

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA
DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

**Mediha Begüm KAYAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA-2007

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA
DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

**Mediha Begüm KAYAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

Bu çalışma Ç.Ü Rektörlüğü Araştırma Fonu TF.2005.YL1 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

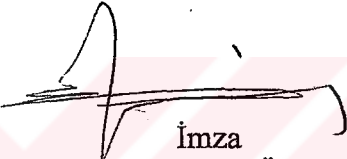
ADANA-2007

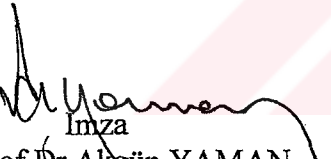
KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan **Mycobacterium tuberculosis** suşlarında direncin moleküler yöntemlerle tespiti adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 12/01/2007


İmza
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı


İmza
Prof. Dr. Akgün YAMAN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Raportör


İmza
Doç. Dr. Görül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 18.01.07. tarih ve 2.118.6 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitim s¼rem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen her zaman, hoŐg¼r¼l¼ davranan, her konuda rahatlıkla ulaŐıp danıŐtıđım, b¼y¼k desteklerini g¼rd¼đ¼m ve engin tecr¼belerinden faydalandığım danıŐman hocam, SAYIN Prof. Dr. Fatih K¼KSAL'a, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen b¼l¼m sekreterimiz SAYIN Suna G¼KMEN'e ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ki diğer t¼m hocalarıma, çalışma arkadaŐlarıma ve b¼l¼m personeline en içten teŐekk¼rlerimi sunarım.

M.Beg¼m KAYAR

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO.

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELEr VE KISALTMALAR	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Dünyada Tüberküloz	4
2.3. Türkiyede Tüberküloz	5
2.4. Tedavi ve Direnç	6
2.5. Duyarlılık Testleri	16
2.5.1. Kültür Bazlı Testler	16
2.5.1.1. Klasik Kültür Testler	16
2.5.1.2. Hızlı Kültüre Dayalı Duyarlılık Testleri	18
2.5.2. Bakteriyofaja Dayalı Duyarlılık Testleri	20
2.5.2.1. Lusiferaz Genli Bakteriyofaj Metodu	20
2.5.2.2. Faj Çoğaltma Metodu	20
2.5.3. Flow Sitometri	20
2.5.4. Moleküler Direnç Testleri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. <i>M. tuberculosis</i> suşları	25

3.2. Fenotipik yöntemlerle duyarlılık tespiti	25
3.3. Moleküler çalışmalar	25
3.3.1. DNA ekstraksiyonu	26
3.1.2. <i>rpoB</i> mutasyonlarının dizi analizi ile tespiti	27
4. BULGULAR	28
4.1 Duyarlılık testleri	28
4.2 Mutasyon analizleri	29
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	35
8. ÖZGEÇMİŞ	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA NO

Grafik 1. rpoB genindeki mutasyonların yerleşimi

30



TABLolar DİZİNİ

	<u>SAYFA NO</u>
TABLO I. Kullanılan primerlerin baz dizileri	27
TABLO II. <i>M. tuberculosis</i> suşunun duyarlılık profilleri	28
TABLO III. Aminoasit dizilimleri	31



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	Mikro litre
A	Adenin
AIDS	Accuried Immunodeficiency Syndrome
Asp	Asparjin
Arg	Arjinin
Bç	Baz Çiftlik
C	Sitozin
ÇİD-TB	Çoklu ilaç dirençli TB
DNA	Deoksi ribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DGTS	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisidir
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing
EMB	Ethambutol
G	Guanin
Gln	Glisin
His	Histidin
HIV	Human Deficiency Virus
IUATLD	International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
INH	İzoniazid
Leu	Lösin
MGH	Milenyum Gelişme Hedefleri
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri
PAS	Paraamino Salisilik Asit

PZA	Pirazinamid
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pro	Prolin
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RE	Restriksiyon Enzimleri
RIF	Rifampisin
Ser	Serin
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
STR	Streptomisin
T	Timin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
TB	Tüberküloz
Val	Valin
YOYÜ	Yüksek Olgu Yüğü olan Ülkeler
WHO/IUATLD	Antitüberküloz İlaç Direnci Sürveyansı Global Projesi

ÖZET

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA DİRENCİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESPİTİ

Rifampin (RIF) yüksek bakterisit etkisi ile tüberküloz tedavisinde kullanılan “primer antitüberküloz” ilaçların en önemlisidir. *Mycobacterium tuberculosis*'e yüksek bakterisit etkisi rifampini tüberküloz tedavisinin anahtar bileşeni haline getirmiştir. Rifampin (RIF) direnci tüberküloz tedavi ve kontrolü için ciddi ve önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Rifampin dirençli vakaların doğru tedavisi ve hızlı tanısı ile ilaca dirençli tüberkülozun kontrolü sağlanabilir. Yeni moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı ile klinik örneklerden izole edilen RIF dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının genetik karakterizasyonu, çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* epidemiyolojisi ile tedaviye cevap alınamayan tüberküloz olgularının kontrolü için faydalı bilgiler sağlayabilir. Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde fenotipik yöntemlerle RIF direnci tespit edilen 25 klinik izolatta dirence sebep olan mutasyonların sıklığı araştırıldı. Mutasyonların tayini için dizi analiz yöntemi kullanıldı. Bu amaçla RIF direnci göstergesi olarak bilinen 81 bp'lik bölgeyi de içeren RNA polimerazın β -alt ünitesini kodlayan gen olan *rpoB* geninin 250 bp'lik merkezi bölgesinin dizi analizi yapıldı. Bulgularımız şimdiye kadar yapılan çalışmaların bulgularını destekler niteliktedir.

Anahtar kelimeler:DNA dizi analizi, İlaç direnci, Rifampin, Moleküler yöntemler, *Mycobacterium tuberculosis*.

SUMMARY

DETECTION OF THE RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* WITH PCR

Rifampicin with its high bactericidal activity is one of the most important drug of choice in the primary treatment of tuberculosis. Its high bactericidal effect against *Mycobacterium tuberculosis* renders rifampicine the key component in the treatment regimens. Resistance to rifampicin (RIF) cause a serious and significant treat in order to tuberculosis control. Control of rifampicin resistant tuberculosis relies proper treatment of drug resistant cases and rapid diagnosis. Molecular characterization RIF-resistant *M. tuberculosis* clinical strains of different origins can generate information useful for developing rapid molecular diagnostic methods that are widely applicable. In this study, we investigated 25 RIF resistant clinical isolates collected from South Turkey by using automatic DNA sequencing. Consequently, we sequenced a 250-bp central region of the RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) that covers the 81-bp-core region known to be the marker for RIF resistance. Our results are in concordance with literature data.

Keywords: Drug resistance, DNA sequencing, Rifampicin, Molecular methods, *Mycobacterium tuberculosis*.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Rifampin (RIF) yüksek bakterisit etkisi ile tüberküloz tedavisinde kullanılan "primer antitüberküloz" ajanların en önemlilerinden birisidir. *M.tuberculosis* üzerindeki yüksek bakterisidal etkisi rifampini tüberküloz tedavisinin anahtar bileşeni haline getirmiştir¹. RIF; RNA polimerazın β alt ünitesine bağlanarak transkripsiyonun başlamasını inhibe eder. Epidemiyolojik ilişkisiz RIF dirençli izolatların % 96'sı, RNA polimerazın β alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 81 baz çiftlik (bç) kor bölgesinde mutasyona sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Kor bölgesi 27 aminoasidi kodlar ve 507. ve 533. kodonlar arasındadır. Aminoasit farklılığı ile sonuçlanan mutasyonlar en sık 531. , 526. ve 516. kodonlarda olur^{2,3,4,5}.

Mutasyonların görülme sıklığında coğrafik değişiklikler büyük rol oynar^{6,7,8,9}. Bu yüzden dünyanın farklı bölgelerindeki tüberküloz insidansı ve direnç prevalansının yüksek olduğu bölgelerden izole edilen dirençli izolatlardaki mutasyonların lokalizasyonları ile ilgili bilgiler, yeni ilaçların bulunmasında ve direnç tespitinde hızlı ve duyarlı metodların geliştirilmesinde yol gösterici ve yardımcı olacaktır^{2,6,9}.

Son yıllarda Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri (NAAT) mikrobiyolojinin diğer alanlarında olduğu gibi tüberküloz tanısında da son derece yaygın ve etkili kullanım alanı bulmuştur^{7,8}. Bir taraftan klinik örneklerden *M.tuberculosis*'e ait IS6110, 23S rRNA gibi spesifik gen dizilerinin varlığını birkaç saat içerisinde göstererek tanıda hem zaman hem de duyarlılık yönünde önemli avantajlar kazandıran NAAT bazlı moleküler teknikler, diğer taraftan da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), DNA dizi analizi, dideoksi-fingerprinting, heterodupleks analiz, restriction fragment length polymorphism (RFLP), single-strand conformation polymorphism (SSCP), line probe assay, DNA microarray ve alele özgü prob hibridizasyon yöntemleri direncin moleküler

analizinde yoğun olarak kullanılmıştır^{9,10}. Mutasyonların görüldüğü gen bölgelerinin PZR amplifikasyonu sonrasında ya spesifik restriksiyon enzimleri (RE) ile kesilerek fragment uzunluklarına göre değerlendirilmesi veya amplifiye edilmiş hedef bölgelerin dizi analizi yapılması, mutasyonların tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁸.

Ülkemizde tüberküloz insidansı 1997–2003 yılları arasında 100 000 kişide 40–26 vaka aralığında seyretmiştir¹¹ ve anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranı da önemli derecede yüksektir^{12,13,14,15,16}. Bu nedenle mutasyonların ve dirençli vakaların tespiti büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı; Adana bölgesinde görülen tüberküloz vakalarından izole edilen RIF dirençli *M. tuberculosis* izolatlarındaki, *rpoB* direncinin en sık rastlanan mutasyonları hedef alan DNA dizi analizi ile tespitine dayanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Çok eski zamanlardan beri insanları etkileyen hastalıkların pek az bir kısmı, tüberküloz kadar korku ve acı yaratmıştır. Tüberkülozun bu denli eski bir hastalık oluşu Bankoff'u; "Tanrı 6. günde insanları yaratırken herhalde tüberküloz basilinin bolca bulunduğu Asya çamurunu kullanmış olsa gerek" diye düşünmesine neden olmuştur¹⁷.

