplar yan yana olacak şekilde yerleşirler. Oligonükleotid proplar, termostabil ligaz enzimi ile birleştirilirler (ligasyon). Orijinal DNA dizi ve ligasyona uğraşım oligonükleotid çiftleri bir sonraki siklusta kalıp olarak kullanılır. Böylelikle tekrarlayan döngüler sonunda hedef dizi milyarlarca kez üretilmiş olur (106).

2.7. Tüberküloz Tedavisi

TB kemoterapisinin genel olarak beş amacı vardır:

- 1- Hastada kür sağlamak,
- 2- Ölümleri engellemek,
- 3- Relapsı engellemek,
- 4- TB bulaşını azaltmak,
- 5- İlaç direnci kazanmış bakterilerin gelişmesini durdurmak (110) .

Antitüberküloz ilaçların ise 3 ana özelliği vardır: hastalanmış konağın dokularında çoğalmakta olan çok büyük sayıdaki basilleri hızla öldürmek, ilaca dirençli klinik olarak anlamlı mutant suşların ortaya çıkmalarını önlemek, hastalık bölgelerini etkin şekilde sterilize etmek (111). Bu gün kullanılmakta olan antitüberküloz ajanlar bu üç amaca hizmet etmektedir.

İzoniazid (INH) ve rifampisin (RİF) en güçlü bakterisidal ilaçlar olup TB basillerinin tüm popülasyonlarına karşı etkindirler. Pirazinamid (PZA) ve streptomisin (STR) de bakterisidal olmakla birlikte bazı TB basil popülasyonlarına karşı etkilidir. Pirazinamid sadece asit ortamda aktiftir. Tedavi rejimleri 2 ay süren başlangıç dönemi ile genellikle 4 ay süren idame fazını kapsar (110).

Tedavi süreci başladığında, TB hastalarının tedaviye uyumsuzlukları genellikle karşılaşılan önemli bir sorundur. Bu sorunun çözümünde en etkili yöntem, hastanın ilaçlarını içerken bir görevlinin gözetimidir; bu, doğrudan gözetimli tedavi (DGT) olarak adlandırılmaktadır. Doğrudan gözetimli tedavi stratejisi ise TB kontrolünde temel stratejidir (112). DGT, çok farklı özellikleri olan birçok ülkede başarıyla uygulanmıştır. DGT Türkiye’de de son yıllarda uygulanmaya başlanmıştır ve giderek daha da yaygınlaşmaktadır (113).

DGT uygulaması ile ilgili veriler Sağlık Bakanlığı'nca aylık olarak toplanmakta, DGT uygulama süreci ise saha ziyaretleri ve telefon görüşmeleri ile aktif olarak takip edilmektedir. Elde edilen verilere göre Türkiye'de 2008 yılı hastalarında tedavi süresince yapılan DGT oranı % 96,6'dır. 2010 yılında DGT uygulanan hastaların %74,7'sine sağlık personeli, %25,3'üne ev halkı ve diğer gözetmenler tarafından DGT uygulaması yapılmıştır (7).

TB Olgu Tanımları

Yeni olgu: Daha önce TB tedavisi görmemiş veya bir aydan daha az süre tedavi almış hasta (7).

Kronik olgu: Nüks, tedaviyi terk ya da tedavi başarısızlığı nedeniyle uygulanan yeniden tedavi rejiminin sonunda hala ARB (+) olan hastalar (7).

Nüks (Relaps): Tedavi edilen ve kür denilen olgunun yeniden yayma pozitif olması (7).

Kür: Başlangıçta ARB (+) olan olgunun biri tedavinin idame döneminde diğeri tedavinin tamamlandığı sırada olmak üzere en az iki kere ARB (-) olması(7).

2.8. Tüberkülozda İlaç Direnci

MTBK suşlarında direnç, doğal olarak direnç genlerinin varlığına veya spontan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bakteriler arası gen aktarımı yoluyla direnç oluşmamaktadır. Plazmitlere bağlı direnç tanımlanmamıştır. Doğal direnç olasılığı: RİF için 10^{-8} , INH ve etambutol (EMB) için 10^{-6} , STR için 10^{-5} , INH+RİF birlikte kullanıldığında 10^{-14} , INH+RİF+ETB birlikte kullanıldığında 10^{-20} kadardır (114,115).

Direnç İle İlgili Tanımlar

Dirençli olgu: En az bir TB ilacına dirençli hasta.

Primer direnç: Bir aydan kısa süre ya da hiç ilaç kullanmamış hastada görülen direnç. Primer direnç; basilin alındığı kaynağa ait olan dirençtir. Bir toplumdaki sekonder direnç oranıyla paralellik göstermektedir. Primer direnç oranının yüksek olması o toplumda uygulanmakta olan TB korunma ve kontrol önlemlerinin yetersizliğini yansıtmaktadır (116).

Sekonder direnç (kazanılmış): Başlangıçta duyarlı olan basillerle infekte olan TB hastasında, uygun olmayan tedaviye (ilaç seçimi, erken ilaç kesme, tedaviye uyumsuzluk) bağlı olarak dirençli mutantların artması sonucu gelişen dirençtir. Artmış sekonder direnç, uygulanmakta olan tüberküloz tedavi protokolünün yetersizliğinin göstergesidir (116).

Çok ilaca dirençli TB (ÇİD-TB): TB tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlardan en az INH ve rifampisine karşı direncin birlikte bulunması olarak tanımlanır. Bu direnç kalıbında tedavi başarı oranı %56 gibi düşük düzeydedir. ÇİD-TB'li hastaların ortaya çıkışı, o ülkede uygulanan tedavi programlarının yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. ÇİD-TB gelişimi insan kökenli hatalardan oluşmaktadır (4).

ÇİD-TB tedavisi zor ve pahalı olup, ilaçların daha uzun süre kullanımını gerektirmektedir. Hastalar uzun süre yayma pozitif kaldıklarından daha çok kişiyi enfekte edebilirler. ÇİD-TB'li hastalardan enfeksiyonu alan kişilerde hastalık gelişince, benzer direnç kalıbı ortaya çıkmaktadır (primer ÇİD-TB). Bu durum gelecek nesiller için TB tedavisini kısıtlı bir hale getirmektedir (4,53). ÇİD-TB olgularının sayısı giderek artmaktadır. 2011 yılında dünya genelinde akciğer tüberkülozlu hastaların 310,000'inin ÇİD-TB olduğu bildirilmiştir (4). Türkiye'de ise 2009 yılında bütün tüberkülozlu olguların arasında 222 (%5,1) ÇİD-TB olgusu bildirilmiştir (7).

Yaygın ilaç dirençli TB (YİD-TB): YİD-TB, INH ve RİF yanında bir florokinolona ve enjekte edilebilir üç aminoglikozidden (kanamisin, kapreomisin ve amikasin) en az birine direnç durumudur (4).

YİD-TB tedavisi, ÇİD-TB göre daha masraflı ve zordur (117). Bunun yanı sıra YİD-TB'da mortalite daha yüksektir. Dünya genelinde YİD-TB olgusu, tüm TB olguları arasında %9 oranında görülmektedir (4).

2.9. Antitüberküloz İlaçların Etki ve Direnç Mekanizmaları

Günümüzde TB tedavisinde kullanılan ilaçlar birinci sıra (primer, majör) ve ikinci sıra (sekonder, minör) olarak iki grupta toplanmaktadır (118,119). Birinci sıra

ilaçlar; INH, RIF, PZA, ve EMB'den oluşmaktadır. Bu ilaçların, EMB dışında bakterisidal etki gösterdikleri kabul edilmektedir. Ancak diğer antimikrobiyal ilaçlarda olduğu gibi bu ilaçları bakteriyostatik ve bakterisidal olarak sınıflamak pek uygun görülmemektedir. Çünkü alınan dozlara, birlikte kullanılan diğer ilaçlara ve in vivo etkinliğe bağlı olarak bakteriyostatik ve bakterisidal etkinliklerin değişikliğe uğrayabildiği farklı klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Sözü edilen bu ilaçların toksisiteleri azdır ve kombine şekilde kullanıldıklarında oldukça etkilidirler. Basiller duyarlı olduğu sürece TB tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır (118).

İkinci sıra ilaçlar; kapreomisin, kanamisin, etionamid, paraaminosalisilik asit, ofloksasin, siprofloksasin , sikloserinden ve streptomisinden oluşmaktadır. Bu grup ilaçlar, birinci seçeneklere göre daha az etkili, daha çok toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. İkinci seçenek ilaçlar, genellikle birinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştiğinde ya da toksik etki meydana geldiği durumlarda kullanılırlar (118).

Diğer ilaçlar; TB tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar olan kinolonlar, amikasin, rifabutin, klofazimin ve beta laktam-beta laktamaz inhibitör kombinasyonları, imipenem, proklorperazin, metronidazol ve linezolid bu grup içersindedir (120,121).

2.9.1. Rifampisin

RİF, DNA'ya bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesine bağlanıp RNA sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Bu ilaç, yarı-sentetik, bakterisidal etkilidir(122). 2011 Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın raporuna göre Türkiye'de rifampisine primer direnç %3,8 sekonder direnç %23,2 olarak saptanmıştır (7). Yaklaşık 500 rifampisine dirençli MTBK izolatının %96'sında rifampisin direncinden, RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 81bp'lik RDBB bölgesindeki mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir (123). En sık görülen (~%50) ve yüksek MİK değerli dirençten sorumlu mutasyon 531. kodon mutasyonudur. İkinci sıklıkla 526. kodon mutasyonları bildirilmektedir (1). Düşük MİK değerli rifampisin direnci 511, 516, 518 ve 522. kodonlardaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur (123).

2.9.2. İzoniazid

INH bir ön ilaçtır, katalaz-peroksidaz enzimiyle aktive olur. Sentetik yapıdadır. Çoğalan basiller üzerine bakterisid etkilidir(122). 2011 Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın raporuna göre Türkiye'de izoniazide primer direnç %10,2 sekonder direnç %30,5 olarak saptanmıştır(7). MTBK suşları bu ilaca yüksek oranda spontan direnç geliştirme özelliğine sahiptir. Etkisini mikobakteri duvarının önemli yapı taşı olan mikolik asit sentezini önleyerek yapmaktadır. INH, MTBK suşları tarafından alındıktan sonra mikobakteriyel katalaz-peroksidaz enzimi tarafından okside edilerek aktif ara ürünlere parçalanır. INH'nin aktif metabolitleri mikolik asit sentezinde rol alan ve *inhA* geni tarafından kodlanan bir enzim olan enoil açıl carrier protein redüktazı (enoil ACP redüktaz) inhibe etmektedir. Böylece hücre duvarı sentezi için önemli olan mikolat yapımındaki yağ asidi uzaması engellenmiş olur. Bakteriye koruyucu katalaz peroksidaz enziminin INH tarafından inhibe edilmesi de diğer bir etki mekanizmasıdır. INH'a karşı dirençten sorumlu tutulan gen mutasyonları şunlardır:

***katG* mutasyonu:** MTBK suşlarının katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan katalaz-peroksidaz genindeki (*kat G*) mutasyon, katalaz negatif suşlarda izoniazidin aktif ara ürünlere dönmemesine neden olur ve ilaca direnç ortaya çıkar. Bu mekanizma klinik izolatlardaki ilaç direncinin ~%50'sinden sorumludur (52).

***inhA* mutasyonu:** Bu gendeki mutasyonların çoğu *inhA* gen ekspresyonunun artmasına, dolayısıyla mikolik asit sentezinin sürekliliğine neden olan fazla miktarda enzim oluşmasına neden olur. INH direncinin yaklaşık %25'inden sorumludur (115).

***ahpC* mutasyonu:** INH direncinin ~%10-15'inden sorumlu olan bu direncin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, *ahpC* geninin düzenlenmesinden sorumlu olan *oxyR* geninde doğal olarak görülen eksikliklerin bu dirence ilişkili olduğu düşünülmektedir (115).

2.9.3. Pirazinamid

PZA, nikotinamidin sentetik analogudur (122). CLSI, klinik örnekten izole edilen her bir MTBK suşunun PZA duyarlılığının çalışılmasını önermektedir (35). PZA bakterisidal etkili bir ilaçtır. Oldukça güçlü tüberkülosid etkisi vardır. Bu

etkisini hem çoğalma halindeki hem de yarı dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde gösterir. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili tüberkülosiddir. Kazeöz lezyonlardaki mikobakterilere RİF kadar etkilidir. INH'den ise daha fazla etkilidir (122,124) . PZA, TB tedavisini kısaltmada çok önemli bir rol oynar; çünkü PZA diğer TB ilaçları tarafından öldürülmeyen asidik ortamlardaki yarı dormant basil popülasyonunu öldürür. PZA'nın aktivite göstermesi için neden asidik bir ortama gereksinim duyduğu bilinmemektedir. Tüberkülosid etkisinin mekanizması belli değildir. Günümüzde tedavi programlarında birinci sıra ilaç şeklinde INH ve RİF'e ek olarak kullanılmaktadır. Eliminasyon yarılanma ömrü 10-16 saattir (124).

Türkiye'de tek başına pirazinamide primer direnç %3, sekonder direnç %13 olarak saptanmıştır (7). MTBK suşlarının ürettiği pirazinamidaz enzimi, pirazinamidi pirazinoik asit denilen aktif şekline dönüştürür. PZA dirençli kökenler pirazinoik aside duyarlıdır, ancak pirazinoik asit farmakokinetik özelliklerinden dolayı in vivo etkisizdir. Pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar pirazinamid direncinden %70-100 oranında sorumlu bulunmuştur. Direnç enziminin işlevinin bozulmasına bağlı olduğu için mutasyonlar *pncA* geninde çok çeşitli ve değişik bölgelerde görülmektedir (124). Buna karşın *pncA* geninin üç bölgesinde (3 ile 17, 61 ile 85 ve 132 ile 142. kodonlar arasında) belli bir kümeleşme görülmektedir. Bu bölgede anlamsız (*missense*) mutasyonların yanısıra delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonlarının olabileceği bilinmektedir. Yüksek MİK değerli pirazinamid direnci olan ancak *pncA* geninde mutasyon içermeyen izolatlarda başka direnç mekanizmalarının etkili olduğu düşünülmektedir (123).

2.9.4. Etambutol

EMB, sentetik yapıda, bakteriyostatik etkili bir ilaçtır (123). Etambutol arabinogalaktan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinozil transferaz enzimiyle etkileşerek MTBK'nın hücre duvarı sentezini bozar. Arabinozil transferaz enzimini kodlayan *embCAB* geninde meydana gelen mutasyonlar % 70 oranında etambutol direncinden sorumludur (123). Özellikle en sık görülen mutasyonlar % 60 oranında *embB* geninin 306. kodonundaki metionin aminoasidindeki değişikliğe bağlıdır (1,123,126). Metionin aminoasidi izolösine (ATG →ATC, ATA ve ATT

mutasyonları ile), lösine (ATG →CTG mutasyonu ile) ve valine (ATG →GTG mutasyonu ile) dönüşebilmektedir.

2.9.5. Streptomisin

STR, bakterisidal etkili bir aminoglikozittir (122). STR bakteri ribozomuna bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Ribozomal protein S12'yi 11 kodlayan *rpsL* genindeki mutasyonlar (% 60) ve 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlar (< %10) STR direncinden sorumludur. En sık görülen *rpsL* genindeki Lys 43 Arg mutasyonu olup daha nadiren Lys 43 Thr mutasyonu da görülmektedir (123). Bu gende ayrıca Lys 88 Arg veya Lys 88 Gln mutasyonları da saptanmıştır. Bu gendeki mutasyonlar yüksek MİK değerli STR direncinden sorumlu bulunmuştur (123). STR direncinden sorumlu diğer mutasyonlar *rrs* geninin 530 halkası ve 915 bölgesinde bulunmaktadır. STR'e karşı düşük değerli MİK direncinin, hücre zarında oluşan değişiklikler sonucu ilacın hücre içine girişinin azalmasıyla olabileceği düşünülmektedir (123).

2.9.6. Kanamisin, Amikasin, Kapreomisin

Kanamisin, amikasin ve kapreomisin protein sentezini inhibe ederek etkilerini gösteren aminoglikozitlerdir. STR ile kanamisin veya amikasin arasında çapraz direnç bulunmazken, kanamisin ve kapreomisin arasındaki çapraz direnç değişkendir. Kanamisin ve amikasine karşı yüksek MİK değerli dirençten *rrs* geninde A 1400 G nükleotid değişikliğinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (123).

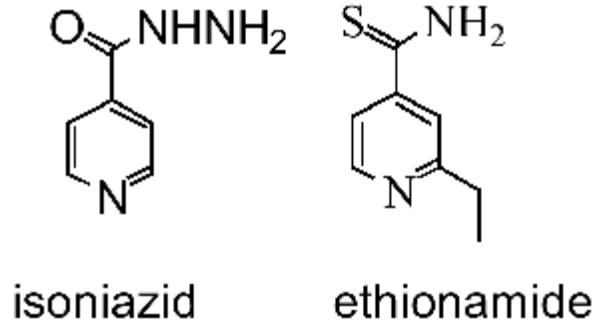
2.9.7. Florokinolonlar

Florokinolonların bakterideki hedefi DNA giraz (Topoizomeraz II) enzimidir. Bu enzim kromozomal çift sarmallı bakteri DNA'sında reversibl kesme, tekrar bağlamafonksiyonuyla negatif kıvrılmalar yaparak, DNA'yı hücre içine sığdırır (123). DNA giraz enzimi *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt ve *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B alt birimden oluşur. MTK'in *gyrA* genindeki küçük bir bölgesinde oluşan mutasyonlar yüksek MİK değerli kinolon direncinden sorumlu bulunmuştur (>%90) (123). Bununla birlikte *gyrB* genindeki mutasyonlar nadirdir, düşük MİK değerli dirençten sorumludur ve fenotipe her zaman direnç olarak yansımamaktadır.

2.9.8. Rifabutin

Rifampisin, rifamisin-B'nin yarı sentetik türevidir, rifabutin ise rifamisinin spiropiperidil derivativesidir(123) . Etki mekanizması rifampisinle aynıdır. Rifampisin ve rifabutin arasında çapraz direnç oranı yüksektir. Özellikle HIV'le enfekte hastaların tedavisinde tercih edilir (75).

2.9.9. Ethionamid



Şekil 2.3. İzoniazid ve ethionamidin moleküler yapıları (125).

Ethionamid, isoniazidin yapısal analogu olup, MTK'de mikolik asit biyosentezini inhibe eder. Ethionamid direncinden *inhA* genindeki mutasyonların sorumlu olduğu düşünülmektedir (123).

2.9. İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi

MTBK suşlarının neden olduğu enfeksiyonların etkili tedavisinin yapılabilmesi için, tedavide kullanılan antitüberküloz ilaçların duyarlılıklarının belirlenmiş olmasının önemi büyüktür. CLSI'nın M24-A2 kodu ile yayınladığı dökümanında MTBK duyarlılık testleri için standartlar belirlenmiştir (35). Buna göre orantı yöntemi PZA hariç bütün antitüberküloz ilaçların duyarlılıklarının çalışılmasında standart metod olarak kabul edilmiştir. Orantı yöntemini PZA duyarlılığı için kanıtlanmış doğru bir yöntem değildir. Çünkü PZA duyarlılığının çalışılabilmesi için asit pH'ya ayarlanmış agarda mikobakteriler üreme safhasında ölebilmektedir veya üremeleri durabilmektedir. Bu nedenle PZA duyarlılığı çalışılmasında radyometrik yöntem olan Bactec 460 TB sistemi referans yöntem olarak önerilmektedir (35). PZA duyarlılığı çalışmak için radyometrik olmayan

ticari hızlı sıvı kültür duyarlılık sistemleri geliştirilmiştir. MGIT 960'da bunlardan biridir. Bu sistemlerin performanslarının radyometrik sisteme eşit olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (35,127).

Duyarlılık testleri, doğrudan veya dolaylı olarak uygulanabilmektedir. Doğrudan testte, ARB pozitif klinik örnek işlendikten sonra, ilaçlı ve ilaçsız besiyerine ekilmektedir. Dolaylı testte ise, besiyerinde saf olarak üretilmiş basillerden hazırlanan süspansiyondan, ilaçlı ve ilaçsız besiyerine ekim yapılır (35).

Antimikobakteriyel duyarlılık belirlenmesinde kullanılan yöntemler, kültüre dayalı yöntemler ve moleküler yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

2.10.1. Kültüre Dayalı Yöntemler

Kültüre dayalı yöntemler, klasik ve hızlı kültür yöntemleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Klasik Kültür Yöntemleri

Orantı Yöntemi (Doğrudan-Dolaylı)

Bu yöntemde MTBK suşları kültürde üredikten sonra 0.5-1 McFarland hazırlanıp 10^{-2} ve 10^{-4} dilusyonları basillerden ayarlanan inokulumun birkaç dilüsyonu eşit miktarlarda ilaç içeren ve ilaç içermeyen agar temelli besiyerlerine ekilip 3 hafta inkübe edilir. Burada kullanılan besiyerleri Middlebrook 7H10 veya 7H11'dir. İnkübasyon sonunda ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen besiyerindeki koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını gösterir. Test edilen suşlarda hesaplanan direnç yüzdesi %1'den daha fazla ise o suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edilir (35). Sonuçlar genellikle, 21 günlük inkübasyon sonrasında elde edilir (128).

Hızlı Kültür Yöntemleri

Hızlı kültür yöntemlerine örnek olarak E-test, Alamar Mavisı Kolorimetrik Yöntemi, Mycolor TK gibi yöntemler sayılabilmektedir. CLSI tarafından önerilen sistem olan Bactec 460 ile çalışmamızda kullanılan MGIT 960 sistemleri yaygın olarak kullanılan sistemlerdir (35).

BACTEC 460 Sistemi

BACTEC TB 460 sistemi klasik yöntemlerle aynı temele dayanır. Farkı sıvı besiyeri (Middlebrook 7H12;12B) kullanılması ve 3 hafta sonra koloni sayılması yerine, üremenin radyometrik olarak takip edilmesi ve sonuçların 4-5 gün içerisinde verilebilmesidir. Bu yöntemle özellikle ilk sıra antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık test edilebilmektedir. Dirençli basillerin oranının belirlenememesi ve radyoaktif madde kullanımı gibi dezavantajlara sahipse de, hızlı, güvenilir bir yöntem olması ve agar orantı metodu ile %90 uyumlu olması nedeniyle birçok merkez tarafından kullanılmaktadır. Bu yöntemde duyarlılığı saptanacak her suş için dört antibiyotikli (STR, INH, RİF, EMB) ve bir antibiyotiksiz olmak üzere beş adet 12B besiyeri kullanılır. Besiyerlerine her ilaçtan 0.1 ml ve 12B besiyerinde üreme indeksi (Growth Index=GI) 500-800 arasında olan denenecek suştan 0.1 ml eklenir. Kontrol şişesinin hazırlanması için, orijinal suş Bactec dilüsyon sıvısı ile %1 direnci saptamak için 1/100 oranında sulandırılır. 37⁰C’de inkübe edilen besiyerleri Bactec cihazında her gün aynı saatlerde okutularak, 4-12 gün boyunca GI’ ları takip edilir.

BACTEC MGIT 960 SIRE

Kültürdeki MTBK suşlarının STR, INH, RİF ve EMB’ye karşı duyarlılığını test etmek üzere MGIT 960 cihazında uygulanan hızlı ve kalitatif bir yöntemdir (128). Bactec MGIT 960 SIRE Kit MTBK’nın antimikobakteriyel duyarlılık testi için tasarlanmıştır. SIRE kiti 20 mL Middlebrook, sığır albümini, katalaz, dekstroz ve oleik asitten oluşan (OADC) zenginleştirici içerir.

BBL MGIT 7 mL mikobakteri üreme indikatör tüpü, mikobakterilerin çoğalmasını ve saptanmasını destekleyen modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren bir tüptür. MGIT tüpü, yuvarlak altlı tüpün alt kısmında bulunan silikonla kaplanmış floresan bir bileşim içerir. Floresan bileşik, sıvı besiyerinde çözünen oksijenin varlığına duyarlıdır. Çözünmüş oksijenin başlangıç konsantrasyonu bileşik emisyonunu bastırıldığı için çok az floresans tespit edilebilir. Daha sonra, aktif olarak solunum yapan mikroorganizmaların oksijeni tüketmesi bileşimin floresans vermesine neden olur (128).

