

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MERSİN İLİNDE İZOLE EDİLEN STREPTOMİSİN
DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSİS
KOMPLEKSİ İZOLATLARIN *rpsL* VE *rrs* GEN BÖLGESİ
MUTASYONLARININ DNA DİZİ ANALİZİ İLE
GÖSTERİLMESİ**

Mahmut ÜLGER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gönül ASLAN

MERSİN - 2007

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MERSİN İLİNDE İZOLE EDİLEN STREPTOMİSİN
DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSİS
KOMPLEKSİ İZOLATLARIN *rpsL* VE *rrs* GEN BÖLGESİ
MUTASYONLARININ DNA DİZİ ANALİZİ İLE
GÖSTERİLMESİ**

Mahmut ÜLGER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gönül ASLAN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TM (MÜ) 2007-1YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

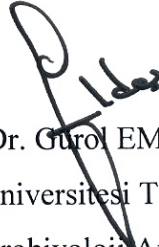
MERSİN - 2007


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “*Mersin İlinde İzole Edilen Streptomisin Dirençli Mycobacterium tuberculosis Kompleksi İzolatların rpsL ve rrs Gen Bölgesi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi*” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

16.07.2007


Prof. Dr. Güröl EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Gönül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi/Danışman


Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 24.07.2007 tarih ve 2007/222 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gönül ASLAN başta olmak üzere değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALIOĞLU, Sayın Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni maddi ve manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi, Genel Durumu, Tedavi ve Direnç Sorunu, Duyarlılık Testleri.....	4
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.1.2. Küresel Sağlık Tehlikesi.....	9
2.1.3. Dünyada Tüberküloz.....	11
2.1.4. Türkiye’de Tüberküloz.....	13
2.1.5. Tedavi ve Direnç.....	14
2.1.6. Duyarlılık Testleri.....	17
2.1.6.1. Klasik Fenotipik Yöntemler.....	18
2.1.6.1.1. Klasik Duyarlılık Testleri.....	18
2.1.6.1.2. Hızlı Duyarlılık Testleri.....	20
2.1.6.2. Yeni Fenotipik Yöntemler.....	23
2.1.6.3. Genotipik Yöntemler.....	25
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği.....	27
2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri.....	31
2.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi.....	35
2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
2.4. DNA Dizi Analizi.....	36
2.4.1. Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi.....	37

2.4.2. Sekans Reaksiyonu.....	38
2.4.3. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi.....	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	42
3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler.....	42
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	43
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	43
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
3.2.3. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler.....	46
3.2.3.1. Kullanılan Boyalar.....	46
3.2.3.2. Kullanılan Çözeltiler.....	47
3.2.4. Kullanılan Besiyerleri.....	49
3.3. Yöntemler.....	50
3.3.1. Agar Proporsiyon Yöntemi İçin İnokulumun Hazırlanması.....	50
3.3.2. PNB'li Besiyerine Ekim ve Üremenin Değerlendirilmesi.....	51
3.3.3. Biyokimyasal Testler.....	52
3.3.4. Moleküler Analiz.....	53
3.3.4.1. <i>M. tuberculosis</i> DNA Örneklerinin Hazırlanması.....	53
3.3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	54
3.3.4.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi.....	56
3.3.4.4. <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> Gen Bölgelerinin Tespiti.....	57
3.3.4.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	57
3.3.5. Sekans Reaksiyonu.....	57
3.3.5.1. Dizi Analizinde Kullanılacak Olan Sekans Camların Hazırlanması.....	59
3.3.5.2. Jel Solüsyonunun Hazırlanması ve Cam Kasete Dökülmesi.....	60
3.3.5.3. Elektroforez.....	61
3.3.5.4. Sekans Jelinin Gümüş Boyanması.....	62
3.3.5.5. Görüntüleme.....	64
3.3.5.6. Değerlendirme.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. İlaç Duyarlılık Test Sonuçları.....	65

4.2. İzolatların İdentifikasyonu.....	67
4.3. Biyokimyasal Test Sonuçları.....	67
4.4. Moleküler Analiz Sonuçları.....	67
4.4.1. PZR aşaması.....	67
4.4.2. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	68
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	77
7. KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.: PZR aşamaları.....	29
Şekil 2.2.: Zincir uzaması.....	29
Şekil 2.3.: PZR döngüleri.....	30
Şekil 2.4.: DNA dizi analizi ile DNA nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılması.....	37
Şekil 4.1.: Primer spesifik PZR yöntemi ile belirlenen direnç ile ilişkili <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> gen bölgelerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri.....	68
Şekil 4.2.: Amonyum-asetat yöntemi ile saflaştırılmış <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> gen bölgelerinin PZR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 4.3.: Gümüş boyama sonucu <i>rpsL</i> gen bölgesinde 43. kodonda görünen AAG→AGG nükleotid değişimi.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.: SM direncinden sorumlu <i>rpsL</i> ve <i>rrs</i> gen bölgelerine spesifik primer dizileri.....	54
Çizelge 3.2.: <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> gen bölgelerinin PZR reaksiyon karışımı.....	55
Çizelge 3.3.: SM direncinden sorumlu <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları	55
Çizelge 3.4.: Sekans reaksiyon karışımı.....	58
Çizelge 3.5.: SM direncinden sorumlu gen bölgelerinin dizi analizinde kullanılan reaksiyon koşulları.....	59
Çizelge 4.1.: Çalışmaya dahil edilen hastaların BACTEC 460 TB yöntemi ile antitüberküloz ilaç duyarlılık test sonuçları.....	65
Çizelge 4.2.: Çalışmaya dahil edilen hastaların BACTEC 460 TB ve agar proporsiyon yöntemi ile fenotipik ilaç duyarlılık test sonuçları.....	66
Çizelge 4.3.: SM direncinin moleküler analizinde çalışmadaki 20 izolatın direnç ile ilişkili <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> hedef gen bölgelerindeki gümüş boyama DNA dizi analizi sonuçları.....	70
Çizelge 4.4.: Gümüş boyama DNA dizi analizi ile, <i>rpsL</i> , <i>rrs-1</i> ve <i>rrs-2</i> hedef gen bölgelerinde SM direnci ile ilişkili tespit edilen mutasyonlar.....	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADT	Antibiyotik Duyarlılık Testleri
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
Arg	Arjinin
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
ÇİD	Çok İlaç Direnç
ÇİDTB	Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
DGTS	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksiribonükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Et-Br	Etidyum Bromid
GİDTB	Genişlemiş İlaç Dirençli Tüberküloz
Gln	Glisin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Lys	Lizin
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
PhaB	Phage amplified biologically
PNB	p-nitrobenzoik asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TB	Tüberküloz
Thr	Thrionin
UV	Ultraviyole

ÖZET

Mersin İlinde İzole Edilen Streptomisin Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi İzolatların *rpsL* ve *rrs* Gen Bölgesi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi

Streptomisin (SM) bakterilerde protein sentezini etkileyerek antimikrobiyal etki gösteren ve tüberküloz (TB) tedavisinde kullanılan major antitüberküloz ilaçlardan biridir. Bu çalışmada bölgemizdeki fenotipik ilaç duyarlılık testi ile SM direnci belirlenen izolatlarda, SM direncinden sorumlu *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerindeki mutasyon varlığının ve mutasyon paternlerinin DNA dizi analizi ile araştırılması amaçlanmıştır. Laboratuvarımızda 2003-2007 tarihleri arasında BACTEC 460 TB ile tanımlanan 304 izolattan SM dirençli 10 izolat ve SM'e duyarlı 10 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen suşların identifikasyonu ρ -nitrobenzoik asit ile, ilaç duyarlılıkları farklı konsantrasyonlardaki (SM 2 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$) agar proporsiyon yöntemi ile yeniden test edilmiştir. Genotipik analiz için spesifik primerler kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile ilaca karşı direnç ile ilişkili olduğu bilinen *rpsL* gen bölgesi ile *rrs* gen bölgesinin oldukça iyi korunmuş 530. ilmeği ve 912. bölgesindeki direnç ile ilişkili olabilecek nükleotid değişikliklerinin varlığı Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi yöntemi ile araştırılmıştır. SM dirençli 8 izolatın *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda AAG→AGG'ye dönüşüm şeklinde tek nokta mutasyonu belirlenmiştir. BACTEC 460 TB ile SM dirençli olarak belirlenen 2 izolat agar proporsiyon yöntemi ile SM2 ilaç konsantrasyonunda dirençli iken SM10 ilaç konsantrasyonunda duyarlı olarak tespit edilmiştir. Duyarlı 10 izolat ve SM10 ilaç konsantrasyonunda duyarlı 2 izolatta mutasyonla ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliği belirlenememiştir. Çalışmamıza dahil ettiğimiz SM dirençli *M. tuberculosis* kompleksi izolatlarının tümünde sadece *rpsL* gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *M. tuberculosis*, Streptomisin, Direnç, Dizi Analizi, *rpsL*, *rrs*

ABSTRACT

Characterization of *rpsL* and *rrs* Gene Region Mutations in Streptomycin Resistance *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates with DNA Sequence Analyses in Mersin Province

Streptomycin (SM) displays antimicrobial activity via inhibition of protein synthesis in bacteria and it is one of the major antituberculosis drugs used in chemotherapies of tuberculosis (TB). We aimed to investigate SM resistance isolates detected by phenotypic drug susceptibility assay, the presence of mutation in *rpsL* and *rrs* gene regions responsible for SM resistance and the mutation patterns with DNA sequencing system in our region. In our laboratory, between 2003-2007, in 304 isolates identified by BACTEC 460 TB 10 SM resistant and 10 SM sensitive isolates were included our study. Identification and the drug susceptibility of the isolates included the study were retested by p-nitrobenzoic acid and agar proportion method in different concentration of SM (SM 2 µg/ml and 10 µg/ml), respectively. For genotypic analysis using specific primers in Polymerase Chain Reaction (PCR) the presence of nucleotide changes, known to be associated with the resistance to the drug in the *rpsL* gene region and *rrs* gene region of highly conserved 530 loop and 912 region, were analyzed by Silver Sequence DNA Sequencing System. In 8 SM resistant isolates, single nucleotide point mutation AAG→AGG substitution was determined at codon 43 in *rpsL* gene region. 2 isolates identified by BACTEC 460 TB as SM resistant, with agar proportion method, while they were resistant to the drug concentration of SM2; in SM10 drug concentration they were determined as sensitive. In 10 sensitive isolates and in SM10 drug concentration, 2 isolates determined as sensitive none of nucleotide changes was determined associated with the mutation. All of the SM resistant *M. tuberculosis* complex isolates included in this study, the nucleotide mutation was determined only in the *rpsL* gene region.

Key words: *M. tuberculosis*, Streptomycin, Resistance, Sequence Analysis, *rpsL*, *rrs*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mycobacterium'lar *Mycobacteriaceae* familyasında bulunan tek genustur (1). Genus içinde, geçmiş insanlık tarihi kadar eski olan lepra ve tüberküloz (TB) etkenleri bulunmaktadır. Önce *Mycobacterium (M.) leprae* (Hansen-1874), daha sonra *M. tuberculosis* (Koch-1882) tanımlanmış, ilerleyen yıllarda sırasıyla sığır, kuş, soğuk kanlı hayvanlar ile farelerin TB basilleri izole edilmiştir (2).

Hastalığın bulaşıcı karakterde olabileceği ilk kez Fracastorius tarafından ileri sürülmüş, Willemin (1865) TB'dan ölen kişilerin akciğer kavite örneklerini tavşanlara inoküle ederek hayvanlarda hastalık oluşturmayı başarmıştır. Robert Koch 1882 yılında bakteriyi mikroskopta göstermiş, 1884'te klinik örneklerde izole ettikten sonra saf kültürünü yapmıştır (2).

TB bakterileri içinde *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* ve *M. microti* yer alır. Günümüzde TB olgularında en sık izole edilen tür *M. tuberculosis*'tir. *M. bovis* ve *M. africanum* ile meydana gelen infeksiyon oranı %1-3'tür. *M. microti* ise kemirici hayvanlar için patojendir. Deoksiribo nükleik asit (DNA) hibridizasyon çalışmaları ve restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak yapılan deneylerde bu bakterilerin tek tür veya *M. tuberculosis* complex (MTC) adı altında toplanması önerilmiştir (2).

TB; sebebinin bilinmesine, son 50 yıldır tedavisinin mümkün olmasına ve korunabilir bir hastalık olmasına karşın, halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. 1882-1982 yılları arasında geçen 100 yılda bir milyon kişi TB'dan ölmüştür ve günümüzde de her yıl iki milyon kişi TB'den ölmektedir. TB dünyada Afrika, Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik'te yaygın olarak görülmektedir. Dünyada TB'a bağlı ölümlerin %98'inin geri kalmış veya gelişmekte olan ülkelerde olduğu bilinmektedir (3).

2005 yılı epidemiyolojik verilerine göre ülkemizde toplam hasta sayısı 20.535, yeni vaka sayısı ise 18.753'tür (4).

TB'un kesin tanısı, uygun klinik örneklerde basillerin izole edilmesiyle olur. TB'un laboratuvar tanısındaki başarı, uygun klinik örneğin uygun koşullarda alınması ve laboratuvara taşınmasına bağlıdır. Mikobakterilerin izolasyonunda yumurta bazlı katı besiyerleri (Löwenstein-Jensen, Petragani, American Thoracic Society), agar bazlı katı

besiyerleri (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11) ve sıvı besiyerleri (Middlebrook 7H9, Dubos Tween albumin) kullanılmaktadır (2).

Mikobakteri türlerinin daha hızlı üremesini ve erken tanıyı amaçlayan ticari kültür sistemleri günümüzde çeşitli laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bu sistemler, radyometrik sistemler olabileceği gibi, oksijen kullanımı ve CO₂ oluşumunun kültür besiyerinin zeminindeki bir jel sistemine gömülü olan florometrik veya kolorimetrik sensörlerle tespitine de dayalı olabilir (5).

Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), klinik örneklerden *M. tuberculosis*'in izolasyon, identifikasyon ve antitüberküloz ajanlara duyarlılıklarının üç hafta içinde tamamlanmasını önermektedir. Konvansiyonel yöntemlerle bu kadar kısa süre içinde söz konusu özelliklerin ortaya konması mümkün olmadığından, yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (2).

Özellikle dirençli olgu sayısındaki artış nedeniyle, tedaviye bir an önce başlayabilmek ve yeni bulaşları önleyebilmek amacıyla, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda geliştirilmiş olan moleküler yöntemler, günümüzde TB tanısında rutin kullanımda yer almaya başlamıştır (6).

TB tedavisinde kullanılan ilk ilaç olan Streptomisin (SM), 1944 yılında Waksman tarafından bulunmuştur. Sonraları 1950'li yıllardan itibaren bulunan diğer TB ilaçları ile TB 18-24 ayda tedavi edilebilir hale gelmiştir. 1970'li yılların ortalarından itibaren TB tedavisi 6-9 aya indirilebilmiştir. Günümüzde ise 6 aylık tedavi rejimlerine geçilebilmiştir (7).

Mikobakteriler, kalın bir lipid tabakası içeren, karakteristik bir hücre duvarına sahiptirler. Bu kalın hücre duvarı 3 makro molekülden oluşur: Peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asit. Ayrıca beta (β) laktamaz ve diğer ilaç modifiye enzimleri salgılamaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı mikobakteriler, bakterilere karşı kullanılan ilaçların büyük bir çoğunluğuna doğal olarak dirençlidir. *M. tuberculosis* tedavisinde kullanılan major antitüberküloz ilaçlar SM, İzoniazid (INH), Rifampisin (RIF), Ehtambutol (EMB), Pirazinamid (PZA)'dir. Bu ilaçlardan; INH ve EMB hücre duvar biyosentezinde görevli olan enzimleri, SM protein sentezini, RIF transkripsiyonu, kinolonlar DNA replikasyonunu engelleyerek etki gösterirler (8, 9).

M. tuberculosis tedavisinde en çok korkulan konulardan birisi de kullanılan antitüberküloz ilaçlara direnç gelişimidir. Bu direnç kromozomal mutasyon sonucu olmaktadır (9). Uygun olmayan tedavi rejimleri ve hastanın kendisine uygulanan tedaviyi tamamlamaması ilaç dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açmaktadır (10).

1944'ten beri TB tedavisinde kullanılan SM, ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak translasyonu inhibe edip polipeptid sentezini engeller. Ribozomal protein S12'yi kodlayan *rpsL* gen bölgesindeki ve 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA)'i kodlayan *rrs* gen bölgesindeki mutasyonlar SM direncinden sorumludur (10, 11).

SM direncinden sorumlu nokta mutasyonlarının çoğu *rpsL* gen bölgesinde meydana gelmektedir. Bu bölgede en çok rastlanan mutasyon 43. kodondaki AAG→AGG değişikliği ile Lysin (Lys) aminoasitinden Arginin (Arg) aminoasitine; daha az rastlanan AAG→ACG değişikliği ile Lys'den Thrionin (Thr)'e değişimle sonuçlanan mutasyondur. Ayrıca 88. kodonda AAG→AGG (Lys→Arg) veya AAG→CAG (Lys→Glycin-Gln) aminoasit değişimi de meydana gelmektedir (11, 12, 13, 14, 15).

Tek nükleotid değişikliği antibiyotik direncine sebep olabilir. *rrs* gen bölgesindeki nokta mutasyonları 530. ve 915. nükleotidlerin çevresinde kümelenmiştir. 16S rRNA'nın 530 ilmeği çok iyi korunmuştur ve ikinci yapı modellerinde 915 bölgesi ile çok yakın bir konumda yer almaktadır. Her iki bölgedeki birkaç nükleotid ribozomal S12 proteini ile birbirini etkilemektedir. 530 ilmeğinin 491, 512 ve 516. nükleotidlerinde Sitozin (C) → Timin (T) değişimi bildirilirken; yine aynı ilmeğin 513. nükleotidinde Adenin (A) → C veya T değişimi bildirilmiştir. Bu genin 915 bölgesindeki, 903. nükleotidin C → A veya Guanin (G)'e ve 904. nükleotidin A → G'e değişimi görülmektedir (10, 12, 15, 16, 17).

Bu çalışmada bölgemizdeki fenotipik ilaç duyarlılık testi ile SM direnci belirlenen *M. tuberculosis* izolatlarının moleküler düzeyde dirençlerinin ortaya konulması amaçlanmaktadır. Bu amaçla SM direncinden sorumlu *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerindeki mutasyonların varlığı ve mutasyon paternlerini hedef alan DNA dizi analizi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberkülozun Tarihçesi, Genel Durumu, Tedavi ve Direnç Sorunu, Duyarlılık Testleri

2.1.1. Tarihçe

Mycobacterium cinsinin 150 milyon yıl öncesinden beri var olduğu düşünülmektedir (18, 19). *M. tuberculosis*'in erken tipi muhtemelen Doğu Afrika'da erken hominidlerle birlikte üç milyon yıl önce aynı zamanda evrimleşmiştir. Modern MTC üyeleri yaklaşık 15.000-35.000 yıl önce evrimleşmiştir (19). TB'un varlığı Mısır'da 5.000, Hindistan'da 3.300 ve Çin'de 2.300 yıl önce belgelendirilmiştir (18). Pott hastalığını içeren tipik iskelet bozuklukları Mısır mumyalarında bulunmuştur (19).

Mikobakterilerin, lipit bakımından zengin hücre duvarları ve stabilitelelerini artıran DNA'larındaki yüksek G-C oranından dolayı diğer bakterilere göre daha iyi korunmuş oldukları düşünülmektedir. Bu yüzden bu bakteriler, çok eski DNA'ları çalışmak için ideal mikroorganizmalardır. TB geniş coğrafik dağılımı olan çok eski bir hastalıktır. Bu hastalık Mısır ve Roma'da geniş alanlara yayılmış; Amerika'da Columbus'tan önce var olduğu belirlenmiştir (19).

Eski DNA üzerine yapılan bu çalışmaların diğer önemli bir başarısı, TB'nin insan kalıntılarında tipik patolojilerini göstermedeki doğrulayıcı yanıdır. Mikobakteriyal DNA İngiltere'de demir çağından kalma bir erkek insan iskeletinin omurgasındaki kemik yarasında tespit edilmiştir (19, 20). DNA teknikleri ayrıca mikobakteriyal DNA'nın varlığını, daha az sıklıkla, kemiklerde patolojik değişiklik olmadan, ölümden önce TB basillerinin dağılımını veya kronik miliyer TB'u göstermektedir (19).

Verem terimine ilk olarak Yunan kaynaklarında rastlanmaktadır. Milattan önce 460 yıllarında Hipokrat, veremi, zamanın en geniş yayılımı olan hastalık olarak tanımlamıştır. Aristo (M.Ö. 384-322) hastalığın bulaşıcı olduğunu düşünmüş, bir çok Yunan yazarı hastalığın kalıtsal olduğuna inanmıştır. Clarissimus Galen (M.S. 131-201)

veremi, akciğerlerin, göğüsün veya boğazın ülserasyonu, öksürükle sonuçlanan, düşük ateş ve irinden dolayı vücudun zayıflaması olarak tanımlamıştır (19).

Hastalığı tedavi etmedeki ilk denemelerin, deneme ve hatalara dayandığı ve efektif olmadığı belirtilmiştir. Romalı hekimler insan idrarında banyo yapmayı, kurt karaciğeri yemeyi ve fil kanı içmeyi tavsiye etmişlerdir. Orta Çağda İngiltere ve Fransa hükümdarına dokunmanın Kral Hastalığına ya da scrofulaya (sıklıkla TB ile ilişkili olan boyun lenf nodlarının şişliği) yakalanan kişileri iyileştireceğine inanılıyordu. Hastalar yaşadıkları zamana ve ülkeye göre dinlenmeye veya egzersiz yapmaya, yemek yemeye veya yemekten uzak durmaya, dağları gezmeye veya yeraltında yaşamaya zorlanıyorlardı (19).

Daha sonraları “Büyük Beyaz Veba” olarak bilinen 17. yy.’ın başlarında başlayan ve sonraki iki yüz yıl boyunca devam eden TB’un Avrupa’da epidemik olduğu belirtilmiştir. TB’dan ölümün kaçınılmaz olduğuna inanılıyordu ve 1650’lerde ölüm oranının en büyük sebeplerinden biriydi. Bu zamanda Avrupa ve Kuzey Amerika’nın büyüyen şehirlerindeki yüksek popülasyon yoğunluğu ve olumsuz sağlık koşulları hava kaynaklı bu patojenin yayılmasında gerekli ortamı sağlamıştır (19).

Bu hastalığın Amerika’da Columbus’tan önce var olduğu fakat yerliler arasında seyrek olduğu belirtilmiştir. Kuzey Amerika’nın yerli halkı arasındaki en büyük salgın 1880’de kamplarda barakalarda yaşamaya zorlandıklarında başlamıştır. Ölüm oranı hızla yükselmiş ve 1886’da 100.000 insanda 9.000 olmuştur (19).

TB’un ayrıca birbirinden uzak köylerde yaşayan Afrikalılar arasında da seyrek olduğu söylenmiştir. Avrupalılarla temasa geçtiklerinde bu hastalığa maruz kalmışlar ve yüksek ölüm oranları görülmeye başlanmıştır. Amerika’ya köle olarak götürülen Afrikalılarda TB’un olmadığı, daha sonra subakut ölümcül TB’un bu insanlar arasında gelişmeye başladığı belirtilmiştir. Kölelikten sonra bu insanların şehirlere yerleşmeleri ile TB morbidite ve mortalitesi hızla yükselerek 1912’de 100.000’de 700 olmuştur (19).

Bu hastalığın doğru patolojik ve anatomik tanımlaması 17. yy.’da ortaya çıkmıştır. Franciscus Sylvius de la Böe (1614-1672), hastaların akciğerlerinde ve diğer bölgelerinde tutarlı ve karakteristik değişiklikleri tanımlayan ilk kişidir. 1679’da yayımlanan *Opera Medica* adlı kitabında lezyonların tüberküllerden ülserlere ve kavitelere gelişimini tanımlamıştır (19).