Muhtemelen ilk insanla birlikte var olduğu iddia edilen *M.tuberculosis*'in Afrika boynuzundan ilk insan göçleri ile birlikte Asya'ya oradan da Avrupa ve daha sonrada Yeni Dünya'ya yayılmıştır. Bir teoriye göre insanoğlunun toplayıcılık ve avcılık yaptığı, yerleşik hayat yaşamadığı paleolitik dönemde, tüberküloz (TB) sporadik olarak görülmekteydi¹⁸. Milattan önce yaklaşık 8000 yıllarında ilkel tarım tekniklerini ve hayvanları evcilleştirmeyi öğrenen insanoğlu yerleşik hayata geçti. İnsanın büyük baş memeli hayvanlar ve onların ataları ile ilişkisi, bu hayvanlarda görülen bovis tipi tüberkülozun insanlara geçişine sebep oldu. Ancak molekülere dayalı metodlarla *M.bovis* ve *M.tuberculosis* izolatlarını takiben *M.tuberculosis* kompleksi içerisinde değerlendirilen suşların dizi analizlerinin yapılması, bu teorinin doğruluğunu tartışılır hale getirdi. Genetik çalışmalar *M.tuberculosis*'in *M. Bovis*'ten daha eski olduğunu göstermekteydi. Yani hayvandan insana bulaş teorisi kısmen çürütülmüş oldu. Hayvancılığın başladığı ilk çağlarda TB giderek daha sık olarak görülmekle birlikte yine de seyrekti. Aradan geçen binlerce yıl içerisinde daha kalabalık topluluklar halinde yaşamaya başlayan insanlar arasında hastalık daha yaygın hale geldi, buna çevre şartlarındaki değişiklikler de katılınca tüberküloza duyarlılık giderek arttı. Nüfus yoğunluğunun artmasıyla birlikte epidemik yayılım başladı. Batı Avrupa ve ABD' de 18. ve 19.yy' da yaklaşık olarak 75 yıl süreyle büyük tüberküloz

pandemisi yaşandı. O yıllarda TB en önemli ölüm nedeniydi¹⁸. Hayat şartlarında belirgin bir düzelme olmamasına rağmen, sonraki yıllarda TB olgularının sayısında yavaş da olsa bir azalma gözlemlendi. Bu durum “genetik olarak gelişen toplumsal bağışıklık” teorisiyle açıklanmaktadır¹⁸. Tüberküloz, daha sonraki yıllarda, Batı Avrupalı göçmenler tarafından önce Doğu Avrupa’ya, sonra Asya, Güney Amerika ve Afrika’ya yayıldı. Yirminci yüzyılda TB yeni yayıldığı bölgelerde sorun olmaya başlarken hayat şartlarının düzelmesiyle Batı Avrupa ve ABD’de TB prevalansı hızla düşmeye başladı. 1949 yılında streptomisin (STR), 1952 yılında izoniazidin (INH) kullanıma girmesiyle TB tedavisinde kemoterapi dönemi başladı. Antibiyotik tedavisinin klinik kullanıma girmesinden sonra TB prevalansı özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada sürekli bir düşme eğilimi gösterdi. Bu eğilim 1980’lerin ortasından itibaren değişti. Tüberküloz ve çoklu ilaç direnci gösteren TB olgularının sayısı artmaya başladı. Halk Sağlığı ile ilgili çalışmalarda yetersizlikler, AIDS’li olguların sayısındaki artış ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde bozulan sosyoekonomik yapı bu hızlı artışın başlıca nedenleri olarak öne sürüldü.

Tüberküloz insanlığın bilinen en eski hastalıklardan birisi olmasına; sebebinin kesin olarak bilinmesine, tedavi edilebilir ve korunulabilir bir hastalık olmasına rağmen, halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir¹⁸.

2.2 Dünyada Tüberküloz

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün 2005 yılı raporuna göre; 2003 yılında dünyada, 8,8 milyon yeni olgu görüldüğünü (140/100.000), ve olguların 674.000’i HIV (11/100.000) pozitif olduğunu bildirmiştir. Aynı yıl 229.000’u HIV pozitifler olmak üzere 1,7 milyon insan (28/100.000) tüberkülozdan ölmüştür. Tüberküloz olgularının % 95’inden fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve küresel ölçekte bakıldığında infeksiyon kaynaklı önlenemez erişkin ölümlerinin % 26’sına yol açmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Dünyadaki TB hastalarının yüzde 80’inin bulunduğu ülkeleri, “Yüksek Olgu-Yükü (YOYÜ)

olan ülkeler” olarak adlandırmıştır¹¹. Günümüzde bu ülkelerin sayısı 22’dir. Bu ülkelerden 12’si Asya’da, 9’u Afrika’da ve 1’i Güney Amerika’dadır. Hindistan, Çin, Endonezya, Nijerya ve Bangladeş en çok hastanın olduğu beş ülkedir. Bu ülkeleri; Pakistan, Etyopya, Güney Afrika, Filipinler, Kenya, Kongo Demokratik Cumhuriyeti, Rusya Federasyonu, Vietnam, Tanzanya, Brezilya, Uganda, Tayland, Mozambik, Zimbabve, Myanmar, Afganistan ve Kamboçya izlemektedir. Sahra Güneyi Afrika ile Güney Doğu Asya’da HIV ile birlikte seyreden tüberküloz bu ülkelerde çözülmesi imkânsız problemler yaratmaktadır. Son yıllarda Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermektedir^{11,19}.

2.3 Türkiye’de Tüberküloz

DSÖ’ nün raporuna göre Türkiye’nin nüfusu 70.318.000, toplam bildirilen olgu sayısı 18.043 ve insidans 100000’de 26’dır.

Türkiye’de bu yüzyılın başında ciddi bir epidemi yaşanmaktaydı. TB ölümleri, bütün ölüm nedenleri içinde birinci sırada yer alıyordu. Bu durum 1950’li yıllara kadar devam etti; 1945 yılında TB ölümleri 100.000/262, 1950 yılında 100.000/204 idi¹¹.

Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda 100.000/20’den az iken, Hindistan, Bangladeş, Çin gibi ülkelerde yüz binde 100’ün üstünde, hatta 100.000/200’ün üstündedir.

Ülkemizde tüberkülozun durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulamış ülkeler ile, kötü programlar uygulamış ülkeler arasında bir konumumuzun olduğu görülmektedir.

Verem Savaşı Daire Başkanlığı tarafından DSÖ’ne gönderilen ve DSÖ 1999 raporunda yer alan bilgide: Türkiye’nin 1997 yılı nüfusu 62.774.000, yıl içinde tanı konan yeni TB hastalarının sayısı 20.778, insidansı 100.000/33,1’dir. Yine DSÖ’nün raporuna göre tanı konulan hasta sayısı 18.038, insidansı 100.000/26’dır. Bu rakamların Türkiye’de tüm hastaları içermediği bilinmektedir. Örneğin bazı dispanserlerde SSK’lı hastaların ya da hastanelerde tedavi

başlanan hastaların bir kısmı kayıtlı değildir. Özel kurumlarda, üniversitelerde, diğer hastanelerde tedavi olan ve kaydı olmayan hastalar olabilmektedir ve kayıtlı olmayan hastaların sayısı konusunda sağlam bilgiler yoktur. Ülkemizde tüberküloza bağlı ölümler, 1940'lı yıllarda, yılda yüz bin de 150 ile 250 arasında ve bütün ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alırken, bu oranları 1950'li yıllardan itibaren hızla azalmış, 1970'li yıllarda yüz binde 20, 1990'lı yıllarda ise yüz binde 1,5'e kadar çekilmiştir. Yine 2002 yılında yapılan bir çalışmada, ülkemizde 0–14 yaş grubunda tüberküloza bağlı ölümlerinin, bütün ölümlerin %1,4'ünü oluşturduğu ve 8. en sık ölüm nedeni olduğu, 15–59 yaş grubunda ise tüm ölümlerin % 2'sini ve 9. en sık ölüm nedeni olduğu gösterilmiştir. Zaman içerisinde ölüm hızı ile morbiditede azalma kaydedilmiştir.

T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre Tüberküloz insidansı 1965 yılında 172/100.000, 1980'de 52.2/100.000, 1990'da 43.8/100.000 ve 2000'de 27/100.000 olarak kaydedilmiş, 2000 yılında 18.038 yeni tüberküloz vakası ile karşılaşmıştır^{12,20}.

Tüberküloz epidemisinde en önemli problem çoğul ilaç direnci gösteren olguların sayısındaki artıştır. Bu durum tüberkülozla mücadeleyi, neredeyse antibiyotiklerin tüberküloz tedavisinde kullanılmaya başlamasından yaklaşık 50 yıl geçmiş olmasına rağmen, yeniden başa döndürmüştür²¹.

2.4 Tedavi ve Direnç

Bilindiği gibi tüberküloz tedavisinde birinci seçenek ilaçlar rifampisin (RIF), izoniazid (INH), pirazinamid (PZA), etambutol (EMB) ve streptomisin (SM)'dir. Sikloserin etionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin ve PAS gibi ilaçlar ise ikinci seçenek ilaçlardır. Ayrıca tüberküloz tedavisinde amikasin, rifabutin, klofazimin, β laktamaz inhibitörleri, kinolonlarda deneme aşamasında olan ilaçlardır²¹.