Bactec MGIT 960 SIRE kiti 4 ila 13 günlük kalitatif bir testtir. Bu test, MTBK izolatının, ilaç içermeyen tüple karşılaştırıldığında ilaç içeren tüpte üremesine dayanır. Bactec MGIT cihazı, tüpleri artan floresans bakımından izler. Cihaz tarafından ilaç içeren tüpteki floresans üreme kontrolü tüpündeki floresansla karşılaştırılarak, duyarlılık sonuçları belirlenir. Bactec MGIT cihazı, önceden tanımlanmış (ilaç içeren tüpteki üremeyi, üreme kontrolü tüpündeki üremeye karşılaştıran) algoritmaları kullanarak bu sonuçları otomatik olarak yorumlar ve duyarlı veya dirençli sonuç cihaz tarafından rapor edilir.

Bactec MGIT 960 SIRE testi, duyarlılık sonucunu Bactec 460TB sistemi ile yaklaşık olarak aynı zaman aralığında verir. Ayrıca, bu yöntem radyometrik olmayan bir yöntemdir ve uygun antibiyotik duyarlılığı sonuçlarının çoğu durumda orantı yöntemine göre daha önce raporlanmasına olanak verir (128).

2.10.2. Moleküler Yöntemler

MTBK suşlarında ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra, direncin erken saptanmasına yönelik moleküler yöntemleri kullanma çalışmaları başlamıştır (1,2,34,129-131). Klasik yöntemlerde haftalar süren duyarlılık testlerinin moleküler yöntemlerle kısa sürede alınabilmesi hedeflenmiştir. Dirençten sorumlu mutasyonları taramak için kullanılan moleküler yöntemler; uygun antibiyotiklerle erkenden tedaviye başlanmasına, tedavinin başarılı olmasına ve tüberkülozun kontrol altına alınmasına büyük katkı sağlayacaktır. Bu yöntemlerden bir kısmında kültüre gerek kalmadan, doğrudan klinik örnek üzerinden yapılan uygulamayla direnç ortaya konulabilmektedir (115). Moleküler yöntemlerle en iyi sonuç RIF direncini belirlemede alınmakta; SM, INH ve siprofloksasine dirençli suşların sırasıyla ~%40, %10-15 ve %25 kadarı bu yöntemlerle saptanamamaktadır (132). Moleküler yöntemlerin dezavantajları; yüksek maliyet, klinik olarak dirence yol açan bakteri topluluğu içindeki dirençli suşların duyarlılara oranının kesin olarak belirlenememesi, saptanan mutasyonların (sessiz mutasyonlar) her zaman ilaç direnciyle ilişkili olmamasıdır (132).

Kullanılan moleküler yöntemlerin çoğunda üç ana aşama vardır:

- 1) Klinik örneklerden nükleik asitin ekstraksiyonu,
- 2) Gendeki dirençten sorumlu spesifik bölgenin amplifikasyonu,

3) Çoğaltılan gen bölgesi üzerindeki mutasyonların saptanması (33).

Bu aşamalarda işlemler kısaltılabildiği ölçüde uygulanan testin sonuç verme süresi erken olabilmektedir. Yöntemlerin çoğunda zaman kaybının, çoğaltılan genlerdeki dirençle ilişkili mutasyonların gösterilmesi aşamasında yaşanmaktadır. Bu aşamada birçok yöntem kullanılmaktadır. Katı faz hibridizasyon testleri (INNO-LiPA RIF TB, GenoType MTBDR, *microarray*), DNA dizi analizi, PCR tek zincir konformasyon polimorfizmi (*single strand confirmation polymorphism analysis*) (PCR-SSCP), heterodupleks analizi, “pyrosequencing”, mutasyona özgü primer ile amplifikasyon, “real-time PCR” ve amplifikasyon ürününün mutasyona özgü restriksiyon enzimle analizi gibi işlemlerle hedef gendeki değişimler saptanabilmektedir (1,133-138).

DNA Dizi Analizi

Bu yöntemle bilinen mutasyonlar yanında, önceden bilinmeyen mutasyonlar da saptanabilmektedir. Genelde özgüllük ve duyarlılığı tam olarak bulunmaktadır (139). Ancak, geleneksel DNA sekanslama işleminin 1-2 gün içerisinde sonuç vermesi ve fazla manüplasyon işlemlerinin olması nedeniyle rutin uygulanan bir yöntem değildir (132). Çoğunlukla diğer moleküler test sonuçlarını doğrulama ve araştırmalar için kullanılmaktadır. En yaygın olarak, Sanger’ın geliştirdiği zincir sonlandırma metodu kullanılmaktadır (45). Bu yöntemde PCR karışımına deoksi nükleotid trifosfatların (dNTP) yanında dideoksi nükleotid trifosfatlar (ddNTP) da konulur. ddNTP’lerin, deoksiribozlarının 3’ ucunda OH grubu yoktur. Polimerizasyon sırasında DNA polimerazın yeni zinciri sentezlemesi esnasında, dNTP’leri kullanırken bir tane ddNTP denk gelip kullandığında polimerizasyon işlemi durur. Çünkü 3’ OH grubu olmayan ddNTP bağlandıktan sonra, peşine yeni bir baz bağlamaz. Zincir bu noktada işaretli nükleotid ile sonlanmaktadır. Bu yöntemle DNA dizi analizi manuel veya otomatize olarak yapılabilir. Otomatize sistemde floresanla işaretli ddNTP’ler veya primerler kullanılır. Böylelikle baz dizilimi görünebilir hale getirilmektedir (107).

Katı Faz Hibridizasyon Testleri:

Katı faz hibridizasyon yöntemleri temel moleküler çalışmaların uygulandığı alt yapı olanakları sınırlı laboratuvarlarda bile kolayca uygulanabilen duyarlı ve özgül yöntemlerdir. Önemli dezavantajları bilinen mutasyonlar için tasarlandıklarından yeni mutasyonları saptayamamaları ve ayrıca amplifikasyondan sonraki aşamalarda yoğun iş yükü ve zaman kaybının olmasıdır. Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan yöntemin Inno-Line Probe Assay (InnoLiPA Rif TB) ve GenoType MTBDR/MTBDR plus olmak üzere iki ticari kiti bulunmaktadır. InnoLipa MTBK suşlarında RIF direncini saptayabiliyorken, MTBDR plus RIF ve INH direncini saptayabilmektedir (133).

DNA Mikroçip (Microarray) Analizleri

Katı faz hibridizasyon esaslı diğer bir yöntem DNA mikroçipleridir. Mikrobakterilerin tanımlanmasına ve çok sayıda farklı mutasyonların saptanmasına olanak sağlamaktadır. DNA mikroçip ile yapılan çalışmalarda *katG*, *inhA*, *rpoB*, *rpsL* ve *gyrA* genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır (134). Yöntemin en önemli avantajı klinik örnekten bakterinin saptanması, tür tayini, ilaç direncinin araştırılması ve virülans geninin aynı anda belirlenmesine olanak vermesidir. Dezavantajı ise pahalı ve ilaçların birçoğunun direnciyle ilgili mekanizmaların tam olarak bilinmemesi nedeniyle henüz beklenen düzeyin altında, sınırlı sayıda laboratuvarında uygulama olanağı bulmasıdır (133,134). Mikobakteriler için geliştirilmiş olan “CombiChip Mycobacteria Drug Resistance detection DNA chip” yöntemi ticari olarak moleküler yöntemler piyasasında yer bulmaya çalışmaktadır (133).

“Real-time PCR” (Gerçek Zamanlı PCR) ile Mutasyonların Saptanması

Yukarda bahsedilen yöntemlerin hemen hepsinde örnek hazırlama, nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyon ve sonuç gözlemlene işlemleri ayrı birer basamak olarak yapılmaktadır. Bu aşamalar, bir taraftan zaman kaybı diğer taraftan da iş yükünde artış ve bazen de gereksiz maliyet artışına neden olmaktadır. Teknolojik gelişmelere paralel olarak TB basillerinde tanı ve direnci belirlemede kullanılan moleküler testlerde de önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. En önemli ilerleme

amplifikasyon ve sonuç gözleme işlemlerinin eş zamanlı olarak yapılabilirdiği “real-time PCR” yöntemlerinin uygulamaya girmesidir. Amplifikasyon ve analiz işlemlerinin kapalı tek tüp içinde yapıldığı bu yöntem, DNA izolasyonunu takiben 1.5-2 saat içerisinde tamamlanmakta, bazı antitüberküloz ilaçlara direnci belirlemede kullanılabilir (1,18,20,129). İlaç direncinin “real-time PCR” ile saptanması, dirence sıklıkla neden olan mutasyonların bakteri genomunun belli bölgelerinde kümelenmesi durumunda faydalı olmaktadır. Çünkü mutasyonun gen üzerinde yaygın olması, mutasyonu kapsayacak prob sayısında artışa dolayısıyla maliyet artışına neden olmaktadır. Bu nedenle PZA direncine neden olan mutasyonlar gibi direnç bölgeleri, gen üzerinde oldukça dağınık halde bulunduğu için bu tarz ilaçların “real-time PCR” ile duyarlılıkları henüz çalışılmamaktadır (140).

Mutasyonların kümeleştiği durumda, genellikle mutasyon bölgelerini kapsayacak şekilde dizayn edilmiş FRET problemleri kullanılmaktadır. FFRET problemlerinin kullanıldığı çalışmalarda, bir verici floresan boya molekülü ile işaretli bağlantı probu, bir de alıcı floresan boya molekülü ile işaretli saptama probu olan 2 adet FRET probu, MTBK suşlarında ilaç direncini saptamak için kullanılır. FRET problemlerinden saptama probu mutasyon aranan bölgeye, bağlantı probu ise bu bölgenin hemen yakınındaki bölgeye uygun olarak hazırlanır. Aralarında 1-5 nükleotit uzaklık olacak şekilde yerleşen problemler, DNA zincirine bağlandıklarında, alıcı ve verici boya molekülleri yan yana gelir. Bu sayede yan yana gelen problemlerden bağlantı probundan saptama probuna enerji transferi olur ve saptama probu floresans yayar (147). Bu çalışmalarda, *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonları saptamak için iki FRET probu gerekmektedir. Bunun yanı sıra *katG* 315 mutasyonunu saptamak için de iki ayrı prob gerekmektedir. Bu sayede testin maliyeti, bizim testimizin maliyetinden çok daha fazla olmaktadır.

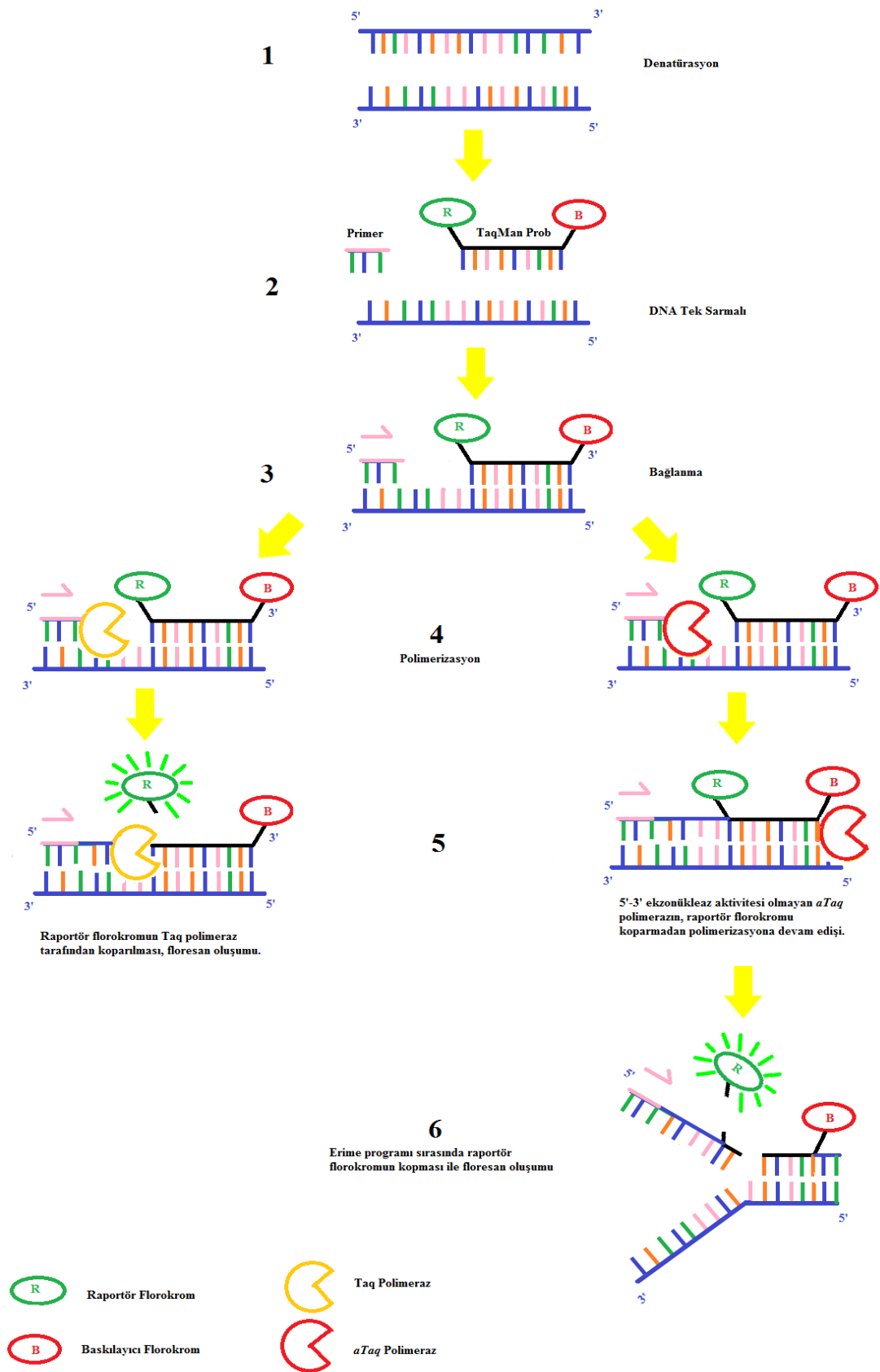
Maliyet sorununun yanı sıra, FRET probu temelli erime eğrisi analizi sadece Roche firmasının Light Cycler cihazları için geliştirilmiştir. Bu da FRET problemlerinin diğer “real-time PCR” cihazlarında kullanılmasını kısıtlayan en büyük sorundur.

Günümüzde artık bazı çalışmalarda yeni olarak geliştirilen yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi yapılmaktadır (28-30). HRM analizi, mutant suşlarda mutasyon taşımayan suşların EST derecelerindeki çok küçük farklılıkları

saptayabilmektedir. Ancak bunun için oldukça gelişmiş “real-time PCR” cihazları gerekmektedir. Bu çalışmada ise, mutant olan ve olmayan suşların EST değerleri arasında en az 5,0⁰C fark olması nedeniyle, bu ayırım kolaylıkla normal bir “real-time PCR” cihazında gözlemlenebilmektedir. Tüm problemler aynı floroforla işaretli olduğu için de tek kanallı “real-time PCR” cihazı bile, bu multipleks uygulama için yeterlidir.

TaqMan problemlerinin kullanıldığı bir “real-time PCR” uygulamasında floresan, problemlerin hedef DNA’ya bağlanması ile değil, problemlerin kırılarak ayrılmasını sağlayan 5’-3’ ekzonükleaz aktivitesi ile oluşmaktadır. Bu nedenle bu tür problemlere hidroliz problemleri adı verilmektedir. Gerek hibridizasyon (FRET) problemleri kullanıldığında, gerekse hidroliz problemleri kullanıldığında, her PCR döngüsünde oluşan floresan ışınım miktarı artar. Ancak floresan sinyali oluşumu, hibridizasyon problemlerinde hedef DNA’ya bağlanma sonucunda oluşurken, hidroliz problemlerinde hedef DNA’dan ayrılma sonucunda oluşur (109). Bu nedenle hibridizasyon problemleri mutasyonların saptanmasına yönelik erime eğrisi analizi için uygulanırken, hidroliz problemleri erime eğrisi analizinde kullanılmamıştır (108) Ancak TaqMan problemleri 5’-3’ ekzonükleaz aktivitesi olmayan aTaq polimeraz ile kullanılarak erime eğrisi analizine uygun hale getirilmişlerdir (1). Bu sayede TaqMan problemleri amplifikasyon aşamasında polimeraz enzimi tarafından kırılmadığı için, erime eğrisi analizine kadar hedef diziyeye bağlı bir şekilde bulunmakta ve erime eğrisi çizdirilerek mutasyonlar saptanabilmektedir.

TaqMan problemleriyle mutasyon saptanırken, erime eğrisi programı, PCR döngüleri tamamlandıktan sonra başlamaktadır. Tüpler cihaz tarafından yavaş yavaş 95⁰C’ye ısıtılır, yeniden denatürasyon işlemi başlar. Bu esnada mutasyon bölgelerine bağlanmış olan problemlerin de sıcaklık artışına bağlı olarak ayrılmaya başlayıp, raportör florokromun da bu ayrılma sırasında kırılmasıyla yoğun floresan açığa çıkar. Sonrasında da floresan miktarı hızla düşer. Floresanın en hızla düştüğü bu ayrılma sıcaklığı, erime sıcaklığı tepe (EST) değerini vermektedir (107,109). (Bkz. Şekil 2.4)



Şekil 2.4. 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi olan ve olmayan polimeraz enzimleriyle “real-time PCR” uygulaması ve erime eğrisi analizi karşılaştırması

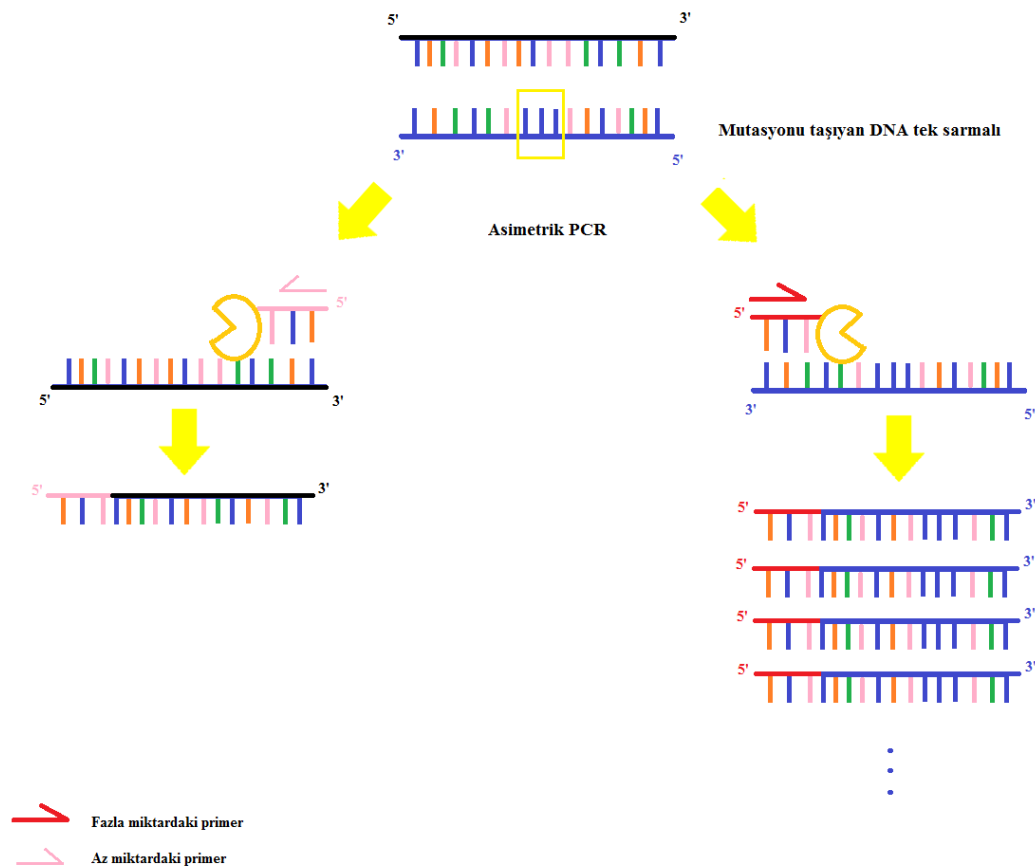
Şekilde gösterilen 1. basamakta, DNA denatürasyona uğrayıp çift sarmal yapısı ayrılmaktadır. 2. basamakta tek zincir haline gelen DNA dizilerine, komplementer olan ve hazırladığımız PCR karışımında bulunan primer ve problar karşılaşır ve bağlanır (3. basamak). 4. aşamada ise primere gelip bağlanan ve Taq polimeraz enzimi, polimerizasyona başlar. Bu esnada karşısına çıkan herhangi bir diziyi (DNA parçası, prob vb.) de 5'-3' ekzonükleaz aktivitesiyle parçalayıp polimerizasyona devam eder. Probonun raportör florokromu, kopma etkisi ile baskılayıcı florokromun etkisinden kurtulur ve floresan açığa çıkar. Ancak bizim çalışmamızda kullanılan *aTaq* polimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi olmadığı için amplifikasyon sırasında problar DNA'ya bağlı halde kalır. PCR tamamlandıktan sonra, erime eğrisi programındayken ısınma ile DNA çift sarmalı yeniden denatüre olmaya başlar. Bu esnada TaqMan proplarının raportör florokrom kısmı kopar. Floresan açığa çıkar (6. Aşama).

Amplifiye edilen gen bölgesinde aranılan mutasyon varsa, probun bölgeye eşleşmesi tam olamayacağı için, erime eğrisi analizi sırasında prob hedef DNA'dan daha kolay ayrılır. Mutasyon taşıyanların EST değerleri, mutasyon taşımayan suşlara göre daha düşük olur (1). Test sonunda mutasyon olmayan suşlar ile mutasyon olan suşların EST değerleri karşılaştırılarak, test edilen izolatların ilgili ilaca karşı duyarlı veya dirençli olduğu söylenebilmektedir (1,92).

TaqMan proplarıyla mutasyon analizinde palindrom dizilerin ilmek oluşturmamasına dikkat edilmelidir. Palindrom dizi, aynı DNA tek sarmalının birden fazla bölgesinde ve komplementer dizide 5'-3' yönünde aynı nükleotid diziliminin bulunması olarak tanımlanmaktadır (141). Birbirine komplementer dizilerin aynı iplikte bulunmasıyla ilmek veya firkete yapısı oluşmaktadır. Palindrom dizinin ilmek oluşturmamasını önlemek için hatalı nükleotidlerle probun dizisi tasarlanabilir (1).

Asimetrik PCR, bir konvansiyonel PCR modifikasyonu olup “real-time PCR” da da uygulanabilmektedir (142). Asimetrik PCR ile mutasyonu taşıyan DNA tek zincirinin amplifikasyonu, komplementer zincire göre daha fazla yapılmaktadır.

Bunu gerçekleştirebilmek için, PCR karışımında, mutasyonu taşıyan DNA tek zincirine bağlanacak primer konsantrasyonunun, komplementer ipliğe bağlanacak primer konsantrasyonuna göre daha fazla gerekmektedir. Böylelikle PCR aşamasında mutasyonu taşıyan zincir komplementer zincire göre daha fazla çoğalmaktadır. Buna bağlı olarak da, konvansiyonel PCR uygulamasında jelde daha net bantlar elde edilirken, “real-time PCR” sonunda alınan floresan miktarı daha fazla olmaktadır (1).