İngiliz doktor Richard Morton (1637-1698) tüberküllerin TB'lu akciğerlerde her zaman mevcut olduğunu doğrulamıştır. Morton, hastalığın inflamasyon (yangı-tüberkül oluşumu), ülserasyon ve verem olmak üzere üç safhasının olduğuna inanmaktaydı. Hem Sylvius hem de Morton hastalığın kalıtsal olduğunu göz önünde bulundurmalarına karşın Morton yakın temas ile hastalığın yayılımından bahsetmemiştir (19).

Gaspard Laurent Bayle (1774-1816) tüberküllerin ürün veya sonuç olmadığını ama hastalığın önemli nedenlerinden olduğunu söylemiştir. “*tuberculosis*” terimi Bayle’ın teorisi ile aynı zamanda tıp literatürüne girmiştir. Alman doktor Johann Lukas Schönlein (1793-1864) 1839’da “*tuberculosis*” terimini tüberküllü hastalığı tanımlamak için kullanmış ama scrofula ve veremin farklı terimler olduğunu düşünmüştür (19).

1882’de Berlin’de Robert Koch (1843-1910) patates ve agardan oluşan katı besiyeri kullanarak bakterinin saf kültürünü elde etmede yeni metotlar bulmuştur. Koch ayrıca, Paul Ehrlich tarafından geliştirilen metilen mavisi boyası ve zıt boya olarak vesuvin temeline dayanan bakteri boyamada yeni metotlar geliştirmiştir. Koch 1890’da kendi adıyla anılan Koch postulatını yayınlamıştır. Bu postulat hastalığa neden olan mikrop ve hastalık arasındaki dört kriterden oluşmaktadır (19).

- Organizma hastalığa maruz kalan bütün hayvanlarda bulunmak zorundadır ama sağlıklı hayvanlarda bulunmamalıdır.
- Organizma hasta hayvandan izole edilmeli ve kültürde saf olarak üretilmeli.
- Kültürü yapılan organizma sağlıklı hayvana verildiğinde hastalığa neden olmalı.
- Organizma deneysel olarak infekte edilen hayvandan tekrar izole edilebilmeli.

1890’da Koch kobaylarda TB basillerinin gelişimini, önce ve sonraki maruziyetten sonra inhibe eden bileşiğin varlığından bahsetmiştir. Bu bileşik tüberkülin olarak adlandırılmıştır ve TB basillerinin sıvı kültürlerinin gliserol ekstraktlarından hazırlanmıştır (19, 21).

1895’te önemli bir ilerleme meydana gelmiştir. Wilhelm Konrad von Röntgen (1845-1923) X ışınlarını bulmuştur. Bundan sonra hastanın hastalığının ilerleyişi ve şiddeti belgelenebilir ve tekrar gözden geçirilebilir hale gelmiştir (19).

20. yy.'ın başlarında TB'dan korunulabileceği ve bu hastalığın kalıtsal olmadığı anlaşılmıştır. Birçok kurum geniş halk topluluklarını eğitmeye başlamıştır. Halk sağlığı yetkilileri iletişimin, reklamın ve ikna etmenin bir aracı olarak açıklayıcı posterler ve pullar kullanmışlardır. Bu yeni yöntem TB'a karşı geniş alanlara yayılmış kampanyalarda etkili bir eğitici araç olmuştur (19).

Edward Jenner'in inek çiçeği ile infeksiyonun çiçek hastalığına karşı immünite geliştirebileceğini göstermesinden sonra, birçok doktor sığır TB'u etkeni olan *M. bovis* kullanarak insan TB'una karşı aşı geliştirmeye yönelmiştir. 1908'den 1919'a kadar Albert Calmette (1863-1933) ve Camille Guerin (1872-1961) tarafından Fransa'da *M. bovis*'in patojenik suşunun 230 defa seri pasajı yapılmıştır. Bu pasajların sonunda Bacille Calmette-Guerin veya BCG diye bilinen, sığırlarda, atlarda, tavşanlarda ve kobaylarda avirulan olan, attenuue suş elde edilmiştir. BCG insanlara ilk kez 1921'de uygulanmış ve halen geniş çapta uygulanmaktadır (19).

İkinci Dünya Savaşı'nın ortalarında, kemoterapi döneminin başlamasıyla, binlerce yıldır insanlığı tehdit eden bakteriye karşı en önemli gelişme meydana gelmiştir. 1944'te Selman Waksman (1888-1973) ve öğrencisi Albert Shatz (1920-2005) *Streptomyces griseus*'tan SM'i saflaştırmayı başarmışlardır. İlaç basillere karşı in vitro, infeksiyonu takiben kobaylarda da in vivo aktivite göstermektedir. İlaç 1944 yılının sonlarında insanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Biri Avrupa'da ve diğeri de Amerika'da olmak üzere SM ile TB'lu hastaların tedavisinde iki öncü klinik çalışma yürütülmüştür. SM tedavisinde hastalarda önemli gelişmeler gözlenmiştir. Ama birinci ayın sonunda bazı hastalar kötüleşmeye başlamış ve bu öncü çalışmalar uygun bir şekilde yorumlanamamış; bunun gibi tedavi başarısızlıkları ilaca karşı direncin gelişmesi ile sonuçlanmıştır (19).

Aspirinin yapısının çok az değiştirilmesi ile yeni molekül, para-aminosalisilik asit (PAS), bakteriler tarafından aspirin gibi aynı yolla alınmakta fakat aspirinden farklı olarak bakteriyel solunumu engellemektedir. PAS ilk olarak 1944 sonlarında denenmiştir. PAS ile tedavi edilen ilk hastada iyileşme gözlenmiştir (19).

1940'ların sonlarında SM ve PAS ile kombine tedavinin tek ilaçlı tedaviden daha üstün olduğu gösterilmiştir. İki ilaçlı kombine tedaviye rağmen TB yenilgiye uğratılamamıştır. Akciğer TB'lu hastaların yaklaşık %80'i basilden arındırılmıştır fakat

geriye kalanlar, özellikle büyük hastalığı ve kavitasyonu olan hastalar, tedavi edilememiştir (19).

TB tedavisinde çok önemli bulgulardan biri, 1944-1948 yılları arasında iki farklı grup tarafından nikotinamidin TB basillerine karşı aktivitesinin bulunmasıdır fakat o tarihte bu buluşun değeri anlaşılamamıştır. Diğeri 1949'da Gerhard Domagk (1895-1964) tarafından geliştirilen yeni sentetik ilaç olan thiosemikarbazon ile Almanya'da 7.000 TB hastasından bir kısmının tedavi edilmesidir (19).

Thiosemikarbazon'daki benzen halkasının piridin halkası ile değiştirilmesiyle INH geliştirilmiştir. INH daha sonra klinik testlerde denenmiş ve hastalığın gelişimi üzerindeki önemli etkisinden dolayı bilimsel yayınlardan önceki haberlerde "muhteşem ilaç" olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte klinik çalışmalar sürerken bazı çalışmalar *M. tuberculosis*'in INH'e karşı direnç kazandığını göstermiştir (19).

John Crofton, TB tedavi kontrolünde önemli bir gelişme ile sonuçlanan bir protokol geliştirmiştir. Çok titiz ve uygulanabilir mevcut kemoterapiye dayanan bu protokol ile TB tedavisinde %100 oranında başarıya ulaşılmıştır. Bu başarı oranı üç ilacın (SM, PAS, INH) birlikte kullanılmasıyla elde edilmiş, TB tedavi edilebilir hale gelmiş ve cerrahi müdahaleye gerek kalmamıştır (19).

Yeni antitüberküloz ilaçların keşfi cesaret verici olmuştur. *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifamisin B adlı antibiyotik üzerindeki bazı değişimlerle, *M. tuberculosis*'e karşı çok güçlü etkisi olan RIF elde edilmiştir. Tarihsel gelişimin devamında PZA, EMB, sikloserin ve etionamid gibi yeni antitüberküloz ilaçlar keşfedilmiştir (19).

Sonuçta bu buluşlara rağmen TB, hala güçlü bir şekilde mevcudiyetini devam ettirmektedir. Balgam yayma pozitif TB hastaları öksürme, hapşırma, konuşma veya şarkı söyleme sırasında canlı basil içeren büyük veya küçük damlacıklar çıkartabilirler. Büyük damlacıklar hızlı bir şekilde yere çökerler ve eğer solunurlarsa üst solunum yolu tarafından yakalanırlar ve bölgesel mukosiliar membranlar tarafından yok edilirler. Daha küçük damlacıklar (1-10 µm) ise havada daha uzun süre asılı kalırlar. Balgamdaki nemli kısmın buharlaşması ile geriye damlacık çekirdeği kalır. Bunlar da sıklıkla TB'un infektif birimleri olan bir veya birkaç bakteriyi içermektedir. TB dağılım riskinin, çevredeki damlacık çekirdeğinin konsantrasyonuna bağlı olduğu saptanmıştır (19).

İnfektivitenin, çevresel koşullarla ve balgamdaki basil içeriği, kavitasyon varlığı, öksürme sıklığı, larengeal TB varlığı gibi kişisel koşullar ile ilişkili olduğu da bulunmuştur. Antitüberküloz ilaçlar ile tedavi, hastanın infektif partiküller üretmesini kontroldeki en etkili önlem olarak tanımlanmıştır ve böylece infektivite kolayca önlenebilmektedir (19).

2.1.2. Küresel Sağlık Tehlikesi

Avrupa ve Amerika'da halk sağlığındaki genel ilerleme, özel ilaçların geliştirilmesinden önce TB'un azaltılmasında yardımcı olmuştur. Başarılı kemoterapi ile güçlendirilmiş TB program aktiviteleri, infeksiyonun ve ölüm oranlarının azaltılmasında etkili olmuştur. Hastalık büyük oranda kontrol altına alınmış fakat tamamen kaybolmamıştır. Daha sonra 1985 yıllarında, gelişmiş ülkelerde TB tekrar yükselişe geçmiştir. Hapishane popülasyonunun artması, evsizlik, enjekte ilaç kullanımı, kalabalık evler ve TB'un endemik olduğu ülkelerden artan göç oranı gibi bazı ilişkiler bu yeniden aktiflik kazanmayı güçlendirmiştir. Bütün bunların arasında TB kontrol programlarının azalması ve İnsan İmmün yetmezlik Virusu (Human Immunodeficiency Virus-HIV)/Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (Acquired Immuno Deficiency Syndrome-AIDS) hastalığı TB'un tekrar ortaya çıkmasında etkili olan iki önemli faktördür (19).

TB programları gelişmiş ülkelerde önemini yitirmeye başlamıştır çünkü hastalığın neredeyse ortadan kaldırıldığı düşünülmekteydi. 1991 yılında yapılan bir çalışma 224 hastanın %89'unun TB tedavisi görüp taburcu edildikten sonra takip edilemediğini ve tedavinin tamamlanamadığını göstermektedir. Bu hastaların dörtte birinden fazlası bir yıl içerisinde hastaneye tekrar dönmüştür. Bu çalışma tutarsız veya kısmi tedavinin her yerde devam ettiğini yansıtmaktadır. Hastalar, kendilerini daha iyi hissetme, doktorların veya sağlık çalışanlarının yanlış tedavi rejimi uygulaması veya ilaca ulaşamama gibi değişik sebeplerden dolayı ilaçlarını gereken dönemde düzenli almayı durdurmaktadırlar. Bunun sonucu olarak bakterilerde ilaçlara karşı direnç gelişimi sıkça gözlenmekte ve sonuçta bütün etkili ilaçlara direnç gelişmektedir. Çok İlaça Dirençli Tüberküloz (ÇİDTB) terimi, en güçlü antitüberküloz ilaçlar olan INH ve

RIF'in en azından her ikisine de dirençli olan *M. tuberculosis* izolatları için kullanılmaktadır. ÇİDTB tedavisi, daha pahalı ve yan etkileri daha fazla olan, ikinci kuşak ilaçlarla ve daha uzun sürede olmaktadır (19).

TB'un dünya genelindeki kontrolünde HIV/AIDS yıkıcı bir etki yapmıştır. HIV ile infekte immün yetmezlikli hastaların onda birinde aktif TB gelişmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde özellikle 20-35 yaş grubunda HIV enfeksiyonunun TB'un kontrolünde olumsuz etkisi vardır (19).

İyi bir halk sağlığı koruma sistemi olan gelişmiş zengin ülkelerde TB kontrol altında tutulmaya çalışılırken, gelişmekte olan ülkelerin çoğunda bir felaket beklenmektedir. Yeteri kadar gelişmemiş ülkelerde, ilaç tedavisi ve aşılardan sonra bile insidansın yüksek kalması, TB'un halk sağlığı için önemli bir tehlike olduğunu göstermektedir. Dünya genelindeki kayıtlı yeni TB vakaları ekonomik koşullarla kabaca ilişkilidir. Yüksek insidans, düşük ulusal geliri olan, Afrika ülkelerinde, Asya'da ve Latin Amerika'da görülmektedir (19).

Doğrudan gözetimli tedaviyi içeren denetimli tedavi, hastaların ilaçlarını düzenli almasına ve tedavilerini tamamlamada yardımcı bir yol olarak önerilmekte, böylece tedavi sağlanmakta ve ilaç direnci gelişimi önlenmektedir. Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS) 1991 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından TB kontrolü için uygulanan resmi politikadır (19).

DSÖ, her yıl sekiz milyon kişinin TB'a yakalandığını ve bunların %95'inin de gelişmekte olan ülkelerde olduğunu, yılda iki milyon kişinin TB'dan öldüğünü tahmin etmektedir. 1993 yılında DSÖ TB'u küresel sağlık tehdidi olarak ilan etmiştir (19).

DSÖ, 2000 yılında TB'u Durdurmada Küresel İşbirliği kuruluşunu ve bazı hedefleri desteklemiştir. Bu hedefler şunlardır (19):

- 2005 yılına kadar: TB ile infekte hastaların %70'i teşhis edilecek ve bunların %85'i tedavi edilecek
- 2015 yılına kadar: Küresel TB yükü %50 azaltılarak 1990'lardaki seviyeye getirilecek
- 2050 yılına kadar: TB'un küresel insidansı milyonda birin altına indirilecek

Bütün bu küresel çabalara rağmen, TB ürkütücü bir tehdit olarak ortaya çıkmaya devam etmektedir. HIV/AIDS ile ilişkili TB'un ölümcül bir formu, Güney Afrika'nın kırsal kesimindeki bir hastanede 2005 yılında kötü bir örnek olarak ortaya çıkmıştır. Genişlemiş İlaç Dirençli Tüberküloz (GİDTB) olarak isimlendirilen bu olayda, ÇİDTB'a ilaveten sekonder ilaçlara da direnç gelişimi gözlenmiştir (19, 22). Sekonder ilaçların yanlış kullanılması ya da bu hastaların sekonder ilaçlarla yanlış tedavi edilmesi sonucu da GİDTB gelişebilmektedir (19, 23). GİDTB tehlikesi sadece Afrika ile sınırlı değildir. Son zamanlarda 14 ulusal laboratuvarında yapılan ilaç duyarlılık testleri sonuçlarına göre 48 ülkede tanımlanan suşların %19,9'unun ÇİDTB ve bu ÇİDTB suşlarının %9,9'unun da GİDTB olduğu belirtilmiştir. Çalışılan bu suşlar altı kıtadan gelmektedir ve GİDTB'un dünya çapında ciddi bir halk sağlığı problemi olarak değerlendirilmektedir (19, 24).

Günümüzde TB tedavisi, düşük gelirli ülkelerde bile, eğer iyi laboratuvar altyapısı, uygun tedavi rejimleri ve hastalığın yayılımının önlenmesi gibi güvenilir halk sağlığı uygulamalarına dayanırsa etkili bir şekilde yapılabilir. GİDTB tehlikesi temel kontrol önlemlerinin geliştirilmesini teşvik etmelidir (19).

2.1.3. Dünyada Tüberküloz

Dünya genelinde üç kişiden biri, toplam da ise iki milyar kişi, *M. tuberculosis* ile enfektedir. TB, ölüme sebep olan hastalıkların küresel sıralamasında yedinci sırada bulunmaktadır. Bu hastalığı önlemek için yoğun çaba harcanmadıkça 2020'ye kadar bu pozisyonunu sürdüreceği düşünülmektedir (19, 25).

Elli yılı aşkın bir süredir bu hastalığın tedavisinde etkili ilaçlar kullanılıyor olmasına karşın dünyada 15 saniyede bir kişi TB'dan ölmektedir. Her gün her saniye yeni bir insan *M. tuberculosis* ile enfekte olmakta ve tedavi edilmez ise aktif TB'lu bir hasta 10-15 kişiyi enfekte edebilmektedir (19).

TB, sosyoekonomik gelişimi de engellemektedir. Ekonomik olarak üretken yaş grubu olan 15-54 yaş arasındaki insanların %75'i TB'ludur. Bütün vakaların %95'i ve ölümlerin %99'u gelişmekte olan ülkelerde, Sahra altı Afrika ve Güneydoğu Asya ülkelerinde meydana gelmektedir (19, 26).

TB epidemiyolojisinde HIV infeksiyonunun önemli bir etkisinin olmasının yanında diğer potansiyel risk faktörleri biraz ihmal edilmiştir. Gelecek yıllarda diyabet, yetersiz beslenme, sigara ve hava kirliliğine bağlı solunum sistemi hastalıkları gibi kronik hastalıklar ve TB arasındaki etkileşime daha fazla dikkat edilmelidir (19, 27).

DSÖ 2004 yılında 8,9 milyon (140/100.000) yeni TB vakası olduğunu tahmin etmektedir. Bu vakaların yaklaşık 3,9 milyonu (62/100.000) hastalığın en infektif formu olan balgam yayma pozitif hastalardır. 2004 yılında, HIV ile infekte olanlarda dahil olmak üzere, 1,7 milyon (27/100.000) kişinin TB'dan öldüğü tahmin edilmektedir. DSÖ Afrika bölgesi, tahmin edilen en yüksek insidans oranına (356/100.000) sahiptir, fakat TB'lu hastaların büyük bir çoğunluğu, nüfusun en yoğun olduğu ve yeni vakaların yaklaşık yarısının (%48) görüldüğü ülkeler olan Bangladeş, Çin, Hindistan, Endonezya ve Pakistan'da yaşamaktadır (19, 26, 28).

2004 yılında tahmin edilen TB insidansı küresel olarak her yıl %0,6 artmasına rağmen DSÖ'nün altı bölgesinin beşinde bu insidans sabittir veya düşüş göstermektedir. HIV'in yayılımı ile birlikte TB insidansının hala artmakta olduğu bölge Afrika bölgesidir. Bununla birlikte Afrika ülkelerinde HIV epidemisinin yavaşlaması ile birlikte vaka sayısındaki artış oranı da her yıl azda olsa azalmaktadır. Doğu Avrupa ülkelerinde (özellikle eski Sovyetler Birliği ülkelerinde) insidans 1990'lara kadar artmış, 2001 civarında en üst seviyesine ulaşmış ve o tarihten itibaren düşmeye başlamıştır. Doğu Avrupa bildirimlerinde vakalardaki bu ortalama azalış başlıca Rusya, Estonya, Letonya ve Litvanya verilerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte Tacikistan ve Özbekistan gibi Orta Asya ülkelerinde insidans oranı hala yükselmektedir (19, 26, 28).

Diğer bütün bölgelerde insidans oranı 1990 ve 2003 yılları arasında sabit veya sürekli olarak düşmektedir. Bu düşüş Latin Amerika ve Orta Avrupa'da nispeten daha hızlıdır. Özetle insidans oranındaki küresel gidiş, 1995'te yılda %1,5 oranında hızla artmış fakat o tarihten sonra yavaşlamıştır. Eğer bu vaka bildirimleri doğruysa ve bu küresel gidiş devam ederse, 2015 yılında küresel insidans oranı 100.000'de 150'ye yükselecektir ve o yıl on milyondan fazla yeni vaka ile sonuçlanacaktır (19, 26, 28).

2.1.4. Türkiye’de Tüberküloz

Ülkemizde verem savaşı 1918 yılında gönüllü kuruluşlar ile başlamıştır. 1930 yılında çıkarılan Umumi Hıfzıssıhha Kanunu ile bu mücadelenin yasal altyapısı oluşturulmuştur. 1949 yılında Veremle Mücadele Kanunu bu yasal altyapıyı tamamlamıştır. 1952 yılında BCG kampanya dönemi başlatılmış, daha sonraki yıllarda önce Verem Savaşı Genel Müdürlüğü, daha sonra Verem Savaşı Daire Başkanlığı olarak Sağlık Bakanlığı çatısı altında veremle mücadele çalışmaları programlı olarak devam etmiştir (4).

DSÖ tarafından halen en maliyet etkin mücadele yöntemi olarak DGTS belirlenmiştir. Bu çerçevede ülkemizde 2000 yılında ilk uygulamaları başlayan DGTS, 2003 yılı itibariyle pilot olarak uygulanmış, 2006 yılında tüm ülke geneline yaygınlaştırılmıştır (4).

Ülkemizde yeterli ve güvenilir çalışmaların olmamasından dolayı konu ile ilgili kapsamlı kesin veriler yoktur. 1950-1970 yılları arası değerlendirildiğinde bu yıllarda hastalık prevalansının ve TB’den ölümlerin düştüğü gözlenmektedir. Ancak 1970’lerden itibaren bu sorunun öneminin küçümsenmesi ve konuya ilginin azalmasıyla infeksiyon riskinin tekrar artmaya başladığı gözlenmiştir. 1981-1982 yılları arasında 80.000 kişinin tarandığı ulusal prevalans çalışmasında hastalık prevalansı binde 3,58 bulunmuştur. Ancak bu veriler bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Yine bu araştırmada saptanan vakaların ancak yarısının dispanserlere kayıtlı olduğu görülmüştür (29).

1985’ten sonra ulusal düzeyde kapsamlı çalışmalar yapılmadığından, çoğu Verem Savaş Dispanseri kayıtlarına dayanan yetersiz ve güvenilir olmayan veriler mevcuttur. Çünkü bu dispanserlerde TB tanısı çoğunlukla bakteriyolojik bulgulara dayanılarak konulmamaktadır. Mevcut vakaların sadece %50’si saptanabilmekte ve saptanan vakaların yarısından azı tedavi edilebilmektedir (29).

DSÖ’nün koyduğu beklenen hedef yayma pozitif hastaların en az %70’inin bakteriyolojik olarak tanı almasıdır. Halen ülkemizde bu oran %65 civarında olup DGTS çerçevesinde %70 hedefinin yakalanması amaçlanmaktadır (4).

2005 yılı sürveyansı kapsamında ülkemizin epidemiyolojik verilerine göre toplam hasta sayısı 20.535, yeni vaka sayısı 18.753’tür. Tutulan anatomik lokalizasyona

göre 12.893 hastada akciğer, 5.359 hastada akciğer dışı ve 501 hastada akciğer ve akciğer dışı vaka kayıt altına alınarak takibi yapılmıştır. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı ise şu şekildedir: 0-4 yaş grubunda 293 hasta, 5-14 yaş grubunda 942 hasta, 15-24 yaş grubunda 4.962 hasta, 25-34 yaş grubunda 4.461 hasta, 35-44 yaş grubunda 3.201 hasta, 45-54 yaş grubunda 2.831 hasta, 55-64 yaş grubunda 1.886 hasta ve 65 yaş üzeri 1.959 hasta bildirilmiştir (4).

Bölgelere göre insidans ise Karadeniz Bölgesi'nde yüz binde 24,97; Marmara Bölgesi'nde yüz binde 43,85; Ege Bölgesi'nde yüz binde 21,77; İç Anadolu Bölgesi'nde yüz binde 13,80; Doğu Anadolu Bölgesi'nde yüz binde 17,60; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yüz binde 22,07; Akdeniz Bölgesi'nde yüz binde 18,04 ve Türkiye genelinde yüz binde 25,74 olarak hesaplanmıştır (4).

Ülkemizde 2005 yılı içinde 8.505 yayma pozitif, 5.793 kültür pozitif hasta ve 191 çok ilaca dirençli hasta bulunmuştur (4).