Birinci seçenek ilaçlara karşı gelişen direnci dikkate alan DSÖ 1993 yılında TB'yi küresel sağlık sorunu olarak ilan etmiştir. Hastalığın erken tanısı ve primer anti tüberküloz ilaç direncinin hızlı bir şekilde tespit edilmesi çoğul

dirençli kökenlerin kontrolünde ve etkili tedavide yaşamsal bir rol oynamaktadır. Birçok bakteride görülenin aksine *M. tuberculosis*'de plazmid veya transpozonlar aracılığı ile oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. *M. tuberculosis*' de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Örneğin, rifampin (RIF)'e dirençli mutantların ilaçsız ortam da prevalansı 10^{-8} , INH'a dirençli mutantların ise 10^{-6} 'dır. Akciğer TB'sinde bir kavite büyüklüğüne göre ortalama 10^7-10^9 basil içermektedir. Bu durumda teorik olarak kavite lezyonların içinde çok az sayıda da olsa genetik olarak ilaç direnci olan kökenler bulunabilmektedir. Fakat ilaca dirençli bu mutantlar duyarlı mikroorganizmalar arasında dilüe olmaktadır. Buna karşın özellikle büyük kavite lezyonları olan hastalarda tedavide tek bir antibiyotik kullanılması ya da düzensiz antibiyotik kullanımı ile duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve ilaca dirençli kökenler seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmektedirler. Başka bir deyişle normal şartlarda doğada var olan bir fenomen insanoğlu tarafından amplifiye edilmektedir. Tedavi sırasında gelişen bu dirence kazanılmış direnç ya da sekonder direnç, oluşan dirençli kökenlerin başka bir hastaya bulaştırılması ile ortaya çıkan dirence ise primer ilaç direnci denilmektedir¹⁹. Bir kavitenin içerebileceği en fazla basil sayısının 10^9 , bir basilde hem INH hem de RIF direncinin bir arada olma olasılığının 10^{-14} ($10^{-6} \times 10^{-8}$) olduğu göz önünde bulundurulursa teorik olarak duyarlı bir bakteri topluluğunda spontan mutasyonlarla çoğul ilaç direnci gelişme olasılığının olmadığını söylemek yanlış olmaz. Çoğul direnç hemen daima belli bir antibiyotiğe dirençli topluluktaki basillerde yeni mutasyonlarla oluşan mutant kökenlerin antibiyotik baskısıyla seçilip topluluk içinde baskın duruma geçmesi sonucunda gelişmektedir.^{19,20}

Dünya ve ülkemizdeki tıbbi kaynaklar incelendiğinde 1980'den önceki dönemlerde dirençli tüberküloz sözcüğü daha çok izoniazid ve streptomisine karşı direnci ifade etmektedir. İlerleyen yıllarda rifampisin kullanıma girmesi gerek Türkiye'de gerekse dünyada tüberkülozda hem yeni hem de dirençli vakaların tedavilerinde çok önemli başarıların elde edilmesine imkân sağlamıştır. Başlangıçta RIF tedavisinden çok iyi sonuçlar alınmışken, uzun vadede oluşan RIF direncinin daha önceden var olan ve hep sürmekte olan

izoniazid direncine eklenmesiyle içinden çıkılması oldukça zor olan bir durum ortaya çıkmıştır. RIF direncinin giderek artması Türkiye'nin asıl önemli sorununu oluşturmaktadır^{20,21}. Ülkemizde halen kullanılmakta olan rejimler ve tedavi protokolleri ile izoniazid direnci olan hastalarda prognoz değişmezken rifampisin direnci olan hastalarda prognoz kötü olmakta ve dirençli hale gelmeleri kolaylaşmaktadır. RIF hemen hemen her zaman tedavi rejimlerinde izoniazid ile birlikte kullanılmaktadır. Bu durum 1990'lardan sonra dünyada çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİDTB) kavramını gündeme getirmiştir. Türkiye'de direnç boyutlarını rakamsal olarak ifade edebilecek resmi bir veri yoktur. Ülkemize ait bilgiler çeşitli kurumlarda yapılan lokal araştırmalara dayanmaktadır. Dispanserler, iller ve hastanelerde yapılan çalışmaların sonucunda tespit edilen tahmini ilaç direnci oranları; en az bir ilaca direnç: %14–31, ÇİD: %1,7–6, tedavi görmüş hastalarda ise en az bir ilaca direnç: %18,5–65, ÇİD : %6,7–30 arasında bulunmuştur. Bu oranlar, ülkemizin dünyada ilaç direnci oranı yüksek ülkelerinden birisi olduğunu göstermektedir⁴. Çünkü DSÖ, ulusal programların etkin bir şekilde işletildiği ülkelerde primer çok ilaca dirençli tüberküloz oranının %1'in altında olması gerektiğini vurgulamaktadır. DSÖ'nün önerdiği kategorilere göre tedavi yaklaşımı Türkiye'de aynı şekilde uygulanmamaktadır, farklılıklar vardır; Yayma negatif akciğer TB'unda ve akciğer dışı TB'un daha az ciddi şekillerinde DSÖ, üç ilaçla tedavi önermiştir. Ülkemizde ise bu hastalar için de dört ilaçla tedavi yöntemi kullanılmaktadır²⁴.

Ülkemizdeki yüksek ÇİD oranlarının en önemli iki sebebi, tedavi terk oranlarının yüksekliği ve kür oranlarının düşüklüğüdür. Gerek tanıda gerekse hasta takibinde bakteriyolojinin rutin kullanımının artması ile kür oranları da artacaktır. Tedavi terklerini önlemenin en etkili yolu da Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisidir. (DGTS) . Etkin bir tüberküloz kontrol programı uygulanarak bulaş ve mortalite azaltılabilir. Tüberküloz hastalarının programa uyumu ve ilaç direnci önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) öncülüğünde 1991'den bu yana yeni bir TB kontrol stratejisi hızla yayılmış ve günümüzde TB kontrolünün temel yöntemi olarak kabul görür hale gelmiştir. Doğrudan Gözetimli Tedavi uygulaması Dr. Styblo'nun önerisi ile Afrika'da başlatılmıştır. İlk uygulama örneği Tanzania olup, burada sağlanan başarı, iyi bir uygulama ile çok fakir

bölgelerde ve ülkelerde bile tüberkülozun kontrol edilebileceğini kanıtlamıştır. Bu başarı sağlık alt yapısı ve ekonomik gelişmişlik iyi olmadan TB ile yeterince mücadele edilemeyeceği şeklindeki yaygın kanaati yıkarak Çin, Peru, Hindistan gibi ülkelerde de uygulamaya geçilmesini sağlamıştır. Ancak DGTS uzun süre sadece fakir ülkeler için geçerli bir strateji olarak kabul edilmiş ve diğer ülkelerin ilgi alanına girmemiştir. Ancak ABD’de bu stratejinin başarı ile uygulanması, gelişmişlik seviyesi yüksek ülkelerde de yayılmasını hızlandırmıştır. DGTS dünya nüfusunun %55’ini ve dünyadaki tüberküloz vakalarını % 27’sini kapsayan 148 ülkeyi kapsar. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün raporuna göre; 2003 yılında, 2002 yılından iki fazla ülke ile toplam 182 ülke DGTS stratejisini uygulamıştır. 2003 sonunda, dünya nüfusunun %77’si, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi(DGTS) uygulanan bu ülkelerde ya da bu ülkelerin bazı bölümlerinde yaşamaktadırlar²³. Global olarak tüberküloz vakalarının %27’si DGTS ile tedavi edilmektedir. DGTS’un uygulandığı ülkelerin nüfusu da Dünya nüfusunun %55’ine ulaşmıştır.

DGTS’nin yurdumuzda uygulanan TB Kontrol Programına uygulanması diğer ülke uygulamalarında olduğu gibi 3 aşamada gerçekleştirilecektir. Bu aşamalar;

1. Demostrasyon ve Eğitim Aşaması,
2. Yaygınlaştırma Aşaması,
3. Kalıcılık Aşamasıdır.

Halen ülkemizde 1. aşama olan “Demostrasyon ve Eğitim Aşaması” devam etmektedir. Bu pilot uygulamanın neticelerinden sonra yeni bir planlama yapılarak 2. aşama olan “Yaygınlaştırma” aşamasına geçilecektir²⁴.

DGTS stratejisi:

1. TB kontrolü ile ilgili uygulamalar için politik iradenin ortaya konması,
2. Semptomatik hastalarda pasif yöntemle bakteriyolojik tanı,
3. Gözetimli kısa süreli tedavi,
4. Ücretsiz ve sürekli ilaç sağlanması ve
5. Kayıt-raporlama-analiz sistematığının kurulması, unsurlarını içermektedir.

DGTS programları uygulanan bölgelerde kayıtlı yeni yayma pozitif TB hastalarının sayısı 2000 yılında 1.021.404'tür. 2000 yılında DGTS uygulanan bölgelerde yeni olguların %62'si, uygulanmayan yerlerde ise %34'ü yayma pozitifdir. Yayma pozitif hastalarda 1999 yılında saptanan tedavi başarısı, DGTS uygulanan bölgelerde %80,2, uygulanmayan bölgelerde %27,6 bulunmuştur. DGTS uygulanmayan yerlerde hastaların küçük bir kısmı değerlendirilmekte, tedavi başarısı da tüm hastaların tedavi başarısı olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle tedavi başarısı düşüktür. Örneğin, dünyada 1999 yılı sonunda DGTS uygulanan yerlerde hastaların %96'sının, DGTS uygulanmayan yerlerde %41'inin tedavi sonuçları değerlendirilebilmiştir.

Türkiye, DGTS uygulanmayan bir ülke olarak listelenmekte ve Türkiye, tedavi sonucu veremeyen, yani değerlendirilemeyen bir ülke olarak kayıtlara geçmektedir²⁴.

Sanayileşmiş ülkelerde son 10 yıl içinde TB kontrolü çabaları sonuç vermiştir ve hasta sayılarında yeniden düşüş eğilimi görülmektedir. Günümüzde bu ülkelerde TB sorununun önemli bir kısmını göçler oluşturmaktadır.