Şekil 2.5. Asimetrik PCR uygulaması ile mutasyonu taşıyan DNA tek sarmalının komplementer zincire göre daha fazla amplifiye edilmesi

GeneXpert MTB/RIF

TB tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay olan bu yöntem ile iki saat içerisinde örnekte MTBK varlığı ve aynı zamanda RİF direnci olup olmadığı saptanabilmektedir (136-138). Bu test, üç primer ve beş prob setinin kullanıldığı bir “yarı-nested “real-time PCR”” yöntemidir. Testin en

belirgin özelliklerinden biri, 2 mL üzerindeki yüksek örnek hacimleriyle çalışmaya başlanmasına uygun özel kartuşların kullanılmasıdır. Xpert MTB/RIF testi içerisinde bulan primerler *rpoB* geni üzerinde bulunan 81 baz çiftlik RIF direncinden sorumlu bölgeyi amplifiye etmek, moleküler firkete problemleri ise bütün RIF dirençli suşların % 95-98'inde gözlenen mutasyonları saptamak üzere tasarlanmıştır. Problemlerin özel tasarımı sayesinde RIF direncine yol açan 23 farklı mutasyonun araştırılması mümkün olabilmektedir (133). Sistemde, el değmeden balgamın işlenmesi ve “real-time PCR” sistemi kombine edilmiştir. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve mutasyon saptama işlemlerinin tümü tek bir kartuş içerisinde gerçekleşmektedir. DSÖ, yayımlanan çalışmaların sonuçlarını dikkate alarak, 2010 yılında bu yöntemin tüberkülozun endemik olduğu düşük gelirli ülkelerde (özellikle Afrika ülkeleri) rutin TB kontrol programları kapsamına alınmasını önermiştir (143).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. MTBK Suşları

Bu çalışmada “real-time PCR” ile antitüberküloz ilaç duyarlılıklarının gösterilmesi için Hacettepe Üniversitesi Klinik Patoloji ve Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi bağlı TB laboratuvarlarında izole edilerek saklanmış MTBK klinik izolatlarından 50 tanesi seçildi.

Çalışmanın Bactec MGIT Pirazinamid duyarlılık testi için ise 50 MTBK suşu kullanıldı.

Her iki yöntemde de kontrol suşu olarak tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğu bilinen “American Type Culture Collection” (ATCC) 25177 numaralı *M. tuberculosis* H37Ra suşu kullanıldı.

3.2. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar, Besiyerinin Hazırlanması, Suşların Ekimi

Kullanılan Malzemeler

- High Pure PCR Template Kit, Roche Diagnostics, Almanya.
- Light Cycler - FastStart DNA Master miks HybProbe, Roche Diagnostics, Almanya.
- Light Cycler - Capilleries (20µl), Roche Diagnostics, Almanya.
- Primerler, Integrated DNA Technologies, A.B.D.
- Problar, Integrated DNA Technologies, A.B.D.

Kullanılan Cihazlar

- Becton Dickinson BACTEC 960 MGIT Sıvı Kültür Sistemi
- Light Cycler 1.5 “real-time PCR” cihazı, Roche Diagnostics, Almanya.
- Bioneer termal döngü cihazı, Kore.
- ABI 3500 DNA dizi analizi cihazı.
- Etüv
- Otoklav
- +4°C buzdolabı
- -20°C dondurucu
- Sınıf-2 Biyogüvenlik kabini

LJ Besiyerinin Hazırlanması

Stoklarda bulunan suşların taze pasajlarının alınabilmesi için LJ besiyeri aşağıdaki malzemelerle hazırlandı.

Distile su: 600 ml

KH₂PO₄ : 2.4 g

Magnezyum sülfat.7 H₂O : 0.24 g

Magnezyum sitrat : 0.6 g

Asparagine : 3.6 g

Gliserol : 2 ml

Malaşit yeşili: 20 ml

Yukarıdaki maddelerin tamamı karıştırıldıktan sonra hazırlanan besiyeri otoklavda steril edildi. Bir gece dinlenmeye bırakıldı. Aynı gün 30 adet yumurta fırça yardımıyla sabunlu su ile yıkandı. Yumurtalar kuruduktan sonra, %70 alkol içerisinde bir gece bekletildi. Hazırlanan besiyerine ikinci gün 30 g patates nişastası ilave edildi ve bu karışım kaynar su banyosuna konuldu. Burada yaklaşık 15 dakika karıştırılarak kaynatıldı. Bu işlemden sonra besiyeri 56 °C’de 1 saat boyunca su banyosunda bekletildi.

Alkolden alınan yumurtalar iyice kuruduktan sonra alev kaynağının yanında kırılıp taze olup olmadıkları kontrol edildi. Yumurta sarısının yapısında herhangi bir bozukluk gözlemleniyse yenisiyle değiştirildi. Kırılan yumurtalar, cam boncuklu balon içersine konuldu. Burada çalkalanarak iyice karıştırıldı. Yumurtalar steril süzgeç yardımıyla hazırlanan besiyeri solüsyonuna eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra her bir tüpe 5-6 ml besiyeri gelecek şekilde paylaştırıldı. Daha sonra bu tüpler, 85°C’deki fırında yatık konumda 50 dakika bekletildi. Ortamın ısısı nedeniyle besiyerinde bulunan yumurta katılaştı ve tüpte yatık yüzeyli katı besiyeri elde edilmiş oldu.

Suşların LJ’de Üretilmesi

LJ besiyerinde üremiş ve +4°C’de saklanmış olan MTBK suşları yeni hazırlanan LJ Besiyeri’ne pasajlandı. 37°C’de 4-6 hafta inkübe edildi. Besiyerlerinde herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı ve üremeler kontrol edildi. LJ Besiyeri’nde üreyen suşlardan Bactec MGIT tüplerine ekim yapılarak duyarlılık çalışıldı.

3.3. İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi

3.3.1. Sıvı Kültür Yöntemi

Antimikobakteriyel duyarlılık testleri, RİF, INH ve EMB için tasarlanmış olan BACTEC MGIT 960 SIRE kiti ile PZA duyarlılığı ise özel PZA besiyerinde yine MGIT 960 cihazında çalışıldı. PZA duyarlılığı MTBK izolatlarının iki farklı konsantrasyonu inokule edilerek çalışıldı.

MGIT 960 SIRE Kiti Duyarlılık Testi için RİF, INH ve EMB Duyarlılığı Çalışılması

1. Öncelikle LJ'de üremiş izolatlardan süspansiyon hazırlandı. Bunun için kapaklı, 8 – 10 cam bilye içeren 16,5 x 128 mm'lik steril tüpe 4 mL BBL Middlebrook 7H9 Broth (veya BBL MGIT broth) eklendi.

2. Steril bir öze ile LJ'den koloniler alınarak, Middlebrook 7H9 Broth'ta süspansiyon edildi. Süspansiyonun türbiditesi 1,0 McFarland standardının üstünde olacak şekilde ayarlandı.

3. Büyük parçaların dağılması için süspansiyonu 2-3 dk. boyunca vortekslendi.

4. Süpernatant sıvı başka bir 16,5 x 128 mm'lik kapaklı steril tüpe aktarıldı (sediment kısmının aktarılmamasına dikkat edin) ve 15 dakika daha bekletildi.

5. Süpernatant sıvı (topaksız, homojen olmalıdır) 16,5 x 128 mm'lik üçüncü bir steril tüpe aktarıldı.

6. Süspansiyon 0,5 McFarland türbidite standardıyla görsel olarak karşılaştırarak 0,5 McFarland standardına ayarlandı.

7. Ayarlanan süspansiyonun 1 mL'sini 4 mL'lik steril serum fizyolojikte seyreltildi (1:5 seyreltim).

MGIT 960 SIRE Kiti Duyarlılık Testi için RİF, INH ve EMB Duyarlılığı çalışılması

1. Hazır olarak alınmış MGIT tüplerine, ilk olarak antibiyotik kombinasyonu olan PANTA ilave edildi. Daha sonra hazırlanan MTBK suşları süspansiyonundan alınıp ilave edildi. MGIT tüpleri 37⁰C'de inkübasyona bırakıldı. Üreme gözlenen tüp antibiyogramına alındı.

2. Üreme saptandıktan sonraki 1-2. gün liyofilize haldeki RİF, INH ve EMB antibiyotikleri 4'er ml steril distile su ile sulandırıldı.

3.Üreme kontrolü (GC=Growth Control) tüpü ve duyarlılığını test edeceğimiz antitüberküloz ilaçların tüpleri olmak üzere toplamında 4 tüp hazırlandı.

4. Pozitif MGIT tüpünden 0,1 ml örnek alınarak steril bir tüp içerisinde, 10 ml steril serum fizyolojik ile sulandırıldı.

5.GC tüpüne ve antitüberküloz ilaçlar için olan tüpler içersine kitten çıkan *Growth Supplement* karışımından 0,8'er ml eklendi.

6. Antitüberküloz ilaçlar için olan tüplere CDC'nin önerdiği kritik ilaç konsantrasyonlarına eşdeğer miktarda rifampisin, izoniazid ve etambutol antibiyotikleri eklendi. (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. MGIT Tüplerine Eklenen İlaç Konsantrasyonları (128).

| İlk Konsantrasyon | Eklenen Hacim | Son Konsantrasyon |
|-------------------|---------------|-------------------|
| INH 8,3 µg/mL | 100 µL | 0,1 µg/mL |
| RIF 83 µg/mL | 100 µL | 1,0 µg/mL |
| EMB 415 µg/mL | 100 µL | 5,0 µg/mL |

7. 1/100 sulandırılmış süspansiyondan 0,5 ml GC kontrol tüpüne ekildi.

8. Pozitif olan MGIT tüpünden doğrudan 0,5 ml örnek (süspansiyon yapılmadan) alınıp, antitüberküloz ilaçların eklendiği tüplere ekildi.

Testin 4 ile 13 gün arasında sonuç vermesi beklendi.

MGIT Sıvı Kültür Sisteminde Pirazinamid Duyarlılık Testi İçin:

1. Aşama:

1. MGIT tüplerine MTBK suşları inoküle edilip 37°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra üreme gözlenen tüp PZA antibiyogramına alındı.

2. Üreme saptandıktan sonraki 1-2. gün liyofilize haldeki PZA antitüberküloz ilacı 2.5 ml steril distile suyla sulandırıldı.

3.PZA için özel olan bir adet GC tüpü ve bir adet PZA ilave edilecek tüp kullanıldı.

4. Pozitif MGIT tüpünden 0,5 ml örnek alınarak steril bir tüp içerisinde, 4,5 ml steril serum fizyolojik ile sulandırıldı.

5. GC tüpüne ve pirazinamid tüpüne kitten çıkan *Growth Supplement* karışımından 0,8'er ml eklendi.

6. PZA test tüpüne 0,1 ml PZA eklendi.

7. 1/10 sulandırılmış süspansiyondan 0,5 ml GC kontrol tüpüne ekildi.

8. Pozitif olan MGIT tüpünden ise, 0,5 ml örnek (süspansiyon yapılmadan) pirazinamidin eklendiği tüpe ekildi.

Tüpler MGIT 960 cihazına yerleştirildi. Kontrol tüpü pozitif sinyal verdiği anda test, cihaz tarafından sonlandırıldı. Bu sırada PZA tüpündeki üreme de cihaz tarafından kontrol edildi. Eğer PZA tüpündeki üreme ≥ 100 üreme ünitesi ise suş PZA dirençli, üreme < 100 üreme ünitesi ise suş PZA duyarlı olarak cihaz tarafından belirlendi.

Cihazdan suşun PZA dirençli olduğuna dair pozitif sinyal alındıktan sonraki ilk 1. veya 2. gün pozitif tüp alınıp, yeni metotta kullanılacak test inokulumu olarak belirlendi. PZA testi cihaza ilk yüklendiğinde 4 gün içerisinde üreme olduğunda cihaz kontaminasyon olarak değerlendirdi.

2. aşama:

Birinci aşamada PZA dirençli çıkan örnekler, aynı yöntemle 2. aşamada yeniden çalışıldı. Yarı hacimde inokulum kullanılarak yaptığımız modifikasyonda, GC tüpüne ve PZA tüpüne konulan inokulum miktarı yarı yarıya düşürüldü (0,25 ml). Diğer tüm maddelerin miktarı aynı tutuldu.

3.3.2. “Real-time PCR” Yöntemi

Çalışmada kullanılan antitüberküloz ilaçlara karşı dirence neden olan mutasyonların en sık görüldüğü gen bölgeleri özgül primerler kullanılarak çoğaltıldı.

Multipleks “real-time PCR” uygulamasıyla, dirençten sorumlu bölgeler aynı anda çoğaltıldı.

DNA dizi analiziyle *rpoB*, *katG*, *inhA*, ve *embB* genlerindeki mutasyonlar değerlendirildi.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile manuel olarak yapıldı. Kullanılan bu kitle, spin-kolon yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı. Bu şekilde nükleik asitler santrifüjle bir membran filtreye tutturularak saflaştırılmış oldu (108).

Mikobakteriyel DNA’ların izolasyonu için kite ilave olarak kullanılan solüsyonlar ve maddeler:

PBS (phosphate buffered saline)

İzopropanol

Lizozim

Etanol

Distile su

İzolasyon için kullanılan solüsyonlar (1X):

| | |
|----------------------------|--------|
| “Binding Buffer” | 200 µl |
| “Proteinase K” | 40 µl |
| “Inhibitor Removal Buffer” | 500 µl |
| “Wash Buffer” | 500 µl |
| “Elution Buffer” | 200 µl |

İzolasyon Basamakları:

1. DNA izolasyonu yapılacak bakteri kültüründen PBS içerisinde 10^8 - 10^9 bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1.5 ml'lik nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı.

2. Bakteri süspansiyonu, 5 dk 3,000 g'de santrifüj edildi.

3. Pelet kısmı üzerine yeniden 200 µl PBS eklendi.

4. 5 µl lizozim eklenerek 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Lizozim tam hücre lizisine neden oldu, DNA serbest kaldı.

5. 200 µl "Binding Buffer" eklendi. 40 µl proteinaz K eklendi. Böylelikle izolasyon havuzu oluşturulmuş oldu. 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Proteinaz K, hücresel proteinlerin sindirimini yaptı.

6. 100 µl izopropanol eklendi, iyice karıştırıldı.

7. Karışımın tamamı filtre tüpüne aktarıldı. 1 dk boyunca 8,000 g'de santrifüj edildi. Böylelikle DNA, membran filtreye bağlanmış oldu.

8. İnhibitör maddeleri uzaklaştırmak için "Inhibitor Removal Buffer"dan 500 µl eklendi. 1 dk boyunca 8,000 g'de santrifüj edildi.

9. Bağlanmamış diğer hücresel yapıları uzaklaştırmak için "Wash Buffer"dan 500 µl eklendi. 1 dk boyunca 8,000 g'de santrifüj edildi. Bu yıkama basamağı iki kez tekrar edildi.

10. Filtrede kalan alkolü uzaklaştırmak için, filtre üzerine hiçbir madde eklenmeden boş filtre 10 sn. son hızda santrifüj edildi.

11. Saflaşmış DNA'ları bağlı buldukları filtreden sökebilmek için fitre üzerine 200 µl "Elution Buffer" eklendi. 1 dk boyunca 8,000 g'de santrifüj edildi ve DNA saf olarak elde edildi.

Bu şekilde izole edilen 200 µl bakteri DNA'ları hemen kullanılmayacaksa -20°C'ye kaldırıldı.

Özgül Problar Kullanılarak "real-time PCR" ile Amplifikasyonunun Saptanması :

Primer ve Problar

İlaç dirençleriyle ilişkili 4 gen bölgesi için, çift işaretli 5 prob ve 8 primer kullanıldı (Tablo 3.2, 3.3).

TaqMan problemleri kullanılarak “real-time PCR” ile amplifikasyonun saptanması (5’ ekzonükleaz aktivitesi):

Bu sistemde 5’ ve 3’ uçlarından florokrom maddelerle işaretli TaqMan problemleri kullanıldı. 81-bç’lik RİF direncini belirleyen bölgedeki (RDBB) mutasyonları saptamak için 25 nükleotidden uzun 2 prob (RpoP1 ve RpoP2) kullanıldı. RpoP1 ve RpoP2 problemlerinin ortasında raportör florokrom olarak 6-carboxyfluorescein (FAM), bağlı bulunmakta idi. Problemlerin 3’ ucunda ise baskılayıcı florokrom olarak “black hole quencher 1” (BHQ1) bulunmakta idi. (Tablo 3.3) Daha fazla mutasyonu kapsayabilmesi için bu uzun problemler, ortasından işaretlendi. Böylelikle raportör ve baskılayıcı florokrom arasındaki olması gereken uzaklık sabit tutulmuş oldu.

RpoP2’de 2 tane yanlış nükleotid (t) bulunmakta idi (Tablo 3.3). Bu uygulama palindrom diziyi önlemek amacıyla planlandı. Diğer gen bölgeleri (*katG*, *inhA* ve *embB*) için tasarlanan problemler ise normal bir şekilde 5’ ucundan raportör florokromla, 3’ ucundan baskılayıcı florokromla işaretli idi. Çalışmada kullanılan problemlerin hepsi FAM’la işaretli idi.

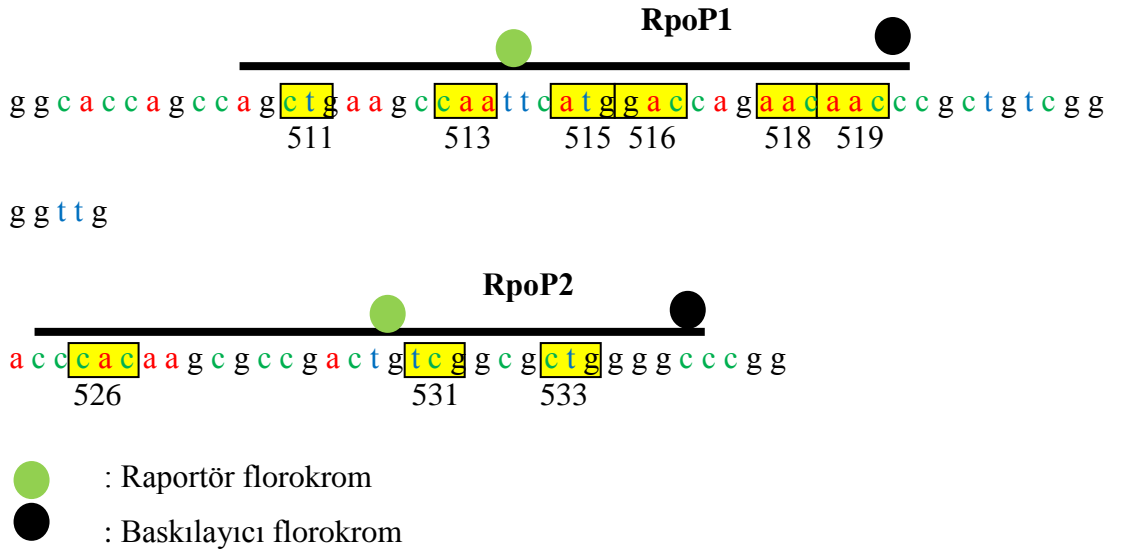
Tablo 3.2. “Real-time PCR”da kullanılan primer dizileri

| Primerler | Hedef Bölge | Primer Dizisi | Oligonükleotid sayısı |
|------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| rpoBF | <i>rpoB</i> | GCCGCGATCAAGGAGTTCTTC | 21 |
| rpoBR | <i>rpoB</i> | CGGCACGCTCACGTGACAGAC | 21 |
| katGF | <i>katG</i> | CGTATGGCACCGGAACCGGTAA | 22 |
| katGR | <i>katG</i> | GCTCCCCTCGTAGCCGTACA | 21 |
| inhAF | <i>inhA</i> | CACGTTACGCTCGTGGACATAC | 22 |
| inhR | <i>inhA</i> | CTGTGGCAGTCACCCCGACAA | 21 |
| embBF | <i>embB</i> | GGTGATATTCGGCTTCCTGCTC | 22 |
| embBR | <i>embB</i> | GCCGAACCAGCGGAAATAGTTGGA | 24 |

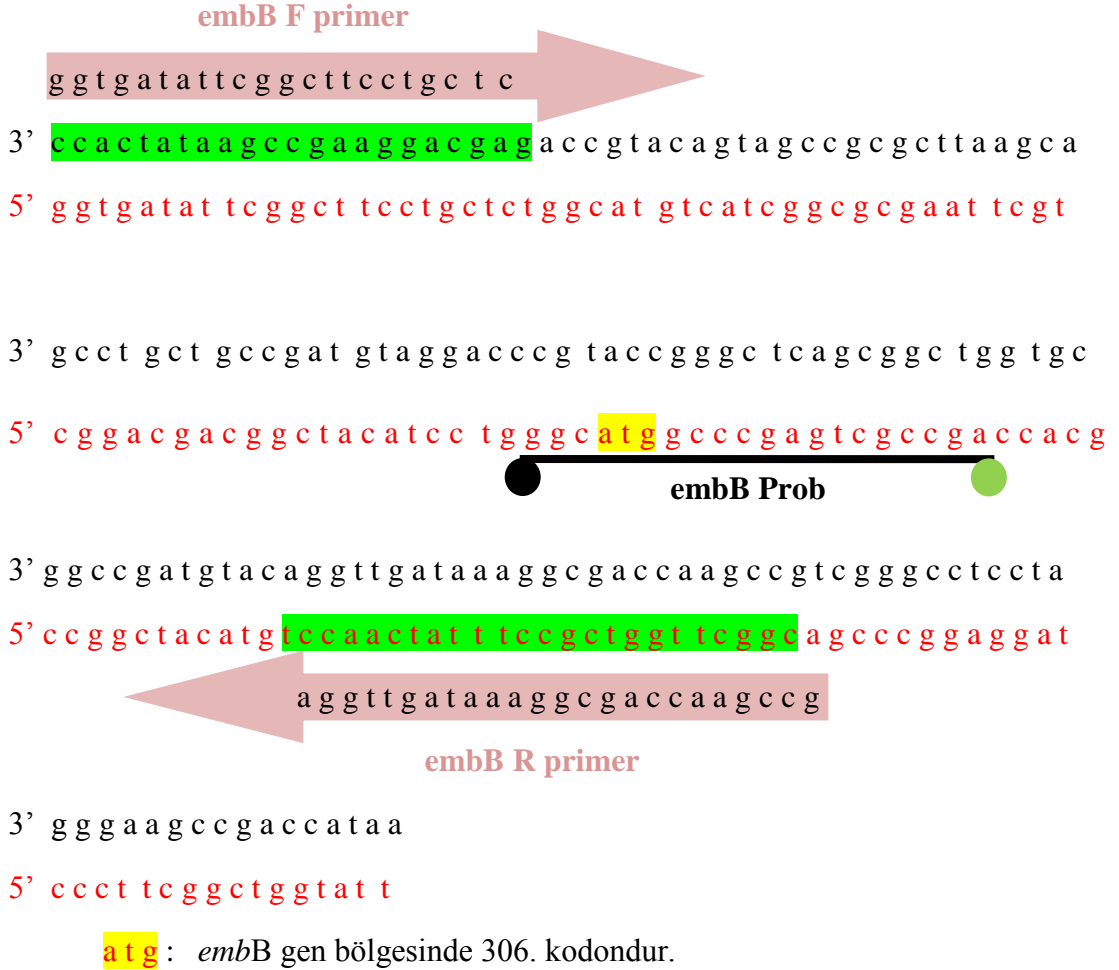
Tablo 3.3. “real-time PCR”da kullanılan prob dizileri

| Problar | Hedef Bölge | Prob Dizisi |
|---------|---------------------------|---|
| rpoBP1 | <i>rpoB511- rpoB519</i> | 5'-GGTTGTTCTGGTCCA FAM GAATTGGCTCAGC-BHQ1-3 |
| rpoBP2 | <i>rpoB524 - rpoB5335</i> | 5'-GCCCCAGCG t CGACAG FAM CGG t GCTTGTGGG-BHQ1-3 |
| katGP | <i>katG</i> 315 | 5'- FAM -TCACCAGCGGCATCG- BHQ1 -3' |
| inhAP | <i>inhA</i> 15 | 5'- FAM -GCGAGACGATAGGTTG- BHQ1 -3' |
| embBP | <i>embB</i> 306 | 5'- FAM -TCGGCGACTCGGGCCATGCC- BHQ1 -3' |

rpoB gen bölgesinde RİF direncinin saptanabilmesi amacıyla, RİF direncine neden olan başlıca mutasyonlarını saptayan 2 prob aynı PCR karışımına konuldu. Probların gen bölgesi üzerindeki konumları aşağıdaki şekilde gibidir.