2.1.5. Tedavi ve Direnç

Antitüberküloz tedavide dönüm noktası 1944'te SM'nin Selman Waksman tarafından bulunması ile yaşanmış ve bu ilacın keşfi araştırmacılarına Nobel ödülü kazandırmıştır. Ancak 1946 yılının ilk dönemlerinde bu ilaca karşı ilk mutantlar rapor edilmiştir (30, 31).

Üç yıl sonra zayıf etkili bir tüberkülostatik olan PAS'ın tedaviye eklenmesi ile SM direncinin en çok %9'a kadar çıkabildiği gösterilince TB'da kombine tedavinin önemi anlaşılmıştır. Ancak PAS alan hastaların yarısından fazlasında görülen gastrointestinal yan etkiler önemli bir sorun oluşturmuştur; hastaların yaklaşık 1/3'ünde ilaç kesilmek zorunda kalınmıştır (30).

1950'nin başlarında INH ve izleyen yıllarda PZA, tiasetazon, etionamid, protionamid ve EMB bulunmuştur. Bu keşifler sanatoryumların sonunu getirmiş ve tedaviler ayaktan yapılmaya başlanmıştır. Türkiye'de de 1970'li yıllardan itibaren aynı süreç yaşanmıştır. Kemoterapideki son devrim 1966 yılında RIF'in kullanıma girmesi ile olmuştur. Bu keşif şu anda da uygulanmakta olan kısa süreli tedavinin yolunu açmıştır (30).

Günümüzde TB tedavisinde birinci seçenek ilaçlar INH, RIF, PZA, EMB ve SM'dir. EMB dışındaki birinci seçenek ilaçlar bakterisittir. Sikloserin etionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin ve PAS gibi ilaçlar ise ikinci seçenek ilaçlardır. Bu ilaçlar birinci seçenek ilaçlara göre daha toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Hastanelerde ve deneyimli hekimlerce kullanılmaları uygundur. Ayrıca TB tedavisinde amikasin, rifabutin, klofazimin, β -laktamaz inhibitörleri, kinolonlar gibi kullanımı deneme aşamasında olan ilaçlar mevcuttur (30).

TB tedavisinde birinci seçenek ilaçlar arasında yer alan SM hücre dışı alkali ortamlarda etkili bir ilaç olup, hücre içine ve inflamasyon olmadıkça beyin omurilik sıvısı (BOS)'na giremez. Hemen hemen tamamı böbrek yoluyla atıldığından böbrek yetmezliğinde birikir ve toksisitesi artar. En önemli yan etkileri ototoksitedir. Sekizinci kranial siniri etkileyerek bulantı, kusma, baş dönmesi ve işitme kaybına yol açabilir. İşitme kaybı, eğer hasar yoğunsa SM kesildiğinde kalıcı olabilir (30).

Günümüzde *M. tuberculosis*'e karşı gelişen ilaç direnci "Dirençli Mutant Basiller ve Antibiyotik Etkisinde Seleksiyon" kuramına göre açıklanmaktadır. Bu kurama göre ilaçlar ile hiç karşılaşmamış bir TB odağında basiller hızla çoğalırken, genlerinde meydana gelen değişiklikler sonucu ilaca karşı dirençli olurlar. Direncin ortaya çıkmasını sağlayan tek mekanizma nokta mutasyon sonucu kromozomal DNA'nın değişikliğe uğramasıdır ve bu olasılık antitüberküloz ilaçlar için 10^{-5} (SM için) ile 10^{-8} (RIF için) arasında değişir. İki ilaca aynı anda direnç gelişimi olasılığı, bu iki ilaca tek tek direnç gelişimi olasılıklarının çarpımı kadardır. Örneğin INH ve EMB için $10^{-6} \times 10^{-6} = 10^{-12}$ 'dir(32, 33). Dirençli mutant basiller, çok sayıda basil içeren TB odaklarında bulunurlar ve yalnız bir antitüberküloz ilaca karşı dirençlidirler. Bol sayıda basil içeren bir TB odağı tek bir antitüberküloz ilaç ile karşılaştığında hassas organizmaların inhibe olması ile beraber dirençli mutant basillerin seçici çoğalması sonucunda ilaç direnci gelişir (33).

Mikobakterilerde görülen çoklu direnç diğer birçok bakterideki gibi birden çok ilaca direncin aynı anda kazanımıyla değil, birbirinden bağımsız çeşitli genlerde adım adım ortaya çıkan mutasyonların birikimi sonucu gelişmektedir. TB basili ile diğer birçok insan patojeni arasındaki en belirgin fark, direncin mikobakterilere başka bakterilerden veya plazmid gibi hareketli ekzojen elementler aracılığı ile aktarılamamasıdır. İlaçlar uygun kombinasyon, uygun doz ve sürede kullanılmadığı

taktirde hassas olan mikobakteriler ölecek, dirençli olanlar lezyona hakim olacak ve ikincil direnç veya kazanılmış direnç gelişecektir. Dirençli bir topluluğun hassasa dönmesi imkansızdır, fakat uygun ilaç kombinasyonları ile bu basiller yok edilebilir (33).

TB'da ilaç direnci, *M. tuberculosis*'in tedavi edilemeyen bazı ÇİDTB suşlarından dolayı, TB kontrol programlarında büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu suşların tüm dünyaya dağılacığı kuşkusundan dolayı ilave kontrol önlemleri, yeni tanı metotları, tedavi için daha iyi ilaçlar ve daha etkili aşilar üstünde önemle durulmaktadır. Bununla birlikte GİDTB suşları da büyük bir problem oluşturmaktadır. Bu suşlar Çok İlaça Dirence (ÇİD) ilave olarak, ikinci seçenek ilaçların altı ana sınıfının (aminoglikozidler, polipeptitler, fluorokinolonlar, tioamidler, sikloserin ve PAS) en az üçüne dirençli olarak tanımlanmaktadır (34). DSÖ'nün yaptığı tanımlama ise GİDTB, en az RIF ve INH'a dirençli olan ÇİDTB'a ilaveten herhangi bir fluorokinolona ve TB tedavisinde kullanılan enjekte edilebilir üç ilaçtan (kapreomisin, kanamisin ve amikasin) en az birine dirençli olması şeklindedir (35). GİDTB hastalığın kontrolünde ve özellikle HIV ile infekte hastalarda ilaç direncinin dağılımında önemli bir tehlike oluşturmaktadır (22). Bu yüzden birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlara karşı ilaç direncinin hızlı belirlenmesi TB kontrol programlarının önemli bir unsuru haline gelmiştir (19).

1990'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D.) hastanelerde ortaya çıkan ve yüksek mortaliteye neden olan ÇİDTB salgınları hastalığa dikkat çekilmesine neden olmuştur. Dünyada direnç sorununun boyutunu araştırmak üzere DSÖ ve Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıklarına Karşı Birlik (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease-IUATLD) 1994 yılında uluslararası ilaç direnç paterni izleme programı başlatmıştır. Dokuz yıllık sonuçlar üç rapor halinde yayımlanmıştır. 1997 ve 2001 yıllarında yayımlanan ilk iki rapordan çıkarılan temel sonuç dirençli TB'un her kıtada ve hemen her ülkede bulunduğu ve TB kontrol programı iyi olan ülkelerde direnç sıklığının düşük olduğudur. 2004 yılında yayımlanan üçüncü raporda direnç oranları ve zaman içinde izlenen değişiklikler araştırılmıştır. Bu son raporda çalışma kapsamına alınan 77 bölgeden, 74'ünde ilaç direnci saptanmıştır. İlk iki raporda olduğu gibi ÇİDTB hemen her bölgede mevcuttur. Yeni olgular içinde ÇİDTB prevalansı %0 ile (Andora, Kamboçya, İzlanda, Lüksemburg, Malta, Yeni

Zelanda, İskoçya, İsviçre) %14,2 (Kazakistan ve İsrail) arasında saptanmıştır. ÇİD prevalansı Rusya Federasyonu, Estonya, Kazakistan, Letonya, Litvanya, Umman, Özbekistan, İsrail, Ekvator ve Çin'in bazı bölgelerinde kritik oran olarak belirtilen %6,5'in üzerindedir. Eski olgularda ortalama ÇİDTB prevalansı %7, en yüksek prevalans Kazakistan (%56,4) ve Umman (%58,3)'da saptanmıştır. Rusya Federasyonu ve Polonya'da zaman içinde ÇİDTB prevalansında belirgin artış, Hong Kong, Tayland ve A.B.D.'nde belirgin düşüş izlenmiştir. Batı Avrupa'da ÇİDTB prevalansı %1'den az, Orta Avrupa'da da %1,2'dir. TB insidansı yüksek toplumlarda, prevalans düşük olsa da ÇİDTB mutlak olgu sayısı yüksektir. Güney Afrika'da tüm yayma pozitif olguların %2,6'sı ÇİDTB iken, Kazakistan'da her 4 yayma pozitif olgudan biri ÇİDTB'dir. Her iki ülkede bu rakamlar her yıl 3000 ÇİDTB olgusunu ifade etmektedir. Bu ülkeler dünyada en fazla ÇİDTB olgusu saptanan ülkelerdir (36, 37, 38, 39).

Dünyada 2004 yılında tüm TB olgularının 424.203'ünün (%4,3) ÇİDTB olduğu tahmin edilmektedir. Bu olguların %62'si Çin, Hindistan ve Rusya Federasyonu'nda bulunmaktadır (39).

Araştırma yapılmamış ülkelerde ÇİDTB oranları bilinmemektedir. Ancak ÇİDTB gelişimine neden olan faktörler göz önüne alınarak bu ülkelerdeki oranlar tahmin edilebilmektedir. Böyle bir çalışmada Türkiye'de 2004 yılında yeni olgu sayısı 19.944, yeni olgular arasında olası ÇİDTB olgu sayısı 563 (%2,8; %0,5-%14,6); tedavi görmüş olgu sayısı 5.406, önceden tedavi görmüş olgular arasında ÇİDTB olgu sayısı 512 (%9,5; %1,3-%45,1) ve tüm olguların %4,2'sinin ÇİDTB olduğu tahmin edilmiştir. Ülkemizde standardize çalışmalar olmamakla birlikte değişik merkezlerden bildirilen raporlarda yeni olgularda ÇİDTB oranları %3,2 ile %4,8 arasında değişmektedir (39).

2.1.6. Duyarlılık Testleri

İlaç direncinin hızlı belirlenmesi TB kontrol programlarının önceliklerinden birini oluşturmaktadır ve direncin belirlenmesi hastalarda uygun tedavinin başlatılmasını sağlar. İlaç direncinin belirlenmesi eskiden, antibiyotik varlığında *M. tuberculosis*'in üremesinin tespit edilmesine dayanan konvansiyonel yöntemlerle yapılmaktaydı. Bununla birlikte, bu yöntemlerin bazılarının zahmetli ve sonuçların elde

edilmesi için gereken zamanın uzun olmasından dolayı, son yıllarda fenotipik ve genotipik yöntemleri içeren yeni teknolojiler ve yaklaşımlar önerilmektedir. Genotipik yöntemler daha az zaman gereksinimi, organizmanın gelişimine ihtiyaç duymaması, klinik örneklerle doğrudan uygulanabilir olması, düşük biyogüvenlik riski ve otomasyonunun yapılabilir olması gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte ilaç direncinin bütün moleküler mekanizmaları bilinmemektedir. Diğer taraftan fenotipik yöntemlerin uygulaması ve klinik mikobakteriyoloji laboratuvarlarında rutinde kullanılması daha kolaydır (19).

2.1.6.1. Klasik Fenotipik Yöntemler

Genelde fenotipik yöntemler, duyarlı ve dirençli suşları birbirinden ayırt etmede *M. tuberculosis*'in antibiyotik varlığında üremesinin engellenmesiyle tayin edilir. Fenotipik yöntemler, genellikle yumurta bazlı ve agar bazlı katı besiyerlerinde antibiyotik varlığında *M. tuberculosis*'in kültürüne dayanan yöntemlerdir ve direkt ya da indirekt yöntemlerle yapılabilir. Direkt yöntemde dekontamine ve konsantre edilen klinik örnek antibiyotik içeren ve içermeyen kontrol besiyerlerine ekilirken indirekt yöntemde izole edilen suşun süspansiyonu ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilmektedir (19). DSÖ/IUATLD, antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı belirlemede klasik kültüre dayalı, kabul edilebilir üç yöntem tanımlamıştır (40).

2.1.6.1.1. Klasik Duyarlılık Testleri

- **Mutlak Konsantrasyon Yöntemi**

Bu yöntemde ilaç içeren ve içermeyen besiyerinde iki kat dilüsyonda üreyen test edilen suşun standart inokulumu kullanılır. Bir suşun direnci, üreyen suşların tamamını veya tamamına yakın bir kısmını inhibe eden belirli bir ilacın en düşük konsantrasyonu olarak ifade edilir. İlacın kritik konsantrasyonu her bir laboratuvar tarafından

belirlenmelidir. Çalışma yapıldıktan 4 hafta, 37°C’de inkübasyondan sonra; eğer yeterince üreme yoksa 5-6 hafta sonra; testin yorumu yapılır. Eğer ilaçlı besiyerindeki kolonilerin sayısı 20’den az ise suş duyarlı olarak değerlendirilir (19, 40, 41).

- **Direnç Oran Yöntemi**

Bu yöntemde aynı anda çalışılan, test suşunun Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) ilaç duyarlı referans suş olan H37Rv’nin MİK değerine bölünmesi ile değerlendirilir. Böylece direnci bilinmeyen bir suş, standart suş ile değerlendirilir. Test edilen ilacın iki kat dilüsyonunu içeren tüplere test suşu ve standart suşun standardize edilen inokülumları ilave edilerek 4 hafta 37°C’de inkübe edilir. 20 veya daha fazla koloni içeren tüpler pozitif olarak kabul edilir ve 20’nin altındaki koloni sayısı MİK değeri olarak değerlendirilir. Direnç oran değeri 2 veya daha küçük olan izolat duyarlı, 8 veya daha fazla olan izolat dirençli olarak değerlendirilir (19, 40, 41).

- **Proporsiyon Yöntemi**

Dünya genelinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bilinen bir ilaca karşı dirençli mutantların oranlarının tam olarak belirlenmesine izin verir. Kısaca yüz kat sulandırılmış basil dilüsyonları ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine inoküle edilir. İlaçlı ve ilaçsız besiyerindeki koloniler sayılır ve dirençli mutantların oranı hesaplanır. Test Löwenstein-Jensen (L-J) besiyerinde yapılmış ise 37°C’de 28 günlük inkübasyon sonunda ilk okuma yapılır. Dirençli bakterinin oranı INH, RIF ve PAS için %1’den, diğer ilaçlar için %10’dan daha yüksekse suş dirençli olarak değerlendirilir ve test sonuçlandırılır; aksi taktirde test inkübasyonun 42. gününde, suşun belli bir ilaca karşı duyarlılığını değerlendirmek için tekrar okunur. Eğer test Middlebrook 7H10/11 gibi agar bazlı besiyerinde gerçekleştirilmiş ve %10’luk CO₂’li atmosferde inkübe edilmiş ise sonuçlar 21 gün sonra ya da eğer suşun dirençli olduğu gözlenirse daha erken değerlendirilir (19, 40, 41).

2.1.6.1.2. Hızlı Duyarlılık Testleri

Bu yöntemler ticari otomatize veya yarı otomatize kültür sistemlerinden oluşmaktadır. Bunlar

- Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460 TB, Becton-Dickinson, Sparks, MD)
- Floresan Kültür Sistemi (BACTEC Mycobacterium Growth Indicator Tube [MGIT] System 960, Becton-Dickinson, Sparks, MD; BACTEC 9000 MB Becton-Dickinson, Sparks, MD)
- Kolorimetrik Kültür Sistemleri (BacT/Alert 3D, bioMerieux, Durham, NC, USA; TK Kültür Sistemi, Salubris, MA, USA)
- Gaz Basınç Değişimini Saptayan Kültür Sistemi (VersaTREK, AccuMed, Chicago, Ill.)

➤ Radyometrik Kültür Sistemi

BACTEC 460 TB radyometrik metodu A.B.D.'nde Gıda ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmış ve birinci seçenek antitüberküloz ilaçların ilaç duyarlılık testi için “altın standart” olarak önerilmiştir. Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden geçirilen klinik örneklerden, zenginleştirilmiş ¹⁴C işaretli palmitik asit içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan şişelere (Middlebrook 7H12) ekim yapılır. Yağ asidi kullanılarak ¹⁴CO₂ ortaya çıkar ve şişeler periyodik olarak BACTEC 460 TB cihazına yerleştirilerek ¹⁴CO₂ saptanmaya çalışılır. Oluşan ¹⁴CO₂ miktarı üreme indeksi (Growth Index-GI) olarak cihaz tarafından saptanır. Üreme indeksi 500 olunca duyarlılık testi yapılır. Bir organizma antitüberküloz ilaç içeren besiyerine eklendiğinde duyarlı ise üreme baskı altına alınır. Bu kontrole kıyasla günlük üreme indeksinde azalma veya çok küçük artış şeklinde saptanabilir. Organizma dirençliyse çok az veya hiç baskılanma görülmez. Direncin %1 oranını tayin etmek için kontrol şişesinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı şişedekinden 100 defa daha azdır. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçların yanı sıra bazı ikinci seçenek

antitüberküloz ilaçların duyarlılık testleri de yapılabilmektedir. Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıklarının olması dezavantajdır. Geleneksel yöntemlerle ortalama 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktadır (19, 42).

➤ **Fluoresan Kültür Sistemi**

• **BACTEC MGIT 960**

Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren dip kısmı ruthenium kompleksi bulunan silikon bir tabaka ile kaplı tüpler kullanılmaktadır. Tüp içinde bulunan oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen ultraviyole (mor ötesi-UV) ışımına karşı fluoresan ışımaya oluşmazken, oksijenin mikobakteri veya kontaminant mikroorganizmalar tarafından kullanılarak tüketilmesi ve CO₂ birikmesi sonrası tüp dibine gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle fluoresan vermektedir. Saptanan fluoresan miktarı üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir. Duyarlılık testi için ilaçsız ve ilaçlı tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve saptama zamanı BACTEC 460 TB ile aynıdır. Radyoizotop kullanılmaması, sürekli monitörizasyon ile 960 tüpün aynı anda takibini sağlaması ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü azlığı en önemli avantajlarıdır (19, 42).

• **BACTEC 9000 MB**

Besiyerlerindeki oksijen kullanımının fluoresans ile belirlendiği bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyerlerine ekimden önce polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin (PANTA) ilave edilir. Sistemde balgam ve

diğer solunum yolu örnekleri için Myco/F sputa, kan ve diğer steril vücut bölgelerinden alınan örnekler için MycoF/lytic besiyeri kullanılır (43).

➤ **Kolorimetrik Kültür Sistemi**

- **BacT/Alert 3D**

Oleik asit - albümin - dekstroz - katalaz (OADC) ve bazı antibiyotikleri içeren modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanılır. Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460 TB'den daha uzundur. Diğer otomatik sistemlerle kıyaslandığında aralarında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu sistem, uygun şişeler kullanıldığında, mikobakteriyal kan kültürleri içinde uygundur (19, 42).

- **TK Besiyeri**

TK besiyeri içeriği Middlebrook besiyerinden tamamen farklı orijinal bir besiyeridir. Mikobakteri üremesini, içerdiği renk indikatörü sayesinde ortam pH'sının değişmesi sonucu besiyeri renginin kırmızıdan sarıya dönmesiyle gösterir. Katı bir besiyeri olduğu için renk değişiminden sonra kolonilerin oluşması ve gözlenmesini sağlar. Diğer kültür besiyerlerine göre önemli bir üstünlüğü kontaminasyonu gerçek mikobakteri üremesinden ayırt edebilme yeteneğidir. Mantar, Gram negatif bakteriler gibi sıkça görülen kontaminantlar ürettiği zaman besiyerinin rengi yeşile dönerek mikroskop ile inceleme öncesinde bunun anlaşılmasını sağlar. Diğer hızlı kültür sistemlerinde olduğu gibi TK kültür sistemi ile antitüberküloz ilaçlara duyarlılık bakılabilmekte, *M. tuberculosis* kompleks grubu bakteriler diğer mikobakterilerden ayırt edilebilmektedir. TK kültür sisteminin bir başka üstünlüğü kültür tüplerinin göz ile

rahatça değerlendirilebilmesi, herhangi bir okuyucu sisteme gereksinim duymamasıdır. Buna karşın iş yoğunluğu fazla olan merkezler için tüplerin otomatik olarak inkübe edilip izlendiği “MyColor TK” adı verilen çok gelişmiş bir okuyucusu bulunmaktadır (44).

➤ **Gaz Basınç Değişimini Saptayan Sistem**

Bu yöntemde VersaTREK (eski adı ESP system II) sistemi kullanılmaktadır. Modifiye Middlebrook sıvı besiyeri şişelerinde inokülasyondan sonra eğer mikobakteriler mevcutsa, metabolizmaları sonucu oksijen kullanımı ile şişedeki gaz basıncındaki değişiklikleri ölçerek üreme değerlendirmesi yapan tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Bu sistemde mikobakteriyal kan kültürleri de çalışılmaktadır. Ancak tam kan kullanılmamakta, inokülasyon için kandan sedimentin elde edilmesi için kanın işlenmesi gerekmektedir. Lisis santrifüj yöntemiyle elde edilen buffy-coat veya sediment inokülasyon için uygundur (19, 42).

2.1.6.2. Yeni Fenotipik Yöntemler

Klasik yöntemlerin sonuç vermek için zahmetli ve uzun zaman gerektirmesi, diğer taraftan da moleküler tekniklerin deneyimli personel gerektirmesi ve bu yöntemlerde kullanılan cihazların pahalı oluşu, TB’da ilaç direncinin belirlenmesinde alternatif ve kolay uygulanabilir yeni yöntemlerin araştırılmasını sağlamıştır. Bu yeni teknikler hem kültür izolatlarında hem de direkt olarak klinik balgam örneklerinde test edilmiştir (19).

➤ **Faja Dayalı Yöntemler**

M. tuberculosis’te ilaç direncinin hızlı tespiti için faja dayalı iki yöntem tanımlanmıştır (19).

- **Faj oğaltma Yöntemi**

Faj oğaltama biyolojik deneyinde (Phage Amplified Biologically-Pha B-Assay) mikobakteriler hem *M. tuberculosis* hem de hızlı üreyen mikobakterileri infekte eden bir faj aracılığı ile saptanır. Önce fajlar klinik örneğe eklenir. Örnekte mikobakteri varsa faj bunların içerisine girer ve ortama eklenen virüs öldürücü kimyasaldan (ferrus amonyum sülfat) korunur. Ortamdaki serbest fajlar öldürüldükten sonra mikobakteri içerisinde korunmuş fajlar hızlı üreyen bir mikobakteri (*M. smegmatis*) kültüründe çoğaltılarak faj plaklarının oluşması sağlanır. Faj plaklarının varlığı klinik örnekte mikobakteri olduğunu gösterir (19, 44).

- **Lusiferaz Genli Faj Yöntemi**

Ateşböceği lusiferaz geni taşıyan mikobakteriyofaj ile infekte mikobakteriler ortama lusiferin eklendiğinde görünür hale gelirler. Lusiferaz, ATP varlığında lusiferini oksitler ve ışık oluşmasını sağlar. Reaksiyonun oluşması için ATP'nin olması canlı ve cansız bakteri ayırımı yapılmasını sağlar. Bu yöntemle ilaç direnci çalışmaları da dört saat gibi kısa bir sürede mümkün olabilmektedir (19, 45).

➤ **Kolorimetrik Yöntemler**

- **Alamar Mavisi**

Bakteri ilaçlı ve ilaçsız Middlebrook sıvı besiyerlerine ekilerek 10-14 gün inkübe edilir. Kontrol tüpüne alamar mavisi eklenip, 50°C'de 2 saat bekletilir. Rengin maviden pembeye dönmesi üreme olduğunu gösterir. Üreme saptanmışsa aynı işlem ilaçlı tüplere uygulanır. Pembe renge dönmenin görüldüğü tüplerde üreme olduğu, o tüplerdeki ilaçlara karşı bakterinin dirençli olduğu saptanır. Üremenin ne zaman olacağı

tam olarak tahmin edilemediğinden birden fazla kontrol tüpü hazırlanması ve belli aralıklarla bu tüplerde üreme araştırılması gerekmektedir (19, 42).