DGTS stratejisinin önemli başarılar sağlaması ve yapılan maliyet-yararlılık analizlerinde çok etkili olduğunun gösterilmesi, dünya çapında önemli bir harekete yol açmıştır. Ayrıca DSÖ öncülüğünde StopTB adı ile tüberküloza karşı sosyal ve politik hareketi hızlandırmaya yönelik uluslararası bir örgütlenme oluşturulmuştur. Dünyanın 10 yıldan uzun süren DGTS deneyimleri sonrasında 2002 yılında DSÖ, DGTS stratejisinin içeriğini genişletmiştir. DGTS stratejisini bütünlüklü bir destek stratejisine dönüştürmek gerektiği: sağlık hizmeti verenlere, hastalara ve TB sorunu ile karşılaşan insanlara destek sağlayıcı

olması gerektiği ortaya konulmuştur. Bu yeni yaklaşımda, TB tedavisinin bir insan hakkı olduğu ve TB kontrolünün toplum için önemli yararlarının olacağını vurgulamıştır. 1991 yılında 44. Dünya Sağlık Örgütü Genel Kurul Toplantısında 2001 yılı için ortaya konan (bulaştırıcı TB olgularının %70'ini saptamak ve bu olguların %85'inde kür sağlamak) hedefi, 2007 yılına ertelenmiştir. Yine, bulaştırıcı olgularda yüksek kür oranları sağlamaya öncelik verilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Bu yeni genişletilmiş DGTS yapısı içinde TB kontrolü ile ilgili girişimlerin çeşitli yönlerine, balgam mikroskopisinden ÇİD-TB tedavisine kadar değişen çerçevede değinilmiştir. Bir ülkede DGTS uygulanmasındaki temel girişimlere ilişkin maddelere 2002 yılında bir "program geliştirme planı" hazırlanması eklenmiştir; bunun yanında "ek anahtar girişimler" başlığı altında bir dizi uygulama istenmiştir. Bunlar;

- 1- Bilgi, eğitim, iletişim ve sosyal mobilizasyon,
- 2- Özel ve gönüllü sağlık hizmeti vereceklerin dahil edilmesi,
- 3- Ekonomik analiz ve mali planlama,
- 4- Operasyonel araştırmadır²⁴.

Başarılı bir tüberküloz önleme programı için laboratuvar örgütlenmesi gereklidir. Bu örgütlenmeye göre periferik birim (seviye 1 laboratuvarlar), balgam toplama ve yayma hazırlama; orta birim (seviye 2 laboratuvarlar), balgam toplama, yayma ve kültür işlemlerini; merkezi birim (seviye 3 laboratuvarlar), yayma, kültür ve direnç takibi işlemlerini gerçekleştirecek ve merkezi birimlerden biri ulusal referans laboratuvarı olacaktır²⁵.

WHO/IUATLD pek çok ülkeyi kapsayan; "Antitüberküloz İlaç Direnci Sürveyansı Global Projesi" başlatmıştır²⁶.

Projenin 1994–96 yılları arasında 35 bölgede, dünyadaki TB vakalarının %16'sını kapsayan 1. raporunda; yeni vakalarda %3'ten daha fazla oranda ÇİD-TB olduğu bildirilmiştir. Bu oran özellikle Arjantin, Dominik Cumhuriyeti, Estonya, Litvanya, Rusya gibi bazı ülkelerde yüksektir. Aynı projenin 1994–99

arasını değerlendiren, 72 b6lgeyi, d6nya n6fusunun %33'6n6 ve TB vakalarının % 28'ini kapsayan 2. raporunda; yeni vakalarda en az bir ilaca direnç oranı %1,7-%36 (ortalama %10,7), ÇİD-TB oranı %0–14,1 (ortalama %1) olarak bildirilmiştir. Direnç açısından y6ksek prevalans g6zlenen 6lkelerden bazıları Çin, Litvanya, Rusya ve İnan'dır. Almanya, Yeni Zelanda, Estonya ve Danimarka'da zamanla ÇİD-TB oranlarında artış saptanmıştır. ABD ve Fransa'da ise bu oran zamana bağlı olarak azalmıştır. Yine aynı proje çerçevesinde tedavi almış hastalar değerlendirildiğinde; en az bir ilaca direnç oranının %0 (Finlandiya) ile %94 (Uruguay) arasında değiştiiği ve ortalama %23,3 olduğu belirtilmiştir. ÇİD-TB oranı ise %048,2 (İnan) arasında değişmekte olup ortalama %9,3 olarak bildirilmiştir. Estonya'da belirgin artış g6zlenirken K6ba, İngiltere ve Kore'de azalmaya doğru bir eğilim tespit edilmiştir. WHO araştırma yapılamamış bazı 6lkelerde değişkenlere g6re tahmini değerlendirme yapmıştır. Buna g6re T6rkiye'de 2000 yılında 24110 yeni vaka ve 1166 ÇİD-TB (% 4,8) vakası olduğu tahmin edilmektedir^{21,22}.

WHO/IUATLD Antit6berk6loz İlaç Direnci S6rveyansı Global Projesi çerçevesinde bazı konularda tespitler yapılmıştır. Buna g6re:

1. Direnç prevalansı; 6nceki tedavi ile doğrudan; kısa s6reli kemoterapi, tedavi başarısı, DOTS ve kişi başına milli gelir ile ters ilişkilidir.
2. Kanada, Danimarka, Finlandiya, Almanya, İnan, Hollanda, İsveç, İngiltere ve ABD'de yabancılarda y6ksek direnç prevalansı g6zlenmektedir.
3. 0–14 yaş arasında ve 65 yaş 6zerinde direnç daha d6ř6k olarak g6r6lmektedir.
- 4-Human Immunodeficiency Virus (HIV) açısından pozitif olan hastalarda ÇİD-TB prevalans y6ksektir.

HIV epidemisinin dirençli TB sayısında artışa sebep olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte AIDS hastalarda TB değerlendirildiğinde; TB vaka sayısındaki artışın primer dirençli vaka sayısında artışla da ilişkili olduğu, TB tedavi

birimlerinin kalabalıklaşmasının edinsel dirençli vakalarda artışa neden olduğu ve baskılanmış bağışıklığın tüberküloz tedavisinin etkinliğini azaltıp edinsel direnci arttırdığı yapılan saptamalar arasındadır²⁷. Sahra Güneyi Afrika ile Güney Doğu Asya'da HIV ve TB birlikteliği büyük bir sorundur. Son yıllarda Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermektedir. İlaça dirençli TB sorunu dünya çapında önemli bir olgudur. Dünyanın bütün ülkelerinde TB tedavisini zorlaştırmaktadır²⁴. Dünyada 58 ülke ya da bölgede yapılan ilaç direnci saptama çalışmasında, ilaç direncinin yaygın olarak bulunduğu ve bazı ülkelerde ciddi boyutlarda olduğu (sıcak-noktalar) görülmüştür.

Türkiye'deki ÇİD-TB değerlendirilmesinin yapılabilmesi için henüz ne yazık ki yeterli veri bulunmamaktadır.

2000 yılında İnönü Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada Malatya bölgesinden 96 yeni vaka değerlendirilmiş, 36 vakada en az bir ilaca direnç (%37,5) ve dört ÇİD-TB (%4,2) tespit edilmiştir.

Ülkemizde Gaziantep Üniversitesi'nde yapılan lokal bir çalışmada 264 *M. tuberculosis* suşu BACTEC 460 ile duyarlılık açısından test edilmiş; en az bir ilaca direnç % 40,2, yalnız bir ilaca direnç % 17,8, iki ilaca direnç % 10,6, üç ilaca direnç % 11,0 ve dört ilaca direnç % 0,8 olarak bulunmuştur. INH ve RIF'e aynı anda direnç oranı ise % 7,6 olarak bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda Güneydoğu Anadolu'da direncin yüksek olduğu belirtilmiştir²⁸.

Çoklu dirençli tüberkülozun nozokomiyal geçişi hastanelerde AIDS hastalarının bulunduğu birimlerde görülebilir. İlk salgınlar 1988 başlarında bildirilmiştir²⁹. Bu salgınlarda mortalite oranı %72-89'dur.

Çoklu dirençli tüberkülozun kontrol altına alınması için WHO temel prensipler belirlemiştir³⁰. Buna göre;

1. Öncelik ÇİD-TB gelişimini önlemektir.
2. Gerekli ilaçlar mevcut olmalıdır.
3. Bu hastalar için özel tedavi üniteleri oluşturulmalıdır.
4. Bu hastalar için uygun tedavi rejimleri düzenlenmelidir.

5. Gerekli duyarlılık testleri yapılabilmelidir.
6. ÇİD-TB kontrol programı için uzun süreli personel ve mali kaynak ayrılmalıdır.

Dünya sağlık örgütü ayrıca yüksek çoklu dirençli tüberkülozlu olan bölgelerde uygulanmak üzere "DGTS-plus" stratejisi geliştirmiştir. Bu strateji, 2. seçenek ilaçlarla uygun tedaviye dayanır. DGTS' tan ayrı bir strateji değil DGTS'a yardımcı bir stratejidir. Litvanya, Estonya, Filipinler, Peru ve Rusya gibi çoklu dirençli tüberkülozun yüksek olduğu bazı ülkelerde uygulanmaktadır³¹. "DGTS-plus" stratejileri şunları içerir:

1. Kültür ve antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) ile tanı
2. ADT sonuçlarına göre uygun tedavi
3. Sekonder ilaçlara da ADT yapılması.
4. Detaylı Laboratuvar Değerlendirme (3 ayda bir kültür, ADT, RFLP ile değerlendirme)
5. Sekonder ilaçların kontrolsüz kullanımının önlenmesi
6. Uluslararası kuruluşların desteği

Tüberküloz danışma konseyi çoklu dirençli tüberkülozu önlemek için uygun tedavilerin ve direnç sorunlarının sürveyansının yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Konsey uygun tedavinin önemini belirtmiştir²¹. Çünkü tekli ilaç kullanımı ile mutant dirençli suşlar popülasyonda baskın hale geçebilir³². TB hastalarında ilk izolata duyarlılık testleri yapılmalıdır. Direnç testleri, tedavinin başlamasından 3 ay sonra kültür negatif hale dönüşmeyen ya da tedaviye yanıt yetersizliği olduğuna dair klinik delilleri olan hastalardan izole edilen sonraki izolatlarda da yapılmalıdır³³.