Şekil 3.1. *rpoB* geni üzerinde problemlerin bağlandığı bölgeler

embB gen bölgesi üzerinde EMB direncine neden olan 306. kodon mutasyonunu saptayabilmek amacıyla tasarlanmış primer ve prob lar *embB* geni üzerindeki konumları aşağıdaki şekilde gibidir.



Şekil 3.2. *embB* geni üzerinde embBF ve embBR primerlerinin ve TaqMan probunun bağlandığı bölgeler

1. Aşama:

Primer ve problemlerin denenmesi amacıyla, ilk olarak multipleks uygulama yapılmadan, problemler ayrı reaksiyonlarda tek tek denendi. Her karışımın total hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlandı.

RpoB mutasyonlarının saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X):

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 13,3 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,8 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,1 µl |
| RpoP1 prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 1,0 µl |

RpoB mutasyonlarının saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X):

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 13,3 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,8 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,1 µl |
| RpoP2 prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 1,0 µl |

inhA mutasyonunun saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X):

| | |
|---------------------------|---------|
| H ₂ O | 15,3 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,1 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,8 µl |
| <i>inhA</i> prob | 0,4 µl |

| | |
|---|--------|
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 1,0 µl |

katG mutasyonunun saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X):

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 15,3 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,1 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,8 µl |
| <i>katG</i> prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 1,0 µl |

embB306 mutasyonlarının saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X):

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 13,3 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| <i>embB</i> Primer Forward (10 µM) | 0,8 µl |
| <i>embB</i> Reverse (10 µM) | 0,1 µl |
| <i>embB</i> prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 3,0 µl |

2. Aşama:

Her MTBK izolatu için aşağıdaki 3 ayrı PCR karışımı hazırlandı. Her bir reaksiyon ayrı bir tüp içersinde gerçekleşti. Kısaca her izolat için 3 PCR tüpü kullanıldı. İlk iki reaksiyon multipleks, son reaksiyon tek problu PCR'dır. Her karışımın total hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlandı.

RpoB mutasyonlarının saptanması için multipleks “real-time PCR” karışımı (1X): 1.reaksiyon

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 12,9 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,8 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,1 µl |
| RpoP1 prob | 0,4 µl |
| RpoP2 prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 3,0 µl |

katG315 ve inhA-15 mutasyonlarının saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X): 2. Reaksiyon

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 12,0 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| katG Primer Forward (10 µM) | 0,1 µl |
| katG Primer Reverse (10 µM) | 0,8 µl |
| inhA Primer Forward (10 µM) | 0,1 µl |
| inhA Primer Reverse (10 µM) | 0,8 µl |
| katG prob | 0,4 µl |
| inhA prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 3,0 µl |

embB306 mutasyonlarının saptanması için “real-time PCR” karışımı (1X): 3.

Reaksiyon

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 13,3 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| embB Primer Forward (10 µM) | 0,8 µl |
| embB Reverse (10 µM) | 0,1 µl |
| embB prob | 0,4 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix, (Roche) | 2,0 µl |
| DNA | 3,0 µl |

Tüm reaksiyonlarda asimetrik amplifikasyon yapabilmek amacıyla bir çift primerden birinci primerin miktarı, ikinci primerin miktarından 8 kat fazla konuldu. Böylelikle mutasyonun olduğu DNA tek sarmalı, asimetrik PCR ile diğer tek sarmala göre 8 kat fazla amplifiye edilmiş oldu. Mutasyonu taşıyan ipliğin PCR ile daha fazla çoğaltılmasıyla daha net sonuçlar elde edildi.

“Real-time PCR” işlemi, Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Light Cycler kapiller tüplerine 17 µl PCR miksi, 3 µl bakteri DNA’sı dağıtıldı. Miksin hazırlanması ve kapillerlere örnek dağıtması işlemleri soğuk blokta gerçekleştirildi. Bu karışımların cihaz içerisindeki sıcaklıktan en iyi şekilde yararlanabilmeleri amacıyla kapiller tüpler mikrosantrifüjde 0’dan 3000 rpm’e gelinceye kadar birkaç saniye santrifüj edildi. Son olarak kapiller tüpler Light Cycler 1.5 cihazına yerleştirildi. Her “real-time PCR” testinde DNA içermeyen bir negatif kontrol ve standart avirulan suş olan ve tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğu bilinen “American Type Culture Collection” (ATCC) 25177 numaralı *M. tuberculosis* H37Ra suşu kullanıldı.

Light Cyclers 1.5 cihazında sıcaklık döngüleri şu şekilde ayarlandı:

| | |
|----------------------------------|---|
| <u>Denatürasyon:</u> | 95 ⁰ C’de 10 dk |
| <u>Amplifikasyon: (45 döngü)</u> | 95 ⁰ C’de 10 sn denatürasyon, 58 ⁰ C’de 10 sn bağlanma, 72 ⁰ C’de 15 sn polimerizasyon |
| <u>Erime Eğrisi:</u> | 95 ⁰ C’de 30 sn, 40 ⁰ C’de 0 sn, 85 ⁰ C’de 0 sn, “ramp rate” sıcaklık artış derecesi 0,05 ⁰ C (veya 1 ⁰ C) şeklinde ayarlanıp floresan devamlı alındı. |
| <u>Soğutma:</u> | 40 ⁰ C’de 30 sn |

TaqMan problemlerinin kullanıldığı “real-time PCR” işlemi tamamlandıktan sonra, örneklerin erime eğrisi analizi yapıldı. Erime eğrisi analizi, Light Cyclers 4.1 yazılımında yapıldı. Amplifikasyon ve erime eğrisi analizi aynı Light Cyclers cihazında yapıldı.

3.3.3. DNA Dizi Analizi

TaqMan problemleriyle yapılan bu çalışmanın sonuçlarını kontrol etmek amacıyla “real-time PCR”da farklı erime eğrisi gösteren ve farklı mutasyon olabileceği düşünülen ve kültür duyarlılığı ile “real-time PCR” sonucu uyumsuz çıkan toplam 16 izolata moleküler yöntemler arasında altın standart olan DNA dizi analizi yapıldı. DNA dizi analizi için “zincir sonlandırma yöntemi” ile çalışılan “Bigdye Terminator cycle sequencing 3.1” kiti kullanıldı. Kullanılan antibiyotiklere dirençli suşların genomunda ilaç direncinden sorumlu olan kısımları PCR yöntemi ile çoğalttıktan sonra, kalıp olarak kullanarak, üzerine bu kalıp DNA’ya özgü primerler ilave edilip, ABI 3500 sekans cihazında dizi analizi işlemi gerçekleştirildi. Sonuçlar

sekans analiz yazılımına göre değerlendirildi. Böylelikle sekanslanan her bir örnek ile, önceki çalışmalarımızın güvenilirliği doğrulandı, DNA dizileri saptandı ve mutasyon bölgeleri belirlendi.

1. DNA izolasyonu: DNA dizi analizi için seçilen suşların DNA'ları spin kolon yöntemiyle yukarıda belirtildiği şekilde izole edildi.

2. "in-house PCR" : Seçilen izolatların DNA'larının çoğaltılabilmesi için "in-house PCR" yöntemi uygulandı. Her bir gen bölgesi için ayrı ayrı PCR karışımı hazırlandı, "real-time PCR" karışımında kullanılan primerler kullanıldı. Hazırlanan PCR karışımı:

DNA dizi analizi için PCR karışımı (*rpoB* ve *embB* için) (1X):

| | |
|------------------------------------|---------|
| H ₂ O | 14,2 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,8 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,1 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix | 1,0 µl |
| DNA | 3,0 µl |

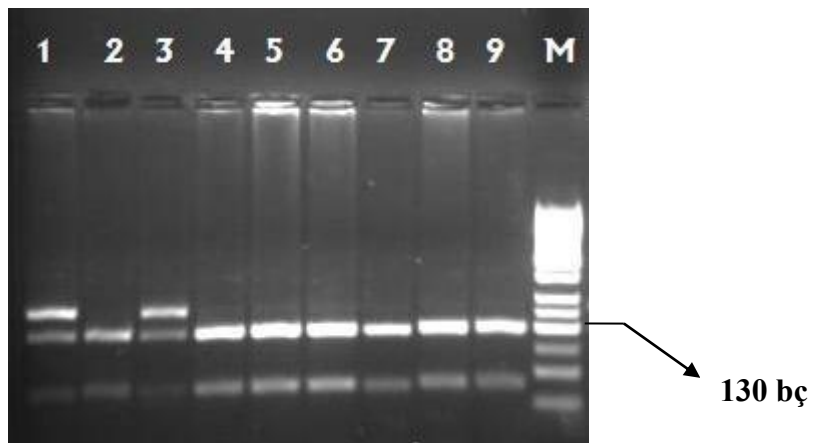
DNA dizi analizi için PCR karışımı (*inhA* ve *katG* için) (1X):

| | |
|------------------------------------|---------|
| H ₂ O | 14,2 µl |
| MgCl ₂ (1,5mM) | 0,4 µl |
| Primer Forward (10 µM) | 0,1 µl |
| Primer Reverse (10 µM) | 0,8 µl |
| HybProbe Fast Start DNA Master Mix | 1,0 µl |
| DNA | 3,0 µl |

Elde edilen bu PCR karışımından 0,2 ml'lik tüplere 17 µl, bakteri DNA'sından da 3 µl dağıtılarak termal döngü cihazına (BIONEER termal cycler, Kore) yerleştirildi. Termal döngü cihazında sıcaklıklar şu şekilde ayarlandı:

| | |
|----------------------------------|---|
| <u>Denatürasyon:</u> | 95 ⁰ C'de 10 dk |
| <u>Amplifikasyon: (45 döngü)</u> | 95 ⁰ C'de 10 sn denatürasyon, 58 ⁰ C'de 10 sn bağlanma, 72 ⁰ C'de 15 sn polimerizasyon |
| <u>Soğutma:</u> | 40 ⁰ C'de 30 sn |

3. Elektroforez: Elde edilen PCR ürünlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bu amaçla %1'lik agaroz jel için 0,4 gr agaroz 40 ml TAE (Tris Asetik asit EDTA) tamponuna eklendikten sonra, agarozun erimesi için 2 dk süreyle mikrodalga fırında yüksek sıcaklıkta ısıtıldı. Bu süre sonunda elde edilen sıvı haldeki karışıma, DNA boyası olan etidyum bromür (2 µl) eklendi. Diğer taraftan elektroforez tankı hazırlandı, kuyucukları oluşturacak taraklar yerleştirildi. Sıvı karışım uygun sıcaklığa geldikten sonra elektroforez tankına dökülerek jel haline gelmesi için 15 dk beklendi. Katı hale geldikten sonra jel tarağı çıkarılıp kuyucuklara 5 µl PCR ürünü ile 3 µl yükleme tamponu (Orange G) ile karıştırılarak yüklendi. 130 V, 500-A'da 15 dk DNA'lar yürütüldü. Ardından jel görüntüleme sisteminde UV kaynağı altında incelendi. DNA bantlarının görülmesi ile hedef bölgenin amplifiye olduğu görüldü.



Şekil 3.3. MTBK suşlarından “in-house” PCR yöntemiyle çoğaltılan gen bölgelerinin agaroz jel elektroforeziyle incelenmesi

Kolonlar: 2,4,5,6,7,8,9 : *embB* PCR’ı (130 bç uzunluğunda), M: 25 bç Moleküler ağırlık standardı (Invitrogen, A.B.D).

4. Saflaştırma: PCR ürünleri, PCR ürünü pürifikasyon sistemi (Exo-SAP-IT, ABD) protokolüne göre saflaştırıldı. Bu aşamadaki amaç, ortamı bir önceki PCR reaksiyonunda kullanılmamış olan primerlerden arındırmaktı. Ekzonükleaz-*shrimp* alkalin fosfatase enzim kombinasyonu ile pürifikasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için karışıma 2 µl PCR ürünü, 5 µl Exo-SAP konuldu. Hazırlanan örnekler Bioneer termal döngü cihazına yerleştirildi. 45 dk’lık pürifikasyon programında reaksiyon gerçekleşti. Saflaştırılan PCR ürünlerin kontrolü için tekrar agaroz jel elektroforezi yapıldı.

5. Tek Yönlü Sekans: Bu aşamada, forward ve reverse primerler için ayrı karışımlar hazırlandı. Karışımlar aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

| “Forward” | (1X) | “Reverse” | (1X) |
|------------------|-------------|------------------|-------------|
| H ₂ O | 2,0 | H ₂ O | 2,0 |
| Buffer | 2,0 | Buffer | 2,0 |
| Big Dye | 2,0 | Big Dye | 2,0 |
| F Primer | 2,0 | R Primer | 2,0 |
| Saf ürün | 2,0 | Saf ürün | 2,0 |

Kitte belirtilen tek yönlü sekans programı cihaza girildi. Bu reaksiyon BIONEER termal cyclus cihazında çalışıldı. Böylelikle her izolat için bir tüpte “forward” primerle çoğaltılmış örnekler, diğer tüpte ise “reverse” primerle çoğaltılmış örnekler elde edildi. Her örneğin çift yönlü sekansı yapılması için bu işlem uygulandı.

6. Sephadex Saflaştırması: Bir önceki reaksiyonda kullanılmayan işaretli nükleotidlerden örneği temizlemek için sephadex saflaştırması uygulandı. Bu amaçla

toz bir madde olan sephadexten 2 gram tartıldı. 1 gramı için 14 ml distile su olacak şekilde 28 ml suya eklendi. İyice vortekslendi. Buzdolabında 1 saat bekletildi. Özel filtreli tüplerin içersine 0,7 ml sephadex ucu kesilmiş pipet ucuyla dağıtıldı. Tüpler 3 dk boyunca 5000 rpm’de santrifüj edildi. Sephadexin suyu filtreden geçip alttaki toplama tüpüne indi. Filtre üstünde ise sephadex kolonu oluştu. Bu kolonun üzerine tek yönlü sekansdan çıkan örneklerin tamamı yüklendi (10µl). Alt toplama tüpleri değiştirildi. Tüpler yeniden 3 dk boyunca 5000 rpm’de santrifüj edildi. Böylelikle bütün Big dye kalıntıları sephadexte kaldı. Alt toplama tüpünde dizi analizi için saf bir halde örnek toplandı. Örneğin tamamı ABI 3500 DNA dizi analizi cihazı mikropلاغına yüklendi. Forward ve reverse olarak toplam 32 örnek 4 saatte sonuç verdi.

4. BULGULAR

4.1. MTBK İzolatlarının MGIT 960 ve “Real-time PCR” ile Saptanan İlaç Duyarlılıkları

Bactec MGIT sıvı kültür sisteminde 50 MTBK suşunun INH, RİF ve EMB antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı. Buna bağlı olarak aynı 50 suşun INH, RİF ve EMB duyarlılığı yeni geliştirilen “real-time PCR” yöntemiyle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de MGIT sonuçlarıyla birlikte verilmiştir.

Tablo 4.1. MTBK suşlarının MGIT 960 ve “real-time PCR” ile elde edilen ilaç duyarlılık sonuçları

| İlaç | MGIT 960 | | “real-time PCR” | |
|------------|----------|----------|-----------------|----------|
| | Duyarlı | Dirençli | Duyarlı | Dirençli |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| RİF | 31 (62) | 19 (38) | 31 (62) | 19 (38) |
| İNH | 24 (48) | 26 (52) | 24 (48) | 26 (52) |
| EMB | 39 (78) | 11 (22) | 38 (76) | 12 (24) |

Elde edilen sonuçlara göre, MGIT ile 50 suştan 31’i RİF duyarlı bulunup, 19’u RİF dirençli bulundu. PCR yöntemiyle de 31 RİF duyarlı, 19 RİF dirençli sonucu elde edildi. MGIT yöntemiyle 50 suşun 24’ü INH duyarlı bulunurken 26’sı

INH dirençli bulundu. PCR yöntemiyle INH duyarlı 24 suş, INH dirençli 26 suş bulundu. MGIT ile 50 suşun 39'u EMB duyarlı, 11'i EMB dirençli bulundu. PCR yöntemiyle aynı suşların 38'i EMB duyarlı, 12'si EMB dirençli bulundu.

Her iki yöntemle dirençli ve duyarlı bulunan suşlar aynı suşlar idi. Bu durum Tablo 4.2.'de açıklanmaya çalışıldı. MGIT ve "real-time PCR" yöntemiyle RİF duyarlı 31 suş bulundu. Her iki yöntemle 19 suş dirençli bulundu. Bu durumda "real-time PCR" yönteminin, MGIT ile RİF direnci saptama uyumu %100 bulundu.

INH duyarlılığı çalışılan 50 suştan 24 tanesi, her iki yöntemle duyarlı, 26 tanesi de her iki yöntemle dirençli bulundu. Bu durumda her iki yöntemin INH duyarlılığı saptama uyumu %100 bulundu.

EMB duyarlılığı çalışılan 50 suştan 38 tanesi her iki yöntemle duyarlı, 11 tanesi her iki yöntemle dirençli bulunmuştur. Ancak 1 suş sadece MGIT ile dirençli bulunurken, farklı 1 suş da sadece PCR ile dirençli bulundu. Bu durumda "real-time PCR"'ın EMB duyarlılığında MGIT ile uyumu %96 olarak bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çalışılan 50 izolatın iki yöntemle elde edilen duyarlılıklarının karşılaştırılması

| İlaç | İki yöntemle duyarlı | | İki yöntemle dirençli | | MGIT dirençli PCR duyarlı | MGIT duyarlı PCR dirençli | Uyum | | | |
|------------|----------------------|------|-----------------------|------|---------------------------|---------------------------|------|-----|----|-------|
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) | n | (%) | | |
| RİF | 31 | (62) | 19 | (38) | 0 | (0) | 0 | (0) | 50 | (100) |
| INH | 24 | (48) | 26 | (52) | 0 | (0) | 0 | (0) | 50 | (100) |
| EMB | 38 | (76) | 11 | (22) | 1 | (2) | 1 | (2) | 48 | (96) |

Çalışmamızın bir diğer kısmı PZA duyarlılığının MGIT 960'da doğru saptanabilmesi idi. Bu amaçla MGIT 960 PZA duyarlılık testiyle, MTBK suşlarının ilaç duyarlılıkları standart hacim inokulum (0,5 ml) ve yarı hacim inokulumla (0,25 ml) çalışıldı. Standart inokulumla yapılan çalışmada, 50 suşun 41 tanesi PZA dirençli bulundu (%82). 9 suş PZA duyarlı bulundu. Duyarlı suşlardan biri kontrol amaçlı çalışılan standart suş *M. tuberculosis* H37Ra idi. Dirençli bulunan 41 suş için, PZA

MGIT testi, kontrol tüpü ve PZA test tüpü için yarı hacim inokulum (0,25 ml) kullanılarak tekrarlandığında ise, dirençli çıkanlardan 2 tanesi duyarlı, 39 tanesi (%78) yine PZA dirençli bulundu. Aynı suşların önceden çalışılmış MGIT SİRE duyarlılıkları, PZA duyarlılıklarıyla birlikte incelendiğinde aşağıdaki tablo elde edildi. PZA duyarlılığı sonucu dirençliden duyarlıya dönen 2 örnekten biri, sadece INH dirençli idi. Diğeri ise ÇİD-MTBK idi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. MTBK suşlarının S.İ.R.E. ve PZA duyarlılıkları

| MTBK S.İ.R.E. Direnci | n (%) | PZA Duyarlılığı | | | |
|---|-----------------|-------------------------------------|---------------|----------------------------------|----------------|
| | | Standart Hacim İnokulum (0,5 ml) | | Yarı Hacim İnokulum (0,25 ml) | |
| | | Dirençli(%) | Duyarlı(%) | Dirençli(%) | Duyarlı(%) |
| İNH Dirençli | 11 (22) | 9 (18) | 2 (4) | 8 (16) | 3 (6) |
| STR+İNH | 2 (4) | 2 (4) | 0 (0) | 2 (4) | 0 (0) |
| STR+RİF | 1 (2) | 1 (2) | 0 (0) | 1 (2) | 0 (0) |
| STR+İNH+EMB | 1 (2) | 1 (2) | 0 (0) | 1 (2) | 0 (0) |
| STR+RİF+EMB | 1 (2) | 0 (0) | 1 (2) | 0 (0) | 1 (2) |
| ÇİD-MTBK | 20 (40) | 15 (30) | 5 (10) | 14 (28) | 6 (12) |
| S.İ.R.E. Duyarlı (=PZA monodirençliler) | 13 (26) | 13 (26) | 0 (0) | 13 (26) | 0 (0) |
| H37Ra | 1 (2) | 0 (0) | 1 (2) | 0 (0) | 1 (2) |
| Toplam (%) | 50 (100) | 41 (82) | 9 (18) | 39 (78) | 11 (22) |

MGIT SİRE testindeki tüm ilaçlara duyarlı bulunup, PZA duyarlılığı çalışıldığında PZA dirençli çıkan suşlara PZA monodirençli suş denilmektedir. Bu şekilde MGIT'da standart yöntemle PZA duyarlılığı çalışılan 13 suşun 13'ü PZA monodirençli bulundu. Aynı suşlar yarı hacim inokulum ile çalışıldığında da yine aynı 13 suş PZA dirençli bulundu. (Tablo 4.3).

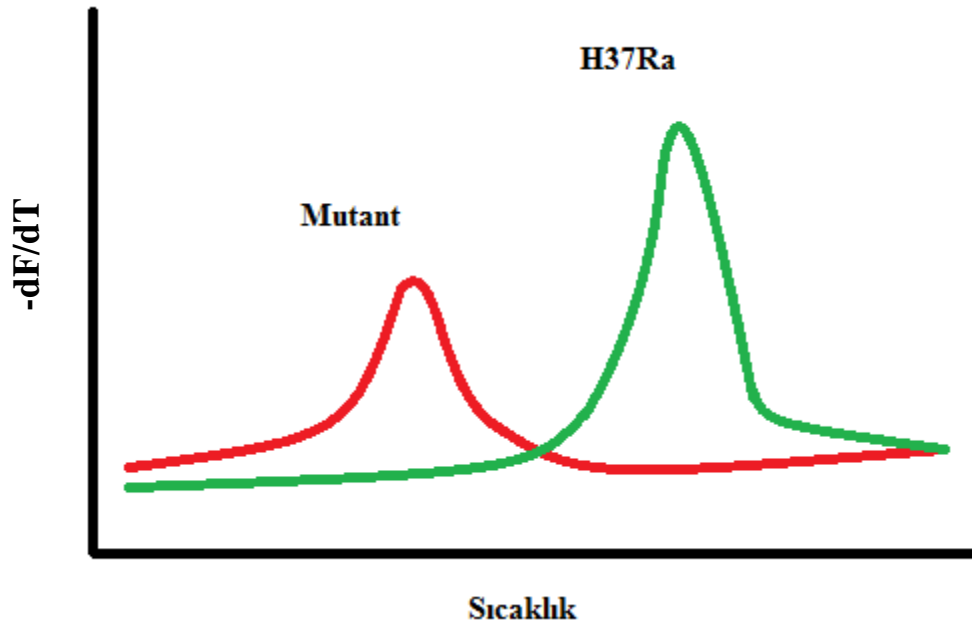
MGIT'da iki farklı inokulum hacmiyle çalışılan prosedürlerin uyum oranı %95 bulundu. Yarı inokulum çalışılarak bulunan değerler referans alındığında standart PZA test prosedürünün hata oranı %5 bulundu (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Standart yöntem ve modifiye yöntemin PZA direncinde uyumu ve sonuç farkı

| İnokulum Hacmi (ml) | PZA dirençli n (%) | Standart ve Modifiye Yönt. Uyumu % | Standart ve Modifiye Yönt. Sonuç Farkı % |
|---------------------|--------------------|------------------------------------|--|
| 0,5 (Standart) | 41 (82) | 95 | 5 |
| 0,25 (Modifiye) | 39 (78) | | |

4.2. MTBK İzolatlarının Multipleks “real-time PCR” Yöntemi ile Saptanan Erime Eğrileri ve DNA Dizi Analizi ile Saptanan Mutasyonlar

Mutasyon taşıyan suşların DNA'larından erime eğrisi analizi sırasında problemler mutant bölgeye tam oturmadığı için daha kolay ayrıldı. Sonuç ekranında mutant olmayan suşa göre daha erken zamanda pik gözlemlendi. Mutasyon taşımayan *M. tuberculosis* H37Ra suşu ise, tüm ilaçlar için yapılan çalışmalarda problemlere tam komplementer oldukları için problemlerin ayrılması daha yüksek sıcaklıklarda gözlemlendi.