- **Tetrazolium Tuzları**

Başlangıçta sarı olan tetrazolium tuzu, mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde, çözünmeyen pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona dönüşerek spektrofotometre ile ölçülebilir hale gelir (19, 43).

- **Nitrat Redüktaz Yöntemi**

M. tuberculosis'in nitrati nitrite dönüştürme kapasitesine dayanan, kültür ortamına eklenen kimyasal ile tespit edilebilen basit bir tekniktir. Antibiyotikli L-J besiyerinde üreyen *M. tuberculosis*'in inkübasyonun onuncu gününden sonra nitrati indirgemesine dayanır. Dirençli suşlar besiyerinde pembe-kırmızı renk meydana getirirlerken duyarlı suşlar antibiyotik tarafından inhibe edilip nitrati indirgeme yeteneklerini kaybederler (19).

2.1.6.3. Genotipik Yöntemler

1980'li yıllardan itibaren tüm dünyada TB olgularının artışı ilaç direnci ile birlikte gözlenmiştir. İlaç dirençlerinin geleneksel yöntemlerle saptanması, izolasyonda olduğu gibi zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemlerle, dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi direnci kanıtlarken, dirençli olduğu saptanan fakat mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençte başka gen bölgesi mutasyonları veya başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. RIF'e dirençli mutasyonlarda; genellikle, *rpoB*'nin 81 baz çiftlik gen bölgesinde nokta mutasyonların, delesyonların ve insersiyonların olduğu gözlenmiş ve bu bölge Rifampisin Direncini Belirleyen Bölge (Rifampin Resistance Determining Region-RRDR) olarak adlandırılmıştır. TB

tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlardan olması, moleküler yöntemlerle saptanabilirliği nedeniyle araştırmalar ve klinik kullanımda diğer antitüberküloz ilaçlardan çok rifampisin direncinin belirlenmesine çalışılmaktadır. Ayrıca RIF'e dirençli izolatların %90'dan fazlasında INH direnci de birlikte bulunduğundan İDTB için bir gösterge olduğu düşünülmektedir (46).

Direncin belirlenmesinde DNA dizi analizi, Tek Zincir Biçim eşitliliği (Single Strand Conformation Polymorphism-SSCP), Heterodupleks (HDF) Analiz, Katı Faz Hibridizasyon Yöntemi (Inno-Lipa, Innogenetics, Ghent, Belgium; GenoType MTBDR, Hain Lifesciences, Nehren, Germany), Floresans Rezonanslı Enerji Aktarımı (Fluorescence Resonance Energy Transfer-FRET) gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler direnç testleri; hızlı sonuç vermesi, kültür gereksiniminin minimal olması ya da olmaması nedeniyle avantajlı yöntemlerdir. Dirence neden olan mutasyonların çoğunun tespit edilmiş olması bu yöntemlerin esasını oluşturur. In-house ya da ticari testler uygulanabilir. Ancak bu yöntemlerin pahalı olmaları, dirençli organizma proporsiyonunu belirleyememesi ve sessiz mutasyonları (klinikte dirence neden olmayan) belirlemesi en önemli dezavantajlarındanadır (46, 47).

DNA dizi analizi ile ilaç direncine neden olan mutasyon, delesyon ve insersiyonların saptanması, antimikobakteriyel ilaç duyarlılığında moleküler altın standart olarak kabul edilmektedir. İlaç direncinden sorumlu bütün moleküler mekanizmaların bilinmemesi, zor ve yüksek maliyeti kullanımını kısıtlamaktadır (19, 46).

SSCP yönteminde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan ilaç direncinden sorumlu gen bölgesindeki çift zincirli DNA, ısı ile denatüre edildiğinde elde edilen tek zincirler içerdikleri nükleotid dizisine göre kıvrılmalar nedeniyle özgül yapı oluştururlar. Elektroforez sırasında zincirin özgül yapısı jel gözeneklerinden geçiş hızını etkilemesi nedeniyle, hastadan elde edilen izolatın ilaca duyarlı kontrol kökenden farklı sonuç vermesi o gende mutasyon olduğunu göstermektedir. Tek zincirli DNA'nın elektroforez jelinde görülebilmesi için genellikle radyoaktif bir madde ile işaretleme gereksinimi, deneyim gerektirmesi ve uygulama zorlukları nedeniyle günlük kullanıma girememiştir (40, 46).

HDF analizinde, ilaç direncine neden olan gen bölgesi, hem hastadan izole edilen basilden, hem de ilaca duyarlı olduğu bilinen bir kontrol suşundan PZR ile

çoğaltıldıktan sonra bir tüpte karıştırılıp, önce 95°C'ye kadar ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması, daha sonra oda sıcaklığına dek soğutulularak zincirlerin yeniden eşleşerek birleşmesi sağlanır. Farklı bakteriden geldiği halde uygunluk gösteren tek zincirler de bir araya gelerek heterodupleksler oluşur. Eşleşme duyarlı bir suşta tam, dirençli suşlarda heterodupleksler arasında mutasyon noktasında birleşmenin olmaması nedeniyle çift sarmal yapı bozulur ve zincirdeki bükülmeler elektroforez sırasında molekülün mutasyon bulunmayan DNA'dan farklı hızda yürütmesine neden olur. Çift zincirlerin Etidyum Bromid (Et-Br) ile boyanıp UV transluminatörde hemen gözlenebilir olması rutinde kullanılmaya uygun olmasını sağlamıştır (46).

Inno-Lipa yöntemi, RIF direncini saptamaya yöneliktir. Nitroselüloz membran üzerinde dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren proplar bulunmaktadır. PZR ile çoğaltıldıktan sonra dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu proplar ile hibridizasyona tabi tutulduğunda, mutant dizilere bağlanırsa dirençli olarak yorumlanır (19, 46, 48). GenoType MTBDR, kültür örneklerinde INH ve RIF direncinden sorumlu tutulan *katG* ve *rpoB* genlerinin tespitinde kullanılır. Testin çalışma prensibi Inno-Lipa ile aynıdır (19, 46, 49).

FRET yönteminde, PZR sırasında çoğaltılmış DNA molekülüne bağlanan biri 3' diğeri 5' ucu fluoresans ile işaretli ve çok yakın yerleşimli iki DNA probu arasında enerji aktarımı ile başlangıçta en yüksek miktarda fluoresans izlenirken, tüplerin yavaş yavaş ısıtılması ile fluoresansın azaldığı erime noktaları saptanır. Probu bağlandığı bölgede mutasyon varlığı, gevşek bağlanmaya ve erime nokta ısısının düşmesine neden olmaktadır. Bu yöntem ilaç dirençlerini belirleyen mutasyonların belirlenmesinde, klinik örneklerdeki mikobakterilerin saptanmasında ve tür düzeyinde tanımlamalarda kullanılmaktadır (46).

2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği

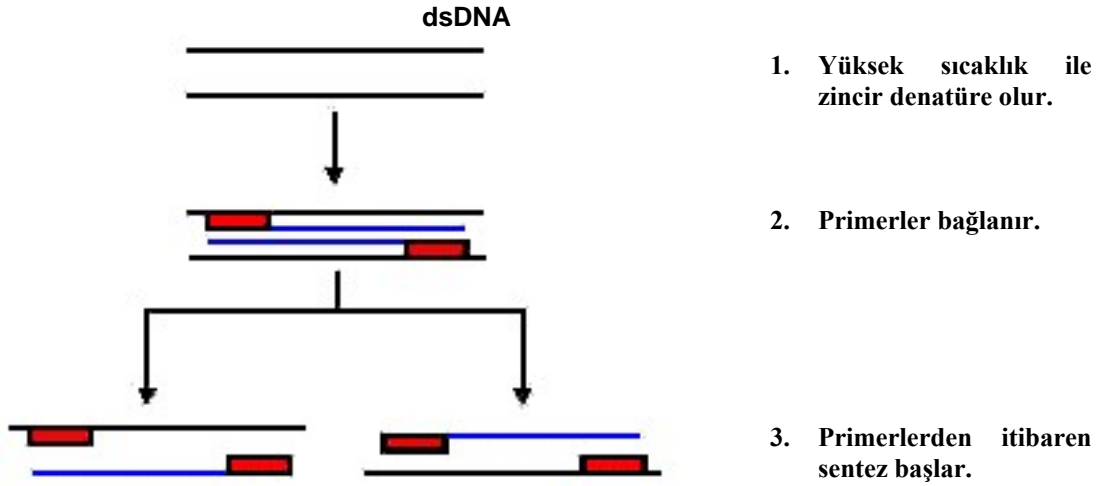
PZR, 1985 yılında ilk kez Kary Mullis tarafından amplifikasyona dayanan sistem olarak keşfedildi (50). Günümüzde ise moleküler biyolojinin temel uygulama tekniklerinden birisidir.

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir tüp test sistemidir. Hedef DNA/Ribonükleik asit (RNA)'in selektif olarak çoğaltılmasına imkan verir. İn vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'de in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir (51).

Amplifikasyon bazlı teknikler; birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyon için kalıp görevi gördüğü, birbirini izleyen siklus serisi içinde tekrarladıkları için "zincir reaksiyonu" (chain reaction) olarak adlandırılmıştır (50).

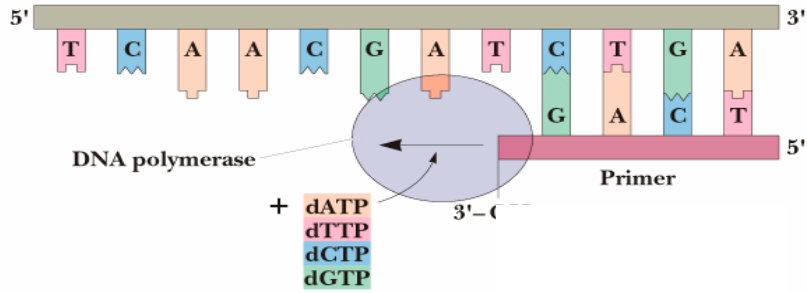
PZR dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki tane oligonükleotid, DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler farklı dizilere sahip olup, kalıp DNA'nın karşılıklı dizilerinde bağlanırlar. Kalıp DNA ilk önce primerlerin varlığında denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra, kalıp dizilere, primerlerin bağlanması için gereken sıcaklığa düşürülür. Bağlanmış olan primerler, uygun sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılması sağlanır (52). Kısaca PZR, temel olarak tekrarlayan 3 aşamalı bir yol izler (Şekil 2.1.). Bunlar (53):

1. Çift iplikli DNA (dsDNA)'nın ısı (90-95°C) ile tek iplikli DNA (ssDNA)'ya denatürasyonu
2. Ortamın 40-60°C'ye soğutulmasıyla primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) ssDNA'ya bağlanması (annealing)
3. Sıcaklığın 70-75°C'ye yükseltilmesiyle ssDNA kalıplarına bağlanmış olan primerlerden doğru 5'-3' yönünde zincir uzamasının (elongasyon) gerçekleşmesi



Şekil 2.1.: PZR aşamaları (54).

Zincir uzaması aşamasında kalıp DNA'ya bağlanmış primerlerin 3'-OH gruplarına kalıp DNA'daki bazlara uygun olarak deoksi-nükleotid-tri-fosfatlar (dNTP) bağlanarak zincirin uzaması sağlanır. Bu işlem ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq* polimeraz ile katalize edilir (Şekil 2.2.) (53).

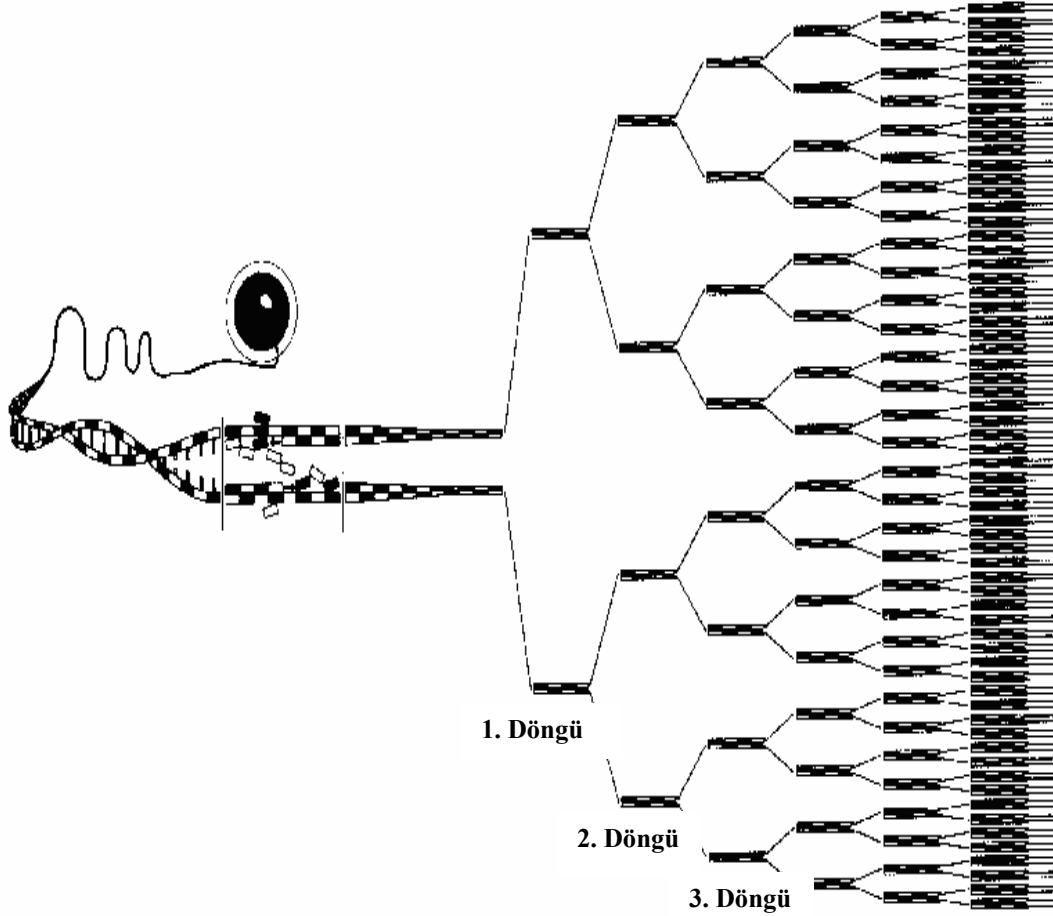


Şekil 2.2.: Zincir uzaması (53).

Uzamayı takiben orijinal DNA segmenti; yeni komplementer DNA'lar (cDNA) ve bunu takiben yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır (53).

Uygun şartlarda meydana gelen, denatürasyon, bağlanma ve uzama ile meydana gelen ilk basamak amplifikasyon işlemi ile DNA sentezi gerçekleşir. Daha sonra bu

işlem birçok kez tekrarlanır (52). Eğer bu üç siklus tekrarlatılırsa yani yeni zincirleme reaksiyon başlatılırsa, her siklusta bir öncekinin iki katı DNA molekülü (sadece primerler arasında kalan bölge) elde edilir. Bu düzen dahilinde yapılan yaklaşık 20-35 siklusun tamamlanmasıyla hedef nükleik asitin miktarı görünür bir şekilde milyontilyon kez (10^9 - 10^{12}) artmaktadır (Şekil 2.3.) (50).



Şekil 2.3.: PZR döngüleri (55).

Reaksiyon ortamındaki tüm bileşenlerin (tampon, nükleotidler, primerler, DNA ve enzim) termostabil olmaları nedeniyle, her siklus için sadece belirtilen sıcaklık değişikliklerinin yapılması yeterlidir. Bu işlem programlanabilir bir cihaz (thermal cycler, ısı döngü cihazı) ile otomatik olarak yapılmaktadır (50).

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri

Standart bir PZR reaksiyonu genellikle 50-100 µL'lik bir hacimde, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1,5 mM MgCl₂, 100 µg/mL jelatin, 0,25 µM primer çifti, 200 µM dNTP (herbir dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1-2,5 U *Taq* polimeraz ve örnek DNA'nın varlığında gerçekleştirilir. Reaksiyon termal döngülerin programlandığı ve uygulandığı bir ısı döngü cihazında gerçekleştirilir. Genel olarak 94°C'de 20 saniyelik denatürasyon, 55°C'de 20 saniyelik bağlanma ve 72°C'de 30 saniyelik uzamadan oluşan 30 siklusk bir döngü programı farklı uzunluklardaki birçok hedef dizilerin amplifikasyonu için kullanılabilir (53).

PZR'nin bileşenleri:

- Enzim
- Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)
- PZR Tampon İçeriği
- Oligonükleotidler (Primer)
- Hedef Diziler
- Sıcaklıklar ve Döngü Parametreleri

• Enzim

Oldukça yaygın kullanılan DNA polimeraz, *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*)'dan izole edilen *Taq* polimerazdır. *T. aquaticus*'un avantajı, yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasıdır. Ancak diğer termostabil DNA polimerazlar da kullanılmaktadır. *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Thermococcus litoralis*'ten elde edilen DNA polimerazlar gibi alternatif termostabil enzimler de kullanılabilir. *Taq* polimerazın aktivitesi kabaca 65-72°C arasında iki katına çıktığı için çalışmadaki ısı da önemlidir. *Taq* polimeraz aktivitesi 10 mM Tris'de 8.2-9.0 pH aralığında (25°C'de ölçülen) optimaldir ancak daha düşük veya yüksek pH aralığında aktivitesi azalmaktadır (56).

PZR protokollerinde kullanılan enzimlerin konsantrasyonu önemli derecede değişkendir. Günümdede en sıklıkta tercih edilen *Taq* polimeraz çoğunlukla reaksiyonlarda 1-2,5 U/100 µl konsantrasyonlarda kullanılır. Enzim konsantrasyonu çok yüksek olduğunda non-spesifik bağlanma, düşük olduğunda ise zayıf amplifikasyon etkisi olur (57).

- **Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTPs)**

dNTP'lerin optimal konsantrasyonu her reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmalı ve Magnezyum⁺² (Mg⁺²) konsantrasyonu ile uyumlu olarak kullanılmalıdır. Genelde dNTP konsantrasyonu 20 ile 200 mM arasındadır. Yüksek konsantrasyonlar düşük reaksiyon spesifitesi ve yüksek maliyet ile sonuçlanırken, düşük konsantrasyonlar normale göre daha az ürün eldesi ile sonuçlanır (57).

dNTP'lerin her biri liyofilize veya nötralize sulu solüsyonlar olarak elde edilebilir. -20°C'de her biri birkaç ay stabildir fakat liyofilize olanların kullanmadan önce KOH ile nötralize edilmeleri gerekebilir. dNTP'ler son konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde hazırlandıkları zaman, küçük hacimlerde (herbir 20 mM dNTP'den 50 µl) paylaştırılabilirler ve birkaç ay -20°C'de 100 katlı konsantrasyon şeklinde saklanabilirler (56).

- **PZR Tampon İeriği (Reaksiyon Buffer)**

Çeşitli reaksiyon tamponu formülasyonları bildirilmiştir. Fakat 1988'de Saiki ve arkadaşlarının tanımladığına benzer bir görüş birliği ortaya çıkmaya başlamıştır. Buna göre bir PZR tamponu; final konsantrasyonunda, 10 mM Tris (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, %0,01 jelatin, %0,01 NP₀₄ ve %0,01 Tween 20 içerir. Non-iyonik deterjanlar yerine %0,1'lik Triton X-100 kullanılabilir. Tuz konsantrasyonu değiştirilebilir (KCl'yi azaltmak veya ortadan kaldırmak için) ve yükseltilmiş Mg⁺² konsantrasyonu ile primerlerin daha iyi çalıştığı gözlenir. Ayrıca dNTP'ler ile Mg⁺² arasında dayanıklı etkileşimler de gözlenir. Bunun sonucunda dNTP'lerin yüksek

konsantrasyonu Mg^{+2} 'ye bağlanır ve mevcut Mg^{+2} konsantrasyonunu azaltır. Bu yüzden eğer dNTP'ler yüksek konsantrasyonda kullanılıyorsa, Mg^{+2} konsantrasyonunu artırmak gerekebilir (56).

PZR reaksiyon tamponundaki değişiklikler efektif bir amplifikasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle $MgCl_2$ konsantrasyonu amplifikasyonun gerçekleşmesinde ve spesifitesinde oldukça önemlidir. Genellikle her bir dNTP'nin 200 mM konsantrasyonunda bulunduğu bir reaksiyonda, 1,5 mM $MgCl_2$ optimal olarak kullanılabilir. Bununla beraber bazı reaksiyonlarda, farklı Mg^{+2} miktarı da gerekebilir. Reaksiyona katılan Mg^{+2} , önemli bir enzim kofaktörü olup, sentez olayını katalize etmenin yanında, hedef dizine primerlerin bağlanmasında da ayarlayıcı rolü olan bir elemandır. Konsantrasyondaki artış başlangıçta primer bağlantısının zayıf olmasına ve yanlış eşleşmelere neden olabilmektedir. Diğer taraftan yine yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu, zayıf reaksiyon spesifitesine, düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ise zayıf reaksiyon etkinliğine neden olabilmektedir. Reaksiyonda kullanılacak Mg^{+2} konsantrasyonu, nükleotid konsantrasyonu gibi hesaplanmalıdır (53).

- **Oligonükleotid Primerler**

Oligonükleotidler genellikle 18-30 baz arasında sentezlenir ama daha az karmaşık olan DNA'ların (plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'lar) amplifikasyonu için daha kısa primerler kullanılabilir (56).

Bir PZR'de başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri olan primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler arka plan ve özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur (58). Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. 24-30 bazlık uzun primerler 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır (56).

Düşük konsantrasyonda primer kullanımı az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük spesifiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı ampikonların tespiti ile mümkündür. Ancak yüksek primer

konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır. Primerlerin genellikle 0,1-0,5 μ M arasındaki derişimi en elverişli olanıdır (58). Sık aralıklarla tekrarlayan dondurup-çözdürme olmaksızın hazırlanan primerler -20°C'de amonyumlu sıvılarda uygun bir şekilde saklanabilirler (56).

- **Hedef Diziler**

Birçok farklı kaynak DNA'nın başarılı amplifikasyonu için materyal sağlayabilir. Bunun için DNA'nın amplifiye edilecek kısmının bozulmamış olması gereklidir. Bunun anlamı da parçalanmış DNA kaynağından amplifiye edilen kısımların daha kısa olacağıdır. Reaksiyon inhibitörlerinin (deterjan, EDTA, fenol kalıntısı) olmadığından da emin olmak önemlidir (56).

- **Sıcaklık ve Döngü Parametreleri**

PZR reaksiyonu için gereken 3 sıcaklık aşaması ve farklı sayılardaki döngüler günümüzde birçok üretici firma tarafından üretilen ısı döngü (thermal cyler) cihazları ile gerçekleştirilmektedir (53).

PZR sırasında çift zincirli DNA molekülünün, tek zincirli hale gelmesi için denatürasyon işleminin etkili bir şekilde yapılması gerekir. Genellikle başlangıçta örneğin 94°C civarında 5 dakika boyunca ısıtılması başarılı bir denatürasyon için yeterlidir. Başarılı bir PZR'de primerlerin, hedef diziye bağlanabilmesi için moleküler etkileşimlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu da kritik bağlanma sıcaklığına bağlıdır (57).