Rifampin (RIF) Tüberküloz tedavisinde kullanılan "primer antitüberküloz" ajanların en önemlisidir. RIF'in *M.tuberculosis* üzerindeki yüksek bakterisidal

etkisi bu ilacı tüberküloz tedavisinin anahtar bileşeni haline getirmiştir. Böylece RIF direnci çoklu ilaç direnci belirteci olarak değerlendirilir. Rifampin semisentetik bir rifamisin türevidir. Rifampin bakterinin RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesine bağlanarak transkripsiyonun başlamasını engellemektedir. Rifampine dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β –alt ünitesini kodlayan rpoB genin 507–533.kodonları arasındaki 81 baz çifti (bç) uzunluğundaki rifampin resistance determining region (RRDR) veya hot spot adı verilen bölgede missense mutasyonların, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir. Buna karşın RIF'e dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin yaklaşık %4'ünde RRDR bölgesinde genetik değişiklik saptanamamıştır. Bu kökenlerin bir bölümünde rpoB genin RRDR bölgesinin dışında kalan 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlarda mutasyonların olduğu gösterilirken çok küçük bir bölümünde ise direncin mekanizması açıklanamamaktadır. Dirençli kökenlerde mutasyonlar tek bir kodonda bir nükleotidin değişmesi şeklinde olabileceği gibi bir kodonda birden fazla nükleotidin değişmesiyle ya da birden fazla kodonu kapsayan ikili, üçlü hatta dörtlü kodon mutasyonları şeklinde de olabilmektedir.^{20,21,26}

Yapılan çok sayıda çalışmada RIF'e dirençli kökenlerin yaklaşık %34-57'sinde rpoB geninin 531. kodonunda TCG→TTG mutasyonu (Ser531Leu) saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyonlar izlemektedir. Bazı istisnalar olmasına karşın genellikle belli kodonlardaki aminoasit değişiklikleri ile RIF için MİK değerleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzey RIF direncine (MİK \geq 64 μ g/ml) neden olurken 514 veya 533. kodonlarda görülen mutasyonlar genellikle düşük düzey RIF direncine yol açmaktadır. Rifampine dirençli kökenlerde rifabutın, rifapentin ve KRM–1648 gibi diğer rifamisinlere karşı duyarlılıklar da araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda RIF için MİK değerleri ile diğer rifamisinler için MİK değerleri arasında kuvvetli bir korelasyon saptanmıştır. Rifampine dirençli kökenlerin tümünde rifapentine de çapraz direnç görülmekte ve her iki antibiyotik için de aynı MİK değerleri saptanmaktadır. Buna karşın RIF'e dirençli kökenlerin rifabutın ve KRM–1648' e duyarlı olabildiği bilinmektedir. Örneğin, rpoB geninde Leu511Pro, Asp516Tyr, Asp516Val, Ser522Leu ve Leu533Pro

mutasyonu olan RIF'e dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin rifabutine duyarlı (MIK $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$) oldukları saptanmıştır^{5,8,20}.

2.5 Duyarlılık Testleri

Günümüzde gittikçe artış gösteren ve dünyayı tehdit eden çoklu dirençli tüberkülozu önlemek için hızlı ve doğru duyarlılık testleri gerekmektedir³¹. Duyarlılık testleri bir antimikrobiyal ajana klinik cevap ile in vitro test sonucu arasındaki korelasyona dayanır. Bir hastanın basillerinin %1'inden fazlası bir ilaca in vitro dirençli ise o ilaç ile tedavi klinik olarak yararlı değildir. İyi bir metod belli bir ilaca karşı duyarlı ve dirençli basil oranını belirleyebilmelidir³².

2.5.1 Kültür Bazlı Testler

Bu testlerde, ya klasik kültür yöntemleri veya hızlı kültür yöntemleri ile uygun bir besiyerinde üretilmiş bakteri kolonileri kullanılır. European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST) 'a göre duyarlılık testlerinin standardizasyonu çok zordur. Çünkü TB direncini tespit için kullanılan besiyerlerinde, inokulum miktarında, ilacın minimum konsantrasyonunda, kullanılan direnç kriterlerinde farklar mevcuttur³³.

2.5.1.1. Klasik Kültür Testleri

WHO/IUATLD, TB duyarlılık testleri için üç kabul edilebilir klasik kültüre dayalı metod tanımlamıştır.

1. Mutlak Konsantrasyon Metodu

Bu metod her bir ilacın MİK değerini tespit etme esasına dayanır. İlaç konsantrasyonu besiyerinde tam ve hatasız olarak ayarlanmalıdır, besiyeri ilaç eklendikten sonra ısıtılmamalıdır³⁴. İlaç LJ besiyerine iki katı dilüsyonlarla eklenir. Katı besiyeri metodlarının standardizasyonu sıvı besiyerine oranla daha kolaydır. Direnç; belli ilaç konsantrasyonunda belli koloni sayısından fazla (genellikle 20) üreme olarak tanımlanır^{19,33}. Bu metotta ilaç konsantrasyonu ve inokulum miktarı iyi standardize edilmelidir.

2. Direnç Oran Metodu

Direnç oran metodu; mutlak konsantrasyon metodunun geliştirilmesiyle oluşmuştur. Test izolatının MİK değerinin standart duyarlı suşun MİK değerine bölünmesine dayanır. Bu oran ikiden küçük ise duyarlı, sekizden büyük ise dirençli olarak değerlendirilir¹⁹. Metotta standart suş olarak *M. tuberculosis* (H37RV) kullanılır. Standart kontrol kullanılması sayesinde ilaç içeren besiyeri hazırlanmasındaki ve ilaç aktivitesindeki değişkenlikler kontrol edilebilir^{19,33}.

3. Proporsiyon Metodu

A.B.D. Halk Sağlığı Servisi, bu metotta kullanılmak üzere Middlebrook 7H10 agar besiyerinin kullanıldığı proporsiyon metodunu önermektedir. Test edilecek mikroorganizmanın çeşitli oranlardaki dilüsyonları ilaçlı ve ilaçsız besiyerine ekilir. Dirençli mutant proporsiyonu; ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısı ile ilaçsız besiyerindeki koloni sayısının oranıdır. İlaçlı ve ilaçsız besiyerindeki koloni sayısı belirlenir ve 'yüzde (%) ' olarak ifade edilir. Suş; dirençli bakterinin kritik bir proporsiyonunun altında duyarlı, üstünde dirençli olarak değerlendirilir. Bu proporsiyon farklı ilaçlar için değişebilir (INH ve RIF için %1) ^{19,33}.

2.5.1.2. Hızlı Kültüre Dayalı Duyarlılık Testleri

Kültüre Dayalı Duyarlılık Testleri; ticari otomatize veya yarı otomatize kültür sistemlerinden oluşmaktadır. Bunlar Radyometrik kültür sistemi (BACTEC), Radyometrik olmayan otomatize kültür sistemleri (MGIT), Kolorimetrik boya yöntemi (alamar mavisi) ve kolorimetrik kültür sistemleridir.

1. Radyometrik Kültür Sistemi

Günümüzde sıklıkla kullanılan BACTEC 460 bir radyometrik kültür sistemlerinden. Bactec yöntemi sıvı besiyerinde üreyen mikobakterinin üremesinin radyometrik olarak izlenmesi esasına dayanır. Temel prensip ^{14}C ile işaretli substrat içeren besiyerinde bu substratı kullanarak üreyen mikobakterilerin $^{14}\text{CO}_2$ üretmesidir. Tespit edilen $^{14}\text{CO}_2$ miktarı vial içindeki üremenin miktarı ve oranını yansıtır ve üreme indeksi olarak tanımlanır. İlaç duyarlılık testleri Bactec sistemi kullanılarak yapılabilir. Kültürde üretilmiş suşa uygulanabildiği gibi yayma pozitif olan örneklere doğrudan da uygulanabilir. Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri kullanılır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve tüberküloz ve akciğer hastalıklarına karşı Uluslararası Birlik / International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Network of Supranational Reference Laboratories tarafından laboratuvarlarda kalite kontrol testleri yapmak üzere 100 suş kullanılmış. Bu suşlar proporsiyon, mutlak konsantrasyon, direnç oran ve BACTEC-TB 460 sistemi ile duyarlılık açısından test edilmiş. Sonuçlar RIF ve INH açısından %97–99, EMB ve SM açısından % 90–95 güvenilir bulunmuş. Aynı şekilde tüm laboratuvarların performansları test edilmelidir ²⁵.

2. Radyometrik Olmayan Sistemler

Radyometrik olmayan sistemlere MGIT sistemi iyi bir örnektir. MGIT yöntemi mikobakterilerin klinik örneklerden (kan ve idrar hariç) hızlı izolasyonunu optimize etmek için geliştirilmiş in vitro bir sistemdir. Hastalardan alınan örnekler işlendikten sonra MGIT tüplerine inoküle edilir. MGIT tüplerinin dip kısımlarında fluorescent içeren silikon bulunur ve sıvı besiyerinde bulunan çözülmüş haldeki O₂ varlığına duyarlıdır. Sıvı besiyerinde üreyen mikobakterilerin açığa çıkardığı çözülmüş haldeki oksijen floresan açığa çıkarır ve üremenin tespit edilmesini sağlar. Middlebrook tüplerindeki jelde indikatör mevcuttur. Bu indikatör indirgendiğinde (CO₂ artışı ile) UV' de flüoresan verir. İlaçlı ve ilaçsız tüpe eşit miktarda bakteri ekimi yapılır. İlaçsız tüpteki üremeden sonraki 48 saat içinde ilaçlı tüpte üreme olursa; dirençli suş olarak değerlendirilir³⁵.

3. Kolorimetrik Boya Yöntemi

Kolorimetrik boya yönteminde alamar mavisi kullanılır. Yükseltgenme indirgenme reaksiyonları renk değişikliğine sebep olur. İlaçlı ve ilaçsız Middlebrook besiyerinde 10–14 gün inkübasyon yapılır. Kontrol tüpüne alamar mavisi eklenir ve 50°C'de 2 saat beklenir. Üreme ile renk maviden pembeye dönüşür. Üreme varsa ilaçlı tüplere de aynı işlem yapılır. Pembe olursa dirençli olarak değerlendirilir. Birden fazla kontrol tüpü kullanılması gerekir. Günümüzde pratik olmadığından fazla kullanılmamaktadır³⁴.