Şekil 4.1. Mutant suşlar ve H37Ra'nın erime eğrisi analizindeki görünüşleri

Mutasyon Varlığında EST Sapmaları

PCR testinin ilaç direncine neden olan mutasyonları saptamasını göstermek amacıyla her prob tek tek konularak ayrı ayrı PCR karışımları hazırlandı. Alınan sonuçlara bağlı olarak *M. tuberculosis* H37Ra'nın ortalama değerleri aşağıdaki şekilde elde edildi:

Tablo 4.5. *M. tuberculosis* H37Ra suşlarının tek proba çalışılan “real-time PCR” testlerinde, problemlerin elde edilen ortalama EST değerleri

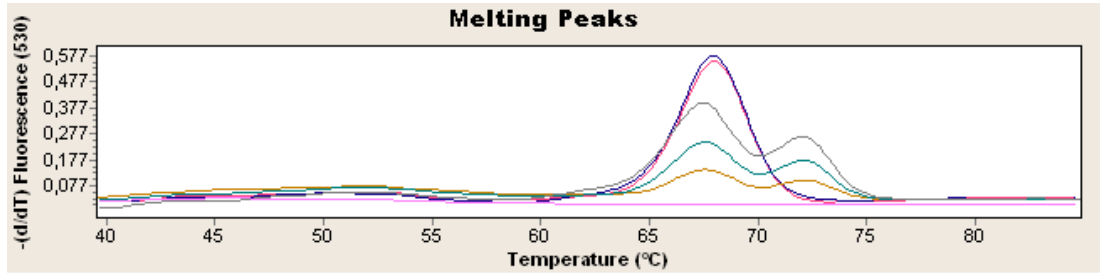
| Prob | Ortalama EST Değeri (°C) |
|--------|--------------------------|
| rpo P1 | 66,34 |
| rpo P2 | 71,28 |
| katP | 57,1 |
| inhP | 57,1 |
| embP | 71,0 |

ÇİD-MTBK suşlarının 81-bç'lik RDBB, *katG315*, *inhA* promotor bölgesi ve *embB* 306 mutasyonları, referans suş olan *M. tuberculosis* H37Ra sonuçları ile karşılaştırılarak tespit edildi. ÇİD-MTBK suşlarının *M. tuberculosis* H37Ra'ya göre ortalama EST değeri sapmaları şöyle bulundu:

Tablo 4.6. ÇİD-MTBK suşlarının *M. tuberculosis* H37Ra suşlarının ortalama EST değerlerine göre sapma miktarları

| Prob | H37Ra'dan Ortalama EST Değeri Farkı (°C) |
|----------------|--|
| <i>rpoB</i> P1 | 11,0 |
| <i>rpoB</i> P2 | 4,18 |
| <i>katP</i> | 12,64 |
| <i>inhP</i> | 1,9 |
| <i>embP</i> | 5,0 |

“Real-time PCR” ile MTBK suşlarının RİF direncini saptamak amacıyla *rpoB* gen bölgesi için multipleks uygulama yapılarak iki prob (RpoB P1 ve RpoB P2) birden konuldu, bölge çoğaltıldı ve erime eğrisi analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre RİF dirençli ve duyarlı suşların EST değeri grubuna örnek olabilecek erime eğrileri, Şekil 4.2’de verilmiştir.



Dirençli : __ , __ Duyarlı: __ , __ , __ Negatif Kontrol (su) : __

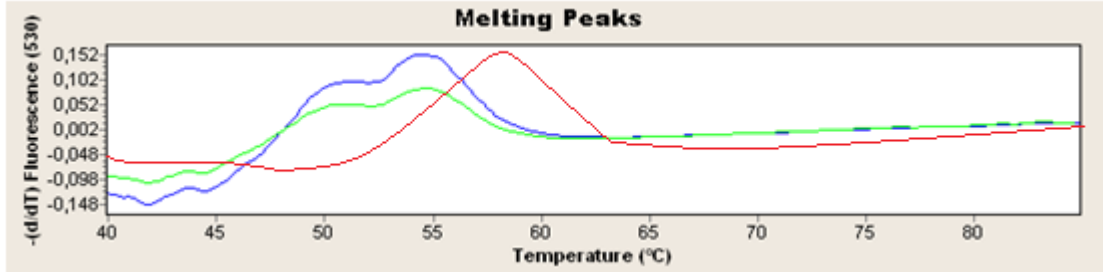
Şekil 4.2. Bazı izolatların “real-time PCR” sonundaki *rpoB* erime eğrileri

RİF dirençli olan suşlar erime eğrisi analizinde *rpo* P2 probu ile ortalama 67,1⁰C’de tek bir pik verdi. Rpo P1 mutasyonu için EST piki saptanamadı. Bunun nedeni ise, 531. kodon mutasyonunun *rpo* P2 probunun kapsamında olmasıdır. Mutasyon olduğu için prob komplementer olduğu bölgeye tam bağlanamadığından erime eğrisi analizi sırasında daha düşük sıcaklıkta ayrılmışlardır.

Başka bir suшта 515. kodonda Met aminoasidinden Ile aminoasidine dönüşüm, *rpo*P1 probuyla saptandı. Bu suşun erime eğrisi analizinde *rpo*P1 probu EST değeri, *M. tuberculosis* H37Ra EST değerinden 11⁰C düşük çıktı (56,59⁰C). Bu değer direncin saptanmasını çok kolaylaştırdı. Bu mutasyonların hangi aminoaside karşılık geldiği, DNA dizi analizi yapıldıktan sonra belirlendi.

RİF duyarlı suşlar ortalama 66,34⁰C ve 71,28⁰C’de olmak üzere her iki prob için iki ayrı pik verdi. Böylelikle RİF dirençli ve duyarlı suşların ayrımları kolaylıkla yapıldı.

MTBK suşlarının INH direncini saptamak amacıyla “real-time PCR” ile *katG* ve *inhA* gen bölgeleri multipleks uygulama ile tek PCR kapillerinde çoğaltıldı ve erime eğrisi analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre *inhA* promotor bölgesinde 15. nükleotitte mutasyon taşıyan MTBK suşlarının (C →T) INH dirençli EST değerine örnek olabilecek erime eğrileri, Şekil 4.3’de verilmiştir.

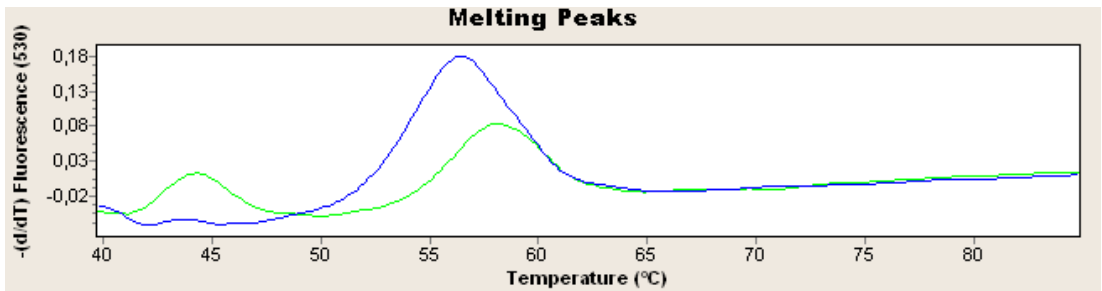


(Mutasyon +) Dirençli : — , — (Mutasyon -) Duyarlı (H37Ra) : —

Şekil 4.3. *inhA* 15 mutasyonu taşıyan MTBK suşlarının erime eğrileri

inhA-15’te mutasyon taşıyan INH dirençli suşlar erime eğrisi analizinde ortalama 51⁰C’de ve 55,1⁰C’de iki pik verdi. Dirençli izolatlarda en belirgin floresan düşüşü yaklaşık 55,1⁰C’de elde edildiğinden bu değer esas olarak alındı. Duyarlı suşlar ise ortalama 57⁰C’de tek bir pik verdi.

katG 315’te mutasyon taşıyan ve taşımayan suşların INH direnç ve duyarlılığına örnek olabilecek erime eğrileri, Şekil 4.4’te verilmiştir.

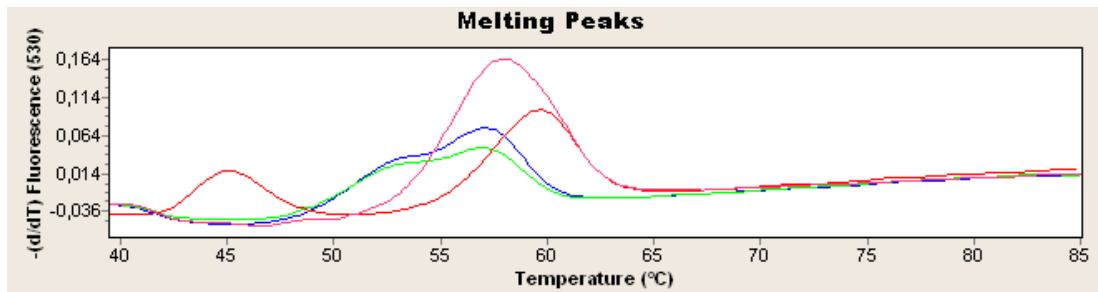


(Mutasyon +) Dirençli : — (Mutasyon -) Duyarlı (H37Ra) : —

Şekil 4.4. *katG* 315 mutasyonu taşıyan MTBK suşunun erime eğrisi

katG 315 mutasyonu taşıyıp INH dirençli olan suşlar erime eğrisi analizinde ortalama 43°C’de ve 58°C’de iki pik verirken, *katG* 315 mutasyonu taşımayan suşlar ortalama 57°C’de tek bir pik verdi. Böylelikle *katG* 315 mutasyonu taşıyan ve taşımayan suşların ayrımları kolaylıkla yapıldı.

Multipleks “real-time PCR” uygulaması ile MTBK suşlarının aynı tüpte hem *inhA* nükleotit 15 hem de *katG* kodon 315 mutasyonlarını saptamak amacıyla gen bölgeleri çoğaltıldı ve erime eğrisi analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre INH duyarlılığını belirlemek amacıyla dirençli ve duyarlı suşların EST değerine örnek olabilecek erime eğrileri, Şekil 4.5’te verilmiştir.

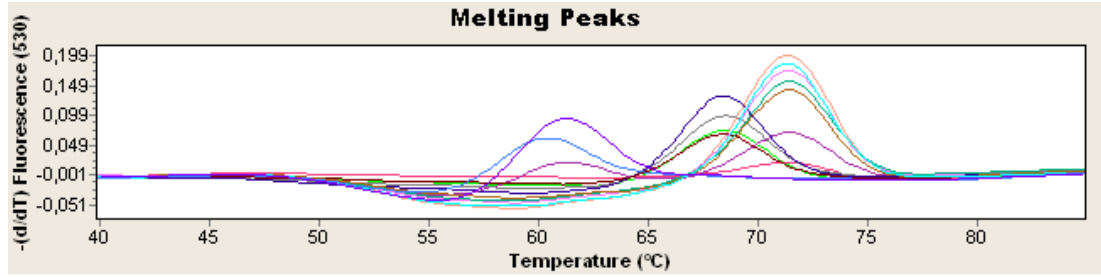


(*katG* 315 Mutasyon +) INH Dirençli : — (*inhA*-15 Mutasyon +) INH Dirençli: —
—, — (*katG* 315 Mutasyon -, *inhA* 15 mutasyon - H37Ra) INH Duyarlı : —

Şekil 4.5. INH dirençli MTBK suşlarının multipleks “real-time PCR” sonucu elde edilen erime eğrileri

Şekle göre *katG* 315 mutasyonu taşıyan kırmızı renkli örneği piki, *inhA*-15’te mutasyon taşıyan örneklerden (mavi ve yeşil) hiçbir mutasyon taşımayan *M. tuberculosis* H37Ra suşunun pikinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir.

“Real-time PCR” ile MTBK suşlarının EMB direncini saptamak amacıyla *embB* gen bölgesi çoğaltıldı ve erime eğrisi analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre EMB dirençli ve duyarlı suşların EST değeri grubuna örnek olabilecek erime eğrileri, Şekil 4.6’da verilmiştir.



EMB Dirençli : __ , __ , __ , __ , __ , __ , __ EMB Duyarlı: __ , __ , __ , __ , __ , __

Şekil 4.6. Bazı izolatların “real-time PCR” sonundaki *embB* erime eğrileri

embB 306 kodon mutasyonuyla dirençli olan suşlar erime eğrisi analizinde (~61°C ve 68°C’de) pik verirken, EMB duyarlı suşlar ortalama 72,0°C’de pik verdi. Böylelikle EMB dirençli ve duyarlı suşların ayrımları kolaylıkla yapıldı. 61°C civarında erime eğrisi piki oluşan suşlarda *embB* 306 kodonunda metionin aminoasidinin nokta mutasyon ile izolösin aminoasidine dönüştüğünü gösterdi (ATG → ATA). 68°C civarında erime eğrisi piki oluşan suşlarda ise *embB* 306 kodonunda metionin aminoasidinin nokta mutasyon ile valine dönüştüğünü gösterdi (ATG → GTG). Bir tek suş ise 60°C’de pik verdi. Bu suшта ise *embB* 306 kodonunda Met aminoasidinin nokta mutasyon ile Ile’ye dönüştüğünü gösterdi (ATG → ATC).

Tablo 4.7. MTBK suşlarının “real-time PCR” sonuçlarına göre belirlenen ilaç direncine neden olan mutasyonları

| MTBK Suşları | n=50 | Mutasyon Yeri (Kodon) | Mutasyon Tipi | Aminoasid Değişimi | EST Değeri(°C) | Direnç Oranı(%) |
|--------------|------|-----------------------|---------------|--------------------|----------------|-----------------|
| RİF R | 18 | (<i>rpoB</i>) 531 | TCG → TTG | Ser → Leu | 67,1 | 95 |
| RİF R | 1 | (<i>rpoB</i>) 515 | ATG → ATC | Met → Ile | 56,59 | 5 |
| INH R | 9 | <i>katG</i> 315 | AGC → ACC | Ser → Thr | 43,0 | 35 |
| INH R | 17 | <i>inhA</i> promotor | C → T | | 51,0 | 65 |
| EMB R | 3 | <i>embB</i> 306 | ATG → ATA | Met → Ile | 61,0 | 27 |
| EMB R | 7 | <i>embB</i> 306 | ATG → GTG | Met → Val | 68,0 | 64 |
| EMB R | 1 | <i>embB</i> 306 | ATG → ATC | Met → Ile | 60,0 | 9 |

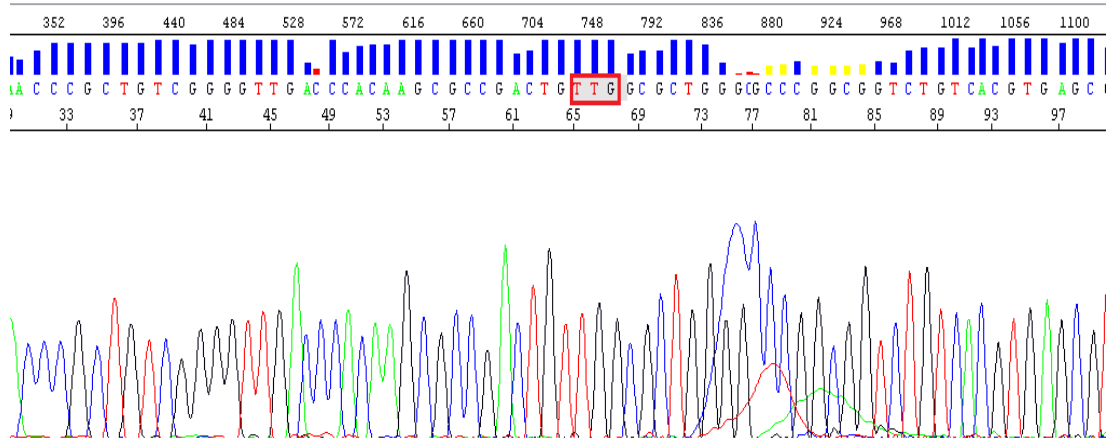
“Real-time PCR” sonucuna göre farklı EST ve farklı mutasyonlara sahip oldukları düşünülen izolatlardaki mutasyonlar DNA dizi analizi ile doğrulandı.

DNA dizi analizinden sonra tek bir suşun EMB duyarlılığının real-time PCR yöntemi ile yanlış saptandığı görüldü. Bu suş, MGIT’da EMB duyarlı çıkmış iken, real-time PCR testinde EMB dirençli çıktı. Ancak dizi analizinde embB geninde 306. kodon dahil olmak üzere herhangi bir mutasyon olmadığı saptandı. Bunun yanı sıra MGIT’da EMB dirençli çıkan bir suş da “real-time PCR” yöntemiyle EMB duyarlı bulundu. Elde edilen tüm sonuçlara göre yeni geliştirilen real-time PCR yönteminin özgüllük ve duyarlılığı:

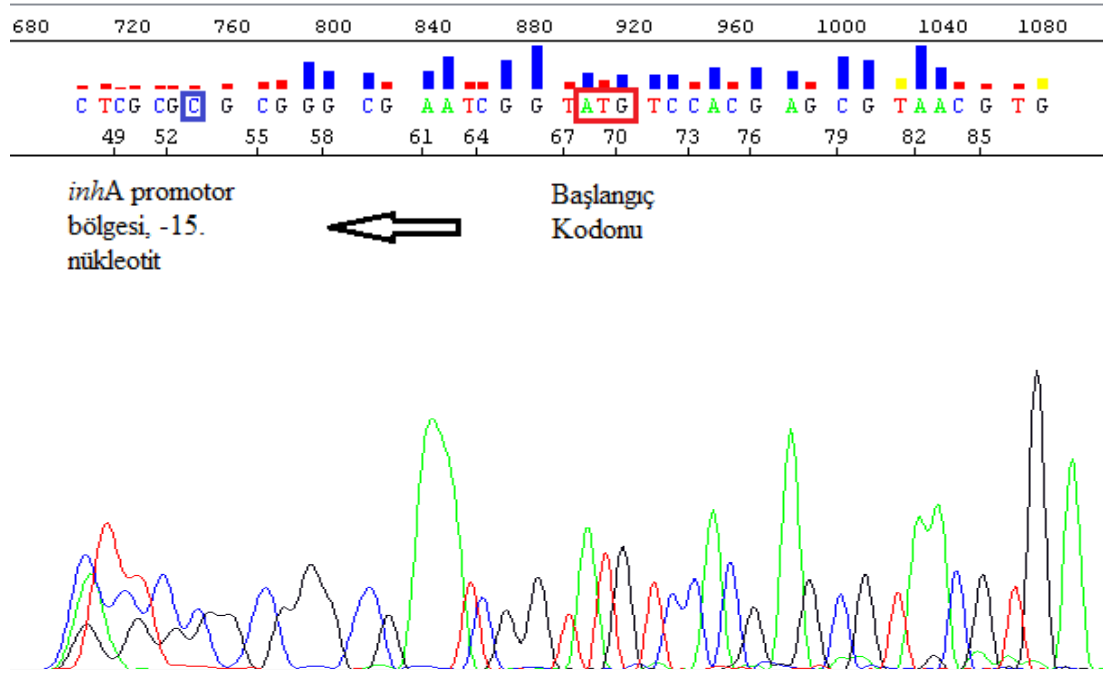
Tablo 4.8. Real-time PCR yönteminin MGIT 960 ve DNA dizi analizine göre özgüllük ve duyarlılığı

| İlaç | n | Özgüllük(%) | Duyarlılık(%) |
|------------|----|-------------|---------------|
| RİF | 50 | 100 | 100 |
| INH | 50 | 100 | 100 |
| EMB | 50 | 97 | 92 |

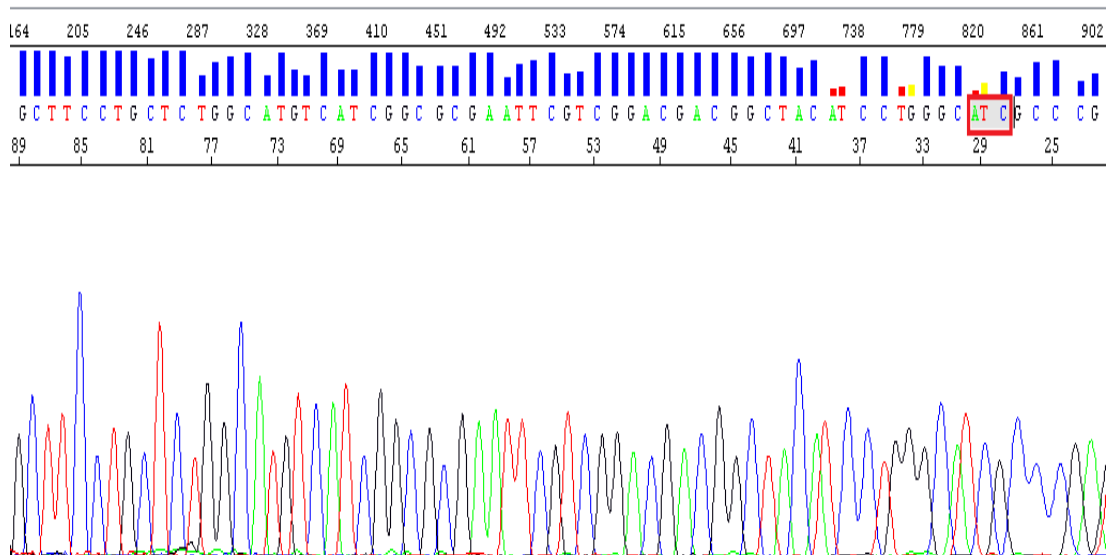
4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçları



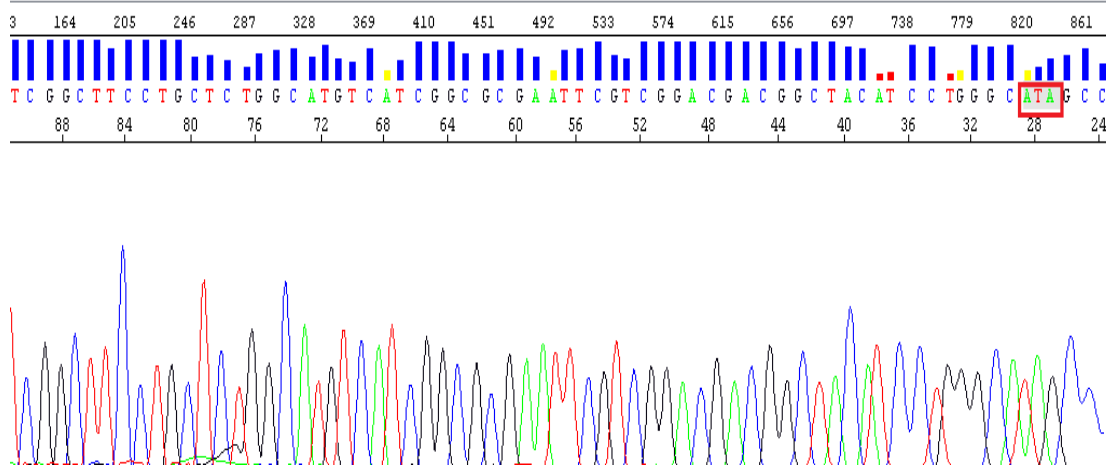
Şekil 4.7. *rpoB* gen bölgesi 531. kodonunda mutasyon sonucu TGC→TTG dönüşümü



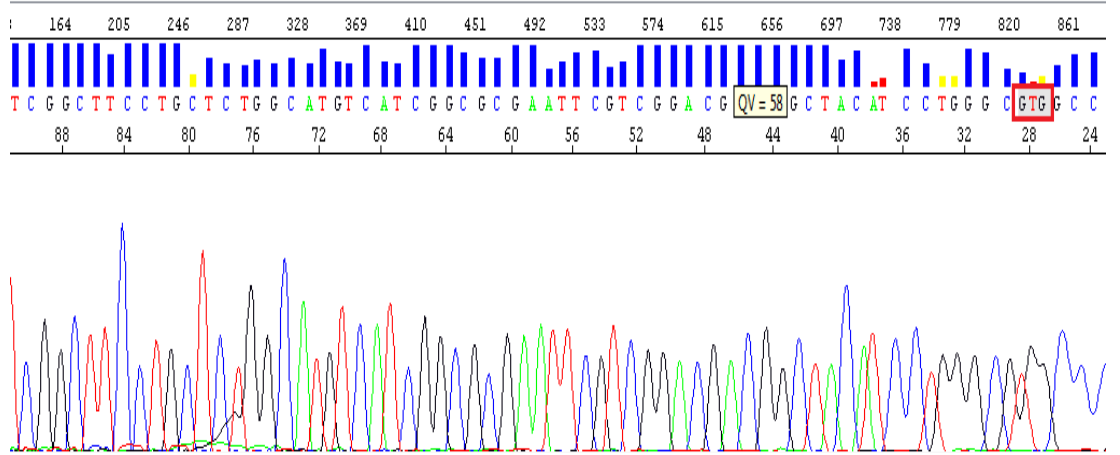
Şekil 4.8. *inhA* promotor bölgesi -15. nükleotidinde mutasyon taşımayan MTBK suşunun DNA dizi analizi



Şekil 4.9. *embB* 306. kodonunda mutasyon sonucu ATG→ATC dönüşümü



Şekil 4.10. *embB* 306. kodonunda mutasyon sonucu ATG→ATA dönüşümü



Şekil 4.11. *embB* 306. kodonunda mutasyon sonucu ATG→GTG dönüşümü

5. TARTIŞMA

TB, günümüzde hala insan sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardandır (1). Bunun nedeni son 60 yılda geliştirilen ilaçlar ve aşılama programlarına rağmen dünya nüfusunun 1/3'ünün TB ile enfekte olmasıdır (4). Bu oran uzun yıllardır değişmemektedir (4,7,45,53,117). TB hastalığı Türkiye'de de çok önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (7).