Denatürasyondan sonra ortam sıcaklığı 40-60°C'ye düşürüldüğü zaman reaksiyon karışımındaki primerler komplementer oldukları kalıp DNA dizilerine bağlanırlar (53). Genelde yüksek bağlanma sıcaklığı, primerlerin hedef diziye daha spesifik bağlanmasında ve hedef dizinin çoğaltılmasında (amplifikasyon) oldukça önemlidir. Düşük sıcaklık ise, hedef dizi ile primer dizisi arasında daha fazla uygunsuzluğa neden olabilir ve hedeflenen dizi dışındaki dizilerin non-spesifik olarak

çoğaltılmasına neden olabilir. Pratikte 55°C’de gerçekleştirilen bağlanma başarılı bir PZR için uygundur. Optimal bağlanma sıcaklığı, genelde MgCl₂ konsantrasyonu ile optimize edilir (57).

Bağlanmayı takiben ortam sıcaklığı 70-75°C’ye çıkarıldığında, primerlerin 3’ ucundan itibaren kalıp DNA’nın kopyasını teşkil edecek şekilde zincir uzamaları (elongasyon) başlar (53). Uzama zamanı hedef dizini derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. Kalıp DNA zinciri üzerindeki primerlerin uzaması için kabul edilen en uygun ısı derecesi 72°C’dir. 1 dakikalık uzama zamanı genellikle uzunluğu 2 kb’a kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır (52).

Optimal siklus sayısı 25-30 arasındadır. Nadiren 35 siklus uygulanabilir. Bununla beraber, 35’den yüksek (40-45) siklus sayısı uygulandığında genelde ortamdaki PZR karışımını oluşturan maddelerin azalması ile birbirleriyle olan kritik dengelerin bozulmasından kaynaklanan non-spesifik ürünlerin sentezlenmesi söz konusu olabilmektedir (53).

2.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi

2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Hedef bölgenin amplifikasyonundan sonra, elde edilen ürünlerin bir şekilde belirlenmesi ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla uygulanan en basit konvansiyonel yöntem agaroz jel elektrofrezidir (53). Agaroz, deniz yosunlarından elde edilmiş lineer bir polimerdir. Ticari olarak elde edilen agaroz tamamen saf değildir. Polisakkarit, tuz ve proteinler ile kontamine haldedir. Bu kontaminasyonun miktarı DNA’nın jelde göçünü etkileyebilmektedir. Bu yüzden firmalar agarozun kimyasal olarak formüle edilmiş formunu satmaktadırlar (58).

Elde edilen PZR ürünlerinin fragment büyüklükleri, çalışmanın en başında bellidir. Seçilen veya dizayn edilen primerlerin hedefledikleri bölge ya literatür bilgileri ile bilinir veya ilgili mikroorganizmanın gen haritasına bakılarak bu büyüklük hesaplanır. PZR’da elde edilecek olan fragment büyüklüklerinde aynı olması gerekir.

Bunun tespiti, elektriksel bir ortamda molekül ağırlığına göre ayrımının sağlandığı elektroforez metodlarıyla gerçekleştirilir. DNA negatif elektrik ile yüklü olduğundan dolayı pozitif kutba doğru göç eder. Agaroz jeli, porlu bir yapıya sahip olduğundan, elektriksel ortamda göç eden DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre birbirinden ayırır. Jel, ya elektroforezden önce veya elektroforezden sonra Et-Br gibi bir DNA boyası ile boyanır. Bu boya 312 nm dalga boyundaki UV ışığı ile fluoerans vermektedir (53).

Bu sebeple, Et-Br ile boyanmış jel UV transilüminatöründe görüntülenir ve fotoğrafı çekilerek incelenir. İstenen büyüklükteki DNA fragmentlerinin tespit edildiği örnekler “pozitif” kabul edilir. Fragment büyüklüğü hesaplamalarında, ticari olarak temin edilebilen standard DNA molekül ağırlığı kullanılmaktadır (53).

2.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da “DNA Sequencing” bir DNA örneğinin tüm nükleotid dizilerinin belirlenmesi anlamına gelmektedir. DNA çift polimerdir ve G, C ile ve A, T ile eşleşir. DNA'nın bir zinciri, cDNA zincirlerinin oluşturulmasını sağlar ve bu komplementer zincir orijinal zincirin tekrar oluşturulmasında kullanılabilir. Bu DNA replikasyonun ve dolayısıyla moleküler biyoloji ve genetiğin temelini oluşturmaktadır. DNA dizi analizi yöntemleri temelde aynı prensibe dayalıdır. Bu yöntemler, her biri bir öncekinden bir baz daha fazla içeren seriler halindeki tek zincirli DNA molekülleri oluşturulması esasına dayanırlar. Bu moleküller elektroforezle dizinin okunabilmesini sağlayan merdiven şeklinde gözlenirler (Şekil 2.4.) (59).

=====	T	AAGGTAACCCCCCTAGTCGGAT
=====	A	AAGGTAACCCCCCTAGTCGGA
=====	G	AAGGTAACCCCCCTAGTCGG
=====	G	AAGGTAACCCCCCTAGTCG
=====	C	AAGGTAACCCCCCTAGTC
=====	T	AAGGTAACCCCCCTAGT
=====	G	AAGGTAACCCCCCTAG
=====	A	AAGGTAACCCCCCTA
=====	T	AAGGTAACCCCCCT
=====	C	AAGGTAACCCCC
=====	C	AAGGTAACCC
=====	C	AAGGTAAC
=====	C	AAGGTA
=====	C	AAGG
=====	A	AAGG
=====	A	AAG

Şekil 2.4.: DNA dizi analizi ile DNA nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılması (59).

Dizi analizi yöntemlerinden Sanger yöntemi, dideoksi zincir sonlanması yöntemi olup günümüzde en fazla kullanılan yöntemdir. Dört farklı reaksiyon içinde farklı uzunluklarda DNA zincirlerinin sentezi için enzimatik prosedürün kullanımı, DNA replikasyonunun durdurulmasının dört bazdan biri tarafından gerçekleştirilmesi ve daha sonra oluşan fragmentlerin uzunluklarının belirlenmesi esasına dayanır (59).

2.4.1. Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi

Teknik olarak dizi analizinde en fazla kullanılan en popüler yöntemdir. Elektroforeze dayanan bir metot olup DNA zincirindeki her bir bazın pozisyonu tek tek belirlenmektedir. Bu yöntemde dört sıra halinde, işaretlenen DNA fragmentleri yüksek çözünürlükteki poliakrilamid jelde ayrılarak DNA zincirindeki baz dizilerinin okunması sağlanmaktadır (51).

Teknik olarak dizi analizi 3 ana basamaktan oluşur.

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/PCR)
2. Dizileme (sekans) Reaksiyonu
3. Jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme

2.4.2. Sekans Reaksiyonu

Reaksiyon bileşenleri:

- Bir DNA kalıbı (pürifiye edilmiş olması tercih edilir)
- Taq DNA polimeraz
- Primer
- Deoksinükleotid
- Dideoksinükleotid

PZR gibi 3 ana basamakta ve ortalama 30-40 döngüde gerçekleşir (59).

1. Basamak: denatürasyon; 94°C'de DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması sağlanır.
2. Basamak: annealing (bağlanma); 50°C'de gerçekleşir. Sekans reaksiyonunda sadece bir primer kullanılır.
3. Basamak: extension (uzama); 60°C'de uygulanır. Polimeraz enzimi normal şartlarda 72°C'de çalışır ancak ortama katılan kimyasal olarak modifiye edilmiş (Fluoresan işaretli) ddNTP'ler bu sıcaklıkla uyum sağlamadıkları için daha düşük ısılar tercih nedenidir.

Reaksiyon sırasında lineer bir artış elde edilir. Bu reaksiyon klasik ısı döngü cihazlarında gerçekleştirilir. Bu yöntemde PZR'ın ana prensibi ile DNA polimeraz ile primerin 3' ucundan DNA sentezi başlatılmakta ve her bir yeni nükleotid son eklenen nükleotidin 3'-OH grubuna eklenmektedir. Dideoksi metodu ismini reaksiyonda kritik bir rol oynayan 3' karbon atomunda -OH'in eksik olduğu sentetik nükleotidden alır. Dideoksinükleotidlerin reaksiyona uygun konsantrasyonlarda eklenmesiyle de oluşan DNA oligonükleotid zincirlerinin uzaması, diğer nükleotidin bağlanması için gerekli olan 3'-OH eksik olduğu için rasgele bir biçimde sonlanmaktadır. Bu sebeple dideoksi metodu zincir sonlanma metodu olarak da adlandırılmaktadır. Sonlandırıcı özellikteki bu bazlar 4 farklı fluoresan boya (veya radyoaktif madde, kemilüminesans maddeler) ile işaretlenir ve reaksiyon 4 farklı tüpte, 4 ayrı reaksiyon karışımı halinde gerçekleştirilir. Reaksiyonun sonucunda, elimizde deoksinükleotidlerle uzamış ve dideoksinükleotidler

ile sonlanmış çeşitli uzunlukta diziler üretilmiş olur. Tüm dizilerin 5' uçları aynıdır ancak 3' uca özgün baza göre uzunlukları değişecektir. Bu dizilerin son bazıları otomatik dizi analizi cihazlarında okunabilmektedir. Karakteristik fluoressan renkleri ise poliakrilamid jelde de belirlenebilmektedir (59, 60).

2.4.3. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi

Gümüş boyama, yaklaşık 20 yıl önce poliakrilamid jelde az miktarda proteinleri ortaya çıkarmak için oldukça duyarlı bir yöntem olarak ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra gümüş boyama, elektroforez ile ayrılan diğer değişik biyolojik moleküllerle de çalışılarak genişletilmiş ve kusursuz bir şekilde uygulanmaya başlamıştır. Günümüzde DNA gümüş boyama poliakrilamid jelde DNA fragmentlerinin yüksek duyarlılıkta saptanmasında kullanılmaktadır (61).

Gümüş boyamanın genellikle 2 uygulama metodundan biri kullanılır. İlkinde jeli boyamak için diamin veya amonyaklı gümüş solüsyonları ve görüntünün gelişmesi için de formaldehitin sulandırılmış asit solüsyonları kullanılır. Diğerinde ise, jel boyama için zayıf asidik yapıda gümüş nitrat kullanılır ve gümüşü alkali duruma indirgemek için formaldehit kullanılır. Bununla birlikte diamin alkalın metodu daha az duyarlı fakat kalın jeller için daha uygun olduğu, buna karşın asidik metodun ise hızlı ve ince jellerle çalışıldığında daha iyi sonuç verdiği ifade edilmektedir (62).

Görüntü gelişmesi sırasında hemen hemen bütün boyama prosedürleri gümüşü metalik gümüşe indirger ve hemen sonra boyanan materyalin çevresinde tortu şeklinde kalır. Optimal görüntü kontrastı için poliakrilamid matriksde gümüş indirgeme seviyesi minimumda tutulmalıdır. Buda genellikle gümüş kompleksasyonunun veya jel matriksindeki gümüş emilim gücünün minimumda tutulması ile gerçekleşir. Buda hızlı redüksiyon işleminin uygun ayarlanmasıyla başarılmaktadır (başlıca pH, gümüşün veya indirgeme ajanının konsantrasyonuna ve reaksiyonun oran sabitine bağlıdır). Örneğin; gümüş iyonlarının kompleksasyonu, gümüş konsantrasyonunu ve oran sabitinin her ikisini azaltır bu da metalik gümüş ile ayrılan bantların seçici boyanmasına izin verir. Bu işlem termodinamik olarak değil, gümüş redüksiyon kinetiğine bağlı olarak meydana gelir (60, 62).

Prensip: Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi sistemi bir ısı döngüsü sekans sistemidir. Bu teknikte yükseltilecek ısı derecelerinde ilave edilen nükleotidlerle *Taq* DNA polimerazın birleşme yeteneği kullanılmaktadır. Sekans reaksiyonu; miktarı pmol-fmol (10^{-12} - 10^{-15}) olan DNA, tek bir hedefe spesifik sense-primer, deoksi ve dideoksinükleotidlerin optimum oranlarında karıştığı A, C, G ve T nükleotidleri ve Sequencing Grade *Taq* DNA polimeraz kullanılarak hazırlanır. Daha sonra reaksiyon; 95°C’de denatürasyon ve 42-70°C’de yani primerlerin optimize olduğu sıcaklıkta annealing/extension aşamaları 45-60 siklus olacak şekilde ısı döngü cihazında gerçekleştirilir. Reaksiyon ürünleri standart sekans jelinde yürütülür ve ürünler gümüş boyama tekniği ile görünür hale getirilirler (63).

Bu sistemin non-radyoaktif olması en önemli avantajlarından biridir. Bu nedenle bu sistemle yapılan dizi analizi, geleneksel radyoaktif metotlardan daha güvenlidir. Sonuçlar 1 gün içerisinde elde edilebilir. Radyoaktif sekans sisteminde ise filme aktarmak için gereken en az 1-2 günlük süre, radyoizotop maliyetinin ve bu radyoaktif maddelerin çevreye atılımının olmaması bu sistemi daha avantajlı hale getirmektedir (63).

Aslında gümüş boyama, küçük miktarda nükleik asitin tespitinde etkili olarak kullanılmaktaydı. Ancak, kompleks DNA profillerinin analizi gibi daha dikkat gerektiren uygulamalar gümüş boyama protokolünün çok yönlü kullanımını gerektirmiştir. Kompleks nükleik asit karışımları çok ince poliakrilamid jellerde ayrılırlar ve oluşan bantlar yüksek duyarlılıkta güvenilir bir şekilde tespit edilmelidirler (63).

Bu sistemde kullanılan gümüş boyama prosedürü, foto-kimyasal olarak oluşturulan gümüş boyama tekniğine dayanır. Gümüş nitrat emdirilen ajan ve formaldehit (alkali ortamda) indirgeyici ajan olarak kullanılır. Emdirmede formaldehit içeren bir solüsyonun içinde göreceli olarak düşük konsantrasyonda gümüş kullanılır. Görüntünün gelişmesi (development) yüksek konsantrasyonda formaldehit kullanılarak meydana gelmektedir ve reaksiyon tiyosülfatın varlığında düşük sıcaklık derecesinde (8-12°C) gerçekleştirilir. Tiyosülfat kimyasal olarak gümüş tuzlarının kompleksasyonu ile çözülmektedir. Bu işlem, jel yüzeyindeki çözünmemiş gümüş iyonlarının eritilmesiyle gerçekleşmektedir ve böylece nonspesifik boyanmalar azalmaktadır. Yani

gümüş redüksiyon kinetiğini değiştirerek jelde arka plan boyanmasını minimize etmektedir (61).

Pratikte gümüş boyama DNA dizi analizi sistemi ile gümüş boyama birkaç basamaktan oluşan basit bir tekniktir. Elektroforezden sonra sekans jeli elektroforez tamponunun, ürenin atılması ve küçük uzama ürünlerinin dağılmasının engellenmesi için asetik asitte fikse edilir. Fiksatafin uzaklaştırılması için jel birkaç kez ultra-pure distile su ile yıkanır. Daha sonra jel gümüş nitrat ve formaldehit karışımı ile boyanır. Ardından boyanan jel yıkanır ve daha sonra formaldehit ve sodyumtiyosülfat içeren alkalın sodyum bikarbonat tampon çözeltisi ile jelin banyo (developed) işlemi yapılır. Bu koşullar altında gümüş iyonları formaldehit ile birlikte metalik gümüşe indirgenir. Eklenen sodyumtiyosülfat ise metalik gümüşün serbest gümüş iyonlarına indirgenmesini önleyerek jelde arka plan boyanması (background staining-jelin kararması) engeller. Uygun banyo süresinden sonra jel yıkanır ve daha sonra kurutularak değerlendirme yapılır (63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda 2003-2007 tarihleri arasında TB şüpheli hastalardan alınan klinik örneklerden tanımlanan 304 izolattan SM'e dirençli 10 izolat ve SM'e duyarlı 10 izolat olmak üzere toplam 20 izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Klinik örnekler; steril (BOS, diğer vücut sıvıları, kan, kemik iliği, subrapubik aspirasyon ve biyopsi örnekleri) ve steril olmayan (balgam, idrar, apse, laringeal sürüntü, bronkoalveoler lavaj sıvısı, açlık mide suyu, gaita, cilt ve yumuşak doku) örnekler olarak gruplandırılmış, steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır (64, 65). Steril örnekler santrifüjlendikten sonra, santrifüj tüpünün dip kısmından; steril olmayan örnekler homojenizasyon-dekontaminasyon işleminden sonra L-J katı ve BACTEC 12B sıvı besiyerlerine ekilmiş ve üremeleri için 37°C'de inkübatörde 6 haftaya kadar bekletilmiştir. Üremesi gözlenen izolatların saflık kontrolü Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama metodu ile yapılmıştır (66, 67). Boya sonuçları saf olan izolatların MTC ve TB dışı mikobakterler (Mycobacteria other than tuberculosis-MOTT) ayrımı BACTEC 460 TB p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi (68) ve klasik biyokimyasal testler (niasin, katalaz, nitrat redüktaz) ile yapılmıştır (69). MTC olduğu tespit edilen izolatların primer antitüberküloz ilaç duyarlılıkları BACTEC 460 TB radyometrik yöntemi ile saptanmıştır (68). Bu yöntemde kullanılan primer antitüberküloz ilaç konsantrasyonları, SM 2,0 μ g/ml, INH 0,1 μ g/ml, RIF 2,0 μ g/ml ve EMB için 2,5 μ g/ml olmuştur. BACTEC 460 TB ile ilaç duyarlılık profili belirlenen izolatların L-J kültürleri +4°C'de saklanmış ve her üç ayda bir tekrar pasajlanarak izolatların devamlılığı sağlanmıştır.

Bu çalışmaya, BACTEC 460 TB ile SM direnci tespit edilen 10 izolat ile SM'e duyarlı olduğu belirlenen 10 izolat dahil edildi. Bu suşların identifikasyonu p-nitrobenzoik asit (PNB) (500 mg/l) (70, 71) besiyeri ile tekrar yapıldı ve ilaç

duyarlılıkları farklı konsantrasyonlardaki (SM 2 µg/ml ve 10 µg/ml) agar proporsiyon yöntemi ile yeniden test edildi.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich- Universal 32 R)
- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Otoklav (Nüve- OT 020)
- Hassas Terazî (Scaltec)
- Buzdolabı (Indesit)
- Vortex (NM- 110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P 10-P100-F1000)
- Sekans dikey jel tankı (Life Technologies, Gibco BRL Sequencing System, Model S2, Gaithersburg, MD 20884-9980 USA)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)

- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema-302430300, cat nr 30354)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L-4509 USA)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science B7722)
- Sükroz (Merck 1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221 Germany)
- Fenol kristalleri (Sigma P-1039, USA)
- Kloroform (Merck K28735331 107)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Promega M1665)
- 10X PCR Buffer (Mg Free) (Promega M190G)
- 5 mM MgCl₂ (Promega A351H)
- 10 mM dNTP Mix (Sigma Deoxynucleotide set DNTP-100)
- Proteinaz K (Sigma P 2308)
- 100 baz çiftlik (bç) Marker (100 bp DNA Step Ladder) (Promega G6951)
- Löwenstein-Jensen besiyeri (Merck 01256-03 Germany)
- Middlebrook 7H10 Agar (Difco 262710 Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
- Bazik fuksin (Sigma C-4165 USA)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)
- Fenol kristalleri (Sigma P-1039 USA)
- Metilen mavisi (Sigma 6900 USA)
- Hidroklorik asit (Sigma 920-01 USA)
- NaNO₃ (Sigma S8170 USA)
- KH₂PO₄ (P-2222 USA)
- Na₂HPO₄ (Sigma S0876 USA)
- Sulfanilamid (Sigma S9251 USA)
- N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma N9125 USA)
- H₂O₂ (Sigma H6520 USA)

- Tween-80 (Sigma P043 USA)
- Anilin (Sigma A9880 USA)
- Siyanojen bromid (Sigma C9142 USA)
- Gliserol (Sigma G516 USA)
- İyot (Merck 34806 USA)
- Oleik asit, albümin, dekstroz, katalaz (OADC) (BBL 212240 Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
- ρ -nitrobenzoik asit (PNB) (Merck, S4678746 Germany)
- Etidyum-Bromid (Sigma E8751-1G USA)
- Sigma Cote® (Sigma Cat.#SL-2)
- Akrilamid-Bis (Merck L54056638 Germany)
- Amonyun persülfat (APS) (Sigma A3678-100G)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Fluka 87689 Switzerland)
- Üre (Merck K35483387 Germany)
- Glasiyal Asetik Asit (Riedel- deHaän/27225 Germany)
- AgNO₃ (Merck K22699210 616 Germany)
- Na₂CO₃ (Merck A766492 632 Germany)
- Formaldehit (Riedel- deHaän/15512 Germany)
- Sekans camları (Watman Biometra® glass plates)
- Promega Silver Sequence DNA Sequencing System (Q4130)
 - Dizi analizi reaktifleri (Q4131)
 - Sequencing Grade *Taq* DNA polymerase
 - DNA Sequencing 5X Buffer
 - 4 nükleotidin SILVER SEQUENCE d/ddNTP Mixes (Deaza)
 - DNA Sequencing Stop Solution
 - Boyama solüsyonları (Q4132)
 - Gümüş Nitrat (Silver Nitrate Q4133)
 - Q4134
 - Band Silane Solüsyonu
 - %37'lik Formaldehit

- Sodyum tiyosülfat 10mg/ml
- Sodyum karbonat
- Distile Su
- DNase, RNase Free Su
- Primerler
 - SM1: CCAACCATCCAGCAGCTGGT
 - SM2: ATCCAGCGAACCGCGGATGA
 - SM3: GATGACGGCCTTCGGGTTGT
 - SM4: TCTAGTCTGCCCCGTATCGCC
 - SM5: GTAGTCCACGCCGTAAACGG
 - SM6: AGGCCACAAGGGAACGCCTA

3.2.3. Kullanılan Boyalar ve Çözeltiler

3.2.3.1. Kullanılan Boyalar

- **Karbolfuksin Hazırlanması**

0,3 gr bazik fuksin tartılarak 10 ml %95'lik etil alkolde çözüldü. 5 gr fenol kristalleri tartılarak 100 ml distile suda çözüldü. Hazırlanan bu solüsyonlar 1/1 oranında karıştırıldı.

- **Metilen Mavisi Hazırlanması**

0,3 gr metilen mavisi tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.

- **%3'lük Asit Alkol Hazırlanması**

3 ml hidroklorik asit 97 ml %95'lik etil alkolde çözüldü.

3.2.3.2. Kullanılan Çözeltiler

- **Nitrat Testi Kimyasallarının Hazırlanışı**

- **Nitrat Çözeltisi Hazırlanışı**

M/45 fosfat tamponu eriyiği (0,02 M, pH 7,0) içindeki nitrat test substratı şu şekilde hazırlandı. 0,8 gr NaNO₃; 1,17 gr KH₂PO₄ ve 1,93 gr Na₂HPO₄ tartılarak 1 litre steril distile suda çözüldü.

- **%0,2'lik Sulfanilamid Hazırlanışı**

0,1 gr sulfanilamid tartılarak 50 ml steril distile suda çözüldü.

- **%0,1'lik *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride Hazırlanışı**

N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0,1 gr tartılarak 100 ml steril distile suda çözüldü.

- **Katalaz Testi Kimyasallarının Hazırlanışı**

- **%30'luk Hidrojen Peroksit Hazırlanışı**

30 ml H₂O₂ çözültisi, son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- **%10'luk Tween-80 Hazırlanışı**

10 ml Tween-80, son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

- **Niasin Testi Kimyasallarının Hazırlanışı**

- **%4'lük Anilin Hazırlanışı**

4 ml anilin, son hacim 100 ml olacak şekilde %95'lik etil alkol ile tamamlandı.

- **%10'luk Siyanojen Bromid Hazırlanışı**

10 gr siyanojen bromid tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.

3.2.4. Kullanılan Besiyerleri

- **L-J Besiyerinin Hazırlanması**

37,5 gr toz L-J besiyeri tartılarak cam balona aktarıldı. Üzerine 600 ml distile su ve 12 ml gliserol eklendi. 121°C’de 15 dakika 1 atmosfer basınçta otoklavlandı. Otoklavdan çıkan besiyeri benmaride 50°C’ye kadar soğutuldu. Yumurtaların uç tarafı önce %2’lik iyotla daha sonra alkol (%70’lik etil alkol) ile silindi. Steril pens ile yumurtalar uç tarafından kırılarak, öncelikle içerisinde steril cam bocuk bulunan steril cam balona aktarıldı. Cam balon sürekli karıştırılarak yumurtaların tamamen homojenize olması sağlandı. Daha sonra ağız kısmı iki kat steril gazlı bez ile kaplanan steril cam mezüre son hacim 1000 ml olacak şekilde aktarıldı. Homojenize edilen yumurta, hazırlanmış olan besiyeri üzerine ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerinden steril tüplere 5’er ml dağıtıldı. Tüpler koagülatörde, 80°C’de eğik bir şekilde, 45 dakika koagüle edildi. Besiyerlerinin sterilite kontrolü için ekim yapılmamış bir adet L-J besiyeri 37°C’de inkübatörde 2-3 gün bekletildi. Yine hazırlanan bu besiyerinin kalite kontrolü standart suşlarla [*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. kansasii* (ATCC12478)] yapıldı.

- **Middlebrook 7H10 Agar Besiyerinin Hazırlanması**

Ticari olarak temin edilen Middlebrook 7H10 Agar toz haldeki besiyerinin 19 gr’ı bir cam balona aktarılarak, üzerine 5 ml gliserol ve 900 ml distile su eklendi. Otoklavda 121°C de 15 dakika 1 atmosfer basınçta tutularak steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri benmaride 50-55°C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 100 ml OADC supplement eklendi. İlaçsız besiyeri steril vida kapaklı tüplere 5’er ml olacak şekilde dağıtıldı ve eğik bir şekilde katılaşması için beklendi. Aynı şekilde ilaçlı besiyeri hazırlanırken otoklavdan çıkan ve OADC eklenmiş olan besiyerine son konsantrasyonu SM 2 µg/ml ve 10 µg/ml olacak şekilde toz haldeki antitüberküloz ilaçlar eklendi ve daha sonra steril vida kapaklı tüplere 5’er ml olacak şekilde

dağıtılarak yine eğik bir şekilde katılması beklendi. Hazırlanan besiyerleri kullanılmıncaya kadar +4°C’de muhafaza edildi (72).

- **PNB’li L-J Besiyerinin Hazırlanması**

Bu besiyerinin hazırlanmasında, L-J besiyerinin hazırlanması bölümündeki işlemler aynen yapıldı. 800 mg PNB tartılarak, homojenize edilmiş yumurta ile hazırlanmış olan besiyeri üzerine ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerinden steril tüplere 5’er ml dağıtıldı. Tüpler koagülatörde, 80°C’de eğik bir şekilde, 45 dakika koagüle edildi. Besiyerlerinin sterilite kontrolü için ekim yapılmamış bir adet L-J besiyeri 37°C’de inkübatörde 2-3 gün bekletildi. Yine hazırlanan bu besiyerinin kalite kontrolü standart suşlarla [*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. kansasii* (ATCC 12478)] yapıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Agar Proporsiyon Yöntemi İçin İnokulumun Hazırlanması

Çalışmaya alınan 20 suşun +4°C’de saklanan L-J kültürlerinden yapılan pasajlardan 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilenler, öncelikle EZN yöntemiyle boyanarak saflık kontrolünden geçirildi. L-J besiyerinde saf olarak üremiş olan koloniler, öze ile alındı ve içerisinde 5 ml steril %0,85’lik serum fizyolojik (SF) ve cam boncuk bulunan 10 ml’lik steril tüpün içerisinde süspanse edildi. Daha sonra tüpün ağzı kapatılıp 1 dakika boyunca vorteks ile iyice çalkalandı. Bu işlemden sonra vortekslenen tüp hareket ettirilmeden 30 dakika bekletilerek büyük partiküllerin ve besiyeri kalıntılarının dip kısma çökmesi sağlandı. Bekleme süresinin sonunda hazırlanan süspanسیونun üst kısmından steril pipet ile 1 ml yeni bir temiz tüpe alınarak SF ile McFarland 1.0 bulanıklık değerinde süspanسیون elde edildi. Bu süspanسیونdan 10⁻² ve 10⁻⁴ dilüsyonlar hazırlandı. Duyarlılık testi için ekim, aynı hasta suşunun 10⁻² ve 10⁻⁴

sulandırımı için ilaçlı ve ilaçsız besiyerine 100 µl olacak şekilde insülin enjektörü ile inoküle edildi. Kontaminasyon kontrolü için çalışılan her suş aynı zamanda çikolata/kanlı agar besiyerine de ekildi. Tüplerin içerisindeki inokülumun besiyeri yüzeyine tamamen yayılması sağlanarak, 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 1. ve 2. gününde çikolata/kanlı agar ve ekim yapılan tüpler kontaminasyon yönünden incelendi. Kontaminasyon saptanması durumunda çalışma tekrar edildi. Değerlendirmede, ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinde üremeler 2. haftadan sonra kontrol edildi ve 3. hafta sonunda üreme olan tüplerdeki koloniler sayıldı. Koloniler EZN yöntemiyle boyanarak aside dirençli basil (ARB) varlığı doğrulandı. İlaçsız besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* kolonileri sayıldıktan sonra koloni sayısının %1’i hesaplandı. İlaçlı besiyerinde üreyen koloni sayısı, hesaplanan %1’lik sayıdan fazla ise bu suş çalışılan ilaç konsantrasyonuna dirençli, az ise duyarlı olarak değerlendirildi (73). Bu çalışmanın bütün aşamaları Sınıf II biyogüvenlik kabininde gerçekleştirildi.

3.3.2. PNB’li Besiyerine Ekim ve Üremenin Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan 20 suşun +4°C’de saklanan L-J kültürlerinden yapılan pasajlardan 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilenler, öncelikle EZN yöntemiyle boyanarak saflık kontrolünden geçirildi. L-J besiyerinde saf olarak üremiş olan koloniler, öze ile alındı ve bir adet PNB’li L-J besiyerine ve iki adet ilaçsız L-J besiyerine ekildi. PNB’li ve ilaçsız L-J besiyerlerinden bir tanesi 37°C’de, diğer ilaçsız L-J besiyeri 25°C’de inkübe edildi ve 3., 7., 14. ve 21. günlerde üreme olup olmadığı incelendi. 37°C’de inkübe edilen ilaçsız L-J besiyerinde üreme tespit edildiğinde tüpün kapağı biraz gevşetilerek tüpe oksijen girişine izin verildi ve direkt güneş ışığına maruz bırakılmayacak şekilde gün ışığında 1 saat bekletildi. Daha sonra inkübatörde tekrar inkübe edildi ve ertesi gün pigment oluşumu gözlemlendi. 37°C’de 3 gün içerisinde üremeyen suşlar; 25-45°C’de ilaçsız veya PNB’li besiyerinde üremeyen suşlar; karanlıkta veya ışıklı ortamda sarıdan turuncuya değişen renklerde pigment oluşturmayan suşlar MTC olarak kabul edildi (74).

3.3.3. Biyokimyasal Testler

Çalışmaya alınan 20 suşun +4°C’de saklanan L-J kültürlerinden yapılan pasajlardan 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilenler, öncelikle EZN yöntemiyle boyanarak saflık kontrolünden geçirildi. Biyokimyasal identifikasyon için saf olan kültürlere niasin, nitrat ve katalaz testleri yapıldı.

- **Nitrat Testi**

Nitrat testi için, L-J besiyerlerinde 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilip, EZN yöntemiyle boya sonucu saf olan taze kültürlerden bir öze dolusu koloni alınarak, 2 ml nitrat çözeltisi içerisine süspansiyon edildi ve 37°C’lik inkübatörde 2 saat bekletildi. Bu süre sonunda süspansiyona 1 damla hidroklorik asit, 2 damla %0,2’lik sülfanilamid çözeltisi ve 2 damla %0,12’lik N-naftil etilen diamin dihidroklorid çözeltisi ilave edildi. Tüpler çalkalanarak renk oluşumuna göre değerlendirildi. Pembe renk oluşumu nitrat redüksiyonunun olduğunu göstermektedir. MTC izolatlarında nitrat redüksiyon reaksiyonu gelişmesi beklenmektedir (69).

- **Katalaz Testi**

Katalaz testi, ısıya stabil katalaz testi ve semikantitatif katalaz testi olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Bu çalışmada semikantitatif katalaz testi yapıldı. L-J besiyerlerinde 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilip, EZN yöntemiyle boya sonucu saf olan taze kültür tüpüne 1 ml %30’luk H₂O₂-%10’luk Tween 80 karışımı eklendi. Tüp oda ısısında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda oluşan hava kabarcıklarının yüksekliği ölçüldü. Yüksek katalaz reaksiyonunda hava kabarcıklarının yüksekliği 45 mm’den daha yüksek, düşük katalaz reaksiyonunda 45 mm’den daha düşüktür. MTC izolatlarında düşük katalaz aktivitesi gözlenmektedir (69).

- **Niasin Testi**

Niasin testi için, L-J besiyerlerinde 3-4 hafta içerisinde üremesi tespit edilip, EZN yöntemiyle boya sonucu saf olan taze kültür tüpüne 1,5 ml steril distile su veya steril SF konuldu. Steril bir öze ile besiyeri yüzeyindeki koloniler, besiyerine fazla zarar vermeden, kazınarak sıvı içerisine geçmeleri sağlandı. Tüpler eğik bir şekilde 30 dakika bekletilerek sıvının besiyeri yüzeyini örtmesi sağlandı. Süre sonunda tüpteki sıvıdan 1 ml boş tüpe aktarıldı. Tüpün üzerine %4'lük anilin ve %10'luk siyanojen bromid'den 0,5'er ml ilave edildi. 10 dakika içerisinde renk değişimine göre testin değerlendirilmesi yapıldı. Sarı renk oluşumu besiyerinde biriken niasini göstermektedir ve MTC izolatlarında niasin test sonucunun pozitif olması beklenmektedir (69).

Bu biyokimyasal testlerde kontrol olarak *M. fortuitum* ve *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşları kullanıldı.

3.3.4. Moleküler Analiz

3.3.4.1. *M. tuberculosis* DNA Örneklerinin Hazırlanması

Hızlı DNA ekstraksiyon protokolü L-J besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* kolonilerine uygulandı. Bu yöntemde, 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne 1 ml steril distile su konuldu. Bir öze dolusu koloni su içerisinde süspanse edildi ve 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı (75). Daha sonra ependorf tüpü 12.000 x gravity (g)'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su ilave edildi. Karışım 12.000 x g'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere yeni bir steril ependorfa aktarılarak PZR'de kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

M. tuberculosis'in SM direncinden sorumlu önemli gen bölgeleri primer spesifik PZR tekniği ile çoğaltıldı. Direncin araştırılacağı hedef bölgeler ve bu bölgeler ile ilgili primer dizileri Tracevska ve arkadaşlarının (10) çalışmalarından seçilmiştir. SM direnci ile ilişkili ribozomal protein S12'yi kodlayan *rpsL* gen bölgesi SM1-SM2 primer çiftleri ile, 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* geninin 530. ilmeği (*rrs-1*) SM3-SM4 primer çiftleri ile ve *rrs* gen bölgesinin 912. bölgesi (*rrs-2*) SM5-SM6 primerleri ile çoğaltılmıştır (Çizelge 3.1.).

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Her bir gen bölgesi için standart PZR reaksiyonu son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile su, 10X PZR tamponu [(NH₄)₂SO₄] (Promega), MgCl₂ (Promega), dNTP (Promega), primerler (SM1-SM2, SM3-SM4 ve SM5-SM6), Taq DNA polimeraz (Promega) ve ekstrakte edilen *M. tuberculosis* DNA'sı konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1.: SM direncinden sorumlu *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerine spesifik primer dizileri (10).

Gen bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
<i>rpsL</i>	SM1	CCAACCATCCAGCAGCTGGT	306
	SM2	ATCCAGCGAACCGCGGATGA	
<i>rrs</i>	SM3	GATGACGGCCTTCGGGTTGT	238
	SM4	TCTAGTCTGCCCCGTATCGCC	
	SM5	GTAGTCCACGCCGTAAACGG	240
	SM6	AGGCCACAAGGGAACGCCTA	

Çizelge 3.2.: *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerinin PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	<i>rpsL</i> gen bölgesi (306 bç)	<i>rrs</i> gen bölgesi (238 bç)	<i>rrs</i> gen bölgesi (240 bç)
Distile su	36,75 µl	36,75 µl	36,75 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl	3 µl	3 µl
10X PZR tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl (SM1)	0,5 µl (SM3)	0,5 µl (SM5)
Primer (100 pmol/µl)	0,5 µl (SM2)	0,5 µl (SM4)	0,5 µl (SM6)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	47 µl	47 µl	47 µl
<i>M. tuberculosis</i> DNA'sı	3 µl	3 µl	3 µl
Toplam hacim	50 µl	50 µl	50 µl

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR tüplerine 47 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 3'er µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgeleri için ısı döngü cihazında PZR koşulları Çizelge 3.3.'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.3.: SM direncinden sorumlu *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	62	30 saniye	42
Zincir Uzaması (Extension)	72	45 saniye	
Bekleme	4	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır.

3.3.4.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR ile SM direncinden sorumlu gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra %1,5'lük agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. Bant oluşumu gözlenen örneklerin bir sefer daha amplifikasyonu yapıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X konsantre stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Bu reaksiyonların her bir seti için pozitif [*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)] ve negatif (*M. tuberculosis* DNA'sı hariç PZR karışımı) kontroller kullanıldı.

- **Agaroz Jelin Hazırlanması**

Bir balon jodede 0,45 gr agaroz 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra Et-Br'den 3 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşıma kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

3.3.4.4. *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* Gen Bölgelerinin Tespiti

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra *rpsL* gen bölgesine spesifik primerlerinin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde 306 bç hizasında gözlenen bantlar hedef *rpsL* gen bölgesi olarak değerlendirilmiştir. *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde *rrs-1* için 238 bç hizasında, *rrs-2* için ise 240 bç hizasında gözlenen bantlar ile *rrs-1* ve *rrs-2* hedef gen bölgeleri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).

3.3.4.5. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

SM'e dirençten sorumlu gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılmış ürünlerinin dizi reaksiyonundan önce saflaştırma işlemi uygun görülmektedir. Bu amaçla Amonyum-asetat'ın kullanıldığı manuel saflaştırma yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde; 100 µl PZR ürünü, eşit hacimde (100 µl) 4 M amonyum asetat ile karıştırıldı. Sonra bu hacime eşit miktarda (200 µl) 2-propanol (iso-propilalkol) ilave edildi. Karıştırılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp 500 µl %70'lik etil alkol ilave edildi. 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve DNA kurutuldu. 10 µl nükleaz-free distile su, Tris-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TE] tamponu veya 1X sekans tamponu ile süspanse edildi. Daha sonra ürünler %1,5'luk agaroz jele yüklenerek elektroforezi yapıldı. Oluşan bantların yoğunluğuna göre saflaştırılan DNA, sekans reaksiyonunda kullanılmak üzere nükleaz-free distile su ile sulandırıldı. Şekil 4.2.'de saflaştırılmış *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgesi PZR ürünlerinin saflaştırmadan sonraki, Et-Br ile boyanmış %1,5'luk agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntüsü verilmiştir.

3.3.5. Sekans Reaksiyonu

Sekans reaksiyonu üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi (63). Her bir sekans reaksiyonu için 4 adet 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü sırasıyla Adenin (A),

Sitozin (C), Guanin (G) ve Timin (T) olarak işaretlenerek 2 µl dideoksinükleotid (d/ddNTP) karışımı konuldu. Yaklaşık 20 µl (1 damla) mineral yağ, tüplerin üzerine ilave edildi. Tüplerin kapakları kapatılarak +4°C’de sekans reaksiyon karışımı hazırlanmaya kadar bekletildi.

Reaksiyonda kullanılacak DNA’lar denatürasyon amacı ile 80°C’de 2 dakika tutulduktan sonra buz üzerinde bekletildi. Çizelge 3.4.’te dizi analizi yapılacak olan her bir suş için gereken sekans reaksiyonunun hazırlanışı verilmiştir.

Çizelge 3.4.: Sekans reaksiyon karışımı (63)

Kullanılan Reaktif	Miktar
Hedef DNA	3 µl
DNA Sequencing 5X Buffer	5 µl
Primer (2 pmol/µl)	3 µl
Nükleaz-free distile su	4,5 µl
Sequencing Grade Taq DNA polymerase (5 U/µl)	1 µl

Daha sonra hazırlanan sekans reaksiyonu karışımından 4’er µl, +4°C’de bekleyen A, C, G, T d/ddNTP üzerine ilave edildi. Mikrosantrifüjde dikkatlice santrifüj edildi. Döngü reaksiyonu başlatılarak reaksiyon için hazırlanan mikrosantrifüj tüpleri ısı döngü cihazına, sıcaklık 95°C’ye ulaştığı zaman yerleştirildi. Dizi analizinde kullanılan reaksiyon programı Çizelge 3.5.’te verilmiştir.

Çizelge 3.5.: SM direncinden sorumlu gen bölgelerinin dizi analizinde kullanılan reaksiyon koşulları

Primer 24 bazdan az ve GC içeriği %50'den az ise		
Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	2 dakika	1
95 (Denatürasyon)	30 saniye	
42 (Annealing)	30 saniye	45-60
70 (Extension)	1 dakika	
4	∞	∞
Primer 24 bazdan fazla ve GC içeriği %50'den fazla ise		
95	2 dakika	1
95 (Denatürasyon)	30 saniye	
70 (Annealing/Extension)	30 saniye	60
4	∞	∞

Isı döngü cihazındaki program tamamlandıktan sonra reaksiyonun sonlandırılması için örnekler cihaz üzerinde iken mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 3'er µl DNA sekans durdurma solüsyonu her bir örneğin üzerine eklendi. Örnekler daha sonra +4°C'de elektroforez yapılmaya kadar saklandı.

3.3.5.1. Dizi Analizinde Kullanılacak Olan Sekans Camlarının Hazırlanması

Sekans reaksiyonunda kullanılan camların biri diğerinden daha kısadır. Camlar sıcak su ve %1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) ile yıkandı. Camlar durulanırken ise deterjan kalıntılarını çıkarmak için deiyonize su (ultra-pure veya bidistile su) kullanıldı. Camlar toz bırakmayan kağıt havlular kullanılarak kurulandı ve temiz kurutma kağıtları üzerinde alındı (63).

- **Kısa Camın Hazırlanması**

Jel hazırlanırken aynı zamanda temizlenmiş olan kısa cam bağlayıcı solüsyon ile muamele edildi. 1 ml %95'lik etil alkol, 5 µl %0,5'lik asetik asit ve 3 µl Bind Silane

(Promega) temiz bir ependorf tüpüne konularak bağlayıcı solüsyon taze olarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon, toz bırakmayan kağıt havluya emdirilerek kısa camın bütün yüzeyi solüsyon ile kaplandı. 4-5 dakika sonra yaklaşık 2 ml %95'lik etil alkol, toz bırakmayan kağıt havlu ile yatay ve dikey yönde, cama fazla bastırmadan uygulandı. Bu işlem eğer çok fazla bastırılarak uygulanırsa bağlayıcı solüsyon yerinden kalkmakta ve jeli iyi tutamamaktadır. Bu yıkama işlemi bağlayıcı solüsyonun fazlasını almak için 2 kez tekrarlandı. Bu işlemler sırasında uzun camın bağlayıcı solüsyon ile bulaşmasının önlenmesi önemlidir. Aksi takdirde jel iki cama da yapışmaktadır (63).

- **Uzun Camın Hazırlanması**

Uzun cam Sigma Cote solüsyonu ile muamele edildi. Eğer su cam yüzeyinde damla halinde kalıyorsa her seferinde camı bu solüsyon ile muamele etmeye gerek yoktur. Bağlama sol syunu ile uzun camın çapraz kontaminasyonunu engellemek için öncelikle eldivenler değiştirildi. Eğer ki uzun cam Bind Silane ile kontamine olursa %10'luk NaOH'de 30-60 dakika tutulması gerekmektedir. Sigma Cote solüsyonu toz bırakmayan kağıt havlu yardımı ile cama sürüldü. 5-10 dakika sonra toz bırakmayan kağıt havluyla fazlası silindi. Aşırı Sigma Cote solüsyonu boyamayı inhibe edebilir (63).

3.3.5.2. Jel Solüsyonunun Hazırlanması ve Cam Kasete Dökülmesi

Jel 7 M  re içeren, %4-6'luk poliakrilamid jel (19:1 akrilamid-bisakrilamid) TBE tamponu ile hazırlandı. 34,5 gr üre tartılarak cam behere aktarıldı.  zerine 50 ml bidistile su ilave edilerek ısıtıcıda kaynayıncaya kadar yavaş yavaş karıştırıldı. Üre kristallerinin tamamen eridiği gözlendiğinde beher ısıtıcıdan alınarak bir mezüre aktarıldı.  zerine 12,5 ml akrilamid solüsyonu (19:1), 7,5 ml 10XTBE tamponu ve 250  l %10'luk amonyun persülfat (APS) ilave edildi. Son hacim 80 ml'ye bidistile su ile tamamlanarak jel temiz bir behere aktarıldı. Beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak jelin içerisine toz ve yabancı partiküllerin girmesi engellendi (63).

Jel hazırlandıktan sonra jelin döküleceği camların hazırlanmasına geçildi. Kısa cam Bind Silane ile, uzun cam ise Sigma Cote ile muamele edildi. Kısa camın muamele edilen yüzeyinin iki kenarına 0,4 mm kalınlığındaki boşluk plastikleri konularak uzun camın muamele edilen yüzeyi boşluk plastiklerinin üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Her iki cam dikkatli bir şekilde cam sıkıştırıcı plastik taşıyıcıya konuldu. Taşıyıcının alt kısmındaki doldurma deliği açıldı. Hazırlanmış olan jele 50 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) eklenerek jel, 50 ml'lik bir enjektör yardımı ile camların üst kısmından dikkatlice iki cam arasındaki boşluğa dökülmeye başlandı. Bu sırada jelde hava baloncuklarının oluşmamasına dikkat edildi. Jel, doldurma deliğinden çıkmaya başladığı an delik kapatılarak jelin üst kısımdan dökülmesi durduruldu. Camların üst kısmındaki jel içerisine, yükleme sırasında kullanılan tarakların ters yüzleri ile, 2-3 mm kadar bir oluk oluşturuldu. Tarakların yerleştirildiği bu kısmının daha iyi sıkıştırılması için taşıyıcının kenarları, camların ortası ve iki kenarı bağlama klipsleri ile tutturuldu. Daha sonra jelin fazlası taraklar üzerine dökülerek jelin yaklaşık 2 saat boyunca polimerize olması beklendi (63).

Süre sonunda bağlama klipsleri açılarak cam kaset, sıkıştırıcı plastik taşıyıcıdan çıkartıldı. Camların üst kısmındaki taraklar çıkartılarak polimerize olmayan jel ve üre kristallerinin temizlenmesi için camlar bidistile su ile yıkandı. Yıkamadan sonra camlar toz bırakmayan kağıt havlu ile silinerek elektroforez aşamasına geçildi.

3.3.5.3. Elektroforez

Cam kaset dizileme cihazına yerleştirilerek cihazdaki tampon bölümüne 1XTBE tamponu önce üst kısımdaki bölüme 500 ml, eğer alt kısma veya cam kaset ile alüminyum plaka arasında 5 dakika boyunca bir sızıntı yoksa alt kısma yine 500 ml, elektrotların üstünü kaplayacak biçimde konuldu.

Bantların iyi açılması için cam kaset dizileme cihazına yerleştirildikten sonra H bağı oluşumunun engellenmesi için 75 miliAmper (mA)'de sıcaklığı 50°C'ye gelinceye kadar, yaklaşık 2 saat boyunca ısıtıldı. Jel ısıtıldıktan sonra sivri dişli taraklar jelin üst kısmındaki oluğa yüzeyine hafifçe batırıldı. Yükleme başlamadan önce sekans reaksiyonu sonucu oluşan ürünler 70°C'de 5 dakika su banyosunda ısıtıldı ve hemen

buza batırılarak, ürünlerin 3 µl'si hızlı bir şekilde jele yüklenerek 75 mA'de elektroforeze devam edildi. Elektroforez bittikten sonra dizileme cihazından çıkarılan cam kaset birbirinden ayrılarak küçük cama yapışık halde kalan jele gümüş boyama protokolü uygulandı (63).

3.3.5.4. Sekans Jelinin Gümüş Boyanması

Bu protokelde kullanılan solüsyonlar ve malzemeler aşağıda verilmiştir (63).

- Tespit-Durdurma (Fix-stop) solüsyonu
- Boyama solüsyonu
- Banyo (Developing) solüsyonu
- Yatay karıştırıcı
- Kısa camdan daha geniş olan plastik tepsi

Boyama prosedürü süresince inkübasyonlar plastik tepsi içerisinde gerçekleşmektedir.

• Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması (63)

➤ **Tespit-Durdurma Solüsyonu:** %10'luk asetik asittir. Bu solüsyon her boyama protokolü için yeniden hazırlandı.

- Asetik asit 200 ml
- Bidistile su 1800 ml

➤ **Boyama Solüsyonu:**

- Gümüş Nitrat (AgNO₃) 1 gr
- Formaldehit (%37) 1,5 ml
- Bidistile su 1000 ml

➤ **Banyo Solüsyonu:**

- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) 45 gr
- Bidistile su 1500 ml
- 10°C 'ye kadar soğutulur.

Kullanmadan hemen önce develop solüsyonuna eklenenler:

- Formaldehit (%37) 2,25 ml
- Sodyum tiyosülfat (10 mg/ml) 300 μl

• **Boyama Protokolü (63)**

1. **Jelin tespiti:** Plastik tepsideki jel tespit-durdurma solüsyonu ile kaplandı ve boya izleri kayboluncaya kadar yaklaşık 15 dakika boyunca çalkalanarak yıkandı. Bu işlem, üre kalıntılarının iyice çıkması için bir kez daha tekrarlandı. Jel çalkalamadan bir gece boyunca tespit-durdurma solüsyonunda muhafaza edilebilir.
2. **Jelin yıkanması:** Jel 5'şer dakikadan 5 kez bidistile su ile çalkalanarak yıkandı. Bu aşamada asitin jelden tamamen uzaklaşması sağlandı.
3. **Jelin boyanması:** 2 saat boyama solüsyonu ile çalkalanarak muamele edildi.
4. **Jelin yıkanması:** Jel tepsi içerisine yerleştirilerek bidistile su ile 5-10 saniye, iki kez hızlı bir şekilde yıkandı.
5. **Jelin banyosu (develop):** Jel, soğutulmuş ve kullanmadan hemen önce 2,25 ml %37'lik formaldehit ve 300 ml sodyum tiyosülfat eklenmiş banyo solüsyonunun 750 ml'sinin bulunduğu tepsiye yerleştirildi. Hedef DNA'lar (template) görününceye kadar ya da develop başlayıncaya kadar jelin bulunduğu tepsi çalkalandı. Jel daha sonra geriye kalan 750 ml soğuk banyo solüsyonun aktarıldığı tepsiye alındı ve çalkalanmaya devam edildi. 2-3 dakika içinde bantların hemen hepsi görünür hale gelmeye başladı.
6. **Banyonun durdurulması:** Uzun banyo aşaması koyu renkte arka planın (kararma) oluşması ile sonuçlanacağından jelin tamamen boyanmasının engellenmesi için banyonun durdurulması işlemine geçildi. Görüntü gelişim reaksiyonunun sonlandırılması için ve jelin tespit edilmesi için 1000 ml

tespit-durdurma solüsyonu direkt olarak banyo solüsyonu içindeki jelle döküldü. Çalkalanarak 2-3 dakika süresince inkübe edildi.

7. **Jelin yıkanması:** Jel 2'şer dakikadan 2 kez bidistile su ile çalkalanarak yıkandı.
8. **Jelin kurutulması:** Jel oda ısısında tutularak kurumaya bırakıldı.

3.3.5.5. Görüntüleme

Jelde oluşan bantlar en iyi beyaz ışık (fluoresan ışık) üzerindeyken görülmektedir.

3.3.5.6. Değerlendirme

Değerlendirme aşamasında, Genbank'tan elde edilen standart dizilerle jelde oluşan diziler, 5' ucundan 3' ucuna doğru karşılaştırılarak okundu. Belirlenen nükleotid değişiklikleri kayıt edildi.

4. BULGULAR

4.1. İlaç Duyarlılık Test Sonuçları

Yaptığımız bu çalışmada, BACTEC 460 TB ile fenotipik ilaç duyarlılığı belirlenen 10 SM dirençli izolatın 8'i agar proporsiyon yöntemi ile dirençli olarak tesbit edilmiş, BACTEC 460 TB ile SM dirençli olarak belirlenen 2 izolat agar proporsiyon yöntemi ile SM2 ilaç konsantrasyonunda dirençli iken SM10 ilaç konsantrasyonunda duyarlı olarak tesbit edilmiştir. SM'e duyarlı 10 izolat tüm yöntemlerle duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.1.'de çalışmaya dahil edilen hastaların BACTEC 460 TB yöntemi ile antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları belirtilmiştir.

Çizelge 4.1.: Çalışmaya dahil edilen hastaların BACTEC 460 TB yöntemi ile antitüberküloz ilaç duyarlılık test sonuçları (SM: Streptomisin 2,0 µg/ml; INH: İsoniazid 0,1 µg/ml; RIF: Rifampisin 2,0 µg/ml; EMB: Ethambutol 2,5 µg/ml)

BACTEC 460 TB					
İzolot Numarası	SM	INH	RIF	EMB	
1	EG-1	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	<i>Dirençli</i>
2	RC-2	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
3	VC-3	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
4	AG-4	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
5	FD-5	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>	Duyarlı
6	ME-6	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
7	AA-7	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
8	HaDe-8	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>	Duyarlı
9	NC-9	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
10	ZG-10	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
11	BD-11	Duyarlı	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
12	HD-12	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
13	MO-13	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
14	MS-14	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
15	RT-15	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
16	EY-16	Duyarlı	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı
17	HG-17	Duyarlı	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı
18	EC-18	Duyarlı	<i>Dirençli</i>	Duyarlı	Duyarlı
19	ZM-19	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
20	TD-20	Duyarlı	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>

Çizelge 4.2.'de çalışmaya dahil edilen hastaların BACTEC 460 TB ve agar proporsiyon yöntem sonuçları ile SM'e karşı fenotipik ilaç duyarlılık test sonuçları belirtilmiştir.

Çizelge 4.2.: Çalışmaya dahil edilen hastaların BACTEC 460 TB ve agar proporsiyon yöntemi ile fenotipik ilaç duyarlılık test sonuçları (SM: Streptomisin, SM2: 2 µg/ml ilaç konsantrasyonu, SM10: 10 µg/ml ilaç konsantrasyonu)

	BACTEC 460 TB		AGAR PROPORSİYON		
	İzolat Numarası	SM	İlaç Konsantrasyonu	SM2	SM10
1	EG-1	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
2	RC-2	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
3	VC-3	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
4	AG-4	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
5	FD-5	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
6	ME-6	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
7	AA-7	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
8	HaDe-8	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
			10 ⁻⁴	<i>Dirençli</i>	<i>Dirençli</i>
9	NC-9	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
10	ZG-10	Dirençli	10 ⁻²	<i>Dirençli</i>	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
11	BD-11	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
12	HD-12	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
13	MO-13	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
14	MS-14	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
15	RT-15	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
16	EY-16	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
17	HG-17	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
18	EC-18	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
19	ZM-19	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı
20	TD-20	Duyarlı	10 ⁻²	Duyarlı	Duyarlı
			10 ⁻⁴	Duyarlı	Duyarlı

4.2. İzolatların İdentifikasyonu

Bactec 460 TB sisteminde NAP testi ile MTC olarak tanımlanan suşlar PNB'li L-J besiyerinde de MTC olarak değerlendirilmiştir.

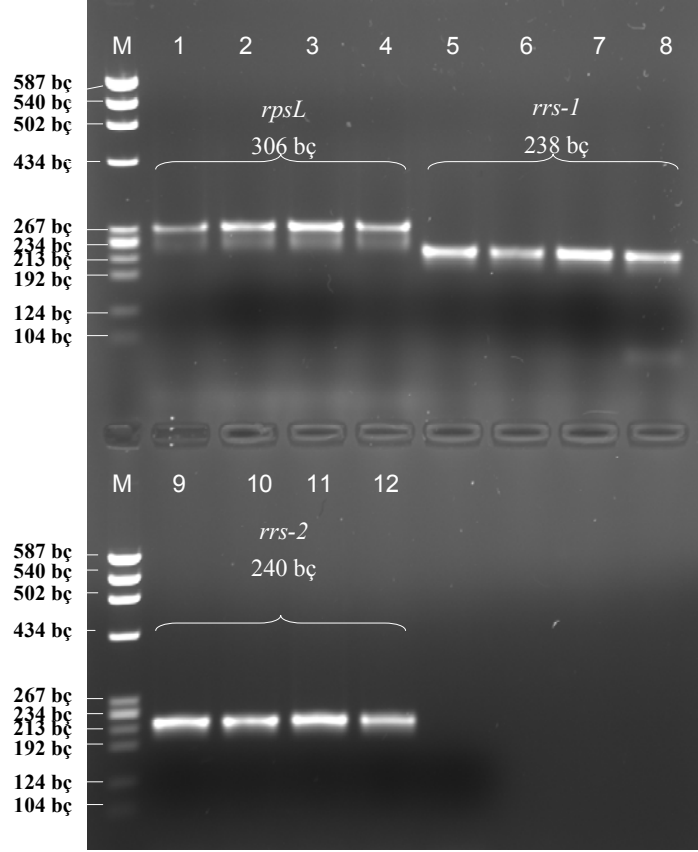
4.3. Biyokimyasal Test Sonuçları

Çalışmamızdaki bütün izolatlar için; niasin pozitif, nitrat pozitif, katalaz düşük aktivite olarak yani MTC üyesi olarak belirlendi.

4.4. Moleküler Analiz Sonuçları

4.4.1. PZR aşaması

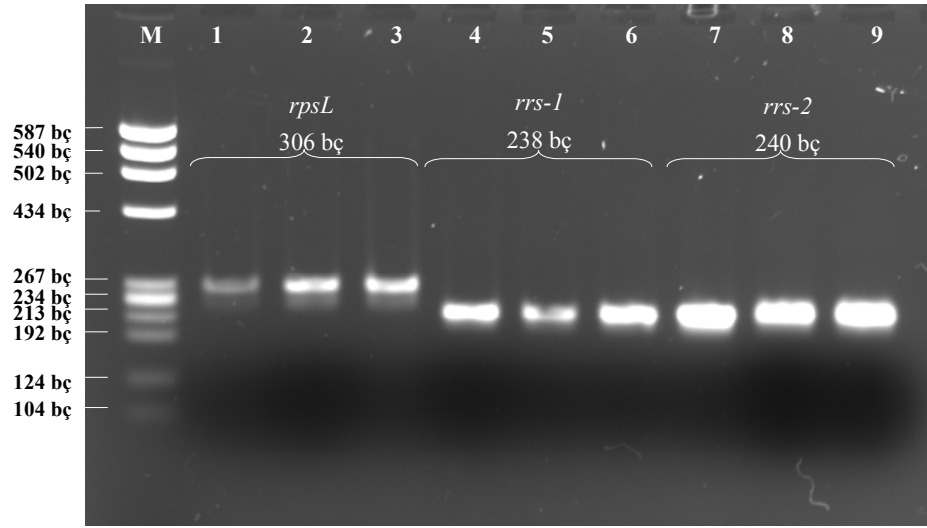
M. tuberculosis'in SM direnci ilişkili önemli gen bölgeleri olan *rpsL* ve *rrs* gen bölgeleri primer spesifik PZR tekniği ile çoğaltılmıştır. *M. tuberculosis*'in SM1 ve SM2 primer çiftleri kullanarak 306 bç'lik *rpsL* gen fragmanı, SM3 ve SM4 primer çiftleri kullanarak 238 bç'lik *rrs* gen fragmanının (*rrs-1*) 530. ilmeği ve SM5 ve SM6 primer çiftleri kullanarak 240 bç'lik *rrs* gen fragmanının (*rrs-2*) 912. bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin Et-Br ile boyanmış %1,5'luk agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntüsü moleküler ağırlık standartı kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1.: Primer spesifik PZR yöntemi ile belirlenen direnç ile ilişkili *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerinin %1,5'luk agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri. (Kolon M: HaeIII DNA moleküler ağırlık standartı, Kolon 1, 2, 3, 4: 306 bç'lik *rpsL* gen bölgesi, Kolon 5, 6, 7, 8: 238 bç'lik *rrs-1* gen bölgesi, Kolon 9, 10, 11, 12: 240 bç'lik *rrs-2* gen bölgesi)

4.4.2. Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi Sonuçları

Primer spesifik PZR aşamasından sonra, elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi reaksiyonunu etkilememesi için, PZR reaksiyon bileşenlerinden arındırmak amacı ile, amonyum asetat yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgesi PZR ürünlerinin saflaştırmadan sonraki, Et-Br ile boyanmış %1,5'luk agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntüsü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2.: Amonyum-asetat yöntemi ile saflaştırılmış *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerinin PZR ürünlerinin %1,5'lük agaroz jel elektroforez görüntüsü. (Kolon M: HaeIII DNA moleküler ağırlık standartı, Kolon 1, 2, 3: 306 bç'lik *rpsL* gen bölgesi, Kolon 4, 5, 6: 238 bç'lik *rrs-1* gen bölgesi, Kolon 7, 8, 9: 240 bç'lik *rrs-2* gen bölgesi)

Gümüş boyama DNA dizi analizi sistemi ile sekans reaksiyonu tamamlanan ve 7 M üre ile hazırlanmış sekans jelinde elektroforezine yüklenen örneklerin, elektroforez sonrası gümüş boyama metodu ile boyandıktan sonra floresan ışık altında GenBank'dan elde edilen referans dizi ile karşılaştırarak değerlendirilmesi yapıldı. İlaç dirençli klinik izolatların elektroforez temelli gümüş boyama DNA dizi analizi metodu ile DNA zincirindeki her bir bazın (A, C, G, T) pozisyonu belirlendi. Referans dizi ile karşılaştırma sırasında saptanan nükleotid değişiklikleri ilaç direncinden sorumlu mutasyon olarak kabul edildi.

Çalışmaya dahil edilen SM dirençli 8 izolatın hepsinin *rpsL* gen bölgesinde dirençle ilişkili nükleotid değişikliği 43. kodonda AAG'den AGG'ye dönüşüm olarak tespit edildi. Bu izolatların *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerinde dirençle ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmadı (Çizelge 4.3.). *rpsL* gen bölgesinde bulduğumuz bu nokta mutasyon sonucu lizin aminoasiti, arjinin aminoasitine dönüşmüştür (Çizelge 4.4.). BACTEC 460 TB ile SM dirençli olarak belirlenen 2 izolat ile SM'e duyarlı 10 izolatın çalışılan hedef gen bölgelerinde (*rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2*) herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmadı (Çizelge 4.3.). Çalışmamızda mutasyon tespit edilen *rpsL* gen bölgesi için tek bir mutasyon patterni tespit ettik (AAG-43-AGG)

(Şekil 4.3.). Tespit ettiğimiz bu mutasyon paterni de tek nükleotid değişikliği ile karakterizedir (Çizelge 4.4.).

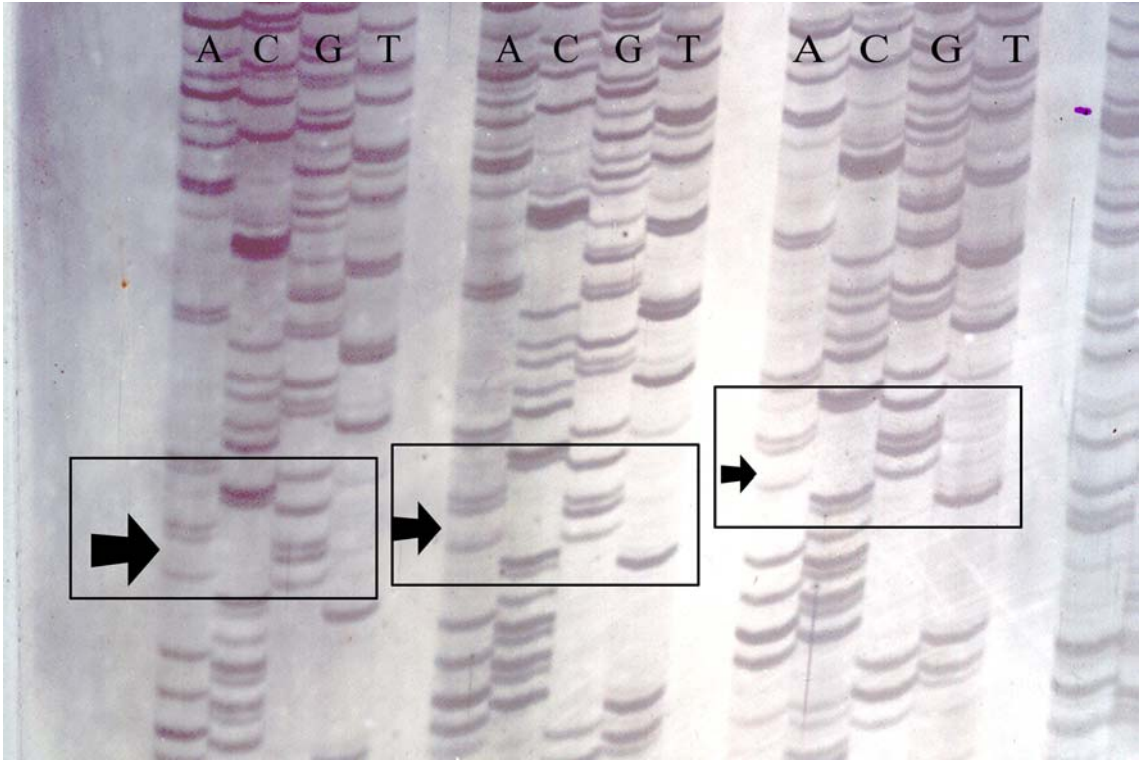
Çizelge 4.3.: SM direncinin moleküler analizinde çalışmadaki 20 izolatın direnç ile ilişkili *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* hedef gen bölgelerindeki gümüş boyama DNA dizi analizi sonuçları.

Sıra no	İzolat Numarası	Hedef bölgede tespit edilen mutasyonlar		
		<i>rpsL</i>	<i>rrs-1</i>	<i>rrs-2</i>
1	EG-1	AAG-43-AGG	-	-
2	RC-2	AAG-43-AGG	-	-
3	VC-3	AAG-43-AGG	-	-
4	AG-4	AAG-43-AGG	-	-
5	FD-5	AAG-43-AGG	-	-
6	ME-6	AAG-43-AGG	-	-
7	AA-7	AAG-43-AGG	-	-
8	HaDe-8	AAG-43-AGG	-	-
9	NC-9	-	-	-
10	ZG-10	-	-	-
11	BD-11	-	-	-
12	HD-12	-	-	-
13	MO-13	-	-	-
14	MS-14	-	-	-
15	RT-15	-	-	-
16	EY-16	-	-	-
17	HG-17	-	-	-
18	EC-18	-	-	-
19	ZM-19	-	-	-
20	TD-20	-	-	-

BACTEC 460 TB sistemi ve agar proporsiyon yöntemi ile SM dirençli olarak belirlenen 8 izolatta *rpsL* bölgesinde mutasyon belirlenmiş, iki yöntemle de SM duyarlı olarak belirlenen 10 izolatta ve BACTEC 460 TB sistemi ile dirençli ancak agar proporsiyon yöntemi ile SM2 ilaç konsantrasyonunda dirençli iken SM10 ilaç konsantrasyonunda duyarlı olarak tesbit edilen 2 izolatta gümüş boyama DNA dizi analizi yöntemi ile herhangi bir mutasyon belirlenmemiştir.

Çizelge 4.4.: Gümüş boyama DNA dizi analizi ile, *rpsL*, *rrs-1* ve *rrs-2* hedef gen bölgelerinde SM direnci ile ilişkili tespit edilen mutasyonlar.

Suş sayısı	Analiz edilen gen bölgesi	Mutasyonun lokalizasyonu	Nükleotid değişikliği	Amino asit değişikliği
8	<i>rpsL</i>	43. kodon	AAG→AGG	Lys→Arg
0	<i>rrs-1</i>	-	-	-
0	<i>rrs-2</i>	-	-	-



Şekil 4.3.: Gümüş boyama sonucu *rpsL* gen bölgesinde 43. kodonda görünen AAG→AGG nükleotid değişimi (A: Adenin, C: Sitozin, G: Guanin, T: Timin).

5. TARTIŞMA

TB hastalarının erken tanıları, etkili ve düzenli tedavileri ve tedavilerinin uygun takipleri, TB kontrol programının temelini oluşturmaktadır. TB'un kesin tanısında "altın standart", etkenin kültürde üretilmesi olarak kabul edilmektedir. Kültür aynı zamanda basilin identifikasyonu ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılması için gereklidir (76). Ancak son yıllarda kullanıma giren moleküler yöntemlerle örnekten ya da kültürde üretilen suştan *M. tuberculosis* izolasyonu, tanımlanması ve ilaç direnci belirlenebilmektedir (46, 47).

SM, *M. tuberculosis*'e karşı etkili olduğu gösterilen ilk antibiyotiktir ve uzun yıllardır kontrol programlarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte SM monoterapisinin bazı yan etkilerinden dolayı INH ve RIF gibi daha iyi ilaçların bulunması ile 1960'lı yıllarda bazı ülkelerde kullanımını azalmıştır. Ancak *M. tuberculosis*'in bu majör ilaçlara gösterdiği direnç ile TB kontrol programlarında yeniden kullanılmaya başlanmıştır (11).

Ribozomal protein S12'yi kodlayan *rpsL* gen bölgesinin ve 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* gen bölgesinin SM direncinden sorumlu olduğu bilinmektedir (10, 11) ve *rrs* gen bölgesindeki bu mutasyonlar 530. ve 912. nükleotidlerin çevresindeki bir bölgeyi etkilemektedir (11).

Bu çalışmada, Mersin ilinde *M. tuberculosis* kompleksi izolatlarındaki SM direncinin temelini oluşturan mutasyonların sıklığı ve etkilenen bölgelerin belirlenmesi amaçlandı. Fenotipik ilaç duyarlılık yöntemleri ile SM'e dirençli 8 izolat ile, agar proporsiyon yönteminde SM2'ye dirençli ancak SM10'a duyarlı 2 izolat ve SM duyarlı 10 izolat çalışmaya dahil edildi. İlaç direncine neden olabileceği düşünülen *rpsL* ve *rrs* hedef dizilerindeki nükleotid değişikliği Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi metodu ile incelendi.

Çalışmamızda, *rpsL* gen fragmentinde SM direnci ile ilişkili tek bir mutasyon paterni tespit edildi. Genotipik mutasyon tespit edilen SM dirençli izolatların (8 izolat) hepsi *rpsL* gen bölgesinde 43. kodon pozisyonunda AAG→AGG (Lys→Arg)'ye dönüşüm (nokta mutasyonu) şeklinde tespit edildi. *rpsL* geninin 43. kodon pozisyonunda tespit edilen bu mutasyon, bölgemizdeki *M. tuberculosis* suşlarındaki SM direncinin gelişmesindeki bu kodonun önemini göstermektedir.

Öztürk ve arkadaşlarının Düzce’de, 52 *M. tuberculosis* suşu üzerinde yaptıkları DNA dizi analizi çalışmasında (otomatize 310 DNA sequencer Applied Biosystems cihazı) suşlarda 4 INH, 3 RIF ve 5 SM direnç mutasyonu belirtilmiştir. SM dirençli 5 suşun hepsinde bizim çalışmamızda olduğu gibi *rpsL* gen bölgesinde 43. kodonda Lys→Arg aminoasit değişikliği tespit edilmiştir (77).

Yaşar ve arkadaşları tarafından Adana’da, 47 kültür pozitif hastada yapılan diğer bir çalışmada konvansiyonel yöntemlerle 17 SM dirençli suşun 15’inde, SM’e duyarlı suşların 2’sinde PZR-HDF yöntemiyle *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerine ait mutasyonlar tespit edilmiştir. RZR-HDF yönteminin SM direncini saptamada duyarlılığının %88,2 ve özgülüğünün de %97,1 olduğu belirtilmiştir (29).

Erdem ve arkadaşları tarafından Ankara’da yapılan bir çalışmada, 72 *M. tuberculosis* suşunun SM duyarlılığı konvansiyonel yöntemlerle çalışılmış ve 25 suşta SM direnci tespit edilmiştir. Bu dirençli suşlardaki mutasyon varlığı, PZR-FRET yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. SM’e dirençli olarak belirlenen 25 suşun 16’sında ve SM’e duyarlı 47 suşta, kontrol suşu olarak kullanılan H37Ra ile benzer erime sıcaklığı eğrisi tespit edilirken, SM’e dirençli 9 suşta farklı erime sıcaklığı eğrisi tespit edilmiştir. PZR-FRET yöntemi sonuçlarını doğrulamak için, kontrol suşu ile birlikte bu yöntem ile kontrol suşundan farklı erime sıcaklığı eğrisi tespit edilen suşlardan 3’ünde (rastgele seçilen) ve konvansiyonel yöntemlerle SM’e dirençli olduğu belirlenen fakat kontrol suşu ile benzer erime sıcaklığı eğrisi tespit edilen suşlardan 3’ünde *rpsL* gen bölgesindeki mutasyon varlığı DNA dizi analizi ile araştırılmıştır. PZR-FRET yöntemi ile kontrol suşundan farklı erime sıcaklığı eğrisi tespit edilen 3 suşun *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda Lys→Arg aminoasit değişikliği tespit edilmiştir. Kontrol suşu ile benzer erime sıcaklığı eğrisi gösteren örneklerin hiçbirisinde mutasyon saptanmadığı belirtilmiştir (78).

Değişik ülkelerde ve değişik coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda, *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerindeki mutasyon oranları bildirilmiştir. Litvanya’da ÇİD belirlenen 66 izolatin %61’inde *rpsL* gen bölgesinde, %24’ünde *rrs* gen bölgesinde mutasyon saptandığı bildirilmiştir (10).

Sreevatsan ve arkadaşları 139 *M. tuberculosis* izolatinın 78’inde SM direnci tespit etmişler, dizi analizi sonucunda 42 (%54) izolatin *rpsL* gen bölgesinin 43. veya 88. kodonlarında; 8 (%10) izolatin *rrs* gen bölgesinde mutasyon tespit etmişlerdir (12).

Ramaswamy ve arkadaşları 37 ÇİD ve 13 duyarlı izolatın dizi analizi sonucunda, 6 izolatta SM direncinden sorumlu tutulan *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda Lys→Arg aminoasit değişikliği, 3 izolatta yine dirençten sorumlu tutulan *rrs* gen bölgesinin 1238. nükleotid pozisyonunda T→C değişikliği tespit etmişlerdir. SM duyarlı bir izolatta da *rrs* gen bölgesinin 516. nükleotid pozisyonunda C→T değişikliği tespit edilmiştir (79).

Brzostek ve arkadaşları Polonya’da yaptıkları çalışmada, 3705 *M. tuberculosis* izolatının 169’unda SM direnci tespit edilmiş ve bunların 88’i ile 15 tane duyarlı izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Dizi analizi sonucunda 27 (%30.7) izolatta *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda Lys→Arg aminoasit değişikliği, 3 izolatta aynı gen bölgesinin 88. kodonunda Lys→Arg aminoasit değişikliği ve 1 izolatta yine 88. kodonda Lys→Gln aminoasit değişikliği tespit edilmiştir. 2 izolatta *rrs* gen bölgesinin 912. ilmeğinin 906. pozisyonunda mutasyon tespit edilirken aynı gen bölgesinin 530. ilmeğinde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir (80).

Fukuda ve arkadaşları SM duyarlılığı ve *rpsL* gen bölgesindeki mutasyonları araştırdıkları çalışmada, 121 *M. tuberculosis* klinik izolatından 49’unun SM’e dirençli olduğunu tespit etmişler ve bu dirençli izolatların dizi analizi ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) sonuçlarına göre 23 izolatta genetik değişim belirlenmiştir. 18 izolatın *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda Lys→Arg aminoasit değişikliği, 4 izolatın 88. kodonunda Lys→Arg aminoasit değişikliği ve 1 izolatın aynı kodonunda Lys→Gln aminoasit değişikliği tespit edilmiştir. Mutasyon tespit edilen 1 izolatın MİK değerinin 16 mg/L olduğu diğer 22 izolatın MİK değerinin ≥ 256 mg/L olduğu belirtilmiştir. *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda mutasyon tespit edilen 18 izolatın RFLP sonuçlarında da bu izolatların SM’e dirençli olduğu tespit edilmiştir. Çok sayıda klinik örneğin incelenmesi gerektiği durumlarda RFLP yönteminin SM dirençli izolatların belirlenmesinde kullanışlı olacağı vurgulanmıştır (81).

Sekiguchi ve arkadaşlarının Japonya’da yapmış oldukları çalışmada SM dirençli 30, duyarlı 108 suş’a (toplam 138) DNA dizi analizi uygulanmış duyarlı suşlardan hiç birinde mutasyon saptanmazken SM dirençli 30 suşun 18’inde mutasyona rastlanmıştır. SM dirençli 30 suşun 13’ünün *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda mutasyon gözlenirken, 17 suшта *rrs* gen bölgesinde mutasyon gözlenmiştir (82).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada suşlarımızın tümünde *rpsL* gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır. Bu konuda yapılan daha önceki çalışmalarda da en sık mutasyona *rpsL* gen bölgesinde (%61-%94) rastlanmaktadır (10, 80). *rrs* gen bölgesinde diğer araştırmalarda da düşük oranda (%6, %24, %33) mutasyonlara rastlanmakla birlikte (10, 79, 80), Öztürk ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bölgemizdeki SM dirençli izolatlarda *rrs* gen bölgesine ait herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Bunun örnek sayımızın azlığı ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

BACTEC 460 TB yöntemiyle SM dirençli 2 izolat (NC-9 ve ZG-10 izolatları, Çizelge 4.2.) agar proporsiyon yönteminde, düşük ilaç konsantrasyonunda (SM2, 2 µg/ml) dirençli, yüksek ilaç konsantrasyonunda (SM10, 10 µg/ml) ise duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlarda da dizi analizinde, SM direnci ile ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmamıştır. Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada, yüksek seviyedeki ilaç konsantrasyonundaki (MIC>500 µg/ml) 24 izolatın hepsinde *rpsL* gen bölgesinde Lys43Arg şeklinde mutasyon tespit edilirken, düşük seviyeli SM dirençli (MIC, 10 µg/ml) 20 izolatın sadece bir tanesinin *rrs* gen bölgesinin 915. bölgesinin 903. pozisyonunda C→G'ye değişim saptandığı bildirilmiştir. *rrs* geninin 530. ilmeğinde ise hiçbir mutasyon tespit edilmediği belirtilmiştir. Araştırmacılar mutasyon tespit edilmeyen bu düşük seviyeli SM dirençli suşlarda alternatif başka bir mekanizmanın varlığının olabileceğini belirtmişlerdir. Bu doğrultuda, *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerinde değişiklik olamayan *M. tuberculosis* suşlarında, hücre permeabilite değişikliği, aminoglikozid modifiye eden enzimlerin üretimi veya diğer ribozomal moleküllerdeki değişikliklerin, düşük seviyeli ilaç direncinin oluşmasından sorumlu olabileceği ifade edilmiştir (13, 15).

Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda SM direnç oranları %1,6; %2,2; %2,5; %2,89; %4 şeklinde bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu oranlara benzer şekilde SM direnci %3,2 olarak belirlenmiştir (83, 84, 85, 86, 87).

Yan etkilerinden dolayı TB tedavisinde çok tercih edilmeyen SM, son yıllarda artan RIF ve INH direnci nedeniyle yeniden tedavi rejimlerinde yer almaya başlamıştır. Ülkemizde INH ve RIF direnci ile ilgili moleküler çalışmalara ait veriler SM'den daha fazla bulunmaktadır. Bunun başlıca nedeni bu ilaçların TB tedavisinde birinci seçenek olarak kullanılması, bu ilaçlara direncin daha fazla olması ve bu dirençlerin belirlenmesinde ticari kitlerin de bulunmasıdır. Ülkemizde SM direncinden sorumlu gen

bölgelerinin belirlenmesine yönelik ilk dört çalışmadan biridir. Aynı bölgede yapılan tez çalışmasında (29) 17 suşta *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerine ait mutasyon tespit edilmiş ancak bunların hangi gen bölgelerine ait olduğuna dair bilgiye rastlanmamaktadır. Konu ile ilgili Öztürk ve arkadaşlarının (77) Düzce’de yapmış olduğu çalışmada da SM dirençli 5 izolatta da (%100) *rpsL* gen bölgesinde mutasyon belirlenmiştir. Yine aynı konu ile ilgili yapılan doktora tezinde (78) SM’e dirençli 25 suşun 3’ünde *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda mutasyon saptanmıştır. *rrs* gen bölgesi mutasyonu tespit edemememizin başlıca nedeni; sınırlı sayıda izolatla çalışılması, bu bölgeye ait mutasyonların daha az sıklıkta olmasından kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Ancak izolatlarımızın üç yıllık döneme ait olması, bu konuda ülkemizde oldukça kısıtlı veri bulunması nedeniyle çalışmamızın önemli sonuçları olacağı kanısındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışma ile Mersin ilinde SM dirençli izolatlarda, SM direnci ile ilişkili değişik hedef bölgeleri analiz edildi ve *rpsL* gen bölgesinde meydana gelen tek bir mutasyon paterninin ortaya çıkarılmasının bölgemiz için önemli bir veri sağladığını düşünmekteyiz. Çalışmada kullandığımız sekans analiz tekniği, non-radyoaktiftir ve bu nedenle uygulaması geleneksel diğer radyoaktif yöntemlerden daha güvenlidir. Ayrıca, sonuçların bir gün içerisinde elde edilebilmesi ve laboratuvar şartları bir kez standardize edildikten sonra oldukça ekonomik olması önemli avantaj sağlamaktadır. Bu açıdan, bu yöntemin bölgemizdeki *M. tuberculosis* kompleksi izolatları arasındaki SM direnci ile ilişkili mutasyonların ortaya çıkarılmasında kullanışlı bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Şu anda rutin kullanıma giren sekans analizi yöntemi ile bölgesel izolatlarda da SM direnci belirlenebilir. Böylece bölgenin hatta ülkenin SM direnci ile ilgili gen bölgeleri arasında coğrafik dağılım ve epidemiyolojik veriler oluşturulabilir.

Antitüberküloz ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan genotipik yöntemlerin esasını, dirence neden olan mutasyonların çoğunun tespit edilmiş olması oluşturur. Ancak bu yöntemlerin pahalı olmaları, dirençli organizma proporsiyonunu belirleyememesi ve sessiz mutasyonları (klinikte dirence neden olmayan) belirlemesi en önemli dezavantajlarıdır. Rutin çalışmalarda her zaman altın standart yöntem olan klasik yöntemler kullanılmalı, eğer laboratuvar şartları uygunsa diğer hızlı ve moleküler yöntemler de klasik yöntemlerle beraber uygulanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Bilgehan H.** Mycobacteriaceae. In: Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları* 10. Baskı, İzmir: Barış Yayınları, **2000**:439-488.
2. **Kıyan M.** Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:419-455.
3. **Bilgiç H.** Dünyada Tüberkülozun Durumu. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Ankara, **23-25 Kasım 2006**:17-21
4. **Gümüşlü F.** Türkiye Tüberküloz Kontrol Programı. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Ankara, **23-25 Kasım 2006**:22-27.
5. **Erturan Z.** Kültür Ve Serolojik Tanı Yöntemlerinde Yenilikler. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Ankara, **23-25 Kasım 2006**:153-164.
6. **Alpaslan A.** Moleküler Tanı Yöntemlerinde Yenilikler. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Ankara, **23-25 Kasım 2006**:165-169.
7. **Kiraz N.** Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun, **11-12 Haziran 2003**:173-177.
8. **Pfyffer GE.** Drug-resistance tuberculosis: resistance mechanisms and rapid susceptibility testing. *Schweiz Med Wochenschr*, **2000**;130:1909-1913.
9. **Telenti A.** Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax*, **1998**;53:793-797.
10. **Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V.** Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Research in Microbiology*, **2004**;155:830-834.
11. **Honore N, Cole ST.** Streptomycin Resistance in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **1994**;38(2):238-242.
12. **Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM.** Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **1996**;40:1024-1026.

13. **Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT.** Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **1996**;40:1186-1188.
14. **Meier A, Sander P, Schaper K-J, Scholz M, Böttger EC.** Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **1996**;40(5):2452-2454.
15. **Ramaswamy S, Musser JM.** Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*, **1998**;79(1),3-29.
16. **Meier A, Kirschner P, Bange FC, Vogel U, Bo1tger EC.** Genetic Alterations in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Mapping of Mutations Conferring. Resistance *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **1994**;38(2),228-233.
17. **Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM.** Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clinical Microbiology and Infection*, **2007**; 13(6):620-626.
18. **Daniel TM.** The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, **2006**;100:1862-1870.
19. **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** Tuberculosis 2007 From basic science to patient care. 1st Ed. Erişim: TuberculosisTextbook.com. Erişim tarihi 10.02.2007
20. **Taylor GM, Young DB, Mays SA.** Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**;43:2236-2240.
21. **Kaufmann SH, Schaible UE.** 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiology*, **2005**;13:469-475.
22. **Gandhi NR, Moll A et al.** Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*, **2006**;368:1575-1580.
23. **Raviglione MC, Smith IM.** XDR tuberculosis--implications for global public health. *The New England Journal of Medicine*, **2007**;356:656-659.
24. **Shah NS, Wright A, Bai GH et al.** Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis *Emerging Infectious Diseases*, **2007**;13(3):380-387
25. **Smith I.** What is the health, social, and economic burden of tuberculosis. p. 233-7, In: Frieden T. (ed). Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring: questions and answers. 2nd ed. Geneva, WHO, **2004**. WHO/HTM/TB/2004.334. Erişim tarihi: 15.01.2007
26. **Dye C.** Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*, **2006**;367:938-940.

27. World Health Organization. The world health report **2004**: changing history. Geneva: WHO, 2004. Erişim: www.who.int Erişim tarihi: 14.12.2006
28. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. Geneva, Switzerland: WHO; **2006**. Publication WHO/HTM/TB/2006.362. Erişim tarihi: 02.12.2006
29. **Yaşar M.** Tüberkülozda Streptomisin ve Rifampisin Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ABD., Adana, **2000**
30. **Otkun M.** Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. *Klinik Dergisi*, Cilt 14. Sayı 2. **2001**;71-82.
31. **Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y, Ochi K.** Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, **2007**;63(4):1096-1106.
32. **Musser JM.** Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clinical Microbiology Reviews*, **1995**(8):496-514.
33. **Özışık NÇ.** Çok İlaça Dirençli Tüberküloz Hastalarında Bactec ve Agar Proporsiyon Yöntemleri ile Saptanan Etionamid Direncinin Klinik Önemi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi İstanbul **2006**
34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000-2004. *MWR Morb Mortal Wkly Rep* **2006**; 55: 301-5. Erişim: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5511a2.htm>. Erişim tarihi: 10.12.2006.
35. World Health Organization Report of the Meeting of the WHO Global Task Force on XDR-TB Erişim: http://www.who.int/tb/xdr/taskforcereport_oct06.pdf. Erişim tarihi: 25.12.2006.
36. **Zignol M, Hosseini MS, Wright A et al.** Global incidence of Multidrug-resistant tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, **2006**;194:479-485.
37. **Aziz MA, Wright A.** The World Health Organization & International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: A model for other infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, **2005**;41(4):258-262.
38. **Aziz MA, Wright A, Laszlo A et al.** Epidemiology of antituberculosis drug resistance (The Global Project on Anti-tuberculosis drug resistance surveillance): an updated analysis. *Lancet* **2006**;16:368(9553):2142-2154.

39. **Törün T.** Çok İlaça Dirençli Tüberküloz. Erişim: <http://www.istabip.org.tr/kg/cilt20sayi1/cokilacadirencli.pdf>. Erişim tarihi: 15.01.2007.
40. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. EUCAST Discussion document E.DIS 8.1 December **2001**.
41. **NCCLS.** Antimycobacterial Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*; Tentative standart. **1995**
42. **Tansel Ö.** Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. Erişim: http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Ozlem_Tansel.pdf. Erişim tarihi: 05.12.2006.
43. **Uzun M.** Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemi. Erişim: http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Meltem_Uzun.pdf. Erişim tarihi: 10.11.2006.
44. **Kocagöz T.** Etkin Tüberküloz Tanısı İçin Nerede, Ne zaman, Hangi İnceleme. *ANKEM*, **2007**;21:261-265.
45. **Kiper N.** Çocukluk Çağı Akciğer Tüberkülozu. Erişim: http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Nural_Kiper.pdf. Erişim tarihi: 26.11.2007.
46. **Esen N.** Tanı ve İlaç Duyarlılık Testlerinde Moleküler Yöntemlerin Değeri. Erişim: http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Nuran_Esen.pdf. Erişim tarihi: 18.11.2006
47. **Kayar MB.** Mycobacterium tuberculosis suşlarında Direncin Moleküler Yöntemlerle Tespiti. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD. Adana **2007**
48. **Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H et al.** Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **1997**;41:2093-2098.
49. **Makinen J, Marttila HJ, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H.** Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2006**;44:350-352.
50. **Harper DR.** Molecular Virology: A Medical Perspectives Book, 1st.Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **1994**.
51. **Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, **2001**.
52. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 2, 2nd. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.

53. **Serin MS.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR). Aslan G, Emekdaş G, Köksal F, Serin M.S. IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu: Uygulamalı Moleküler Kurs Kitabı, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No. 51*, Mersin, **2005**:37-52.
54. PCR-Symposium. Erişim: http://derma.klinikum.unimuenchen.de/Alte%20Seiten/PCR_symposium.htm. Erişim tarihi: 10.02.2007.
55. Advances in the diagnosis of sexually transmitted diseases caused by bacteria. Erişim: <http://www.roche.com/pages/facets/1/chlamyde.htm>. Erişim tarihi: 05.03.2007
56. **Taylor GR.** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. İn: McPherson M.J, Quirke P, Taylor G.R. *PCR Volume 1: A Pratical Approach*, 1st Ed. New York: Oxford University Press, **1991**:1-14.
57. **McPherson MJ, Moller SG.** PCR: The Basics from Background to Bench, 1st. Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **2000**.
58. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manuel, Book 1, 2nd. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
59. **Horasanlı S.** Dizi Analizleri ve Biyoinformatik. İn: Ustaçelebi Ş., Abacıoğlu H., Badur S. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, **2004**:89-99.
60. **Ban M.** DNA Sequencing and PCR Methods. *Techniques in Neuroscience*. **2006**:5(6);18-19.
61. **Caetano-Anollés G, Gresshoff PM.** Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. *Promega Notes Magazine*. **1994**:45;13.
62. **Qu L, Li X, Wu G, Yang N.** Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **2005**:(26);99-101.
63. **Promega Technical Manuel.** Silver Sequence™ DNA Sequencing System, Instructions for use of products Q4130, Q4131 and, Q4132. Erişim: www.promega.com Erişim tarihi: 05.11.2006
64. **Isenberg DH.** Homogenization-decontamination Procedures. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: *ASM Pres*, **2000**: 182-184.
65. **Aslan G.** Hasta örneklerinin işlenmesi ve kültürü. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, **2004**. Kurs kitabı;10-18.
66. **Isenberg DH.** Acid, fast stain procedures. Essentials procedures for clinical microbiology. Washington, D.C: *ASM Pres*, **2000**:179-181.

67. **Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiyede tüberkülozun kontrolü için başvuru kitabı. 1. baskı, Ankara: Rekmay Ltd. Şti., **2003**;12-14.
68. **Siddiqi SH.** (Becton Dickinson and Company) 1995. BACTEC 460 TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.
69. **Sürücüoğlu S.** Tüberküloz basillerinin identifikasyonu. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, **2004**. Kurs kitabı;30-43.
70. **Grange JM, Yates MD, N. de Kantor I.** Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second Edition. World Health Organization **1996**.
71. **Aziz M A, Laszlo A, Raviglione M, Rieder H, Espinal M, Wright A.** Guidelines for Surveillance of Drug Resistance In Tuberculosis. Second Edition. World Health Organization. Geneva; **2003**.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia and other aerobic Actinomycetes; Tentativ Standard- Second Edition NCCLS document M24-T., Pensylvania USA (2002).
73. **Esen N, Gündüz AT.** Dokuz Eylül Üniversitesinde İzole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında ilaç direnci (2000-2002) *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **2003**;33:337-342.
74. **Grange JM, Yates MD, N. de Kantor I.** Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second edition. World Health Organization **1996**.
75. **Sajduda A, Brzostek A, Popławska M, Augustynowicz-Kopec' E, Zwolska Z, Niemann S, Dziadek J, Hillemann D.** Molecular Characterization of Rifampin and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Poland. *Journal of Cincical Microbiology*, **2004**;42(6):2425-2431.
76. **Brunello F, Favari F, Fontana R.** Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB Systems for Recovery of Mycobacteria from Various Clinical Specimens. *Journal of Cincical Microbiology*. **1999**; 37(4):1206-1209.
77. **Öztürk E, Saniç A, Kaya D, Ceyhan İ.** Molecular Analysis of Rifampin and Streptomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Tuberculosis in Düzce, Turkey. *Japanese. Journal of Infectious Diseases*, **1995**; 58:309-312.
78. **Erdem EN.** *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında *rpsL* 43. Kodon Mutasyonu ile Oluşan Streptomisin Direncinin Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu ve Floresans Rezonans Enerji Transferi Kullanılarak Hızlı Şekilde Saptanması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Ankara **2001**.

79. **Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A et al.** Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *Journal of Medical Microbiology*. **2004**; 53:107-113.
80. **Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T et al.** Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **2004**; 8(8):1032-1035.
81. **Fukuda M, Koga H, Ohno H et al.** Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1999**; 43:281-284.
82. **Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E et al.** Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **2007**; 45(1):179-192.
83. **Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğancı L.** Mikobakteriyoloji Laboratuvarımızda 2002 Yılında Tüberküloz Olgularından İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks (Mtc) Suşları ve Antitüberküloz İlaç Duyarlılık Sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi*. **2003**;43(3):256-262.
84. **Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F.** *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Antitüberküloz İlaçlara Direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi'nin İki Yıllık Sonuçları. *İnfeksiyon Dergisi*. **2003**;17(1):23-26.
85. **Kartaloğlu Z, Bozkanat E, Öztürkeri H, Okutan O, İlvan A.** Bactec Yöntemi Kullanılarak Primer Antitüberküloz İlaç Direnci Saptanan 365 Tüberküloz Olgusu. *Solunum*, **2002**;4(4):443-448.
86. **Korkmaz G, Balcı İ, Bayram A, Karşılığıl T.** *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Kökenlerinin Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Saptanmasında Bactec ve Agar Proporsiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2006**;20(1):7-14.
87. **Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, Sünbül M, Günaydın M, Saniç A.** Klinik Örneklerden İzole Edilen Tüberküloz Basili Kompleksinin Majör Antitüberküloz İlaçlara Direnç Oranları. *ANKEM*, **2004**;18(4):189-192.

ÖZGEÇMİŞ

14.06.1980 tarihinde Kayseri ilinde doğdu. Liseyi Ankara'da tamamladı. 1998 yılında Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2003 yılında mezun oldu. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.