4. Kolorimetrik Kültür Sistemi

Kolorimetrik kültür sistemi mikobakterilerin metabolizmasına bağlı olarak besiyerinde renk değişimi olur. Bu yöntemle koloni görünmeden üreme saptanabilir. Kontaminasyon gerçek mikobakteriden ayırt edilir. Kontaminasyon

rengin kırmızıdan yeşile dönmesine mikobakteriler ise sarıya dönmesine neden olur. Katı besiyerinin kullanıldığı tek hızlı kültür sistemidir. Duyarlılık için ilaçlı ve ilaçsız besiyerine eşit miktarda bakteri ekilir. Kontrolde üremeden sonraki 48 saat içinde ilaçlı besiyerinde üreme varsa; dirençli suş olarak değerlendirilir ³⁶.

2.5.2 Bakteriyofaja Dayalı Duyarlılık Testleri

2.5.2.1 Lusiferaz Genli Bakteriyofaj Metodu

Bu metotta lusiferaz geni eksprese edebilen fajlar kullanılır. Fajla infekte canlı mikobakterinin foton üretimi ve sonrasındaki ışık oluşumuna dayanır. Dirençli olan bakteri lusiferaz üretimine devam eder. Klinik örnekte kullanımı çok yenidir. Yöntemin uygulanabilirliği için 10^5 basil/ml gerekir. Bunun yanı sıra pahalı bir yöntem olması kullanımını sınırlamaktadır¹⁹.

2.5.2.2 Faj Çoğaltma Metodu

Faj çoğaltma metodunda *phaB* (phage amplified biologically) fajı kullanılır. Test edilecek numune ya da kültür mikobakteriyofaj ile infekte edilir. Mikobakteri dışında kalan fajlar ferrus amonyum sülfat ile inaktive edilir. Korunan fajlar içerde çoğalır, mikobakteriyi parçalar. Açığa çıkan fajlar hızlı üreyen *M. smegmatis* ile bir araya getirilir. Bir gecelik inkübasyon sonrası lizis alanları, faj plakları gözlenir. Hızlı ve kolay bir metottur. Mililitrede 10–100 bakteriye duyarlıdır, bu açıdan kültür ile benzerlik gösterir. Zamanla infeksiyöz canlı bakteri azaldığı için görece olarak güvenli bir yöntemdir ¹⁹.

2.5.3 Flow Sitometri

Yöntemde floresein asetat ile işaretlemenin yapılır. Flow Sitometri yöntemi sayıma dayalı bir yöntemdir. Üç gün ilaçlı ve ilaçsız olarak inkübasyon yapılır. Sonrasında flow sitometride sayım yapılır³³. İlaçlı tüpte yarıdan fazla

azalma varsa, ilaç etkili olarak değerlendirilir. Yapılan bir çalışmada 17 izolat için EMB, INH, RIF'e duyarlılık değerlendirilmiştir. Agar proporsiyon metodu ile % 98 uyum bildirilmiştir. Parafolmadehit ile inaktivasyon yapılır. Güvenli, basit ve hızlı bir metod olduğu belirtilmektedir³⁶.

2.5.4 Moleküler Direnç Testleri

Mycobacterium tuberculosis'de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra hızlı ilaç direnci saptamaya yönelik moleküler uygulamalar geliştirilmiştir¹⁹. Moleküler direnç göstergelerinin saptanması için minimal bir üreme yeterlidir. Bu nedenle konvansiyonel ilaç duyarlılık yöntemleriyle karşılaştırıldığında testlerin sonuçlanması için geçen süre haftalardan saatlere inmiştir. Yine bu teknikler otomasyona izin vermekte ve laboratuvar tehlikelerini en aza indirmektedir. Birden fazla gen bölgesinin dirençten sorumlu olduğu durumlarda her bir direnç geni için ayrı işlem yapılmasını gerektirmesi dirence yol açmayan sessiz mutasyonların da saptanması bu tekniklerin önemli dezavantajlarıdır¹⁹. Pratik uygulamalarda moleküler teknikler çoğu kez RIF direncinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Çünkü RIF en potent antitüberküloz ilaçlardan biridir. Bu nedenle RIF direnci özellikle beraberinde diğer antitüberküloz ilaçlara da direnç olması durumunda yüksek oranda klinik relapslara yol açmaktadır. Ayrıca, RIF'e dirençli izolatların yaklaşık %90'ında INH direncide bulunmaktadır; dolayısıyla RIF direnci aynı zamanda INH direncinin de bir göstergesidir. Dahası RIF direncinin tamamına yakın bir bölümünden rpoB geninin 81 bp'lik bölgesindeki mutasyonlar sorumludur. Bu da rpoB genini moleküler teknikler için uygun bir hedef haline getirmektedir³⁷.

Moleküler direnç testleri; hızlı sonuç vermesi, kültür gereksiniminin minimal olması ya da olmaması nedeniyle günümüzde kullanılan testler arasında avantajlı sayılan yöntemlerdir. Dirence neden olan mutasyonların çoğunun daha öncede tespit edilmiş olması bu yöntemlerin esasını oluşturmaktadır. Moleküler direnç testleri In-house olarak ya da ticari testler

olarak kullanılabilir. Fakat aynı zamanda bu yöntemlerin bazı dezavantajları olduğu da bilinmektedir. Pahalı olmaları, dirençli organizma proporsiyonunun belirsiz olması ve sessiz mutasyonlar olma ihtimali yöntemin dezavantajlar arasındadır.

Moleküler direnç testlerinin uygulanabilmesi, ilaç hedefi ve gen mutasyonunun bilinmesine dayanır. Bu testler; örnek hazırlanması, nükleik asit amplifikasyonu ve mutasyonun tespiti basamaklarından oluşur.

RIF direncinin saptanması TB tedavi protokolünün belirlenmesinde önemlidir. RIF; RNA polimerazın β alt ünitesine bağlanır, transkripsiyonu ve RNA'nın uzamasını engeller. *M. tuberculosis*'te bulunan *rpoB* geni DNA'ya bağımlı RNA polimerazın β alt ünitesini kodlar. Bu gendeki bir mutasyon RIF direncine neden olur³⁶. RIF dışı ilaçlarda direnç mekanizmaları ile ilgili bilgi yetersizdir. Bu nedenle bu ilaçlarda duyarlılığın tespitinde genotipik testler yetersiz kalabilir. Başarı oranı SM için % 40, INH için %10–15 ve siprofloksasin için % 25 olarak bildirilmiştir¹⁹.

INH direncinin tespiti için kullanılan moleküler yöntemler daha komplekstir. Çünkü bu ilaca direnç gelişimi ile ilişkili olarak en az dört gende mutasyon tespit edilmiştir. Bu genler *katG*, *inhA*, *ahpC* ve *kasA* genleridir³⁸.

Tüberküloz suşlarında ilaç direncini ve genetik temelini tespit için en çok kullanım alanı bulan testler; Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Single strand conformation polymorphism (SSCP), Heminested PZR, Heterodupleks analizi, Baz-dizi analizi, Katı faz hibridizasyon testleridir.

Direnç tespitinde kullanılan ve özgül ve duyarlı olmasına rağmen standardizasyonu ve uygulanışı son derece zor olan "Single strand conformation polymorphism" manuel ya da otomatize sistemlerle, mutasyonel fragmentler; radyoaktif olarak ya da gümüş boyama ile jelde gösterilebilir. Bu yöntem ile önce ilaç direncinden sorumlu gen bölgesi PZR ile çoğaltılır, DNA iki tek zincire ayrılır. Tek zincirli DNA, nukleotid dizisine göre üç boyutlu şekil alır. Dizide bir mutasyon olması halinde zincirlerin poliakrilamid jeldeki hızlarının farklı olacaktır¹⁹.

DNA dizi analizi mutasyonları saptamak için en dolaysız ve güvenilir yöntemdir; önceden bilinen ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasına izin

verir. Buna karşın INH direncinde olduğu gibi mutasyonların dağınık ve büyük segmentler halinde olduğu durumlarda her izolat için birden fazla sayıda dizi analizi gerekebileceğinden kolay uygulanabilir bir yöntem değildir. Buna karşın rpoB gibi yoğun ve çok kısa segmentte sınırlı olan direnç genlerinin saptanmasında DNA dizi analizi uygun bir tekniktir. Günümüzde DNA dizi analizi amacıyla Sanger'in zincir sonlandırma temeline dayanan dideoksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. Zincir sonlandırma yöntemi manuel ve otomatize sistem olarak kullanılabilir. Son yıllarda otomatize sistemlerin kullanıma girmesi DNA dizi analizinin çok geniş çaplı kullanım alanı bulmasına olanak sağlamıştır¹⁹.

Diğer önemli bir metod'da heterodupleks analizidir. Bu methodla test edilen izolat ve duyarlı kontrolden dirence neden olan gen bölgesi PZR ile çoğaltılır. Eşit miktarları aynı tüpte karıştırılır, ısı ile zincirler ayrılır. Yavaş yavaş soğutulularak eşleşme sağlanır. Mutasyon varsa eşleşme bozukluğu olur. Çift sarmal yapı bozulur, üç boyutlu yapı değişir. Elektroforezde farklı hızda yürüme varsa direnç mevcuttur. Mutasyon tespiti için akrilamid jel kullanılır. Sonuçlar UV' transiluminatörde gözlenebilir. Bu özelliği ile yöntem, SSCP'den daha kullanışlıdır¹⁹.

Katı Faz Hibridizasyon Testinde beklenen mutasyonlara özgü problemlerle hibridizasyon yapılır. Metod ters hibridizasyon prensibine dayanır. İlaç direncinin beklediği DNA bölgesi çoğaltılır. Probun bağlanmaması söz konusu ise mutasyon dolayısıyla direnç mevcuttur¹⁹.

Gerçek Zamanlı PZR(Real Time PCR) ile RIF ve INH direncinin tayininde; tespitinde tek tüp içinde primerler, floresan veren madde ile işaretli prob ve mutasyonla uyumlu işaretli problemler birlikte kullanılır. Mutasyon indikatör problemleri Red 640 ile işaretlenmiştir. Sistem floresan rezonans enerji transferi esasına dayanır. Her genotip için karakteristik erime profili oluşur. Dirençli ve duyarlı suşun erime eğrileri karşılaştırılır. Otuz dakika gibi kısa bir sürede sonuç verebilmesi en önemli avantajıdır^{38,39,40}. Ancak genotipik yöntemler arasında altın standart dizi analizidir. Genomdaki dirençle ilişkili olabilecek bütün sinonim ve non-sinonim mutasyonlar tespit edilebilir. Ancak bu zordur ve özellikle otomatize sistemler kullanıldığında pahalı bir yöntemdir. Floresan metodlar

kullanan otomatize analizörler ile 48 saatte sonuç verebilmesi avantajları arasındadır³⁵.