DSÖ'nün 2012 yılında yayınladığı son raporuna göre, 2011 yılında dünya genelinde 5,8 milyonu yeni tanımlanmış olmakla birlikte 8,7 milyon insan TB hastalığına yakalanmış, bu hastaların 1,4 milyonu hayatını kaybetmiştir (4). Ülkemiz verilerine göre ise TB insidansı, 2000 yılında Verem Savaş Dispanserleri'ne kayıtlı hastalarda hesaplandığında yüz binde 27'dir (4,5). Bu oran, 2011 yılı Türkiye Verem Savaşı Raporu'na göre yüz binde 24'e düşmüştür (7).

TB tedavisinde kullanılan ilaçların son yarı yüzyıldan itibaren kullanımda olmasına rağmen, TB hastalığının dünyada hala bu kadar önemli bir sorun olmasının en önemli nedeni, antitüberküloz ilaçlara gelişen dirençtir. İlaça dirençli MTBK suşlarının oranı günden güne dramatik bir şekilde artmaktadır. Bu durum, hastalığın kontrolünde başarısızlığa, etkisiz tedavi rejimlerine ve dirençli suşların yayılması problemlerine başlıca neden olmaktadır (10,11).

DSÖ, TB tanısının hızla konulmasını ve tanıdan sonra da en kısa sürede birinci sıra ilaçlara duyarlılığın çalışılmasını önermektedir (4). Konvansiyonel fenotipik ilaç duyarlılık testleri ise, üremeleri oldukça yavaş olan MTBK suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde çok fazla gecikme olmasına neden olmaktadır. DSÖ'nün önerisi olan MTBK suşlarının ilaç duyarlılıklarının hızlı tanısı, biran önce etkili antitüberküloz tedavisine başlanması ve dirençli suşların yayılmasını önlemek için çok gereklidir.

Bu çalışmada daha önceden önerildiği gibi (1), TaqMan problemleri ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi olmayan aTaq polimeraz kullanılarak erime eğrisi analiziyle MTBK klinik izolatlarında ilaç direnci saptanması, bu yöntemin özgüllük, duyarlılığının belirlenmesi ve yönetimin uygulanabilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. MTBK suşlarının birinci seçenek antitüberküloz ilaçlardan olan RİF,

INH, EMB ve PZA duyarlılığı, fenotipik duyarlılık yöntemi olan MGIT 960 sistemiyle çalışılmıştır. Çalışmada MTBK suşları, LJ kültüründen alınıp direkt MGIT’da üremeye konulmuştur. Ancak kültürden alınan örnek bile MGIT’da ortalama 4 günde üremiştir. MTBK suşlarının MGIT’daki ilaç duyarlılıkları ortalama 13 günde sonuç vermiştir. Tüm bu çalışmalar “real-time PCR”ın sonuçlarını karşılaştırabilmek amacıyla yapılmıştır. Ancak üreme için 4 gün+13 gün duyarlılık sonucu verebilmek için çok geçtir.

MTBK suşları ilaç dirençlerini, spontan gerçekleşen nokta mutasyonlar sonucu kromozomal DNA’nın değişikliğe uğramasıyla kazanmaktadırlar (12-15). Antitüberküloz ilaçların pek çoğuna dirence neden olan bu belirli genlerdeki mutasyon bölgeleri tanımlanmıştır (16). İlaç direncine neden olan mutasyonların bilinmesi, ilaca dirençli TB tanısında moleküler yöntemlerin gelişmesine ışık tutmuş, böylelikle dirençli suşların tanısı erken konulmaya başlanmıştır (17).

Moleküler yöntemler arasında “real-time PCR”, hızlı sonuç vermesi, yüksek duyarlılığı, kontaminasyon riskinin çok düşük olması ve tekrarlanabilirliği nedenleriyle yaygın olarak tercih edilmektedir (18-25). İlaç direncine neden olan mutasyonların belirlenmesinde başlıca “real-time PCR” yöntemden biri olan TaqMan problemleriyle nükleik asit amplifikasyonunda, her PCR döngüsünün sonunda, prob ve hedef dizinin hibridizasyonu ile bir floresan ışığı oluşmaktadır.

“Real-time PCR” testlerinden çoğu, bir mutasyonu ayırt edebilmek için en az 2 farklı florokromla işaretlenmiş problemlere ihtiyaç duymaktadır. Buna bağlı olarak da test fiyatı oldukça yükselmekte ve çok sayıda mutasyonun saptanabilmesi için “real-time PCR” cihazının da çoklu kanallı olması gerekebilmektedir (24,25). MTBK suşlarında ilaç direnci mutasyonlarının tanısında bu yöntem başarılı bir şekilde uygulanmıştır (20,26-30). Fakat bu yöntemlerin “real-time PCR” uygulamaları için ilave gereksinimleri vardır.

İlaç direncine neden olan mutasyonların belirlenmesinde başlıca iki “real-time PCR” yöntemi vardır: TaqMan problemleri ve Moleküler Firkete temelli mutasyon saptama testlerinde, her PCR döngüsünün sonunda, prob ve hedef dizinin hibridizasyonu ile bir floresan ışığı oluşmaktadır. Bu “real-time PCR” testlerinden

çoğu, bir mutasyonu ayırt edebilmek için en az 2 farklı floroforla işaretlenmiş problemlere ihtiyaç duymaktadır. Buna bağlı olarak da test fiyatı yükselmekte ve “real-time PCR” cihazının da çoklu kanallı olması gerekebilmektedir (25). Floresan rezonans enerji transferi (FRET) problemleriyle erime eğrisi analizi ve yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (HRM) analizinde ise, mutasyon saptaması, erime eğrisi analiziyle yapılmaktadır. MTBK suşlarında ilaç direnci mutasyonlarının tanısında her iki yöntemde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (1,20,28). Fakat her iki yöntemde sınırlı “real-time PCR” platformlarında uygulanmıştır. HRM testi ise gelişmiş “real-time PCR” cihazları gerektirmektedir (1). Yakın zamanlarda birkaç yeni prob temelli erime eğrisi analizi teknolojisi, genotiplendirmeler için geliştirilmiştir. Bunların arasında işaretli prob, çift işaretli prob ve moleküler firketelerle çalışılan testler de vardır (6,32,33). Fakat bu yöntemlerden MTBK suşlarında ilaç direncini tanımlamaya yönelik sınırlı miktarda çalışma bulunmaktadır (33,34). FRET problemleri ve erime eğrisi analizi ile çalışmamızdaki yöntemle benzer olarak yapılan çalışmalar bulunmaktadır (20,27,146). Bu çalışmalarda, bir verici floresan boya molekülü ile işaretli bağlantı probu, bir de alıcı floresan boya molekülü ile işaretli saptama probu olan 2 adet FRET probu, MTBK suşlarında ilaç direncini saptamak için kullanılmıştır. FRET problemlerinden saptama probu mutasyon aranan bölgeye, bağlantı probu ise bu bölgenin hemen yakınındaki bölgeye uygun olarak hazırlanmaktadır. Aralarında 1-5 nükleotit uzaklık olacak şekilde yerleşen problemler, DNA zincirine bağlandıklarında, alıcı ve verici boya molekülleri yan yana gelir. Bu sayede yan yana gelen problemlerden bağlantı probundan saptama probuna enerji transferi olur ve saptama probu floresans yayar (146). Bu çalışmalarda, *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonları saptamak için iki FRET probu gerekmektedir. Bunun yanı sıra *katG* 315 mutasyonunu saptamak için de iki ayrı prob gerekmektedir. Bu sayede testin maliyeti, bizim testimizin maliyetinden çok daha fazla olmaktadır.

Günümüzde artık bazı çalışmalarda yeni olarak geliştirilen yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi yapılmaktadır (28-30). HRM analizi, mutant suşlarda mutasyon taşımayan suşların EST derecelerindeki çok küçük farklılıkları saptayabilmektedir. Ancak bunun için oldukça gelişmiş “real-time PCR” cihazları gerekmektedir. Bu çalışmada ise, mutant olan ve olmayan suşların EST değerleri arasında en az 5,0⁰C fark olması nedeniyle, bu ayırım kolaylıkla normal bir real-time

PCR cihazında gözlemlenebilmektedir. Tüm problemler aynı floroforlarla işaretli olduğu için de tek kanallı real-time PCR cihazı bile, bu multipleks uygulama için yeterlidir.

Bu nedenle çalışmamızda, MTBK suşlarında ilaç direncine neden olan mutasyonları hızlı bir şekilde tanımlayabilecek düşük maliyetli bir “real-time PCR” yöntemi uygulanmıştır.

Çalışmamızda uyguladığımız multipleks “real-time PCR” yöntemine benzer multipleks “in-house” PCR uygulamaları da bulunmaktadır. *In-house* uygulama ile *rpoB* genindeki 516, 526 ve 531. kodonları ve *katG* genindeki 315. kodondaki mutasyonlar, özgül primerler yardımıyla araştırılmaktadır (130,139,144). Yapılan çalışmalarda bu multipleks PCR yöntemi, *rpoB* geninin 531 ve 516. kodonlarındaki mutasyonları belirlemede dizi analizi ile %100 uyumlu bulunmuştur (139,144). Buna karşın yöntemin 526. kodondaki mutasyonu saptamada duyarlılığı düşük bulunmuştur. *katG* geninin 315. kodonundaki mutasyonu saptamada dizi analiziyle % 94 uyum gözlenmiştir (139).

Yang ve ark. (131) yaptıkları çalışmada, konvansiyonel multipleks PCR ile MTBK suşlarında INH, RIF ve EMB direncinden sorumlu mutasyonlar araştırılmış; yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü INH için % 81 ve %97.5, RIF için %93 ve %98.9, EMB için %54.5 ve %68 olarak kaydedilmiştir. Ancak tüm bu yöntemlerde analiz için elektroforez uygulanması, çalışmaların dezavantajıdır.

Yapılan tüm bu PCR çalışmalarında farklı duyarlılık sonuçları elde edilmesinin, kullanılan PCR yönteminin yanı sıra, örnek türü ve örnek içindeki basil miktarı ile de önemli bir ilişkisi vardır. Teorik açıdan bakıldığında, örnek içinde birkaç basilin bulunması durumunda bile PCR sonucunun pozitif bulunabileceği söylenmektedir. Ancak pratik uygulamada, birçok çalışmada TB PCR duyarlılığının bu kadar yüksek olmadığı gösterilmiştir. Bunun nedenleri arasında MTBK DNA'sının iyi bir şekilde açığa çıkarılamaması, örneğin işlenmesi sırasında basillerin kaybedilmesi veya örnek içinde inhibitör maddeler bulunması sayılabilir (80,145). Tüm bu nedenler de PCR'da MTBK'nın saptanmasını ve duyarlılık çalışmasını etkilemektedir.

DSÖ tarafından MTBK tanısında ve RİF duyarlılığı çalışılmasında önerilen yöntem olan GeneXpert MTB/RIF sisteminin klasik yöntemlerle kıyaslandığı ilk çalışmalarda tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir(21,136-138) . Doğrudan hasta materyalinden semi kantitatif nested “real-time PCR” yöntemiyle, MTBK varlığı ve RİF direnci tek bir testle, iki saatten kısa bir sürede saptanabilmektedir. Bu çalışmalarda testin duyarlılığı yayma-pozitif örneklerde ortalama %99, yayma-negatif örneklerde ise ortalama %90 olarak bulunmuştur. Testin en belirgin olumsuz yönü ise, pahalı bir yöntem olmasıdır. Ancak DSÖ tarafından TB tanısında ve RİF direnci saptanmasında öneriliyor olması moleküler yöntemlerin TB laboratuvarlarında yavaş yavaş yer almaya başladığının göstergesidir.

Bu çalışmada LJ besiyerinde üretilmiş MTBK suşlarının spin kolon yöntemiyle DNA’ları izole edilmiştir. İzole edilen DNA’ların *rpobB*, *inhA* promotor bölgesi, *katG* ve *embB* gen bölgelerinde ilaç direncine neden olan mutasyonların olup olmadığı multipleks “real-time PCR” uygulamasıyla saptanmaya çalışılmıştır. Bu nedenle, ilaç direnciyle ilişkili bölgelere komplementer olan çift işaretli TaqMan problemleri kullanılmıştır. Mutasyonlar, amplifikasyondan sonra yapılan erime eğrisi analizi ile saptanmaya çalışılmıştır.

Pek çok farklı prob, ilaç duyarlılıklarını saptamada kullanılmaktadır. TaqMan ve moleküler firkete temelli mutasyon saptama yöntemleri karşılaştırıldığında her iki yöntemin benzerlikleri olmasına karşın, bu çalışmada kullanılan problemlerinin avantajları fazladır. Yine FRET problemlerinin kullanıldığı yöntemlerde genellikle en az bir çift prob, bir mutasyonu saptamak için kullanılmaktadır (9,32). Bunun yanı sıra farklı TaqMan ve moleküler firkete problemlerinin kullanıldığı çalışmalarda her bir mutasyonu saptamak için ayrı bir prob tasarlanmaktadır. Bu durum da testin maliyetini çok fazla arttırmaktadır.

Espasa ve ark. (24) ve Wada ve diğ. (23) yaptıkları çalışmalarda TaqMan ve moleküler firkete temelli yöntemleri modifiye ederek *rpoB* bölgesindeki mutasyonları saptamışlardır. RİF direncine neden olan mutasyonlar, moleküler firkete problemlerle tek bir tüpte saptanabilmiştir.

rpoB bölgesindeki mutasyonların hepsinin kapsanabilmesi amacıyla farklı floroforlarla işaretli çoklu prob (dörtten fazla prob) seti gerekmektedir. Ancak böyle bir “real-time PCR” testinin çalışılacağı cihazın, eş zamanlı olarak farklı floroforları saptayabilmesi için çoklu kanala sahip olması gerekmektedir (1,18,23). Bu çalışmada ise, tüm problemler aynı floroforla (FAM) işaretlidir. 2 problu test tüplerinde ise ayırım problemlerin erime eğrisi analizindeki T_m farklılıklarıyla yapılmaktadır. Tüm ilaçlar için uygulanan “real-time PCR” programı aynıdır. Bu nedenle tüm testler, tek kanallı “real-time PCR” cihazlarında aynı anda eş zamanlı olarak kolaylıkla çalışılabilmektedir.

Kültür duyarlılığı ve PCR’a göre duyarlılığı karşılaştırdığımızda, yöntemin başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. MGIT ile RİF dirençli bulunan örneklerin hepsi, “real-time PCR” yöntemiyle de dirençli bulunmuştur. MGIT ile RİF duyarlı bulunan örneklerin hepsi, “real-time PCR” ile de duyarlı bulunmuştur. Bunun yanı sıra, dirençli örneklerde RİF direncine neden olan mutasyonlar *rpoB* gen bölgesinde saptanabilmiştir.

Somoskovi ve ark. yaptığı çalışmada düşük MİK değerli RİF direnci, RDBB bölgesinin 511, 513, 515, 516, 518, 519 ve 522. kodonlarındaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur. RİF’e yüksek MİK değerinden sorumlu olan ve en sık görülen mutasyonlar Ser 531 Leu (%42) ve His 526 Tyr (%23) mutasyonları olarak saptanmıştır (146).

rpoB gen bölgesinde bulunan pek çok mutasyonu saptayabilmek için, çok sayıda prob gerekirken, bu çalışmada 2 adet uzun ve ortasından floroforla işaretli prob kullanılmıştır. *rpoB* P1 probu *rpoB* geninin 511, 513, 515, 516, 518, ve 519. kodon mutasyonlarını saptayabilecek şekilde tasarlanmışken, *rpoB* P2 probu en sık görülen 531. kodon ve sonrasında 526 ve 533. kodon mutasyonlarını saptayabilecek şekilde tasarlanmıştır. Sonuç olarak bu iki uzun prob, *rpoB* gen bölgesindeki tüm mutasyonları kapsamaktadır. Problemlerin sayısının az olması ve aynı işaretli olmaları testin maliyetini oldukça düşürürken, mutasyon saptama olasılığını da çok yükseltmiştir.

Rpo P1 probu, çalıştığımız örneklerden rpo P1 probunun kapsamına giren 515. kodon mutasyonu tek bir suşta saptanmıştır (Direnc oranı=%5). Bu mutasyon, rpo P1 EST değerinde 11⁰C düşüşe neden olmuştur (56,59⁰C). Bu fark da direncin saptanmasını çok kolaylaştırmıştır.

Rpo P2 probuyla dirençli izolatların ortalama 67,1⁰C’de pik verdiği bu sırada rpo P1’in hiç pik vermediği ve örneklerin DNA dizi analiziyle incelendiğinde 531. kodonda mutasyon taşıdıkları saptanmıştır (Direnc oranı=%95). “Real-time PCR” testiyle elde edilen tüm sonuçlar sonuçlar MGIT ve DNA dizi analizi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında “real-time PCR” yönteminin RİF duyarlılığını saptamadaki özgülüğü ve duyarlılığı %100 bulunmuştur.

MTBK RİF dirençli izolatların “real-time PCR” ile yüksek duyarlılıkta sonuç alınması; RİF direncinden sorumlu mutasyonların büyük oranda RDBB’de bulunması ve bizim kullandığımız problemlerin de bu bölgeyi hedeflemesi nedeniyle, beklenir bir sonuçtur.

INH direncinden ~%50 sorumlu olan *katG* bölgesinin 315. kodonunda görülen Ser→ Thr (AGC→ ACC) mutasyonunu saptayabilmek amacıyla katP probu tasarlanmıştır.

katP probuyla, MGIT’la INH dirençli olarak saptanan 26 suştan 9 tanesinin *katG* 315. kodonunda AGC→ACC mutasyonu taşıdığı saptanmıştır (%35). *katG* 315 mutasyonunu saptamak için tasarlanan probun, bu mutasyonu taşıyan suşlarda verdiği ortalama EST değeri 43⁰C’dir. Bu sıcaklık değeri, *KatG* 315 mutasyonu taşımayan suşların EST değerinden 12,64⁰C daha düşüktür. Bu EST değeri farkıyla *katG* 315 mutasyonu taşıyan ve taşımayan suşlar kolaylıkla birbirinden ayrılabilmiştir. Bu suşlarda “real-time PCR” yöntemiyle saptanan *katG* 315 mutasyonu varlığı, yapılan DNA dizi analizleriyle doğrulanmıştır.

katG gen bölgesinin 315. kodonundaki mutasyonu saptamak amacıyla tasarlanan katP probunun, uyguladığımız “real-time PCR” yönteminde bu bölgedeki mutasyonu saptama özgülüğü ve duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur.

INH direncinden ~%25 sorumlu olan *inhA* promotor bölgesinde bulunan ve başlangıç kodonundan geriye doğru nükleotidler sayıldığında karşımıza çıkan 15. nükleotidin mutasyon ile (C → T) değişmesini saptayabilmek için *inhP* probu tasarlanmıştır.

inhP probuyla, MGIT'la INH dirençli olarak saptanan 26 suştan 17 tanesinin *inhA* promotor bölgesinin 15. nükleotidinde mutasyon taşıdığı saptanmıştır (%65). Bu mutasyon C nükleotidinin yerinde T nükleotidi bulunması ile oluşmaktadır. *inhA-15* mutasyonunu saptamak için tasarlanan probun, bu mutasyonu taşıyan suşlarda verdiği ortalama EST değeri 54⁰C'dir. Bu sıcaklık değeri, *inhA-15* mutasyonu taşımayan suşların EST değerinden 1,9⁰C daha düşüktür. Bu EST değeri farkıyla *inhA-15* mutasyonu taşıyan ve taşımayan suşlar kolaylıkla birbirinden ayrılabilmiştir. Bu suşlardaki *inhA-15* mutasyonu varlığı, yapılan DNA dizi analiziyle doğrulanmıştır.

inhA promotor bölgesinin 15. nükleotidindeki mutasyonu saptamak amacıyla tasarlanan *inhP* probunun, uyguladığımız "real-time PCR" yönteminde bu bölgedeki mutasyonu %100 özgülük ve duyarlılıkla saptadığı görülmüştür.

Çalışmamıza toplam 26 INH dirençli izolat alınmıştır. Bu izolatlarda *katG* ve *inhA* mutasyonların saptandığı için uyguladığımız real-time PCR yönteminin duyarlılığı %100 bulunmuştur. Ancak INH dirençli izolat sayısı artırıldığında "real-time PCR" yönteminin duyarlılığının düşmesi beklenebilir. Çünkü MTBK izolatlarında izoniazid direncinde *katG* ve *inhA*'dan başka genler de sorumludur (1).

MTBK suşlarında EMB direncinden sorumlu olduğu bilinen mutasyonların %70'ine *embB* gen bölgesindeki aminoasit değişiklikleri sebep olmaktadır. Bu mutasyonların ise %90'ının ise, *embB* 306. kodonunda olduğu ve Met306 mutasyonlarının, EMB'ye direncin saptanmasında en belirleyici mutasyonlar olduğu gösterilmiştir (126).

EMB direncine neden olan *embB* 306. kodonundaki mutasyonları saptamak amacıyla *embP* probu tasarlandı. Bu prob ile 306. kodonda mutasyon taşıyan 11 suş saptandı. Bu suşlara yapılan DNA dizi analizi ile, EST değeri ortalama 61,0⁰C olan 3 suşun ATG306ATA mutasyonu taşıdığı görüldü (Direnç oranı=%27).