3-GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 *M. tuberculosis* suşları

Çalışmada 2004–2005 tarihleri arasında, Çukurova Üniversitesi Balcalı hastanesinde akciğer tüberkülozu tanısı ile takip edilen hastadan alınan balgam örneklerinden BACTEC-TB 460 sistemi ile izole edilip rifampisin ilaç dirençli (ÇİD) 25 suş kullanılmıştır.

3.2 Fenotipik yöntemlerle duyarlılık tespiti

Dört majör ilaç için duyarlılık testleri, modifiye proporsiyon metodu ile BACTEC 460 radyometrik sistem (Becton Dickenson and Company, Sparks, Maryland, USA) kullanılarak yapıldı. Test sonucunda; 0,1 µg/ml izoniazid, 2 µg/ml rifampin, 2,5 µg/ml etambutol ya da 2 µg/ml streptomisin varlığında elde edilen üreme indeksi kontrol tüpünden fazla ise (>%1) suş dirençli olarak kabul edildi. Çoklu ilaç direnci (ÇİD); en az izoniazid ve rifampine direnç olarak tanımlandı.^{41,42}

3.3 Moleküler çalışmalar

RIF direncine sebep olan mutasyonların tespiti için *M.tuberculosis* suşlarının, RNA polimeraz geninin β-alt ünitesini kodlayan gen olan *rpoB* geninin 250 bp'lik merkezi bölgesinin dizi analizi yapıldı. Dirençli izolatlar dizi analizi yapılana kadar, DNA ekstraksiyonları yapılarak – 70C° de saklandı.

3.3.1 DNA ekstraksiyonu

PZR analizi için kullanılan DNA, BACTEC 460 radyometrik sistem (Becton Dickenson and Company, Sparks, Maryland, USA) tespit edilen hücrelerden, Walsh PS ve ark. tarafından tanımlandığı gibi⁴³, aşağıdaki şekilde ekstrakte edildi;

1. Dirençli suşların ürettiği Bactec şişesi iyice vortekslendi
2. Şişenin lastik tıpası izopropil alkol ile iyice silindi,
3. Üremiş kültürden 1 ml'lik enjektörle 0,5 ml alınıp 1,5 ml'lik ependorf tüpüne konuldu,
4. Beş dakika 14000 rpm'de santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü, üstteki sıvı atıldı,
5. 250 µl kullanılmadan hemen önce vortekslenmiş *Chelex-100 (% 10'luk solüsyon) ilave edildi,
6. 10-15 sn. vortekslendi,
7. 10 dakika 60 C°'lik kuru ısı bloğunda veya su banyosunda inkübe edildi,
8. 10-15 sn. tekrar vortekslendi,
9. Beş dakika 100 C°'lik kuru ısı bloğunda veya su banyosunda inkübe edildi,
10. Oda ısısında soğumaya bırakıldı,
11. Üç dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildi,
12. Mycobacterium DNA'sını içeren süpernatant PCR için daha sonra kullanmak üzere -20 veya -70C°'de saklandı.

*Chelex-100 Solüsyonu (%10)

2.5 ml TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

7.5 ml distile su

1 gram Chelex-100 (Sigma)

Toplam 10 ml solüsyon kullanılıncaya kadar + 4 C°'de saklandı. Kullanılmadan önce vortekslenerek karıştırıldı.

3.1.2. *rpoB* mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tespiti

PZR çalışmaları, BD Advantage 2 PCR Emzyme System (BD Biosciences Clontech, CA, USA) kullanılarak 50 µl'lik amplifikasyon karışımı ile yapıldı. Her bir reaksiyon için 2 µl purifiye DNA örneği ve uygun primerler kullanıldı. PZR reaksiyon karışımına eklenen primerlerin konsantrasyonları 10 µM olarak ayarlandı. RIF direncinin karakterizasyonu için RNA polimeraz β alt ünitesini kodlayan gen olan *rpoB*'deki 249 bç'lik santral bölge amplifiye edildi. Bu amplifikasyon için 10 µM ROF ve 10 µM RIR primeri kullanıldı⁴⁴. Kullanılan primerler Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I. Mutasyon tespitinde kullanılan primerlerin baz dizileri

ROF: 5'- GTCGCCGCGATCAAGGA RIR : 5'- TGACCCGCGCGTACAC

Amplifikasyon koşulları:

Başlangıç denatürasyonu için 96C°de 3 dakika
Denatürasyon için 95C°de 50 saniye
Primer bağlanması için 65C°de 40 saniye } 25 siklus
Zincir uzaması için 72C°de 20 saniye }
Final uzama için 72C°de 3 dakika

Yukarıdaki koşullarda amplifiye⁴⁴ edilen *rpoB* bölgesine ait DNA, QIAquick PZR purifikasyon kiti (QIAGEN companies) ile pürifiye edildi. DNA dizi analizi için ABI-PRISM, Model 3700 kullanıldı. Sonuçlar elektronik olarak DNA-STAR programı (Madison, WI, USA) ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1 Duyarlılık testleri

Çalışmaya alınan 25 *M. tuberculosis* suşunun dört majör ilaca karşı duyarlılık profilleri Tablo II.de gösterilmiştir.

Tablo II. 25 *M. tuberculosis* suşunun dört majör ilaca karşı duyarlılık profilleri

Suş no	Direnç durumu			
	Etambutol	İzoniazid	Rifampin	Streptomisin
1	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
2	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Dirençli
3	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
4	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Dirençli
5	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Dirençli
6	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli	Dirençli
7	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
8	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
9	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
10	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
11	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
12	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
13	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
14	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
15	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
16	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
17	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
18	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
19	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Dirençli
20	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
21	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
22	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
23	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
24	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
25	Dirençli	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı

4.2 Mutasyon analizleri

RIF direnci görülen suşların tamamının aynı zamanda birden çok ilaca dirençli suşlar olduğu görülmüştür. Bu suşlardan 13/25 (%52)'ünde 531. kodon da, 7/25 (%28)'inde 526. kodon da, 1/25 (%4)'inde 522. kodon da, 2/25 'inde (%8) 516. kodon da ve 1/25 (%4)'inde de 513. kodon da mutasyon tespit edilmiştir. Kodon 516'da mutasyonu olan üç izolattan birinde aynı zamanda kodon 527'de mutasyon görülmüştür. RIF dirençli izolatlardaki *rpoB* mutasyonlarının sayıları ve dağılımı grafikte (Grafik:1) gösterilmiştir.



Dizi analizi ile tespit edilen ve yukarıda gösterilen mutasyonlara bağlı olarak genomda meydana gelen değişimler, aminoasit dizilimine tabloda (Tablo–III) gösterildiği şekilde yansımıştır.

Tablo III. Aminoasit dizilimi.

Alel/Kodon	Aminoasit değişimi	Sayı (%)
531 TCG TTG	Ser-Leu	10 (%40)
531 TCG TGG	Ser-Trp	3 (%12)
526 CAC TAC	His-Tyr	4 (%16)
526 CAC GAC	His-Asp	2 (%8)
526 CAC CGC	His-Arg	1 (%4)
522 TCG TGG	Ser-Trp	1 (%4)
516 GAC GTC	Asp-Val	2 (%8)
527 AAG AGG	Lys-Arg	1 (%4)
516 GAC TAC	Asp-Tyr	1 (%4)
513 CAA CCA	Gln-Pro	1 (%4)

5. TARTIŞMA

Ülkemizde rifampin dirençli *M. tuberculosis* izolatlarının moleküler karakterizasyonuna dayanan çalışmalar oldukça az sayıdadır^{4,45,46}. Bu çalışma, ülkemizde rifampin dirençli *M. tuberculosis* izolatlarını karakterize eden nadir çalışmalardan bir tanesidir. Çalışma yüksek tüberküloz insidansına sahip Çukurova bölgesinde yapılmıştır.

Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada; Çavuşoğlu ve arkadaşları RIF dirençli izolatlarda *rpoB* geninde en sık rastlanan mutasyonların kodon 531 (%56,1) ve kodon 526 (19,5)'da olduğunu, kodon 516'daki mutasyonların ise görece olarak düşük (%7,3) olduğunu gözlemişlerdir⁴. Bu çalışmada da *rpoB* geninde kodon 531'deki mutasyonların en sık (%52) olduğu görüldü. Bunu 2. sıra olan ve %28'lik görülme sıklığı ile kodon 526'daki mutasyonlar izliyordu. Kodon 516 %8 ile 3. sırada iken, 513, 522 ve 527'de aynı sıklıkta mutasyona rastlandı ve bu oran her bir kodon için % 4 idi. Bu çalışmanın sonuçlarıyla Ege bölgesinde yapılan çalışmanın sonuçları birbirine uyumlu iken, Malatya ilinde yapılan çalışmada ise 516. kodon mutasyonların sık görüldüğü 2. kodon olarak belirlenmiştir⁴⁶. Başka ülkelerde de yapılan çalışmalar da kodon 531 birinci sırada iken, 526 ikinci ve 516'daki mutasyonlar üçüncü sırada yer almaktadır^{2,3,5}.

Bazı çalışmalarda iki ayrı kodonda ya da aynı kodonda çifte mutasyon bildirilmiştir^{3,4}. Bizim çalışmamızda aynı kodonda çifte mutasyon gözlenmedi. Ancak bir kodonda çifte mutasyon gözlendi buda kodon 516 idi. Malatya'da Aktaş ve ark. yaptığı çalışmada ise ancak iki ayrı kodonda çifte mutasyonlar bildirilmiştir. İki ayrı kodonda çifte mutasyonun olduğu her durumda mutasyon olan kodonlardan birinin kodon 516 olduğu dikkat çekici olduğunu düşünmüşlerdir. Çalışmada tek başına ya da diğerleriyle kombine olduğu halde kodon 516'daki mutasyonların ikinci en sık mutasyon olduğu görmüşler ve kodon 516'daki mutasyonların sıklığını dikkate değer bulmuşlardır. Çünkü bazı

çalışmalarda bütün rifamisinlere karşı yüksek seviyede dirence neden olan kodon 531 ve kodon 526 mutasyonlarının aksine; kodon 511, 516, 519 ve 522'deki mutasyonların rifampin ve rifapentine karşı yüksek seviyede dirence neden olmakla birlikte bu mutasyonlara sahip suşların rifabutin, rifalazil ve KRM-1648'e duyarlı olduğu bildirilmiştir^{45,47}. Bu son ilaçlara duyarlı olan suşlar *rpoB* genindeki sekonder - mutasyonlarla direnç geliştirebilir⁴⁶. Ancak çalışmalarındaki izolatları diğer rifampin derivelerine karşı duyarlılık açısından test etmemişlerdir.

Van der Zanden ve ark.³, 44 farklı ülkeden 300 suştaki *rpoB* mutasyonlarını tanımlayan 59 çalışmanın bir derlemesini yapmışlardır. Bu derlemede ortaya çıkan sonuç CAA-513-CCA ve GAC-516-GTC mutasyonlarının Asya, Avustralya ve Rusya'da daha sık olduğu yönündedir. Çalışmamızda kodon 513'te üç mutasyon tespit edildi ve bu mutasyonların hepsi CAA-513-CCA şeklindeydi. Kodon 516'da mutasyonu olan üç izolat vardı ve kodon 516'da tekli mutasyonu olan bir suşta bu GAC-516-GTC mutasyonu idi. Kodon 516'daki diğer mutasyon GAC-516-TAC değişikliği şeklindeydi. Bu mutasyona bir izolatta AAG-527-AGG mutasyonu eşlik ediyordu.

Çalışmamızda en sık rastlanan mutasyon TCG-531-TTG şeklindeydi ve bu sonuç Ege ve Malatya bölgesindeki suşlarda saptanan bulgulara uyum gösteriyordu⁴. Kodon 531'de gözlenen diğer mutasyon TCG-531-TGG değişikliği idi. Çalışmamızda *rpoB*'deki 81 bç'lik sıcak bölge dışında kalan yeni bir mutasyon gözlenmemiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın ve daha önceden Ege bölgesinde ve Malatya ilinde yapılan çalışmaların sonuçları göstermiştir ki Türkiye'deki rifampin dirençli suşlarda görülen mutasyonlar, tüm dünyada rifampin direnci ile ilişkili olan mutasyonlara uyumludur. Klinik örneklerden izole edilen RIF dirençli *M. tuberculosis* suşlarının *rpoB* genindeki mutasyonlarının DNA dizi analizi ile tespiti ile genetik karakterizasyonu; Çoklu İlaç Dirençli (ÇİD) *M. tuberculosis* epidemiyolojisi ile tedaviye cevap alınamayan tuberküloz olgularının kontrolü ve yeni ilaçların oluşturulabilmesi için faydalı bilgiler sağlayabilir. Bu tarz yaklaşımlar; tuberküloz insidansının ve direncinin yüksek olduğu bölgelerde ilaca dirençli suşların yayılımını sınırlandırmada, tanı ve tedavide yardımcı olabilir.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Gillespie SH.** Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**; 46(2):267–74.
- 2- **Caws M, Duy PM, Tho DQ, Lan NT, Hoa DV, Farrar J.** Mutations prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. *J Clin Microbiol.* **2006** Jul;44(7):2333-7.
- 3- **Van Der Zanden, Te Koppele-Vije A.G., E.M., Vijaya Bhanu N., Van Soolingen D., and Schouls L.M.** Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **2003**; 41(3):1101–8.
- 4- **Cavuşoğlu C., Hilmioğlu S., Güneri S., and Bilgiç A.** Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol.* **2002**; 40(12):4435–4438.
- 5- **Titov LP, Zakerbostanabad S, Slizen V, Surkova L, Taghikhani M, Bahrmand A.** Molecular characterization of *rpoB* gene mutations in rifampicine-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus. *Biotechnol J.* **2006** Dec;1(12):1447-52.
- 6- **Mokrousov I, Jiao WW, Sun GZ, Liu JW, Valcheva V, Li M, Narvskaya O, Shen AD.** Evolution of drug resistance in different sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006** Aug;50(8):2820-
- 7- **Ahmad S, Mokaddas E, Fares E.** Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2002** Nov;44(3):245-52.
- 8- **Kapur V., Li L.L., Iordanescu S., Hamrick M.R., Wanger A., Kreiswirth B.N., and Musser J.M.** Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol.* **1994**; 32(4):1095–8.
- 9- **Isfahani BN, Tavakoli A, Salehi M, Tazhibi M.** Detection of rifampin resistance patterns in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Iran by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2006** Sep;101(6):597-602
- 10- **Ma X, Wang H, Deng Y, Liu Z, Xu Y, Pan X, Musser JM, Graviss EA.** *rpoB* Gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China. *Clin Microbiol.* **2006**; Sep;44(9):3409-12..

- 11- Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Geneva. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2005.349)
- 12- Durmaz R., Özerol I.H., Durmaz B., Günal S., Şenoğlu A., and Evliyaoğlu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. *Microbiol Drug Resist.* 2003 Winter; 9(4):361–6.
- 13- Goral G., Aydın O., and Ekici M. Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from treated patients in the province of Bursa, Turkey. *Clin Microbiol Infect.* 1997; 3(5):545–548.
- 14- Bengisun J. S., Karnak D., Palabıykoğlu I., and Saygun N. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Turkey, 1976–97. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32:507–510.
- 15- Tahaoglu K., Kızkın Ö., Karagöz T., Tor M., Partal M., and Sadoğlu T. High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75(5):321–3.
- 16- Kartaloğlu Z., Bozkanat E., Öztürkeri H., Okutan O., and İlvan A. Primary antituberculosis drug resistance at Turkish Military Chest Diseases Hospital in Istanbul. *Med Principles Pract.* 2002;11: 202–205.
- 17- Bankoff, H. Arthur, Christopher Ricciardi and Alyssa Loorya New York Tuberculosis and Health Association. Tuberculosis and other respiratory diseases in New York City, 1966. Complete set of data sheets. 1967
- 18- Brosch, S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser K. Eiglmeyer, T. Garnier, C. Gutierrez A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS* 2002; 99(6):3684–9
- 19- EUCAST discussion document E.dis 8.1 december 2001.
- 20- Türkiye’de tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı s:34
- 21- Otkun M. Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu . *Klimik dergisi.cilt 14.sayı 2. 2001. s.71–82.*
- 22- Maher D, Chaulet P, Spinaci S, Harries A. World Health Organization. Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes: Second Edition, Geneva: 1997.
- 23- http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- 24- http://www.verem.org.tr/pdf/sayfa_23-52.pdf
- 25- Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; Sep; 6(9):748–56.
- 26- Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.2. www.who.int/gtb/publications/drugresistance (10/07/2003).
- 27- de Souza MB, Antunes CM, Garcia GF. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* at a referral center for infectious diseases in the state of Minas Gerais, Brazil: sensitivity profile and related risk factors *J Bras Pneumol.* 2006 Sep-Oct;32(5):430-7. English, Portuguese
- 28- Balci I, Dikensoy O, Bayram A, Filiz A. Drug-resistant tuberculosis at the University Hospital in Gaziantep, South-eastern Turkey *J Int Med Res* 2000; 28(6):300–6.
- 29- www.klimik.org.tr/dergi/14.2/14.3.03.pdf
- 30- Tümer Ö. Dünyada Çok İlaç Dirençli Tüberküloza Karşı Çabalar.4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu. Simpozyum Kitabı. Abant.2002.

- 31- DOTS-Plus for multidrug-resistant tuberculosis. <http://www.who.int/gtb/policyrd/DOTsplus.htm> (Mart 2003)
- 32- **Koneman EW.** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5.ed.Philadelphia: JB Lippincott Co.1997: 935–937.
- 33- **NCCLS.** Antimycobacterial Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*; Tentative standart.2002.
- 34- **Kocagöz T.** *M.tuberculosis* için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4.Ulusal mikobakteri simpozyumu 2002.Simpozyum kitabı. S.115–124
- 35- **Saniç A.** Mikobakteriler ve Laboratuvar tanı. Samsun,1999; s:69–87.
- 36- **Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S.** Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3699-703.
- 37- **Durmaz R.** Tüberküloz ve direnç takibinde kullanılan moleküler yöntemler.1. Ulusal Tanıda Moleküler Genetik Kongresi. Kongre Kitabı. 2002; s: 41–48.
- 38- **Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aiznar J.** Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002; Feb;40(2):735.
- 39- **Long R.** Drug-resistant tuberculosis. CMAJ 2000; 163(4): 425–428.
- 40- **Van Soolingen, D., Hermans P.W., de Haas P.E., Soll D.R., and van Embden J.D..** Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 2578–2586.
- 41- **Van Embden, J.D., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., et al.** Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406–409.
- 42- **Aziz MA, Wright A, Laszlo A, De Muynck A, Portaels F, Van Deun A, Wells C, Nunn P, Blanc L, Raviglione M; WHO/International Union Against Tuberculosis And Lung Disease Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance..** Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis Lancet. 2006 Dec 16;368(9553):2142-54.
- 43- **Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 1991; 10(4):506-13
- 44- **Mokrousov I., Otten T., Vyshnevskiy B., and Narvskaya O.** Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(7):2231–5.
- 45- **Sarıbaş, Z., Kocagöz T., Alp A., and Günalp A.** 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. 2003; 41(2):816–8.
- 46- **42-Aktaş E. et all .** Molecular Characterization of Isoniazid and Rifampin Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Malatya, Microbiol. Drug Resistance. 2005; 11(2):94–99.
- 47- **Williams, D.L., Spring L., Collins L., Miller L. P., Heifets L. B., Gangadharam P.R., and Gillis T.P.** Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* . Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42: 1853–1857.

8. ÖZGEÇMİŞ

25.10.1981 tarihinde ADANA'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Özel Çağ kolejinde tamamladım. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimime başlayıp, 2003 yılında mezun oldum. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji A.D.'da. yüksek lisans eğitimime başladım. İyi derecede İngilizce ve Almanca bilmekteyim.

Mediha Begüm KAYAR