EST değeri ortalama 68,0⁰C olan 7 suşa yapılan DNA dizi analiziyle 6'sının ATG306GTG mutasyonu taşıdığı görüldü. 1 suş ise, MGIT ile EMB duyarlı, DNA dizi analizinde ise 306. kodonda mutasyon taşımadığı görülmüştür. Ancak uyguladığımız “real-time PCR” yönteminde embP probu 68,32⁰C’de EST değerine sahip olarak saptandı. Bu hatalı sonuç, “real-time PCR” testimizin EMB duyarlılığı saptama özgüllüğünü %97’ye düşürmüştür.

embB 306 EST değeri 60,0⁰C bulunan tek bir suşun ise DNA dizi analiziyle ATG306ATC mutasyonu taşıdığı saptandı (Direnc oranı=%9). Bir suş ise, MGIT ile EMB dirençli bulunurken, “real-time PCR” yöntemiyle duyarlı bulundu. Aynı suşa yapılan DNA dizi analizinde ise *embB* geni üzerinde her hangi bir kodonda mutasyon olmadığı görüldü. Bu durumdaki EMB direncinden, farklı bir gendeki mutasyon sorumlu olabilir düşüncesi akla gelmektedir. EMB direncini saptamada “real-time PCR” testimizin duyarlılığı bu nedenle %92’ye düşmüştür.

Tüm veriler sonucunda embP probu ile EST değeri ortalama 61,0⁰C olan suşların ATG306ATA mutasyonu taşıdığı, embP EST değeri ortalama 68,32⁰C olan suşların ATG306GTG mutasyonu taşıdığı, embP EST değeri ortalama 60,0⁰C olan suşların ATG306ATC mutasyonu taşıdığı, embP EST değeri ortalama 71,0⁰C olan suşların ise EMB duyarlı olduğu “real-time PCR” sonucu ile belirlenebilmektedir.

Çalışmamızın bir diğer kısmı, PZA duyarlılığının MGIT 960’da doğru saptanabilmesi idi. Bilindiği üzere, PZA TB vakalarının tedavisinde kullanılan birinci sıra ilaçlardandır (148). Nikotinamid analogu olan bir ön ilaç olan pirozinoik asitin MTBK suşlarına karşı etkili olabilmesi için, mikobakteriyel bir enzim olan pirazinamidaz (PZaz) ile aktif formuna dönüştürülmesi gerekmektedir (146,149,150). PZA dirençli klinik izolatlarda PZaz aktivitesi kaybı, en yaygın PZA direnci nedenidir (150,151). Bunun yanı sıra, PZaz’ı kodlayan *pncA* geninde mutasyon olması, günümüzde artık PZA direncine neden olarak görülen asıl mekanizmadır (152-154). İlacın sadece asit pH’lı besiyerinde aktive olabilmesi, ilaç duyarlılığı çalışılmasını oldukça zahmetli bir hale getirmektedir (155,156). İlaç duyarlılığı çalışıldığında, zayıf üreme sonucunda tam elde edilemeyen sonuçları önlemek ve bu sırada da PZA aktivitesini korumak için besiyeri asidik (pH6) bir maddeyle zenginleştirilmektedir (157). Bactec 460 radyometrik sistemi, PZA duyarlılığı

çalışılmasında önerilen yöntemdir (35). Pek çok mikrobiyoloji laboratuvarı da, Bactec 460 radyometrik sisteminden MGIT 960 radyometrik olmayan sistemine geçmiştir. Her iki sistemde de, asidik Middlebrook 7H9 besiyerinde, modifiye orantı yöntemiyle elde edilmiş kritik PZA konsantrasyonu 100µg/ml olarak kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda, MGIT 960 sisteminin PZA duyarlılığında hatalı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (158-160). Hatalı sonuç vermesinin nedenleri araştırıldığında, farklı çalışmalar tarafından pek çok neden öne sürülmüştür.

Chedore ve ark. (158), radyometrik olmayan MGIT 960 sistemi, ile Bactec 460 TB sistemlerini PZA duyarlılığı çalışmasında karşılaştırmışlardır. PZA duyarlılığında MGIT 960'ın altın standart olan Bactec 460'dan farklı sonuçlar çıkardığını göstermişlerdir. Bunun nedeni olarak da, MGIT 960 ve Bactec 460'ın kullandığı besiyeri miktarında farklılık olması olarak değerlendirilmiştir. Buna bağlı olarak da besiyerindeki basil konsantrasyonunun MGIT'da Bactec'e göre 2,5 kat fazla olduğu belirtilmiştir.

Zhang ve ark. (161), MGIT 960 tüpünde bakteri konsantrasyonunun 2,5 kat fazla olup aktif bir şekilde üreyen basillerin besiyerinde bulunmasının, ortamın pH'sını anlamlı bir şekilde yükseltebileceğini, buna bağlı olarak da, alkali ortamda PZA'nın etkisinin inaktive olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, inokulum yoğunluğuna bağlı PZA duyarlılığı hatalı sonucunu önlemek adına bir MGIT PZA çalışma protokolü modifikasyonu yapılmıştır. İlk olarak MGIT PZA kitinin önerdiği miktarda inokulumla (0,5 ml) PZA duyarlılıkları saptanmıştır. Bu şekilde 50 suşun, 41'i PZA dirençli bulunmuştur.

PZA dirençli bulunan suşlar, yeniden MGIT'da PZA duyarlılığına alınmıştır. Fakat bu sefer tüplere yarı miktarda inokulum (0,25 ml) konulmuştur. Bu şekilde 41 PZA dirençli suştan 2 tanesi, PZA duyarlı olarak bulunmuştur. MGIT 960 PZA duyarlılık testinin %5 oranında farklı sonuç verdiği saptanmıştır. Ancak bu oran yapılan önceki çalışmalardaki hatalı PZA oranlarına göre daha düşüktür (140). MGIT sistemi kullanılarak test edilen bu izolatların, BACTEC 460, PRaz ve *pncA*

gen muatsyonlarının saptanması gibi yöntemlerle tekrar test edilmesi ve doğrulanması gerekmektedir.

İnokulum konsantrasyonunun fazla olması sorunun yanı sıra, MGIT 960'da kullanılan inokulumun kaç günlük olduğu da, test sonucu açısından çok önemlidir. Örneğin ilk kültür tüpünün pozitif verdiği gün 0. gün kabul edilmektedir. Takip eden 1 veya 2. günde testin çalışması daha doğru olmaktadır (158). Kültürün pozitifleştiği ilk 2 günde, PZA duyarlılığı, dilüsyona gerek kalmadan normal prosedürle çalışılmaktadır. Ancak kültür pozitif sonuç verdikten sonra, PZA duyarlılığı hemen çalışılmayıp 3-5 gün bekletildiyse, bu tüpten alacağımız inokulum konsantrasyonu çok yoğun bir hale gelmiş olmaktadır. Bunu önlemek amacıyla, örnek, ilk olarak 1:5 oranında dilüe edilir. Elde edilen dilüsyon tüpü, ilk inokulum tüpü kabul edilip, normal çalışma protokolüne bu tüple devam edilir. 2-5 gün arası PZA duyarlılığı çalışması için bekletilen pozitif kültür tüplerinin, etüvde bekletilmesi önerilmektedir (168). Amaç, tüp içerisindeki basil sayısının biraz daha artmasıdır. Nitekim üremenin olduğu 0. günde PZA çalışılmayıp sonraki günlere bekletilmesinin nedeni de budur. Ancak bizim çalışmamız gibi direk kültürden MGIT tüpüne pasajlandıysa, MGIT tüpü üreme pozitif sinyalini verdikten sonra, PZA çalışılacağı süre zarfına dikkat edilmelidir. Çünkü MGIT 960 cihazının içi etüv görevi görmektedir. Pozitif sinyali alınan tüpü cihazdan alıp etüve koyarak, basillerin üremesine aynı hızla devam etmesi sağlanır. Zaten kültürden yoğun şekilde alındığı için, PZA duyarlılığı çalışılırken de basil konsantrasyonu açısından aşırı yoğunlaşmış olacaktır. Bu örnek, belirli oranlarda seyreltilse de, basiller kümeleşmiş bir halde PZA tüpüne düşebilmektedir. Doğru bir dilüsyon sonucu ile 10^6 cfu/ml olması gereken konsantrasyon, bu değerden sapabilmektedir. Aşırı yoğun inokulumla bağlı olarak da, PZA tüpündeki üreme, kontrol tüpündeki üremeyi geçebilmektedir. Yine aynı şekilde yoğun inokulumla bağlı olarak, cihazın kontaminasyon kabul ettiği ilk 4 gün içinde üreme pozitifliği saptanabilir ve bu cihaz tarafından hata sayılır, test iptal edilir.

PZA duyarlılığı çalışırken vorteksleme işleminden sonra inokulumun 15 dk bekletilmesi önerilmektedir. Ancak önerildiği gibi vorteksledikten sonra 15 dakika bekleyip tüpün dip kısmında kümelenmiş basillere yakın yerden inokulum

alındığında, yoğunluğa bağlı olarak hatalı sonuç elde edilebilmektedir. Bunun yerine, bekletilmesi önerilen inokulumu, 15 dk gibi zaman harcayan bir süre bekletmeyip, tek kullanımlık pipet ucuyla tüpün üst sıvı kısmından alıp PZA duyarlılığı çalışıldığında da PZA testi sorunsuz sonuç vermektedir. Böylece testin çalışılma süresi oldukça kısaltılmış olur.

Werngren ve ark. (162), MGIT’da MTBK suşlarının PZA duyarlılığını çalışırken, üç farklı PZA MİK değeri belirleyip, buna göre sonuçları sınıflandırmayı uygun görmüşlerdir. PZA MİK değeri <64 µg/ml olan suşu duyarlı kabul etmişlerdir. PZA MİK değeri 128 µg/ml olan suşu orta duyarlı kabul etmişlerdir. PZA MİK değeri <128 µg/ml olan suşa ise dirençli demişlerdir.

MGIT 960 sistemi ile, PZA duyarlılığının normal test protokolüyle çalışıldığında hatalı duyarlılık sonucu verdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (150,158,161). Testin çalışma protokolüyle çalışıldığında en fazla hatalı sonucun görüldüğü çalışma Piersimoni ve arkadaşlarına aittir.

Piersimoni ve ark.(150), 211 MTBK suşunun PZA duyarlılığını test etmek amacıyla, 2 farklı fenotipik ve 1 genotipik yöntemi kullanmışlardır. Fenotipik yöntemler, Bactec 460 TB, MGIT 960 ve genotipik yöntem ise, PZA direncine neden olan *pncA* ve *rpsA* gen bölgelerinin dizi analizidir. 211 suşun 55’i MGIT 960 sistemiyle PZA dirençli bulunup, dirençli çıkan bu örneklerin yarı hacim inokulumlarıyla aynı test çalışıldığında 32 tanesini duyarlı bulunmuştur. Geriye kalan 23 suşu hem MGIT 960 hem de Bactec 460 TB dirençli bulmuştur. *pncA* ve *rpsA* mutasyonunu saptamak için 13 dirençli suşa yapılan dizi analizinde, 11 suşun *pncA* bölgesinde mutasyon taşıdığını saptamışlardır. Diğer 2 suşun ise *rpsA* gen bölgesinde mutasyon taşıdığını tespit etmişlerdir. Bactec 460 TB radyometrik sistemi altın standart kabul edilip duyarlılık ve özgüllüklerini hesapladıklarında, standart MGIT çalışma yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %85,4 bulmuşlardır. Yarı hacim inokulumla çalışılan yöntemi kıyasladıklarında ise duyarlılığı %100, özgüllüğü %100 bulmuşlardır. Bu çalışma, MGIT 960 sistemiyle PZA duyarlılığı çalışıldığında, sistemin hatalı sonuç verdiğini gösteren en fazla örnek sayısına sahiptir.

PZA duyarlılığına alternatif bir yol olarak kültürü yapılmış suşların PZaz aktivitesine bakılabilir veya *pncA* mutasyonları saptanabilir. Ancak bu yöntemlerinde dezavantajları vardır. PZaz testinin duyarlılığı düşüktür. Dirençli olan suşlar da PZaz pozitif olabilmektedir (163). *pncA* mutasyonları ise çok çeşitlidir. Gen bölgesi üzerinde baştanbaşa oldukça dağınık biçimde görülmektedir. Bu durum ise, mutasyon analizini kısmen zorlaştırmaktadır.

PZA direnciyle, *pncA* mutasyonu arasındaki ilişkiyi, yapılan çalışmalar doğrulamaktadır (150,164,165). PZA direncinin yapılan dizi analizleriyle saptanması ile, bu moleküler yöntemin önemi ortaya koyulmaktadır. Nitekim, dizi analiziyle hazırlanmış strip testlere, artık günümüzde ticari olarak kolaylıkla ulaşılabilmektedir (164,165). Bizim çalışmamızın kısıtlı yönü ise, imkanların yetersiz olması nedeniyle *pncA* geni mutasyon analizi yapamamış olmamızdır.

Yapılan çalışmalarda, PZA dirençli MTBK suşlarının hepsinin *pncA* geninde mutasyon taşımadığı da gösterilmiştir (166). Ribozomal protein S1'i kodlayan *rpsA* geninde yeni tanımlanabilen bir mekanizmayla mutasyon olması görülmüştür. Bu mutasyonun da düşük bir oranda da olsa, PZA direncine neden olabildiği belirtilmiştir (167).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. 50 MTBK klinik izolatında birinci sıra ilaçlardan RİF, INH ve EMB duyarlılığının saptanmaya çalışıldığı bu çalışmada, tüm suşlar LJ besiyerinde üretilmiş ve ardından MGIT 960 sıvı kültür sisteminde ilaç duyarlılıkları çalışılmıştır. MGIT yöntemiyle 19 suş RİF dirençli, 31 suş RİF duyarlı, 26 suş INH dirençli, 24 suş INH duyarlı, 11 suş EMB dirençli, 39 suş EMB duyarlı bulunmuştur.

2. Aynı ilaç duyarlılıklarının ve dirence neden olan mutasyonların kısa sürede saptanabilmesi amacıyla tasarlanan "real-time PCR" yönteminde toplamda 6 primer ve 5 prob kullanılmıştır. Uzun olarak tasarlanan ve ortasından floroforla işaretli olan iki adet TaqMan probu *rpoB* gen bölgesindeki tüm mutasyonları kapsamaktadır. INH direncinden ~%50 oranında sorumlu olan *katG* 315

mutasyonunu saptayabilmek için bir prob, yine INH direncinden ~%25 oranında sorumlu olan *inhA* promotor bölgesi 15. nükleotidindeki mutasyonu saptayabilmek için bir prob tasarlanmıştır. EMB ilaç direncine %70 oranında neden olan *embB* gen bölgesinin 306. kodonundaki mutasyonların saptanması amacıyla da bir prob tasarlanmıştır. Her suş için 3 tüp hazırlanıp, birinci tüpe *rpoB* primerleri ve problemleri, ikinci tüpe INH direncinden sorumlu mutasyonları saptayan *katG* ve *inhA* primer ve problemleri, üçüncü tüpe ise yalnız EMB direncinden sorumlu mutasyonların bulunduğu *embB* gen bölgesini kapsayan primer ve problemler konulmuştur. RİF direncini belirlemede MGIT ve “real-time PCR” testleri %100 uyum göstermişlerdir. Yine aynı şekilde INH direnci de her iki yöntemle %100 uyum içinde saptanmıştır. Ancak EMB direnci “real-time PCR” yöntemi ile tek bir suşta yanlış pozitif olarak saptanmıştır. Bu nedenle “real-time PCR” testimizin EMB direncini saptama özgülüğü %97’ye düşmüştür. Başka bir suşta ise EMB direnci “real-time PCR” yöntemi ile yanlış negatif olarak saptanmıştır. Bu nedenle “real-time PCR” testimizin EMB direncini saptamada duyarlılığı da %92’ye düşmüştür.

3. “Real-time PCR” yöntemiyle suşların elde edilen ortalama EST değerinin hangi mutasyona karşılık geldiğini saptayabilmek amacıyla, 16 suşa DNA dizi analizi uygulanmıştır. DNA dizi analizi sonuçlarına göre, *rpo P2* probuyla MTBK suşlarının *rpoB* 531. kodonda mutasyon taşıdığı tespit edilmiştir. Tek bir suşta ise *rpo P1* probu 11⁰C düşüş göstermiştir. Bu suşun DNA dizi analiziyle *rpoB* 515. kodonda düşük MİK değerli RİF direncinden sorumlu mutasyona neden olduğu belirlenmiştir. INH dirençli ve duyarlı olan suşların DNA dizi analizine bakıldığında, *katG* 315 geninde mutasyon taşıyanların “real-time PCR”da EST değerlerinin ortalama 43⁰C olduğu belirlenmiştir. *inhA-15*’te mutasyon taşıyanların EST değerlerinin ise 54⁰C olduğu belirlenmiştir. “Real-time PCR” yöntemiyle *embB* EST değeri ortalama 61⁰C olan suşların ATG306ATA mutasyonu, EST değeri ortalama 68⁰C olan suşların ATG306GTG mutasyonu, EST değeri 60⁰C olan suşların ATG306ATC mutasyonu taşıdığı DNA dizi analizi ile saptanmıştır. Suşların hangi mutasyonu taşıdıkları “real-time PCR” sonucunda elde edilen ortama EST değerleriyle kıyaslanılarak belirlenebilir. Ancak EMB direncinin belirlenmesinde “real-time PCR” yöntemiyle bir suşun yanlış pozitif, bir suşunda yanlış negatif sonuç verdiği DNA dizi analiziyle ve MGIT 960 sonucuyla belirlenmiştir. “real-time PCR”

testimizin RİF ve INH direncini belirlemede özgüllük ve duyarlılığı %100'dür. EMB direncini belirlemede özgüllük ve duyarlılığın da %100 olması için çalışmalar yapılması gerekmektedir.

4. Bu çalışmada yaygın olarak kullanılabilir, çok fazla gelişmiş teknik donanım gerektirmeyen, maliyeti düşük ve uygulaması kolay bir "real-time PCR" yöntemi uygulandı. Bu sayede TB hastalarının antitüberküloz ilaç duyarlılıkları birkaç saat içinde belirlenebilmektedir. Yöntemin daha da geliştirilmesiyle, tüm ilaçlara direnci belirleyen primer ve problemlerin tek bir tüpte bulunduğu multipleks uygulamalar yapılabilir.

5. Çalışmanın bir diğer kısmı, MGIT 960 sisteminde PZA duyarlılığının tam doğru olarak saptanabilmesidir. Bu amaçla 50 suşun PZA duyarlılığı MGIT 960 PZA kitiyle çalışılmıştır. Firmanın önerdiği standart PZA çalışma protokolüyle çalışıldığında (0,5 ml bakteri inokulumu ile), 50 suşun 41'i PZA dirençli çıkmıştır. Aynı suşların, yarı inokulum (0,25 ml) konularak PZA duyarlılığı yeniden çalışıldığında, bir önceki PZA testinde dirençli çıkan iki suş bu kez duyarlı çıkmıştır. Bu durumda MGIT 960'ın PZA duyarlılığında sonuçlar arası fark oranı %5 olarak saptanmıştır. MGIT 960 sisteminde PZA duyarlılığı inokulum miktarının yanı sıra testin manipülasyonda yapılan küçük modifikasyonlardan etkilenmektedir.

6. PZA duyarlılığı çalışırken vorteksleme işleminden sonra inokulumun önerildiği gibi 15 dk bekletmek yerine inokulumu, tek kullanımlık pipet ucuyla tüpün üst sıvı kısmından alıp PZA duyarlılığı çalışıldığında, PZA testi sorunsuz sonuç vermektedir. Böylece testin çalışılma süresi kısaltılabilmektedir.

7. MGIT 960 ile çalışılan PZA duyarlılığında majör hatalara neden olmamak için, önceden yapılmış çalışmalar ve bizim çalışmamız referans alındığında, bir suşa dirençli diyebilmek için, o suşun 0,5 ml ve 0,25 ml inokulumla dirençli çıkması gerektiği önerilebilir. Bunun yanında, imkanlar doğrultusunda konfirmasyon için *pncA* ve yeni olarak öne sürülen *rpsA* genleri mutasyon analizi yapılması, duyarlılık sonucunun doğruluğunu göstermek için uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Luo, T., Jiang, L., Sun, W., Fu, G., Mei, J., Gao, Q. (2011) Multiplex real-time PCR melting curve assay to detect drug-resistant mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 49 (9), 3132-3138.
2. Perez-Osorio, A.C., Boyle, D.S., Ingham, Z.K., Ostash, A., Gautom, R.K., Colombel, C. ve diğeri. (2012) Rapid identification of mycobacteria and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of a single multiplex PCR and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 50 (2), 326-336.
3. Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., Dye, C. (2003) Tuberculosis. *Lancet*, 362 (9387), 887-899.
4. World Health Organisation (2012) Global Tuberculosis Report, (WHO/HTM/TB/2012.6.).
5. Özkara, Ş., Aktaş, Z., Özkan, S., Ecevit, H. (2003). *Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı, Türkiye'de Tüberküloz Kontrolü İçin Başvuru Kitabı*. Ankara: Rekmay Ltd. Şti.
6. Zhou, L., Myers, A.N., Vandersteen, J.G., Wang, L., Wittwer, C.T. (2004) Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chemistry*, 50 (8), 1328-1335.
7. Bozkurt, H., Türkkani, M.H., Musaonbaşıoğlu, S., Yıldırım, A., Baykal, F. (2011) *T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Dairesi Başkanlığı, Türkiye'de Verem Savaşı 2011 Raporu*.
8. Dye, C., Watt, C.J., Bleed, D.M., Hosseini, S.M., Raviglione, M.C. (2005) Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA*, 293 (22), 2767-2775.
9. Kıyan, M. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş Kitabevi.
10. Andrews, J.R., Gandhi, N.R., Moodley, P., Shah, N.S., Bohlken, L., Moll, A.P. ve diğeri. (2008) Exogenous reinfection as a cause of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in rural South Africa. *J Infect Diseases*, 198 (11), 1582-1589.

11. Li, X., Zhang, Y., Shen, X., Shen, G., Gui, X., Sun, B. ve diğerleri. (2007) Transmission of drug-resistant tuberculosis among treated patients in Shanghai, China. *J Infect Diseases*, 195 (6), 864-869.
12. Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T. ve diğerleri. (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263 (5144), 227-230.
13. Slayden, R.A., Barry III, C.E. (2000) The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infect*, 2 (6), 659-669.
14. Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. ve diğerleri. (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 341 (8846), 647-651.
15. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., Cole, S. (1992) The catalase—peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358, 591-593.
16. Luo, T., Zhao, M., Li, X., Xu, P., Gui, X., Pickerill, S. ve diğerleri. (2010) Selection of mutations to detect multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (3), 1075-1081.
17. Palomino, J.C. (2009) Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiol*, 56 (2), 103-111.
18. El-Hajj, H.H., Marras, S.A., Tyagi, S., Kramer, F.R., Alland, D. (2001) Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a Single Tube with Molecular Beacons. *J Clin Microbiol*, 39 (11), 4131-4137.
19. Espy, M., Uhl, J., Sloan, L., Buckwalter, S., Jones, M., Vetter, E. ve diğerleri. (2006) “real-time PCR” in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Reviews*, 19 (1), 165-256.
20. de Viedma, D.G., Infantes, M.d.S.D., Lasala, F., Chaves, F., Alcalá, L., Bouza, E. (2002) New real-time PCR able to detect in a single tube

- multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 40 (3), 988-995.
21. Boehme, C.C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M.P., Shenai, S., Krapp, F. ve diğeri. (2010) Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *New England J Med*, 363 (11), 1005-1015.
 22. Lin, S.-Y.G., Probert, W., Lo, M., Desmond, E. (2004) Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. *J Clin Microbiol* 42 (9), 4204-4208.
 23. Wada, T., Maeda, S., Tamaru, A., Imai, S., Hase, A., Kobayashi, K. (2004) Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by “real-time PCR”. *J Clin Microbiol* 42 (11), 5277-5285.
 24. Espasa, M., González-Martín, J., Alcaide, F., Aragón, L.M., Lonca, J., Manterola, J.M. ve diğeri. (2005) Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *J Antimicrob Chemother*, 55 (6), 860-865.
 25. Yesilkaya, H., Meacci, F., Niemann, S., Hillemann, D., Rüsç-Gerdes, S., Barer, M.R. ve diğeri. (2006) Evaluation of molecular-Beacon, TaqMan, and fluorescence resonance energy transfer probes for detection of antibiotic resistance-conferring single nucleotide polymorphisms in mixed *Mycobacterium tuberculosis* DNA extracts. *J Clin Microbiol* 44 (10), 3826-3829.
 26. Chen, X., Kong, F., Wang, Q., Li, C., Zhang, J., Gilbert, G.L. (2011) Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* 49 (10), 3450-3457.
 27. Kocagoz, T., Saribas, Z., Alp, A. (2005) Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by “real-time PCR”. *J Clin Microbiol* 43 (12), 6015-6019.
 28. Choi, G.E., Lee, S.M., Yi, J., Hwang, S.H., Kim, H.H., Lee, E.Y. ve diğeri. (2010) High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin

- and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 48 (11), 3893-3898.
29. Pietzka, A.T., Indra, A., Stöger, A., Zeinzinger, J., Konrad, M., Hasenberger, P. ve diğerleri. (2009) Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by rpoB gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *J Antimicrob Chemother*, 63 (6), 1121-1127.
 30. Ramirez, M.V., Cowart, K.C., Campbell, P.J., Morlock, G.P., Sikes, D., Winchell, J.M. ve diğerleri. (2010) Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of “real-time PCR” and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 48 (11), 4003-4009.
 31. Chakravorty, S., Aladegbami, B., Burday, M., Levi, M., Marras, S.A., Shah, D. ve diğerleri. (2010) Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique. *J Clin Microbiol* 48 (1), 258-267.
 32. El Housni, H., Heimann, P., Parma, J., Vassart, G. (2003) Single-nucleotide polymorphism genotyping by melting analysis of dual-labeled probes: examples using factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations. *Clin Chemistry*, 49 (10), 1669-1672.
 33. Chakravorty, S., Aladegbami, B., Thoms, K., Lee, J.S., Lee, E.G., Rajan, V. ve diğerleri. (2011) Rapid detection of fluoroquinolone-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of sloppy molecular beacons and dual melting-temperature codes in a “real-time PCR” assay. *J Clin Microbiol* 49 (3), 932-940.
 34. Huang, Q., Liu, Z., Liao, Y., Chen, X., Zhang, Y., Li, Q. (2011) Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PloS one*, 6 (4), e19206.
 35. CLSI (2011). *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes approved standard CLSI document M24-A2 (2nd ed.)*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
 36. Dormandy, T. (1999) *The White Death: A History of Tuberculosis*. London: Hambledon Press.

37. Daniel, T.M. (1997) *Captain of Death: The story of tuberculosis*. Rochester, N.Y.: University of Rochester Press.
38. René Jules Dubos, J.D. (1952) *The White Plague: Tuberculosis, Man, and Society*: Rutgers University Press.
39. Hagard, A. (1989) *The doctor in History*. New York: Dorset Press.
40. Nikiforuk, A. (2001) *Mahşerin Dördüncü Atlısı*. İstanbul: İletişim Yayınları.
41. Ocepek, M., Pate, M., Žolnir-Dovč, M., Poljak, M. (2005) Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J Clin Microbiol*, 43 (7), 3555-3557.
42. Romero, B., Rodríguez, S., Bezos, J., Díaz, R., Copano, M.F., Merediz, I. ve diğerleri. (2011) Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerging Infect Diseases*, 17 (12), 2393.
43. Laennec, R.T.H.,Boyle, I. (1819). De l'auscultation mediate (On mediate auscultation). *Recherchez sur la phythisic pulmonaire* (1 bs.). Paris
44. Bloom, B.R. (1994). *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*: American Society for Microbiology.
45. da Silva, P.A.,Ainsa, J.A. (2007) Drugs and drug interactions. *Tuberculosis*, 593-633.
46. Barış, Y.İ. (2003) Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu: Samsun.
47. Barış, Y.İ. (2002). *Osmanlı padişahlarının yaşamlarından kesitler, hastalıkları ve ölüm sebepleri*: Bilimsel Tıp Yayınevi.
48. Unat, E.K. (1879) Osmanlı İmparatorluğu'nun son 40 yılında Türkiye'nin Tüberküloz Tarihçesi. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg*, 10, 273-284.
49. Yenel, F. (1981) Türkiye'de son yüzyılda akciğer tüberkülozu tedavisinde aşamalar. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg*, 12, 266-270.
50. Hart, C., Beeching, N.,Duerden, B. (1996) Tuberculosis into the next century. *J Med Microbiol*, 44 (1), 1-34.
51. McKinney, J.D. (2000) In vivo veritas: the search for TB drug targets goes live. *Nature Med*, 6 (12), 1330-1333.

52. Gillespie, S.H. (2002) Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. *Antimicrob agents Chemother*, 46 (2), 267-274.
53. World Health Organisation (2012) WHO policy on collaborative TB/HIV activities: guidelines for national: programmes and other stakeholders. (WHO/HTM/TB/2012.1), Geneva.
54. Pfyffer, G.E., Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., Pfaller, M. (2006) Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. *Manual Clin Microbiol*, 1: (Ed. 9), 543-572.
55. Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K. ve diğeri. (2002) A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (6), 3684-3689.
56. Özkuyumcu, C., Us, D., Sancak, B., Alp, A., Sarıbaşı, Z., Çakar, A. (2009). Mycobacterium. C. Özkuyumcu (Ed.). Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1, *Klinik Bakteriyoloji El Kitabı* : Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri.
57. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (2002) *Tıbbi Mikrobiyoloji*. M. A. Küçükler, E. Tümbay, Ö. Anđ, Z. Erturan (Çev.), (9. bs.) s. 256-263: Nobel Tıp Kitabevleri.
58. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2002) *Medical Microbiology*: Mosby, American Society for Microbiology.
59. Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. ve diğeri. (2006) *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 6th ed. Molecular microbiology, s. 132-165. Mycobacteria, s. 1065-1124. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
60. Köksal, F., Yaman, A. (2003) Farklı Bir Bakteri Topluluğı Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı. 21. Yüz yılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu (s. 35-42): Samsun.
61. Bilgehan, H. (2000). *Özel bakteriyoloji ve bakteri infeksiyonları*. Klinik Mikrobiyoloji (10 bs.): Barış Yayınları.

62. *Topley Wilson's principles of Bacteriology, Virology and Immunity* (1990), (c. 2).
63. Hett, E.C.,Rubin, E.J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Molec Biol Rev*, 72 (1), 126-156.
64. Brennan, P.J.,Nikaido, H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annual Rev of Biochemistry*, 64 (1), 29-63.
65. Kocabaş, A. (1996). Akciğer Tüberkülozu. G. İliçin, S. Ünal, K. Biberoğlu & S. Akalın (Ed.). *Temel İç Hastalıkları* (s. 456–476): Güneş Kitabevi.
66. Zahra, T., Jerrold, J., Elnerin, R.,Gerold, L. (1995) *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. Principles and Practice of Infectious Disease (s. 2229). Churchill- Livingstone.
67. Status paper on prisons and tuberculosis (2007) Copenhagen.
68. Özkara, Ş.,Kılıçaslan, Z. (2010) *Tüberküloz* (c. 11): Toraks Kitapları, Türk Toraks Derneği.
69. Zeytinli, Ü.O., Köksal, F. (2012) Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotiplendirme ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 46 (2), 202-210.
70. Esen, N. (2005). *Tüberkülozda mikobakteriyel persistans mekanizmaları*. Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Malatya
71. Cole, S.T., Eisenach, K.D., McMurray, D.N.,Jacobs Jr, W. (2005). *Tuberculosis and the tubercle bacillus*: ASM Press.
72. Jose, A.,Luna, A.C. (2003). *Tuberculosis Guide for Specialist Physicians* (C. 158). 68 boulevard Saint Michel, 75006 Paris-France.
73. Öztürk, R. (2003) Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu: Samsun.
74. Ottenhoff, T.H.,Kaufmann, S.H. (2012) Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *Plos Pathogens*, 8 (5), e1002607.
75. Churchyard, G.J., Scano, F., Grant, A.D., Chaisson, R.E. (2007) Tuberculosis preventive therapy in the era of HIV infection: overview and research priorities. *J Infect Diseases*, 196, S52-S62.

76. Siddiqi, K., Lambert, M.-L., Walley, J. (2003) Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Diseases*, 3 (5), 288.
77. Getahun, H., Harrington, M., O'Brien, R., Nunn, P. (2007) Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet*, 369 (9578), 2042-2049.
78. El-Sadr, W.M., Tsiouris, S.J. (2008). HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges. *Seminars in respiratory and critical care medicine*.
79. Wang, L., Turner, M., Elwood, R., Schulzer, M., FitzGerald, J. (2002) A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax*, 57 (9), 804-809.
80. Alp, A. (2011) Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. *Hacet Tıp Derg* (42), 28-33.
81. Chakravorty, S., Dudeja, M., Hanif, M., Tyagi, J.S. (2005) Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 43 (6), 2703-2708.
82. Chakravorty, S., Sen, M.K., Tyagi, J.S. (2005) Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol* 43 (9), 4357-4362.
83. Padilla, E., Manterola, J.M., González, V., Thornton, C.G., Quesada, M.D., Sánchez, M.D. ve diğerleri. (2005) Comparison of the sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using independent specimens with auramine smear, the MB/BacT liquid culture system, and the Cobas Amplicor MTB test. *J Clin Microbiol* 43 (12), 6091-6097.
84. Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., Bailey, W.R. (2007). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*: Elsevier Mosby.
85. Saxena, S., Mathur, M., Talwar, V. (2001) Detection of tubercle bacilli in sputum: application of sodium hypochlorite concentration method. *The J Commun Diseases*, 33 (4), 241.

86. Pai, M., Zwerling, A., Menzies, D. (2008) Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Annals of Int Med*, 149 (3), 177-184.
87. Trebucq, A. (2004) Revisiting sputum smear microscopy Editorial. *The Internat J Tubercul and Lung Disease*, 8 (7), 805-805.
88. Van Deun, A., Maug, A.K., Cooreman, E., Hossain, M., Chambuganj, N., Rema, V. ve diğ erleri. (2000) Bleach sedimentation method for increased sensitivity of sputum smear microscopy: does it work? *The Internat J Tubercul and Lung Disease*, 4 (4), 371-376.
89. Perkins, M.D. (2000) New diagnostic tools for tuberculosis The Eddie OBrien Lecture. *The Internat J Tubercul and Lung Disease*, 4 (12s2), 182-188.
90. Nolte, F.S., Metchock, B. (1995). Mycobacterium. R. R. Murray (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology* (s.400-437). Washington: American Society for Microbiology Press.
91. Siddiqi, S. (1996) Procedure for primary isolation of mycobacteria from clinical specimens. *BACTEC TB system product and procedure manual* Becton Dickinson, Maryland, Revision E. pp II.
92. Koneman, E.W., Winn, W., Allen, S., Janda, W., al., e. (2005). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia Lippincott Williams Wilkins.
93. Esteban, J., Jimenez-Arriero, M., Soriano, F. (1996) Observation of microcolonies on Middlebrook 7H11 medium for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and the Mycobacterium avium complex in clinical samples. *Clin Microbiol and Infect*, 2 (3), 232.
94. Kocagöz, T. (2007) Etkin tüberküloz tanısı için nerede, ne zaman, hangi inceleme? *Ankem Derg*, 21(Ek 2), 261-265.
95. Albay, A., Yıldırım, Ş.T., Alp, A., Aydoğan, H., Şahin, M., Haznedaroğlu, T. (2001) Klinik örneklerden Mycobacterium tuberculosis saptanmasında Bactec radyometrik yöntemi, polimeraz zincir reaksiyonu ve çoğ altılmış *Mycobacterium tuberculosis* direkt testinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül t*, 2, 257-265.

96. Alp, A.,Hasçelik, G. (2002) Klinik örneklerde mikobakterilerin saptanmasında BBL mikobakteri üreme indikatör tüp (MGIT) yöntemi, BACTEC radyometrik sistemi ve Lowenstein-Jensen besiyerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*, 36, 229-235.
97. Siddiqi, S. (1996) BACTEC 460 TB System. *Product and Procedure Manual*. Becton Dickinson and Company Maryland, USA.
98. Siddiqi, S. (1989) Bactec TB system. *Product and Procedure Manual*.
99. Kocagöz, T. (2013) Mikrobiyolojik Tanıda Klasik Yöntemlerde Yeni Yaklaşımlar. *Ankem Dergisi*, 27(Ek 2), 150-153.
100. Chan, D.S.G., Choy, M.Y., Wang, S.,Sng, L.-H. (2008) An evaluation of the recovery of mycobacteria from urine specimens using the automated Mycobacteria Growth Indicator Tube system (BACTEC MGIT 960). *J Med Microbiol*, 57 (10), 1220-1222.
101. Kocagöz, T., Altın, S., Türkyılmaz, Ö., Taş, İ., Karaduman, P., Bolaban, D. ve diğerleri. (2012) Efficiency of the TK culture system in the diagnosis of tuberculosis. *Diagnos Microbiol and Infect disease*, 72 (4), 350-357.
102. Crump, J.A., Tanner, D.C., Mirrett, S., McKnight, C.M.,Reller, L.B. (2003) Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. *J Clin Microbiol* 41 (5), 1987-1990.
103. Parrish, N., Dionne, K., Sweeney, A., Hedgepeth, A.,Carroll, K. (2009) Differences in time to detection and recovery of Mycobacterium spp. between the MGIT 960 and the BacT/ALERT MB Automated Culture Systems. *Diagnos Microbiol and Infect Disease*, 63 (3), 342-345.
104. Erturan, Z. (2010). *Tüberkülozda diğer hızlı tanı testleri*. Ş. Özkara & Z. Kılıçaslan (Ed.). *Tüberküloz* (s. 134-148). İstanbul: Türk Toraks Derneği, Aves Yayıncılık.
105. Menzies, D., Pai, M.,Comstock, G. (2007) Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Annals of Inter Med*, 146 (5), 340-354.
106. Alp, A. (2006) Tüberküloz Tanısı. *Katkı*, 28, 436-448.

107. Durmaz, R. (2001). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*: Nobel Tıp Kitapevleri.
108. Alp, A., Pınar, A., Eser, Ö., Sarıbaş, Z., Ergunay, K. (2012). “real-time PCR” Kursu. Ankara: Ankara Mikrobiyoloji Derneği.
109. Reischl, U., Wittwer, C. (2002). *Rapid Cycle “real-time PCR” Methods and Applications, Microbiology and Food Analysis*. Almanya: Springer.
110. Sönmez, Ö. (2011) Tüberküloz Tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Pulm Med Special Topics*, 4 (2), 46.
111. Iseman, M.D. (2002) *Klinisyenler için tüberküloz kılavuzu*. Çeviren: Ş. Özkara. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (s 291).
112. World Health Organization (1994) Framework for effective TB control: WHO tuberculosis programme. Geneva: WHO, WHO/TB/94.179.
113. Özkara, Ş., Arpaz, S., Özkan, S., Aktaş, Z., Örsel, O., Ecevit, H. (2003) Tüberküloz tedavisinde doğrudan gözetimli tedavi (DGT). *Solunum Hastalıkları*, 14, 150-157.
114. World Health Organization (2005). Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Third Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002.
115. Saniç, A. (2004) Tüberküloz direnç mekanizmaları. 5.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu: İzmir.
116. Durmaz, R. (2005) *Mycobacterium tuberculosis*’ de direnç sorunu. *Ankem Derg*, 19 (2), 107-110.
117. World Health Organization (2008). Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Third Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007.
118. Kurtaran, B., Aysan Akçam, E. (2009) Tüberküloz Tedavisinde Direnç Sorunu: Tanılar ve Öneriler. *Med Rev J*, 18(1): 37-48.
119. Otkun, M. (2001) Tüberküloz tedavisinde Temel ilkeler ve direnç sorunu. *Klinik Derg*, 14 (2), 71-82.
120. Jassal, M., Bishai, W.R. (2009) Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Diseases*, 9 (1), 19-30.

121. O'Brien, R.J., Nunn, P.P. (2001) The need for new drugs against tuberculosis: Obstacles, opportunities, and next steps. *American J Resp and Critical Care Med*, 163 (5), 1055-1058.
122. Wallace, R. (2000). Antimycobacterial agents. G. Mandell, J. E. Bennett & R. Dolin (Ed.). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (s. 436-448). Philadelphia: Churchill Livingstone.
123. Ramaswamy, S., Musser, J. (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*, 79 (1), 3-29.
124. Çilli, A. (2003) Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu kitabı, 163-172.
125. Quémard, A., Lanéelle, G., Lacave, C. (1992) Mycolic acid synthesis: a target for ethionamide in mycobacteria? *Antimicrob Agents and Chemother*, 36 (6), 1316-1321.
126. Mokrousov, I., Narvskaya, O., Limeschenko, E., Otten, T., Vyshnevskiy, B. (2002) Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations. *J Clin Microbiol* 40 (5), 1617-1620.
127. Scarparo, C., Ricordi, P., Ruggiero, G., Piccoli, P. (2004) Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *J Clin Microbiol* 42 (3), 1109-1114.
128. Beckton Dickinson (2010) BACTEC MGIT 960 SIRE Kiti Kullanım Prosedürü.
129. Bergval, I., Vijzelaar, R., Dalla Costa, E., Schuitema, A., Oskam, L., Kritski, A. ve diğerleri. (2008) Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46 (2), 689-699.
130. Mokrousov, I., Otten, T., Filipenko, M., Vyazovaya, A., Chrapov, E., Limeschenko, E. ve diğerleri. (2002) Detection of isoniazid-resistant

- Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation. *J Clin Microbiol* 40 (7), 2509-2512.
131. Yang, Z., Durmaz, R., Yang, D., Gunal, S., Zhang, L., Foxman, B. ve diğ erleri. (2005) Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53 (3), 201-208.
 132. Cho, S.-N. (2007) Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei Med J*, 48 (3), 347-359.
 133. Durmaz, R. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* Suş larında Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemler/Son Geliş meler. *Ankem Derg*, 24(Ek 2), 64-70.
 134. Drobniewski, F., Rüş ch-Gerdes, S., Hoffner, S. (2007) Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E. DEF 8.1)– Report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol and Infect*, 13 (12), 1144-1156.
 135. Saribaş , Z., Kocagöz , T., Alp, A., Gü nalp, A. (2003) Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis and determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. *J Clin Microbiol* 41 (2), 816-818.
 136. Blakemore, R., Story, E., Helb, D., Kop, J., Banada, P., Owens, M.R. ve diğ erleri. (2010) Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol* 48 (7), 2495-2501.
 137. Rie, A.V., Page-Shipp, L., Scott, L., Sanne, I., Stevens, W. (2010) Xpert® MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev of Molec Diagnost*, 10 (7), 937-946.
 138. Zeka, A.N., Tasbakan, S., Cavusoglu, C. (2011) Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin

- resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 49 (12), 4138-4141.
139. Aktas, E., Durmaz, R., Yang, D., Yang, Z. (2005) Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey. *Microbial drug resistance*, 11 (2), 94-99.
140. Piersimoni, C., Mustazzolu, A., Giannoni, F., Bornigia, S., Gherardi, G., Fattorini, L. (2013) Prevention of false resistance results obtained in testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 system using a reduced inoculum. *J Clin Microbiol*, 51 (1), 291-294.
141. Meyers, R.A. (1995). *Molecular Biology and Biotechnology*. A.B.D.: VCH.
142. Türkyılmaz, S., Esenal, Ö.M. (2002) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8 (1), 71-76.
143. World Health Organization, (2010) WHO global tuberculosis control report 2010. Summary. *Cent Eur J Publ Health*, 18 (4), 237.
144. Mokrousov, I., Otten, T., Vyshnevskiy, B., Narvskaya, O. (2003) Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. *Antimicrob Agents and Chemother*, 47 (7), 2231-2235.
145. Greco, S., Girardi, E., Navarra, A., Saltini, C. (2006) Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 61 (9), 783-790.
146. Somoskovi, A., Parsons, L.M., Salfinger, M. (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*, 2 (3), 164-168.
147. Saribas, Z., Yurdakul, P., Alp, A., Gunalp, A. (2005) Use of fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *The Internat J Tubercul and Lung Disease*, 9 (2), 181-187.
148. Yew, W.W., Lange, C., Leung, C.C. (2011) Treatment of tuberculosis: update 2010. *European Resp J*, 37 (2), 441-462.

149. Zhang, Y., Mitchison, D. (2003) The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The Internat J Tubercul and Lung Disease*, 7 (1), 6-21.
150. Piersimoni, C., Mustazzolu, A., Giannoni, F., Bornigia, S., Gherardi, G., Fattorini, L. (2013) Prevention of False Resistance Results Obtained in Testing the Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 System Using a Reduced Inoculum. *J Clin Microbiol* 51 (1), 291-294.
151. Davies, A., Billington, O., McHugh, T., Mitchison, D., Gillespie, S. (2000) Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 38 (10), 3686-3688.
152. Cheng, S.-J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L., Zhang, Y. (2000) *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents and Chemother*, 44 (3), 528-532.
153. Hirano, K., Takahashi, M., Kazumi, Y., Fukasawa, Y., Abe, C. (1998) Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*, 78 (2), 117-122.
154. Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M. ve diğ erleri. (1997) Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (3), 540-543.
155. Heifets, L. (2002) Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of medical microbiology*, 51 (1), 11.
156. Salfinger, M., Heifets, L.B. (1988) Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32 (7), 1002-1004.
157. Butler, W., Kilburn, J. (1982) Improved method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 16 (6), 1106-1109.
158. Chedore, P., Bertucci, L., Wolfe, J., Sharma, M., Jamieson, F. (2010) Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec

- MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 48 (1), 300-301.
159. Pandey, S., Newton, S., Upton, A., Roberts, S., Drinkovic, D. (2009) Characterisation of *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in New Zealand. *Pathology*, 41 (6), 582-584.
 160. Simons, S.O., van Ingen, J., van der Laan, T., Mulder, A., Dekhuijzen, P.R., Boeree, M.J. ve diğerleri. (2012) Validation of *pncA* gene sequencing in combination with the mycobacterial growth indicator tube method to test susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 50 (2), 428-434.
 161. Zhang, Y., Permar, S., Sun, Z. (2002) Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of medical microbiology*, 51 (1), 42-49.
 162. Werngren, J., Sturegård, E., Juréen, P., Ängeby, K., Hoffner, S., Schön, T. (2012) Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing. *Antimicrob Agents and Chemother*, 56 (3), 1253-1257.
 163. Miller, M.A., Thibert, L., Desjardins, F., Siddiqi, S.H., Dascal, A. (1995) Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay. *J Clin Microbiol* 33 (9), 2468-2470.
 164. Chang, K.C., Yew, W.W., Zhang, Y. (2011) Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents and Chemother*, 55 (10), 4499-4505.
 165. Sekiguchi, J.-I., Nakamura, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kirikae, F., Kobayashi, I., Augustynowicz-Kopeć, E. ve diğerleri. (2007) Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 45 (9), 2802-2807.
 166. Huang, T.-S., Lee, S.S.-J., Tu, H.-Z., Huang, W.-K., Chen, Y.-S., Huang, C.-K. ve diğerleri. (2003) Correlation between pyrazinamide activity and *pncA*

mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Antimicrob Agents and Chemother*, 47 (11), 3672-3673.

167. Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J.S., Barry, C.E. ve diğeri. (2011) Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333 (6049), 1630-1632.
168. Beckton Dickinson (2009) MGIT Pirazinamid Kiti Çalışma Prosedürü.

Sayı : B.30.2.HAC.0.20.05.04/ 492

05 Haziran 2012

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 11 MAYIS 2012 CUMA
Toplantı No : 2012/04
Proje No : FON 12/18 (Değerlendirme Tarihi 11.05.2012)
Karar No : FON 12/18 - 35

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Alpaslan ALP'in sorumlu araştırmacısı olduğu, Biyolog Fatma Nur AKDOĞAN ile birlikte çalışacakları FON 12/18 kayıt numaralı ve "Mycobacterium Tuberculosis Klinik İzolatlarında İlaç Direncinin Multipleks "Real-Time PCR" Yöntemiyle Saptanması" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|--|--|
| 1.Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) KATILMADI |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye) | 10. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 3. Prof. Dr. Hakan S. Örer (Üye) | 11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Doç. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sokmensüer (Üye) | 13 Doç. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Meral Aksoy (Üye) | 14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) KATILMADI | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |