

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RİFAMPİSİN DİRENÇLİ *M. tuberculosis* İZOLATLARINDA
RİFABUTİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

Bio. HATİCE ELMAS

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ


Prof. Dr. Gönül ASLAN

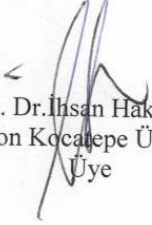
Tez No: 2011 -013

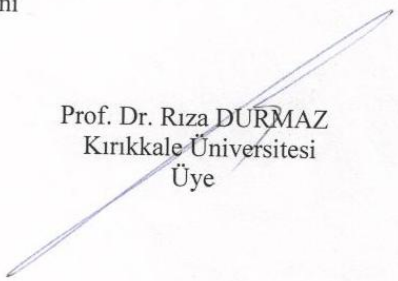
2011 - Afyonkarahisar

KABUL ve ONAY


Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi
olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 30.05.2011


Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Rıza DURMAZ
Kırıkkale Üniversitesi
Üye

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hatice ELMAS'ın "Rifampisin Dirençli *M. tuberculosis* İzolatlarında Rifabutin Direncinin Belirlenmesi" başlıklı tezi, 10.06.2011
günü saat 11:00 ..da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili
maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. İsmail BAYRAM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve Yüksek Lisans eğitimim sürecinde, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her konuda olduğu gibi tez çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutlu olduğum danışman hocalarım Prof. Dr. Gönül ASLAN ve Doç.Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim.

Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ, Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE, Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Özlem MİMAN başta olmak üzere, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Semra UTKU'ya ve özellikle laboratuvar çalışmalarım sırasında destek ve paylaşımları ile katkı sağlayan Öğr. Gör. Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans süresince birlikte çalıştığım ve dostluklarını asla unutmayacağım adlarını yazamadığım değerli arkadaşlarıma; tahsil hayatıma boyunca gösterdikleri destek, hoşgörü ve sabır için aileme ve anlayışını daima yanımda hissettiğim değerli eşim Yasin Elmas'a teşekkür ederim.

Bio. Hatice ELMAS

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Morfoloji.....	2
1.2. Virülans ve Patojenite.....	2
1.2.1. Lipitler.....	3
1.2.1.1. Trehaloz-6,6'-dimikolat (Kord Faktör)	3
1.2.1.2. Sülfatidler (Sülfolipitler)	3
1.2.1.3. Wax D.....	3
1.2.1.4. Proteinler	4
1.3. Antijenik Yapı	4
1.4. Mikobakterilerin Boyanma Özellikleri	5
1.5. Örneklerin İşlenmesi.....	6
1.6. Kültür.....	7
1.6.1 Katı Besiyerleri	7
1.6.2. Bifazik Besiyerleri	8
1.6.3. Sıvı Besiyerleri.....	8
1.7. Moleküler Tanı	8
1.8. İdentifikasyon	9
1.8.1. BACTEC NAP Testi	9
1.8.2. BACTEC MGIT PNB (P-Nitro Benzoik Asit) Testi	10
1.9. Duyarlılık Testleri.....	10
1.9.1. Klasik Fenotipik Yöntemler	10
1.9.1.1. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi.....	11
1.9.1.2. Direnç Oran Yöntemi	11
1.9.1.3. Hızlı Duyarlılık Testleri	12
1.9.1.4. Yeni Fenotipik Yöntemler	12
1.9.1.5. Genotipik Yöntemler	13
1.10. Tedavi	13
1.11. Direnç	14
1.11.1. Streptomisin Direnci	14
1.11.2. İzoniazid Direnci	15
1.11.3. Rifampisin Direnci	15
1.11.4. Etambutol Direnci	16
1.11.5. Pirazinamid Direnci	16
1.12. Yeni Antitüberküloz İlaç Araştırmaları	17
1.13. Geliştirilme Aşamasındaki Yeni Tüberküloz İlaçları	17
1.13.1. Rifabutin.....	17

2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
2.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler	20
2.2. Kullanılan Boyaların Hazırlanması	20
2.2.1. Karbolfuksin Hazırlanması	20
2.2.2. Metilen Mavisi Hazırlanması	20
2.2.3. Asit Alkol (%3) Hazırlanması.....	21
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	21
2.3.1. Sodyum Hipoklorid (%10) Hazırlanışı	21
2.3.2. İlaçlı Besiyeri Hazırlamasında Kullanılan Rifabutin'in Konsantrasyonunun Hesaplanması	21
2.4. Kullanılan Besiyerleri.....	22
2.4.1. LJ Besiyerinin Hazırlanması	22
2.4.2. Middlebrook 7H10 Agar Besiyerinin Hazırlanması	23
2.4.3. Çalışmada kullanılan kontrol parametreleri	24
2.5. Yöntemler	25
2.5.1. Agar Proporsiyon Hazırlığı	25
2.5.2. Agar Proporsiyon İnokulum Hazırlığı.....	26
2.6. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
2.7. Kullanılan Cihazlar.....	29
3. BULGULAR.....	30
3.1. LJ pasaj sonuçları	30
3.2. Boyama Sonuçları.....	30
3.3. Agar Proporsiyon Sonuçları	31
4. TARTIŞMA	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
ARB	Aside dirençli bakteri
Arg	Arjinin
cfu	Colony Forming Unit
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİDTB	Çok İlaç Dirençli Tüberküloz
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMB	Etambutol
EZN	Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FDA	Food and Drug Administration
GLC	Gas-liquid Chromatography
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H₂O₂	Hidrojen peroksit
INH	İsoniazid
LJ	Löwenstein- Jensen
MGIT	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NAD	Niasini Nikotinamid Adenin Dinükleotide
NALC	N-Asetil-L-Sistein
NaOH	Sodyum hidroksit
NAP	P-Nitro-Asetilamino-Hidroksi Propiyofenon
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
PAS	Pirazinamid
RBT	Rifabutin
PNB	P-Nitrobenzoik Asit
RIF	Rifampisin
RNA	Ribo Nükleik Asid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SF	Serum Fizyolojik
SM	Streptomisin
TB	Tüberküloz

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1. H37Rv ve çalışmaya dahil edilen suşların agar proporsiyon yöntemi ile rifabutine karşı duyarlılık paternleri.....	33
Tablo 5.1. Rifabutinin MİK değeri.....	37
Tablo 5.2. Rifampisin ile rifabutin arasındaki çapraz direnç.....	39

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Sol taraftaki resim, LJ besiyerinde üreyen <i>M. tuberculosis</i> suşunun görünümü, sağ taraftaki resim ise ekim yapılmamış LJ besiyerinin resmi.....	31
Resim 3.2. EZN boyoma sonucu <i>M. tuberculosis</i> suşunun mikroskopik görünümü (Fz-Borstel, 2011).....	32
Resim 4.3. Sağdan sırasıyla 1 ve 4 numaralı <i>M. tuberculosis</i> suşunun 2 µg/ml ilaç konstrasyonlarında Middlebrook 7H10 besiyerindeki görüntüsü.....	34
Resim 4.4. 9 numaralı suşunun 1 µg/ml ilaç konstrasyonunda ilaçlı Middlebrook 7H10 besiyerindeki görüntüsü.....	34

1. GİRİŞ

Mycobacterium ismi mikroorganizmanın sıvı besiyerinde küflere benzemesinden dolayı Yunanca “fungus (myces)” ve “küçük çubuk (bakterion)” kelimelerinden türetilmiştir. İlk olarak literatüre Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology-1896'da giren *Mycobacterium* cinsi içinde bugün seksenden fazla tür tanımlanmıştır (Yaylı ve ark., 2003; Gümüşlü, 2006; Gümüşlü ve ark., 2007).

Enfeksiyona neden olan *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* ve *M. canetti* 'nin genetik yakınlıkları temel alınarak bu türler “*M. tuberculosis complex*” adı altında toplanmışlardır. Kazanılmış immün yetmezlik sendromunun (Acquired Immune Deficiency Syndrome- AIDS) ortaya çıkışıyla birlikte diğer bazı mikobakteri türlerinin de (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ve *M. avium complex*) klinik önemi anlaşılacak, diğer mikobakteri türlerine ilgi artmıştır (Metchock ve ark., 1999; Çelik ve Eyüboğlu, 2000; Alpaslan, 2003; Miller, 2000).

Runyon gruplandırmasında I, II, III ve IV. gruplar “atipik mikobakteriler” olarak adlandırılmışsa da son yıllarda bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve bu grup için “MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis)” veya tüberküloza (TB) neden olmayan *Mycobacteria* “non-tuberculosis mycobacteria” terimlerinin kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiş. Ancak zamanla mikobakteri türlerinin tanımlamasında bu terimlerin de yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli mikobakteri türlerinin oluşturduğu enfeksiyonların tedavileri farklı olduğu için tüm mikobakterilerin tür adları ile belirtilmeleri gerekmektedir (Tortoli, 2003; Drennan ve Guidera, 2002).

Çalışma, daha önceki yıllarda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan ve rifampisin(RIF) dirençli olduğu bilinen *M. tuberculosis* suşlarının rifabutinin(RBT) *in vitro* etkinliği agar proporsiyon yöntemiyle araştırılması amacıyla yapılmıştır.

1.1. Morfoloji

Mikobakteriler hafifçe düz yahut kıvrık çomak şeklinde, 0,2–0,8 µm eninde, 1–4 µm boyunda, kapsülsüz, sporsuz, hareketsiz ve aerop ortamda üreyebilen mikroorganizmalardır. Genel olarak mikobakterilerin hücre yapısı diğer bakterilerin hücre yapısına benzemektedir. Önemli farklar hücre kimyasal yapısı ile bu bakterilerin çeperinin yapısından kaynaklanmaktadır (Gupte, 2006).

Mikobakterilerin hücre duvarı, lipitçe zengin olan dallanmış ve uzun zincirli mikolik asitlerinden oluşmaktadır. Diğer bakterilerden farklı olarak lipitçe zengin hücre duvarları anilin boyaların geçişine izin vermediğinden Gram yöntemi ile boyanmazlar. Hücre duvarının boyanmasında yoğun lipit tabakasından anilin boyaların geçebilmesi için ısı ile birlikte fenol uygulanır. Isı ile birlikte hücre duvarına iyice temas eden boyanın uzaklaştırılmasında sadece alkol kullanımı yetersiz olup asit-alkol şeklinde uygulanır, ilk boya asit kullanımına karşın hücre duvarında kalır. Bu güçlü aside dirençlilik özellikleri nedeniyle aside dirençli bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar (Mandell ve ark., 2005; Pfyffer ve ark., 2003; Maza ve ark., 2004; Murray ve ark., 1994).

Mikobakterilerde bulunan kalın lipit hücre duvarı 3 makro molekülden oluşur: peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asit (Gedikoğlu, 1997; Maza ve ark., 2004). Ayrıca mikobakteriler, beta (β) laktamaz ve diğer ilaç modifiye enzimleri salgılamaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı, bakterilere karşı kullanılan ilaçların büyük bir çoğunluğuna doğal olarak dirençlidir (Jarlier ve Nikaido, 1994).

1.2. Virülans ve Patojenite

M. tuberculosis virülansına neden olan net bir yapı henüz gösterilmemiştir. Fakat yapılan çalışmalar kord faktör ve sülfatidler gibi bazı immünreaktif bileşenlerin virülanstan sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur. Virülans ve patojeniteden sorumlu bazı bileşenler şunlardır;

1.2.1. Lipitler

Mikobakteriler normal bakterilerin içerdikleri lipitlerden farklı daha özel ve karmaşık yapıları lipitler içermektedirler. Başlıcaları mikolik asit, wax D, trehaloz-6,6'-dimikolat (kord faktör), fosfolipitler, glikolipitler, lipoglikan, lipoprotein ve sülfolipitlerdir.

1.2.1.1. Trehaloz-6,6'-dimikolat (Kord Faktör)

Virulan olan TB suşlarında rastlanmaktadır. Basile küme oluşturma kabiliyeti kazandıran kord faktör, mikolik asitlerin trehaloz gibi şekerlere bağlanması ile oluşmaktadır. Kord faktörü konak hücrenin mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyon mekanizmasında hasara neden olurlar. Makrofaj uyarımını, savunma sistemini harekete geçirme ve granülom oluşturma yeteneğine sahiptirler. Antitümör özelliği vardır. Alternatif kompleman yolunu aktive eder, polimorfonükleer lökosit göçünü engeller (Kıyan, 1999).

1.2.1.2. Sülfatidler (Sülfolipitler)

Sülfür içeren glikolipitlerdir. Kord faktörünün toksisitesini arttırmanın yanında lizozom fagazom birleşmesini engelleyerek basilin konak tarafından parçalanıp yok edilmesini önlerler.

1.2.1.3. Wax D

Pepdidoglikan yapısındadır. *M. tuberculosis*'ten elde edilip verilmesi halinde yapısında bulunan N-asetil muramildipeptid nedeni ile hücrel immün yanıt oluşumu, antikor yapımında ve interferon yapımını indükleyen adjuvan etki gösteren bir maddedir (Kıyan, 1999).

1.2.1.4. Proteinler

En önemli işlevleri duvar polimerlerinin sentezinde rol almak, atık maddelerin hücre duvarından geçmesini sağlamak, porları oluşturmak ve basile antijenik özellik kazandırmaktır. Proteinler bulduklar yer, görevleri, kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre başlıca 6 grupta sınıflandırılır (Yaylı ve ark., 2003; Gandhi ve ark., 2006). Bunlar; membran ile ilişkili proteinler, peptidoglikan ile ilişkili proteinler, dış hücre duvar proteinleri, sitoplazmik proteinler ve ısı şok proteinleri (hsp) olarak özetlenebilir.

1.3. Antijenik Yapı

M. tuberculosis'in yapısında yer alan protein, polisakkarit ile lipitlerin tamamı immünojeniktir. Bu bileşenler immünsüpresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi oldukça farklı etkilere sahiptir. Mikobakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda temel olarak hücrel immün sistem rol oynadığından proteinler, anahtar immünojen olarak kabul edilirler (Dail ve ark., 2008).

TB immünolojik tanısında kullanılan ilk yöntem tüberkülin deri testidir. Tüberkülin deri testi zengin bir antijen karışımından oluşur (Huebner ve ark., 1993; Andersen ve ark., 2000).

Daha önceden tüberküloz basili ile karşılaşan kişilerin, ilk defa TB basili ile karşılaşan kişilere göre daha hızlı ve belirgin reaksiyon oluşturduğunu belirtildikten sonra TB enfeksiyonu tanısında intradermal olarak old tüberkülin kullanılmaya başlanmıştır (Pfyffer ve ark., 2003). Old tüberkülin, TB basilinın sentetik besiyerinde üretilmiş kaba bir ekstratıdır ve kontaminasyona neden olan komponentleri içermesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyularak PPD (Purified Protein Derivative-PPD) geliştirilmiştir.

PPD ilk defa Seibert ve Glenn tarafından sentetik besiyerinde üretilmiş basilin (Old tüberkülin) öldürülerek saflaştırılıp steril hale getirilmesi ile elde edilmiştir. PPD, Old tüberküline nispeten daha saf bir antijen karışım olmasına rağmen tam anlamda saflaştırılamaması ve çapraz reaksiyonlarla karşılaşılmasına rağmen immünoagnostik önemini hala korumaktadır.

PPD bireylerin aktif TB durumunu göstermemekte, bireyin daha önce TB etkeni bakteriler ile enfekte olup olmadığını göstermektedir (Pfyffer ve ark., 2003; Cengiz, 1999).

1.4. Mikobakterilerin Boyanma Özellikleri

Mikroskopik inceleme maliyeti en düşük, en pratik, en yaygın olarak kullanılan ve tanısal değeri oldukça yüksek bir yöntemdir. Duyarlılığı düşük olmamasına karşın hızlı sonuç alınması nedeniyle laboratuvarlarda yoğun şekilde uygulanmakta olup; tanı değeri oldukça yüksektir (Ceyhan, 2011).

Klinik örnekten bulunan diğer bakteriler boyama işleminin aşamalarından biri olan asit alkolle muamele sırasında ilk almış oldukları boyayı geri verirler. Mikobakteriler ise ilk aldıkları boyayı aside dirençli oldukları için geri vermezler ve aside dirençli bakteriler (ARB) olarak isimlendirilirler. Boyama işlemi sonunda hazırlanan preparatlarda ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığına ilişkin ilk bakteriyolojik kanıttır (Mandell ve ark., 2005; Pfyffer ve ark., 2003). ARB saptanması için örnekte 5000-10000 basil/ml bulunması inceleme esnasında pozitif bulgu elde etmek için gereklidir (Ceyhan, 2011; Köksal 2000; Maza ve ark.,2004).

İkincil bir boyama yöntemi olan Fluorokrom da (Auromine O, Rhodamine B) mikobakteri hücre duvarı mikolik asitlerine floresan bağlanma ve izotiyosiyonat filtreli mavi ışıkta, koyu zemin üzerinde parlak sarı veya turuncu-kırmızı bakteriler görülür (Mandell ve ark., 2005; Pfyffer ve ark., 2003; Maza ve ark., 2004; Murray ve ark., 1994).

1.5. Örneklerin İşlenmesi

Klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını tespit etmek ayrıca patojen olan ve patojen olmayan türleri ayırt etmek TB tanı laboratuvarının amacıdır. Uygun klinik örneklerden mikobakterilerin izole edilmesi TB'un kesin tanısı sağlar. Klinik örnekler ne kadar uygunsa TB laboratuvarının tanındaki başarısı o kadar artar. Enfeksiyon çok farklı organ ve dokuları tutabildiğinden örnek seçimine dikkat edilmelidir. Pulmoner örnekler ve ekstrapulmoner örnekler gibi farklı klinik materyallerden mikobakteriler tespit edilebilir (Maza ve ark., 2004, Baylan ve ark., 2003).

Normal flora içermeyen örnekler alınmaları veya taşınmaları esnasında kontaminasyon olduğu düşünülen klinik örneklere; organik kalıntıların uzaklaştırılması, kontaminasyona neden olan bakteri ve mantarları elimine etmek amacıyla dekontaminasyon işlemi uygulanır. Normal flora içerdiği bilinen klinik örneklere de aynı işlem uygulanır. Günümüze kadar çok sayıda homojenizasyon-dekontaminasyon yöntemleri tanımlanmıştır. Bunlar;

- N-asetil-L-sistein (NALC)-NaOH yöntemi,
- %4'lük NaOH yöntemi,
- Zefiran-trisodyum-fosfat yöntemi,
- Oksalik asit yöntemi,
- Setilpridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi,
- Sülfirik asit yöntemi olarak sıralanabilir.

Bu yöntemler arasında en yaygın kullanılan NALC-NaOH ve %4'lük NaOH yöntemleridir (Babacan ve Över, 2002; Pfyffer ve ark., 2003; Maza ve ark., 2004; Forbes ve ark., 2007; Korkmaz ve ark., 2006).

1.6. Kültür

Mikobakteri türlerinin neden olduğu enfeksiyonların mikrobiyolojik tanısında direkt mikroskopiden daha duyarlı ve tür tespiti ile antimikrobiyal duyarlılık testlerine de olanak sağlaması ile standart yöntem olarak kültür kabul edilir (Uzun ve Ünal, 2002).

M. tuberculosis zorunlu aerop olması nedeniyle anaerop ortamda ürememektedir. Ancak %5-10 CO₂ içeren ortamlar ise üremeyi arttırıcı özelliktedir. Optimal üremesi için pH 7 ve sıcaklığı 35-37°C, olması yeterlidir. *M. tuberculosis* türünün bir üreme siklusu için 18 saate ihtiyaç duyar. Bu nedenle tek bir mikobakterinin katı besiyerinde görünebilir koloni oluşturabilmesi için en az iki haftalık bir süreye gereksim vardır.

Katı besiyerlerinde kuru, kirli beyaz renkte, yüzeyi ve çevresi girintili çıkıntılı koloniler oluştururlar. Gliserin bulunan yarı katı ve sıvı besiyerlerinde zorunlu aerop olmalarından dolayı yüzeyde zar oluşturarak ürerler (Cengiz, 1999; Hall ve Howard, 1994). Mikobakteriler zengin içerikli yapıda sıvı, yarı katı, katı besiyerlerinde üreme gösterirler (Uzun ve Ünal, 2002).

1.6.1 Katı Besiyerleri

Genellikle mikobakterilerin izolasyonu amacıyla gliserol ve asparajin (veya glutamat) içeren yumurta veya agar temelli katı besiyerleri kullanılır. Bunlar; selektif ve nonselektif besiyerleri olarak adlandırılır.

- **Selektif Besiyerleri:** Löwenstein Jensen (LJ) Gruft (penisilin, nalidiksik asit), Mycobactosel LJ (sikloheksimid, linkomisin, nalidiksik asit), Mycobactosel Middlebrook 7H10, Mitchison 7H11 (karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat, amfoterisin B) olarak sıralanabilir.
- **Nonselektif Besiyerleri:** LJ, Petraghani, American Thoracic Society, Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11 olarak sıralanabilir.

1.6.2. Bifazik Besiyerleri

Bifazik besiyerleri genellikle CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı gibi gaz basıncındaki değişiklikleri, fluorometrik veya kolorimetrik olarak ölçen sistemlerle kullanılır. Bunlara örnek olarak; Septi-Check (BD Biosciences) verilebilir. Bu besiyeri sıvı ve katı fazlardan oluşur.

1.6.3. Sıvı Besiyerleri

Mikobakterin kültürü amacıyla ticari olarak sağlanabilen sıvı besiyerleri mikobakterileri daha kısa sürede ve daha yüksek duyarlılıkta tanımlanmasını sağlar (Uzun, 2003). Bunlar;

- MGIT (Becton Dickinson, Biosciences)
- MB Redox (Heipha Diagnostica Biotest)
- BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Biosciences)
- BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Biosciences)
- BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, Biosciences)
- ESP II (Trek Diagnostics)
- MB/BacT ALERT 3D (BioMerieux)

1.7. Moleküler Tanı

Bakterilerin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen kültür yönteminin sonuçlanması uzun sürmesi nedeniyle daha hızlı, iş yükünü azaltan, duyarlı ve özgül testlere olan ihtiyaç artmaktadır. Konvansiyonel nükleik asit testleri zaman kaybına, iş yükünün artmasına ve bazen de gereksiz harcamalara neden olmaktadır. Günümüzde tüberküloz basillerinin tanı ve direncini belirlemede kullanılan moleküler testler için önemli gelişmeler söz konusudur. Özellikle “Xpert MTB/RIF” (Cepheid, USA) için; yarı kantitatif nested gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle, *M. tuberculosis* kompleks ve RIF direncini doğrudan

hasta materyalinden, bir tek çalışma ile 2 saatten kısa sürede saptayabildiği ifade edilmektedir (Durmaz, 2010; Çiftci, 2011).

Ek olarak örneklerden direkt olarak *M. tuberculosis* kompleks varlığını araştırmak için farklı ticari moleküler tanı sistemleri geliştirilmiş olup bunlar; Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD, Gen-Probe) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (Roche Diagnostic System)'olarak ifade edilmektedir. (Durmaz, 2010; Winn ve ark., 2006).

1.8. İdentifikasyon

Doğru antimikobakteriyel tedavi ve veri tabanları oluşturabilmek için farklı metotlar kullanılarak mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması gerekmektedir. Bunun için çeşitli tanımlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar; konvansiyonel biyokimyasal yöntemler, BACTEC NAP (p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon) testi, BACTEC MGIT PNB (p-nitro benzoik asit), moleküler yöntemler veya kromatografik analiz yöntemleri ile yapılabilir. Günümüzde en sık kullanılan NAP ve BACTEC MGIT PNB testleridir.

1.8.1. BACTEC NAP Testi

M. tuberculosis kompleks suşlarını inhibe eden, ancak MOTT türlerini inhibe etmeyen, böylelikle sınırlı bir identifikasyon sağlayan bazı kimyasal maddeler kullanılmaktadır; p-nitrobenzoat, hidroksilamin hidroklorür, 8-azaguanin, nitroksolin ve NAP bunlardan bazılarıdır. NAP, kloramfenikol sentezinde bir ara üründür ve kloramfenikole göre *M. tuberculosis* kökenine dört kat daha etkilidir (Winn ve ark., 2006). BACTEC 460TB sisteminde kullanılan bu yöntem ile identifikasyon 3-5 gün içinde sağlanmaktadır (Uzun ve Ünal, 2002; Hall ve Howard, 1994; Della-Latta, 2004).

1.8.2. BACTEC MGIT PNB (P-Nitro Benzoik Asit) Testi

M. tuberculosis'in PNB'i kullanmasına dayanan bir testtir. BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan bu yöntem ile identifikasyon 2-3 gün içinde sağlanmaktadır. İkinci günün sonunda PNB içeren tüpte floresan saptanması üreyen mikobakterinin MOTT, floresan saptanmaması ile *M. tuberculosis* kompleks olarak değerlendirilmesine yardımcı olur (Dickinson ve Mitchison, 1987; Burman ve ark., 1999; Giampaglia ve ark., 2007; Giampaglia ve ark., 2005).

1.9. Duyarlılık Testleri

TB kontrol programlarının önceliklerinden birini de hızlı ve güvenilir şekilde ilaç direncinin belirlenmesini oluşturmaktadır. İlaç direncinin belirlenmesi ile birlikte hastalara daha doğru olan tedavinin başlatılmasını ve böylece tedavi süresinin kısaltılması sağlanmaktadır. Son zamanlarda iş gücünü azaltan ve ilaç direncinin belirlenmesinde daha hızlı olan temelinde fenotipik ve genotipik yöntemlere dayanan farklı teknolojiler ve yaklaşımlar önerilmektedir. Genotipik yöntemlerin önemli bir diğer avantajı ise mikobakterilerin üremesine gereksinim olmaması, hatta klinik örneklerden direk çalışılabilmesidir (Murray ve ark., 1994).

1.9.1. Klasik Fenotipik Yöntemler

Antibiyotiklere duyarlı ve dirençli suşlar fenotipik yöntemle ayırt etmek için antibiyotik içeren yumurta ve agar içeren besiyerinde inkübasyona bırakılır. Fenotipik yöntemler direkt veya indirekt uygulamaları içerir. Direkt yöntemde rutinde gelen klinik örnekler homojenizasyon ve dekontamasyon işlemlerinden sonra veya direkt besiyerinde üretilen kolonilerden ilaçlı ve kontrol için ilaçsız besiyerlerine ekilmektedir (Murray ve ark., 1994).

1.9.1.1. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi

Antibakteriyel ilaçlara karşı bir ilacın Minimal İnhibitör Konsantrasyonunu (MİK) saptama amacıyla bu yöntemde, 2×10^3 veya 2×10^4 koloni oluşturan birim/mililitre (kob/ml) mikobakteri solüsyonu içeren, hem belirli dilüsyonlarda ilaç içeren hem de ilaç içermeyen kontrol besiyerlerine ekilir. İnkübasyon sonunda besiyerleri dilüsyon sırasına göre sıralanarak mikrobiyal üreme olmayan besiyerindeki ilaç dilüsyonu o suşun MİK değeri olarak kabul edilir (CLSI, 2011).

1.9.1.2. Direnç Oran Yöntemi

Bu yöntemde mutlak konsantrasyon yönteminde olduğu gibi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antibiyotik dilüsyonları ile mutlak konsantrasyondan farklı olarak standart suşunun MİK değerine bölünmesi ile direnç belirlenir. Bu yöntemle direnci bilinmeyen bir suşun standart suş ile değerlendirilmesi prensibine dayanır. Kısaca bu yöntem test edilen ilacın iki kat dilüsyonunu içeren tüplere test suşu ve standart suşun standardize edilen inokülumları eklenerek 4 hafta 37°C 'de inkübe edilir (Gümüşlü ve ark., 2007).

- **Proporsiyon Yöntemi:** Proporsiyon yöntemi daha önceden standart bir ilaç dilüsyonu hazırlanan (Kritik Konsantrasyon) ilaca karşı duyarlı olan mikroorganizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Klinik ve Laboratuvar Standart Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) tarafınca proporsiyon yöntemi kabul edilmekle birlikte dünya genelinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. CLSI'nın kabul ettiği yöntemde BACTEC 460TB ile BACTEC MGIT 960 gibi otomatize cihazlara yönelik kullanılan Middlebrook 7H10 besiyerine ekim yapılmaktadır (CLSI, 2011). Middlebrook 7H10 dışında oleik asit, albumin, dekstroz ile katalaz ilaveli Middlebrook 7H10 veya 7H11 agar, antibiyotik diskleri bu yöntemde kullanılır. ARB pozitif hasta numunesinden direkt ya da kültür de üremiş mikobakterilerden indirekt olarak yapılabilir. Genel olarak şimdije kadar yapılan

çalışmalarda anti-TB ilaçlara direnç gösteren bakteri oranının da %1 düzeyi kriter alınarak ayarlanmıştır (Tansel, 2006).

1.9.1.3. 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 Deęiřimini Saptayan Kültür Sistemi (VersaTREK, AccuMed, Chicago, Ill.)

1.9.1.4. Yeni Fenotipik Yöntemler

TB varlığının tespiti için klasik yöntemler ve moleküler yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldıracak daha hızlı, güvenilir, iř gücü az gerektiren faja dayalı yöntemler (Faj Çoęaltma Yöntemi, Lusiferaz Genli Faj Yöntemi), Kolorimetrik Yöntemler (Alamar Blue, Tetrazolium Tuzları, Nitrat Redüktaz Yöntemi) gibi yeni yöntemler bulunmuştur. Bu yeni geliştirilen yöntemlerde direkt numuneden veya kültürden izole edilen mikobakterilerden çalışılabilmesi ayrıca avantaj oluşturmaktadır (Ülger, 2007).

1.9.1.5. Genotipik Yöntemler

İlaç dirençlerinin saptanmasında moleküler yöntemlerin hızlı sonuç vermesi, kültür gereksiniminin minimal olması veya direk numuneden çalışılabilirliği ile avantajlı yöntemlerdir. Moleküler yöntemlerle, direncin kanıtlanmasında dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi yeterli iken, dirençten sorumlu mutasyon görülmez ise; dirençli olduğu saptanan mikroorganizmalar için dirençten sorumlu başka gen bölgesi mutasyonları ya da başka mekanizmalar olabileceğini akla getirmektedir (Goloubeva ve ark., 2001).

Direncin belirlenmesinde; Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), Heterodupleks Analiz (HDF), Katı Faz Hibridizasyon Yöntemi, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) örnek olarak verilebilir. Bu yöntemlerin temeli dirence neden olan mutasyonların çoğunun tespit edilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat bu yöntemlerin hızlı olmasının yanında, pahalı olmaları, dirençli organizma proporsiyonunu belirleyememesi ve sessiz mutasyonları (klinikte dirence neden olmayan) belirlemesi büyük dezavantajlarından (Durmaz, 2010; Goloubeva ve ark., 2001; Wanger ve Mills, 1996).

1.10. Tedavi

TB basilleri de diğer mikroorganizmalar gibi doğal süreçte anti-TB ilaçlarına karşı direnç geliştirmişlerdir. Özellikle hücre yapısı nedeniyle birçok antibiyotiğe dirençlidir. Örnek olarak beta-laktamlar verilebilir. Zira bakteri doğal olarak beta-laktamaz enzimi bunların başında basilleri doğal olarak beta-laktamaz enzimi üretmektedir. Ayrıca özel hücre duvarı yapıları nedeni ile de pek çok antibiyotiği hücre içine geçirmezler. Mikobakteriler doğal antibiyotik direncinin yanında duyarlı oldukları anti-TB ilaçlara karşı genellikle belirli lokuslarda oluşan spontan mutasyonlar ile direnç geliştirirler. Mikobakterileri diğer bakterilerden farklı kılan önemli bir diğer özelliği ise plazmid ya da transpozon ile direnç genlerinin transfer edilememesidir (Yaylı ve ark., 2003; Pfyffer ve ark., 2003; Hall ve Howard, 1994)..

Anti-TB tedavide dönüm noktası 1944'te streptomisin (SM) Selman Waksman tarafından keşfi ile yaşanmış ve bu ilacın keşfi, araştırmacılarına Nobel ödülü kazandırmıştır. Fakat SM ye karşı ilk ilaç direnci 1946 yılında rapor edilmiştir (Otkun, 2001; Okamoto ve ark., 2007).

Kombine tedavinin önemi 1947'de zayıf etkili bir tüberkülostatik olan Pirazinamid'in (PAS) tedaviye eklenmesi ile SM direncinin en çok %9'a kadar çıkabildiği gösterilince anlaşılmıştır. Fakat PAS alan hastaların yarısından fazlasında görülen gastrointestinal yan etkiler önemli bir sorun oluşturmuştur; hastaların yaklaşık 1/3'ünde ilaç kesilmek zorunda kalınmıştır (Otkun, 2001).

Günümüzde TB tedavisinde birinci seçenek İzoniazid (INH), RIF, Etambutol (EMB) ve SM'dir. EMB dışındaki birinci seçenek ilaçlar bakterisittir (CLSI, 2011). 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, RBT, klofazimin, beta-laktamaz inhibitörleri, kinolonlar gibi kullanımı deneme aşamasında olan ilaçlar mevcuttur (Otkun, 2001).

1.11. Direnç

1.11.1. Streptomisin Direnci

SM diğer aminoglikozid grubu antibiyotikler gibi bakteri ribozomuna bağlanarak protein sentezini inhibe ederek bakterisidal etkilidir. Diğer bakterilerde aminoglikozidlere direnç asetilasyon ile ilacın inaktive edilmesi yoluyla olurken, *M. tuberculosis* türünde bu direnç şekline rastlanmamıştır. SM' e karşı oluşan direncin %80'ninde iki tür mutasyon saptanmıştır: Ribozomal S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde genellikle *Lys 43 Arg* mutasyonu olup daha nadiren *Lys 43 Thr* de oluşan nokta mutasyon (% 60) ve 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* geninde oluşan mutasyon (<%10) SM direncinden sorumludur (Rattanve ark., 1998). Ribozomlardaki bu

değişiklikler ilacın bakteriye bağlanmasını azaltarak dirence katkıda bulunur (Mandell ve ark., 2005; Pfyffer ve ark., 2003).

1.11.2. İzoniazid Direnci

Sentetik yapıda ve çoğalan mikobakteriler üzerine bakterisid etkili ön bir ilaçtır. Aktivite gösterebilmesi için katalazperoksidaz enzimi gerekmektedir. Aktif hale geçtikten sonra hücre içinde farklı biyolojik süreçler üzerine etki ederek mikobakterilerin hücre duvar yapısında bulunan mikolik asidin sentezini inhibe etmektedir. Katalaz-peroksidaz genini kodlayan *katG* geninde mutasyonlar sonucunda inaktive enzim ortaya çıkması ile bu inaktif enzim INH aktif hale gelmesini engellemiş olur. Bu da %60-70 oranında direncin ortaya çıkmasına neden olur (Rattan ve ark., 1998).

Diğer bir direnç mekanizması *inhA* geninin promotor bölgesindeki mutasyonlardır. Mikolik asidin biyosentezinde aktivite gösteren “enoyl-Acyl carrier protein reduktaz” enzimini kodlayan *inhA* geni (< %10) ve yağ asidi uzamasında önemli olan “beta-ketoaçıl Acyl carrier protein sentetaz” enzimini kodlayan *kasA* geninde mutasyonlar da izoniazid direncinden sorumlu tutulmaktadır (Rattanve ark., 1998; Somoskovi ve ark., 2001). Fakat *kasA* geninde mutasyon saptanan izolatlarda aynı zamanda *katG* veya *inhA* genlerinde de mutasyon bulunduğundan bu genin izoniazid direnciyle ilişkisi şüphelidir (Somoskovi ve ark., 2001). INH direncinde son olarak dirençten%10-15 sorumlu olan *aphC* geninde mutasyondur. Bakterilerde *katG* geni yokluğunda, oksidatif strese neden aktif INH ürünlerini detoksifiye eden alkil hidroperoksidaz enzimi, *aphC* geni tarafından kodlanmaktadır (Öztürk, 2003; Piersimoni ve ark., 1998; Kocabaş, 1996).

1.11.3. Rifampisin Direnci

Streptomyces mediterranei'nin kültür filtratından temin edilen RIF yarı sentetik bakterisidal etkili anti-TB ilacıdır (Wallace, 2000). RIF hidrofobik hücre zarından

hızla geçerek mikobakterilerin DNA'ya bağımlı RNA polimerazı *rpoB* geninin tarafından kodlanan beta alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. RIF direncinde RNA polimerazın *rpoB* geninin 81 bp'lik bölgesinde (27 kodon, 507- 533) mutasyonlar sorumludur (Mandell ve ark., 2005; Pfyffer ve ark., 2003; Uzun, 1996). RIF bazı türevleri; RBT, rifapentin, rifamisin ve florokinolondir.

1.11.4. Etambutol Direnci

EMB sentetik yapıda mikobakteri duvarını oluşturan arabinogalaktan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinol transferaz enzimiyle etkileşerek hücre duvarı sentezini inhibe eden bakteriyostatik bir ilaçtır (Yüksel, 2005). EMB direncinin %70'i suşların *embABC* genetik lokusunda ortaya çıkan nokta mutasyonları sorumludur. Özellikle en sık görülen mutasyonlar % 60 oranında *embB* geninin 306. kodonundaki *Met* aminoasidindeki değişikliğe bağlıdır (Ramaswamy ve Musser, 1998). Yüksek MİK değerli etambutol direnciyle *Met 306* ile mutasyonundan ziyade *Met 306 Leu*, *Met 306 Val* mutasyonları ilişkili bulunmuştur (Rattan ve ark., 1998).

1.11.5. Pirazinamid Direnci

Nikotinamidin sentetik analogu olup güçlü tüberkülosid etki göstermektedir. Ajan monosit ve makrofaj içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili tüberkülosid olarak bilinmektedir. İlaç hücre içi bakterisidal etki göstermektedir. İlacın aktif formu pirazinamid mikobakteri hücre duvarından geçtikten sonra pirazonoik aside çevirmesi ile oluşur. Dirençli suşlarda pirazinamidaz aktivitesinde kayıp belirlenmiştir. Dirençli suşların %72-94'ünde bu enzimi kodlayan *pncA* gen bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır (Mandell ve ark., 2005; Öztürk, 2003).

1.12. Yeni Antitüberküloz İlaç Araştırmaları

Yeni anti-TB ilaç geliştirilmesinin temel nedenleri olarak kullanılmakta olan anti-TB ilaçlarını geliştirerek tedavi süresini kısaltmak, çoklu ilaca dirençli TB (ÇİDTB) enfeksiyonlarının tedavisini sağlamak ayrıca latent TB olgularının tedavi başarısını artırmaktır. Anti-TB ilaç tedavisi ticari firmalar açısından incelendiğinde yeni ilaç geliştirmeye yönelik fazla ilgi gösterdikleri söylenemez. Yeni ilaçlar RIF, yeni florokinolonlar, oksazolidinonlar ve nitroimidazopiranlar olarak sayılabilir (Kiraz, 2003).

1.13. Geliştirilme Aşamasındaki Yeni Tüberküloz İlaçları

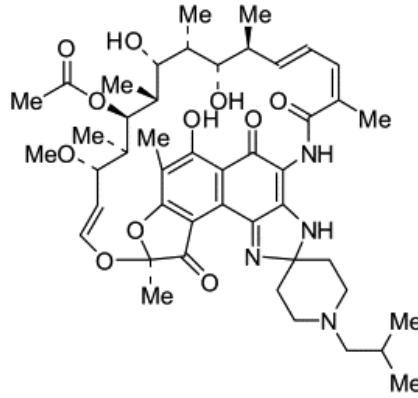
Dünya Sağlık Örgütü'nün hastalığı ortadan kaldırmak için uyguladığı "Stop TB" politikasının temelinde halen kullanımda olan anti-TB ilaçlarının başarılı etkisi, kısa süreli tedavi sağlaması, düşük fiyat gibi avantajlarının yanında hastaların fazla sayıda ilacın aynı anda kullanmak zorunda kalması gibi dezavantajlarını değerlendirerek mevcut ilaçlardaki verimi artırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (O'brien ve Spigelman, 2005).

1.13.1. Rifabutin

RBT, rifamisin S'nin spiro-piperidil türevidir (Uzun, 2002). RBT'in yapısı ve antibakterial etki mekanizması diğer bir RIF türeviden rifamisin gibi mikobakterial RNA polimeraz enzimini inhibe ederek tüberkülostatik etki yapar.

RBT'in kimyasal adı; 1',4-didehydro-1-deoxy-1,4-dihydro-5'-(2-methylpropyl)-1-oxorifamycin XIV, moleküler ağırlığı; 847 ve bununla beraber polaritesi Log P 4.218'dir. Piyasadaki ismi: Ansamycin, Alfacid, Ansatipin, Ansatipine, Antibiotic LM 427, Mycobutin ve RBT olarak tanımlanmaktadır. RBT 'in türevleri ise KRM-1648 (ayrıca Rifalazil ve ABI-1648 denilebilir) ve rifapentindir (Tuberculosis Journal, 2010).

RBT'in kapalı kimyasal formülü; $C_{46}H_{62}N_4O_{11}$ ve açık formülü ise Şekil 2.1' de gösterildi (Tuberculosis Journal, 2010).



Şekil 2.1. Rifabutinin açık kimyasal formülü (Tuberculosis Journal, 2010).

RIF ve RBT arasında çapraz direnç oranını yüksektir (Uzun, 2002; Yuen, 1999). Bununla birlikte çapraz direncin, *RpoB* geninin 511, 516 ve 531 kodonlarındaki mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir (Bodmer, 1995).

RBT, antiretroviral ilaçlarla etkileşiminin az olması nedeniyle RIF kullanılmayan HIV(+) hastalarda kullanımı önerilmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde HIV(+) kişilerde *M. avium complex* tedavisi için kullanımı onaylanmıştır. Bununla birlikte RIF dirençli *M. tuberculosis* suşlarının neden olduğu hastalığın tedavisinde de etkilidir (Mwinga, 2004).

RIF göre, RBT'in önemli bir avantajı da sitokrom p450 sistemini daha az indüklemesidir.

RIF, sitokrom p450 aktivitesini indüklediğinden dolayı proteaz inhibitörleri (PI) ve nonnükleozid revers transkriptaz inhibitörleri (NNRTI) ile birlikte, PI ve NNRTI'ların konsantrasyonları terapötik düzeyin altına düşmektedir. Bu da yetersiz viral süpresyona ve ilaç direncinin gelişmesine neden olmaktadır. RBT ise, daha zayıf bir sitokrom p450 indükleyicisi olduğundan, PI ile birlikte kullanılabilir;

NNRTI ile de dikkatli kullanılmalıdır. Çünkü RBT, bir NNRTI olan Delavirdinin konsantrasyonunu %80 azaltmaktadır. Bazı PI ve NNRTI'lar RBT ile birlikte kullanıldığında, RBT'in serum konsantrasyonunu artırmaktadır. Yan etkilerin azaltılması ve etkin tedavi için, PI ve NNRTI ile RBT birlikte kullanıldığında mutlaka ilaçların serum konsantrasyonları kontrol edilmelidir (Aeron, 2004).

RIF'nin HIV 1 proteaz inhibitörlerinin metabolizmasını indüklemektedir ve 35 yaşına kadar %92 oranında tedaviyi zorlaştırır (Burham, 1999).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerine (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) göre RIF'nin proteaz inhibitörleri ile birlikte kullanılmasını ve RIF yerine türevi olan RBT düşük dozda kullanılması önerilmektedir (CDC,2000).

RIF ve RBT analizi için Deutsches Institut für Normung(DIN) 58943-3, DIN 58959-4, DIN 58959-1, DIN 58959-5, DIN 58959-7, DIN 58959-32 und DIN 58959-17 metodu veya cihazların referansları kullanılabilir (DIN, 2011).

Bunlarla birlikte RIF'e karşı gelişen direnci tespit etmek amacıyla dirençli mutantların tespit analizleri hedef alınarak yapılabilir. Örneğin V176F mutantının *rpoB* geninin 365-bp fragmentinde meydana gelen değişiklikleri tespit etmek için uygun olan TB-176-F (59-CTTCTCCGGGTCGATGTCGTTG-39) ve TB-176-R (59-CGCGCTTGTCGACGTCAAATC-39) primerleri kullanılmıştır (Hwang, 2003; Bártfai, 2001).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Çalışmaya; Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteri Laboratuvarı stoklarında bulunan RIF dirençli olduğu bilinen 20 suş ve bir standart *M. tuberculosis* suşu olmak üzere toplam 21 *M. tuberculosis* suşu dahil edilmiştir.

2.2. Kullanılan Boyaların Hazırlanması

2.2.1. Karbolfuksin Hazırlanması

Bazik fuksinden 0,3 gr tartılarak 10 ml %95'lik etil alkol içerisinde çözülmüştür. Fenol kristallerinden 5 gr tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan bu solüsyonlar 1/1 oranında karıştırılmış, homojenizasyon sağlandıktan sonra çözelti daha sonra kullanılmak üzere koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır. İçerisinde karbolfuksin bulunana şişenin üzeri uygun şekilde etiketlenerek daha sonra kullanılmak üzere kaldırılmıştır.

2.2.2. Metilen Mavisini Hazırlanması

Metilen mavisinden 0,3 gr tartılarak 100 ml distile suda çözüldü ve daha sonra kullanılmak üzere koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır. Şişenin üzeri uygun şekilde etiketlenerek daha sonra kullanılmak üzere kaldırılmıştır.

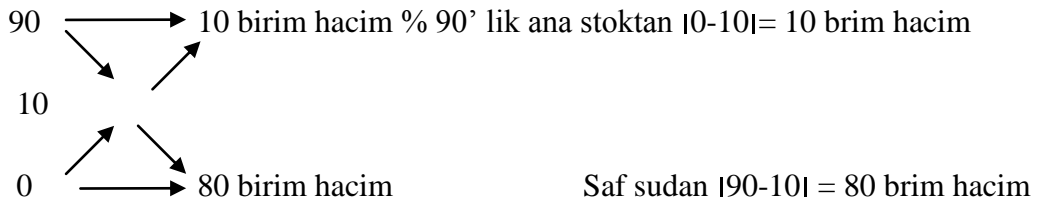
2.2.3. Asit Alkol (%3) Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan %3 asit alkol hazırlanmasında; 3 ml hidroklorik asit 97 ml %95'lik etil alkol içerisinde çözüldü ve daha sonra kullanılmak üzere koyu renkli bir şişeye aktarılmıştır. Şişenin üzeri uygun şekilde etiketlenerek depolanmıştır.

2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.3.1. Sodyum Hipoklorid (%10) Hazırlanışı

Ticari olarak satılan %90 sodyum hipoklorid hazırlamak istediğimiz konsantrasyon için gerekli su ilavesi yaparak hazırlanmıştır. Burada Pearson karesi kullanılarak hesaplama yapılmıştır.



Toplam 100 ml bir mezür içerisinde % 90'lik sodyum hipokloridten 10 ml konup üzerine 80 ml saf su eklenmiştir. Hazırlanan çözelti daha sonra kullanılacak koyu renkli şişenin üzerine, solüsyonun adı, hazırlanma ve son kullanma tarihleri yazılmıştır ve çözelti şişenin içerisine aktarılmıştır.

2.3.2. İlaçlı Besiyeri Hazırlanmasında Kullanılan Rifabutin'in Konsantrasyonunun Hesaplanması

Suda RBT iyi çözünmediği bilinmektedir ve dimetil sülfoksit (DMSO) diğer çözücüler gibi bakterilerin üremesi üzerine olumsuz etki yapmadığı için ticari olarak satın alınan RBT, DMSO içerisinde çözülmüş halde bulunmaktadır (Rastogi, 2000). Ticari olarak satın alınan sıvı RBT'in (Sigma-Aldrich, GmbH, Seelze-Germany) 1 ml DMSO içerisinde >5 mg/mL olarak bulunmaktadır (Sigma-Aldrich, 2011).

RBT için 1000 µl DMSO içerisinde 5000 µg etken madde varlığından yola çıkılarak 2 µg ilaç konsantrasyonu içeren besiyeri elde edebilmek için oran orantı yöntemi kullanılarak hesaplama şu şekilde yapıldı;

$$\begin{array}{ccc} 1000 \mu\text{l stok içerisinde} & \begin{array}{c} \swarrow \searrow \\ \nwarrow \swarrow \end{array} & 5000 \mu\text{g ilaç varsa} \\ X \mu\text{l içerisinde} & & 2 \mu\text{g ilaç elde etmek için} \end{array}$$

Her 1 ml besiyeri için 0.4 µl stok çözeltiden alarak besiyeri içerisinde 2 µg/ml ilaç konsantrasyonu elde etmiş oluruz. Çalışmada kullanılacak besiyerlerinin hazırlanmasında her bir ilaç konsantrasyonu için 250 ml besiyeri hazırlanacaktır.

$$\begin{array}{ccc} 1 \text{ ml besiyeri için} & \begin{array}{c} \swarrow \searrow \\ \nwarrow \swarrow \end{array} & 0.4 \mu\text{l stok çözeltiden alınmalı ise} \\ 250 \text{ ml besiyeri için} & & x \mu\text{l stok çözeltiden alınmalıdır} \end{array}$$

250 ml 2 µg/ml RBT içeren besiyeri için ticari olarak alınan stoktan 100 µl,
 250 ml 1 µg/ml RBT içeren besiyeri için ticari olarak alınan stoktan 50 µl,
 250 ml 0,5 µg/ml RBT içeren besiyeri için ticari olarak alınan stoktan 25 µl,
 250 ml 0,25 µg/ml RBT içeren besiyeri için ticari olarak alınan stoktan 12,5 µl,
 250 ml 0,125 µg/ml RBT içeren besiyeri için ticari olarak alınan stoktan 6,25 µl,
 kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan Besiyerleri

2.4.1. LJ Besiyerinin Hazırlanması

Terazinin denge ayarı kontrol edildikten sonra tartım kağıdı terazi üzerine yerleştirilerek darası alınmış, toz LJ (Merck, Germany) besiyeri 37,5 gr tartılarak erlene aktarılmıştır. Besiyerinin üzerine 600 ml distile su ile 12 ml gliserol eklendikten sonra homojenize olana kadar karıştırılarak otoklava yerleştirilmiştir. 121°C'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta otoklavda steril edilen besiyeri benmaride 50°C'ye kadar soğutulmuştur. Yumurtalar önce %2'lik iyotla daha sonra alkol

(%70'lik etil alkol) ile silinmiştir. Steril edilmiş uygun büyüklükte bir erlen içerisinde steril boncuklar konmuş, Steril pens ile yumurtalar uç tarafından kırılan yumurta erlen içerisine aktarılıp homojenize edilmiştir. Son hacim 1000 ml olacak şekilde homojenize ve filtre edilen yumurtalar, otoklavlanan besiyerine ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan besiyeri önceden hazırlanan steril tüplere 5'er ml dağıtılmıştır. Tüpler koagülatörde, 80°C'de 45 derece açı oluşturacak şekilde eğik olarak yerleştirilerek 45 dakika koagüle edilmiştir. Besiyerlerinin sterilite kontrolü için hazırlanan LJ besiyerlerinden örneklem yöntemiyle %5 oranında ekim yapılmadan 37°C'de inkübatörde 5 gün bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kontaminasyon olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca hazırlanan besiyerinin kalite kontrolü açısından standart suşlarla [*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. kansasii* (ATCC12478)] denetlenmiştir. Hazırlanan besiyerlerinin uygunluğu görüldükten sonra kullanıma kadar bekletilmek üzere +4°C saklanmıştır.

2.4.2. Middlebrook 7H10 Agar Besiyerinin Hazırlanması

Middlebrook 7H10 (Difco- Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) agar toz haldeki besiyerinden 19 gr tartılarak bir balon jojeye aktarılmış ve üzerine 5 ml gliserol ve 900 ml distile su eklenmişti (CDC, 2010). Otoklavda 121°C de 15 dakika 1 atmosfer basınçta tutularak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri benmaride 50-55°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 100 ml OADC eklenmiştir (BD, 2011). İlaçsız besiyeri steril vida kapaklı tüplere 3'er ml olacak şekilde dağıtılmış ve eğik bir şekilde katılaşması için bekletilmiştir.

İlaçsız besiyerinde olduğu gibi ilaçlı besiyeri de aynı şekilde hazırlanmıştır, sadece ilaçsız besiyerinden farklı olarak çalışılacak olan her bir bakteri dilüsyonu için OADC eklendikten sonra 100 ml olacak şekilde besiyeri hazırlanarak içerisine daha önceden son konsantrasyonu 0.12 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml olacak şekilde stok çözeltilerden kullanılacak miktar daha önceden hesaplandığı gibi son ilaç konsantrasyonu değişmeyecek şekilde hesaplanan RBT, yine son konsantrasyonu değişmeyecek şekilde 4 kat dilüe edilerek eklenmiştir. Steril vida kapaklı tüplere 3'er ml olacak şekilde dağıtılarak yine eğik bir şekilde katılaşması

bırakılmıştır. Hazırlanan besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.3. Çalışmada kullanılan kontrol parametreleri

Çalışanın güvenilirliğini sağlamak için tüm çalışmalar kontrollerle birlikte paralel yürütülmüştür. Çalışmamızda kullanılan kontroller sırası ile:

- Çikolata/kanlı agar: Çalışmaya dahil edilen suşların dışında kontaminant başka bir bakterinin olup olmadığını belirlemek amacıyla ekimler yapıldı. Değerlendirmede çalışmaya dahil edilen suşlar LJ besiyerine eş zamanlı olarak çikolata/kanlı agar besiyerine ekildikten sonra inkübasyona bırakıldı. İlk iki gün Çikolata/kanlı agar plakları kontaminasyon kontrolü amacıyla değerlendirildi.
- Sterilite kontrol: Kullanılan her ilaç konsantrasyonu için ekim yapılmamış Middlebrook 7H10 besiyerinde hazırlaması sırasında kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek amacıyla hazırlanan besiyerlerinin %5'i seçilerek bakteri ekilmemiş besiyerleri, ekim yapılan besiyerleri ile benzer şartlarda inkübe edilip besiyeri uygunluğu denetlenmiştir.
- Üreme kontrol: Çalışmaya dahil edilen tüm suşlar 10^6 cfu/ml ve 10^8 cfu/ml bakteri yoğunluğunda üreme kabiliyetlerinin incelenmesi bakımından Middlebrook 7H10 besiyerine ekim yapılmıştır. Böylece besiyerlerinden yada bakteriden kaynaklanan üreme güçlüklerinin olup olmadığı denetlenmiştir.
- H37Rv: RIF direncinden sorumlu olduğu bilinen *rpoB* geninde mutasyon bulunan standart suştur (Williams, 1998).

2.5. Yöntemler

2.5.1. Agar Proporsiyon Hazırlığı

Laboratuvar çalışmaları başlamadan önce tüm yüzeyler %10'luk sodyum hidroksitle temizlenmiştir. Steril bir atık kabı içerisine 15- 20 ml kadar %10'luk sodyum hidroksit ilave edilerek biyogüvenlik kabinin içerisine bırakılmıştır. Çalışma öncesinde biyogüvenlik kabini 2 saat ultraviole (UV) ışığa maruz bırakılmıştır.

Mikrobiyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan 20 klinik ve bir standart suş çalışma esnasında kullanılmak üzere sıraya dizilmiş ve numaralandırılmıştır. Stok kültürlerden kabin içerisinde LJ besiyerlerine öze yardımı ile çizgi ekim şeklinde pasajlanmıştır. Besiyerleri 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Ekim işlemleri sonrasında biyogüvenlik kabininin içerisi ve temas edilen tüm yüzeyler %10'luk sodyum hipoklorid ile steril edilmiştir. Atık kabı otoklanmak üzere kaldırılmıştır. Üreme kontrolleri için gün aşırı kez LJ besiyeri incelenmiştir.

Erlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemi; LJ besiyerinde 3 haftalık inkübasyonu sonrasında üreyen bakterilerin uygunluğunun ve saflığının denetlenmesi için boyama ve mikroskopik inceleme yapılmıştır. EZN boyama ile hazırlanmış preparatlarda tipik pembe basiller gözlenmesi koloninin saf olduğunu göstermektedir.

EZN boyama yöntemi şu şekilde yapılmıştır; lamın bir ucuna suş adı veya protokol numarası yazılmıştır ve lamın ortasına bir damla saf su damlatılmıştır. Daha sonra bir öze dolusu koloni alınarak, lamdaki saf su üzerinde 1-2x2-3 cm çapındaki hayali bir oval alana, sürekli dairesel hareketler ile yayılmıştır. Havada kurutulduktan sonra 3-4 kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Tespit edilen lam üzerine öncelikle filtreden geçirilen karbol fuksin çözeltisinden dökülmüştür. Tespit edilen preparatların üzerine eklenen karbol fuksin boya ile birlikte 5 dakika boyunca buhar çıkacak ancak kaynamayacak şekilde alttan ısıtılmıştır. Isıtma sırasında preparat

üzerinde buharlaşmadan dolayı boya azalması olursa, lam yüzeyini tamamen örtecek şekilde karbol fuksin eklenmiş ve ısıtma işlemine devam edilmiştir.

Beş dakikanın sonunda fazla boyayı preparat üzerinden atmak için lamlar eğilmiştir ve daha sonra normal akım saf su ile lamlar yıkanmıştır. Bu işlemin ardından preparat üzerinden saf suyun kalanı aynı şekilde lamlar eğilerek süzöldükten sonra lamların üzerine %3'lük asit alkol çözeltisi tamamen lamı kaplayacak şekilde dökülmüştür. Preparat en fazla 3 dakika (ilk rengini kaybedinceye kadar) bekletilmiş, süre sonunda lamlar eğilerek asit alkolün fazla kısmı atılmış ve saf su ile lamlar yıkanmıştır. Yıkama işlemini sırasında asit alkolün preparat üzerinden tamamen gitmiş olmasına dikkat edilmiştir. Ardından preparatların üzerine metilen mavisi akıtılmış, 3 dakika bitiminde saf su ile lamların üzerindeki fazla boyalar yıkandıktan sonra lamlar dik olarak kurumaya bırakılmıştır. Preparatların materyal olmayan boyalı kısmı temiz bir bez ile iyice temizlenerek preparatların materyal olan kısmına bir damla immersiyon yağı damlatılarak 1000 kat büyütme altında taranmıştır.

2.5.2. Agar Proporsiyon İnokulum Hazırlığı

Ekim işlemleri daima UV ile steril edilen güvenlik kabini içerisine gerçekleştirilmiştir. Daha önceden ekimleri yapıp pozitif üreme gözlenen LJ besiyeri ve her bir suş için 10 ml'lik steril bir tüp sırasıyla tüp taşıyıcıya yerleştirilmiştir. Deneyde kullanılacak 10 ml'lik steril tüplerin üzerine tarih, analiz yapan kişi ve sıra numarası yazılmış ve daha sonra her bir tüp içerisine 5 ml steril %0,85'lik serum fizyolojik (SF) ve cam boncuk konulmuştur.

Her bir suş için LJ besiyerinde saf olarak üremiş olan koloniler, öze ile alınarak içerisinde 5 ml steril SF ve cam boncuk bulunan 10 ml'lik steril tüp içerisinde süspansiyon edilmiştir. Daha sonra tüplerin ağzı kapatılıp 1 dakika boyunca vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak süspansiyon sırasında besiyeri ile birlikte alınan koloninin besiyerinden ayrılması ve koloninin küçük parçalar halinde ayrılması

sağlanmıştır. Bu işlemden sonra vortekslenen tüpler hareket ettirilmeden 30 dakika bekletilerek büyük partiküllerin ve besiyeri kalıntılarının dip kısma çökmesi sağlanmıştır. Bekleme süresinin sonunda hazırlanan süspansiyonun üst kısmından steril pipet ile 1 ml yeni bir temiz tüpe alınarak üzerine SF eklenerek 1.0 McFarland bulanıklık değerinde süspansiyon elde edilmiştir. Çalışmalarda kritik konsantrasyonun belirlenmesi için besiyerine ekilen bakteri sayısını belirleyebilmek için bakteri 1.0 McFarland standart bulanık kullanılmıştır (1.0 McFarland standart bulanıklık 10^8 cfu/ml) (BD, 2011).

1.0 McFarland standart bulanık ayarlandıktan sonra içerisinde 10^7 ve 10^6 cfu/ml bakteri oluşturacak şekilde sırası ile 10^{-1} ve 10^{-2} dilüsyonları hazırlanması için spor üzerine tüpler dizilmiştir ve üzerine dilüsyon faktörlerini gösteren 10^{-1} ve 10^{-2} yazılmıştır ve her bir tüpe 9 ml SF eklenmiştir. Bakteri süspansiyonları 1.0 McFarland standart bulanıklığa getirildikten sonra bu süspansiyondan 1 ml alınarak 10^{-1} yazan tüpe pipetaj yapılmıştır iyice vortekslenmiştir. Böylece 10^7 cfu/ml standart bulanıkta suş elde edilmiştir. Daha sonra 10^7 cfu/ml standart suşundan 1 ml alınarak dilüsyon faktörü 10^{-2} olan tüpe aktarılmıştır ve iyice vortekslenmiştir. Bu şekilde 10^6 standart bulanıkta suş elde edilmiştir. Klasik antibiyotik duyarlılık testlerinde olduğu gibi agar proporsiyon yönteminde de 10^5 basilden daha az ekilmemesi gerekmediği için en son 10^{-2} dilüsyon faktörü yazan basil konsantrasyonu farklı ilaç konsantrasyonu içeren besiyeri ve ilaçsız besiyerine ekilmiştir (Tansel, 2006).

Antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı giriş kısmında belirtildiği gibi yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak % 1 düzeyi kriter alınarak ayarlanmıştır. Direncin % 1 oranını tayin etmek için kontrol besiyerinde kullanılan suş miktarı ilaçlı besiyerindekinden 100 defa daha azdır. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki suşların sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyon yüzdesi olarak belirtilir. İlaçsız kontrol besiyerinde 200-300 koloni oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun olanıdır.

Bundan dolayı kontrol besiyeri olarak 10^{-2} dilüsyonun hazırlanan suş bakteri dilüsyonu bakteri ekilmiş olan paraleli ile iki kontrol besiyerine ekim yapılmıştır.

Duyarlılık testi için ekim, aynı suşun 10^0 sulandırımından ilaçlı besiyerlerine (daha önceden $0.125 \mu\text{g/ml}$, $0.25 \mu\text{g/ml}$, $0.5 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ ve $2 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında yeni RBT içeren) ve ilaçsız besiyerine $100 \mu\text{l}$ olacak şekilde steril mikropipet uçları kullanılarak bakteri süspansiyonları inoküle edilmiştir. İlaçsız besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kontaminasyon kontrolü için çalışılan her suş aynı zamanda çikolata/kanlı agar besiyerine de ekilmiştir. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak içerisindeki inokulumun besiyeri yüzeyine tamamen yayılması sağlanarak, tüpün kapağı tekrar gevşetilerek 45° açılı pozisyonda sporlara dizilmiştir. Daha sonrasında spor %10'luk CO_2 'li atmosferde, 3 hafta inkübasyona bırakılmıştır. Ekim işlemleri sonrasında biyogüvenlik kabininin içerisi ve temas edilen tüm yüzeyler %10'luk sodyum hipoklorid ile steril edilmiştir. İnkübasyonun 1. ve 2. gününde çikolata/kanlı agar ve ekim yapılan tüpler kontaminasyon yönünden incelenmiştir. Kontaminasyon saptanması çalışmanın güvenliğini etkileyeceğinden böyle bir durumlakarşılaşılması durumunda çalışmaların tekrarlanması planlanmıştır.

İlaçsız kontrol besiyerindeki koloni sayıları ile ilaçlı besiyerindeki koloni sayıları karşılaştırılmıştır. İlaçlı besiyerindeki üreme kontroldeki üremenin % 1 ve daha fazlası ise suş dirençli olarak kabul edilmiştir. Oran hesaplanırken “ilaçlı besiyerindeki koloni sayısı/ilaçsız besiyerindeki koloni sayısı $\times 100 = \% \text{ direnç}$ ” formülü kullanılmıştır. Her bir ilaç dilüsyonu için ekim yapılan kontrol besiyerindeki(kontrol besiyeri ve paraleli) üreme 50-100 koloniden az ise ya da sayılamayacak kadar çok koloni varsa çalışma tekrarlanmıştır.

İlaçlı ve ilaçsız besiyerlerinde üremeler haftada bir kez kontrol edilmiştir ve 3. hafta sonunda üreme olan tüplerdeki koloniler etki ettikleri doz ve ilaçlı besiyerinin içerdiği konsantrasyon not edilmiştir. (Esen ve Gündüz, 2003).

2.6. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Löwenstein-Jensen besiyeri (Merck 01256-03 Germany)
- Middlebrook 7H10 Agar (Difco 262710 Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)
- OADC, BBL Middlebrook OADC; 212240 Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
- Rifabutin (Sigma-Aldrich, GmbH, Seelze-Germany)
- 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)
- DMSO(Sigma 472301 USA)

2.7. Kullanılan Cihazlar

- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- 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)

3. BULGULAR

3.1. LJ pasaj sonuçları

Mersin Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan suşlardan yapılan pasajlar 3 haftalık inkübasyon süresi sonunda LJ besiyerinin üzerinde açık krem renğinde, ekmek kıvrıntısını andıran, kuru, pigmentsiz, granüler, kenarları düzensiz koloniler oluşturdu (Resim 3.1).



Resim 3.1. Sol taraftaki resim, LJ besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* suşunun görünümü, sağ taraftaki resim ise ekim yapılmamış LJ besiyerinin resmi.

3.2. Boyama Sonuçları

LJ besiyerine pasaj yapılan suşların kontrolü EZN preparatları ile yapıldı. Genelde mavi zemin üzerinde sadece kırmızı-pembe renkte boyanmış basiller gözlemlendi. Bu gözlem üreme kontrolü ve suşların saflığı açısından yeterli kabul edildi.



Resim 3.2. EZN boyoma sonucu *M. tuberculosis* suşunun mikroskopik görünümü (Fz-Borstel, 2011)

3.3. Agar Proporsiyon Sonuçları

Saf olarak kabul edilen suşlar, agar proporsiyon çalışmalarına alındıktan sonra 3 hafta sürecek bir inkübasyona sürecine bırakıldı.

Çalışmamızda agar proporsiyon yöntemiyle RIF direnci bilinen *M. tuberculosis* suşları üzerinde RBT'nin 0.12 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml ilaç konsantrasyonu hazırlanılarak MİK değeri araştırıldı. Bu çalışmada standart suş olarak kullanılan H37Rv suşunun çalışılan bütün ilaç konsantrasyonlarına duyarlı olduğu tesbit edildi. 0.12 µg/ml konsantrasyonunda klinik örneklerden izole edilen RIF dirençli 20 suşun tamamının bu konsantrasyonda direnç gösterdiği saptandı. İkinci dilüsyon olarak kullanılan 0.25 µg/ml konsantrasyonunda; klinik örneklerden izole edilen bir tane RIF dirençli suşun duyarlı olduğu, geri kalan 19 suşun direnç gösterdiği gözlemlendi. Üçüncü dilüsyon olarak kullanılan 0.5 µg/ml konsantrasyonunda klinik suşlardan sekizi duyarlı iken 12 suşun direnç gösterdiği saptandı. Dördüncü ilaç konsantrasyonu olarak kullanılan 1 µg/ml konsantrasyonunda incelenen 20 klinik suşun dokuzunun direnç gösterdiği geri kalan 11 suşun ise duyarlı olduğu belirlendi. Son ilaç konsantrasyonu olarak kullanılan 2 µg/ml konsantrasyonunda incelenen 20 klinik suşun onunun direnç gösterdiği saptandı.

Çalışılan standart suş ile birlikte RBT'e karşı MİK değerleri dikkate alınmadan sadece duyarlılık göstermelerine bakıldığında 11 suşun duyarlılık gösterdiği görülmektedir. Bu durum yaklaşık %52'e karşılık gelmekte ve bu RBT'ne karşı

duyarlılık gösteren suşlar içerisinde sadece 0.5 µg/ml ilaç konsantrasyonunda duyarlılık gösteren suşların %65'ünü oluşturdukları ve sadece 0.5 µg/ml ilaç konsantrasyonunda duyarlılık gösteren 9 suş için yaklaşık %43'ünü oluşturmakta olduğu görüldü ve diğer veriler Tablo 3.1' de özetlendi.

Tablo 3.1. H37Rv ve çalışmaya dahil edilen suşların agar proporsiyon yöntemi ile rifabutine karşı duyarlılık paternleri

Suşlar	Üreme kontrol		İlaç Konsantrasyonu (µg/ml)				
	10 ⁸	10 ⁶	0.12	0.25	0.5	1	2
H37Rv	+	+	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	-	-	-
17	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	-	-	-	-

+: Dirençli, -: Duyarlı

2 µg/ml ilaç konsantrasyonlarında sağdan sırasıyla 1 ve 4 numaralı suşlarının Middlebrook 7H10 besiyerindeki görüntüsü Resim 4.2' de belirtildi.



Resim 3.3. Sağdan sırasıyla 1 ve 4 numaralı *M. tuberculosis* suşunun 2 µg/ml ilaç konstrasyonlarında Middlebrook 7H10 besiyerindeki görüntüsü

9 numaralı *M. tuberculosis* suşunun 1 µg/ml ilaç konstrasyonunda ilaçlı Middlebrook 7H10 besiyerindeki görüntüsü Resim 4.3'te verildi.



Resim 4.4. 9 numaralı suşunun 1 µg/ml ilaç konstrasyonunda ilaçlı Middlebrook 7H10 besiyerindeki görüntüsü

4. TARTIŞMA

TB kontrol programının temelini; hastalığın erken tanısı, uygun ve etkili tedavisi, tedavinin düzenli takibi oluşturmaktadır. *M. tuberculosis*'e karşı Anti-TB tedavide dönüm noktası SM keşfi ile başlamıştır ve uzun yıllardır TB kontrol programlarında kullanılmaktadır. SM monoterapisinin bazı yan etkilerinden dolayı 1960'lı yıllardan itibaren ülkelerde kullanımını azalmıştır. Bu duruma INH ve RIF gibi yan etkisi daha az olan ilaçların bulunması katkı sağlamıştır. Ancak *M. tuberculosis*'in birinci seçenek ilaçlara gösterdiği direnç ile TB kontrol programlarında yeniden kullanılmaya başlanmıştır.

Günümüzde TB için genel problemler irdelendiğinde ilaç kullanma rejimlerinin önemi sıkça vurgulanmaktadır. Özellikle son dönemde HIV ile ilişkili TB'da, ÇİDTB enfeksiyonlu hastalarda ve latent TB enfeksiyonlarında kullanımdaki mevcut anti-TB ilaçlara alternatif ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmaktadır.

Bu çalışmada, Mersin yöresinden izole edilen ve birinci seçenek anti-TB ilaçlardan olan RIF'e direnç gösteren *M. tuberculosis* suşlarında RBT etkisinin agar proporsiyon yöntemi ile belirlenmesi amaçlandı.

RBT'in anti-TB etkisi üzerinde daha önce yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler;

Williams ve ark.'nın (1998) 11 farklı ülkeden temin ettikleri 177 RIF dirençli klinik izolatla yaptıkları ve RIF türevlerinin (RIF, RBT, rifapentin ve KRM-1648 etkisini inceledikleri çalışmada, RBT ve KRM-1648'in mutant izolatlar üzerinde yüksek afinite ve aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda da bu çalışmayla uyumlu olarak *M. tuberculosis* suşları üzerinde RBT'in anti-TB yüksek düzeyde olmamakla birlikte etki gösterdiği gözlemlendi.

Yang ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada ise 163 adet *M. tuberculosis* suşu üzerinde RBT and KRM-1648 etkinliğini incelemişler ve çalışma sonucunda RIF duyarlı olan 82 suş için $MİK \leq 16 \mu\text{g/ml}$ (RBT), $MİK \leq 1 \mu\text{g/ml}$ (KRM-1648), geri kalan 81 suş için $MİK \geq 32 \mu\text{g/ml}$ (RBT ve KRM-1648) olarak bulmuşlar.

Yuen ve ark. (1999) benzer amaçla 50 *M. tuberculosis* suşu ile duyarlılık çalışmaları yapmışlar; 50 *M. tuberculosis* suşunun 33'ünü RIF dirençli, 17'sinin ise RIF duyarlı olarak belirtmişlerdir. Bu suşlar üzerinde RIF ve RBT'in etkinliğinin çokta farklı olmadığını %81 oranında çapraz direnç gözlemlediklerini belirtmişlerdir.

Sarıbaş ve ark. (2002), RIF dirençli 97 suş ile RIF duyarlı 21 *M. tuberculosis* suşları üzerinde yapmış oldukları çalışmaya göre RIF dirençli suşlar üzerinde %46 oranında RBT'ye duyarlılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca RBT'nin alternatif bir ilaç olarak da kullanılabileceğini de vurgulamışlardır.

İstanbul'da Uzun ve ark. (2002), yapmış olduğu çalışmaya göre RIF ile RBT arasındaki çapraz direnç olup olmadığını belirlemek amacıyla 50 adet *M. tuberculosis* suşu üzerinde yapmış oldukları çalışmaya göre %88 çapraz direnç verdiğini belirtmişlerdir.

Cavusoglu ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmaya göre *rpoB* mutasyonu bilinen 41 RIF dirençli suş üzerinde RBT' nin etkinliğini incelemişlerdir. Sonuç olarak 35 suşun $MİK \geq 32 \mu\text{g/ml}$ düzeyinde duyarlılık gösterdiğini, ayrıca geri kalan 6 suşun ise $MİK 2 \mu\text{g/ml}$ ile $MİK 16 \mu\text{g/ml}$ arasında olduğunu bildirmişlerdir. Geri kalan 1 suşun ise aynı anda farklı mutasyonlara sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Anthony ve ark. (2005), *rpoB* genine sahip rastgele seçilen 131 *M. tuberculosis* suşu üzerinde RIF ve RBT etkinliğini incelemek amacıyla çalışma yapmışlar; sonuç olarak da *rpoB* genine sahip S522L mutanti üzerinde RIF $MİK$ değerinin $32 \mu\text{g/ml}$, RBT $MİK$ değerinin de $<0.8 \mu\text{g/ml}$ olduğunu bildirmişlerdir.

Senol ve ark. (2005), 112 *M. tuberculosis* izolatları üzerinde RBT ve RIF çapraz direncini incelemişlerdir ve çalışma sonucunda %73 çapraz dirençli sonuç elde edildiğini bununla beraber tüberküloz olgularının kombinasyon tedavisinde uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

Chikamatsu ve ark. (2009), konuyla ilgili olarak yapmış oldukları çalışmada 53 RIF dirençli, 44 çoklu ilaç dirençli 97 *M. tuberculosis* irdelemişler; %27 oranında RBT duyarlılık ve bununla beraber laboratuvar şartlarında RBT'in uygulamasının zor olduğunu belirtmişlerdir.

Yoshida ve ark. (2010), çoklu ilaç direnç gösteren 98 *M. tuberculosis* izolatları üzerinde RBT'in etkisini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmaya sonucunda MİK ≤ 0.015 $\mu\text{g/ml}$ ve ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$ değeri arasında etki gösterdiği bildirmişlerdir.

Satana ve ark. (2010), çoklu ilaç direnci gösteren *M. tuberculosis* suşları üzerinde ikinci seçenek ilaçların etkisini incelemek amacıyla yapmış oldukları çalışmalarında; RBT'in anti-TB etkisinin %100 spesifite gösterdiğini belirtmişlerdir.

CLSI (2011)'de RBT'in *M. tuberculosis* suşları için MİK değeri ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirtilmiştir.

RBT'in MİK değerine ilişkin çeşitli araştırmalar Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

Tablo4.1. Rifabutinin MİK değeri

Araştırmacı	Çalışma yılı	MİK değeri($\mu\text{g/ml}$)
Yoshida ve ark.	2010	≤ 0.015 ile ≤ 0.25 arası
Cavusoglu ve ark.	2004	≥ 32 ile 2-16
Anthony ve ark.	2005	<0.8
Yang ve ark.	1998	MİK ≤ 16

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda 21 suştan 9'u MİK=0.5 µg/ml düzeyinde duyarlı olarak bulunmuştur. ve bu sonuç CLSI tarafından belirtilen RBT MİK≤0.5 µg/ml değerine uyumludur.

Çalışmamız da sonucunda standart suş olarak kullanılan H37Rv suşu ve 1 klinik suş MİK=0.25 µg/ml düzeyinde duyarlı bulundu. Düşük düzeyde duyarlı bulunan bu suşlar Yoshida ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermekteydi.

Ayrıca yaptığımız çalışmamızda yüksek konsantrasyonda duyarlılık çalışmaları yapılamadığı için sonuçlar Anthony ve ark. (2005) tarafından bildirilen verilerle karşılaştırılmadı.

Yang ve ark. (1998), dışında daha önceki çalışmalar incelendiğinde, çalışma aralığı olarak seçtiğimiz 1 µg/ml ve 2 µg/ml ilaç konsantrasyonunda duyarlılık gösteren çalışma bulunamamıştır. Sadece Cavusoglu ve ark.(2004) tarafından yapılan çalışmada bir suş için duyarlı olduğu ilaç konsantrasyonu 2 µg/ml ila 16 µg/ml olarak belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bir suş MİK = 1 µg/ml olarak bulundu. Suş sayısının artırılması ve yüksek konsantrasyon çalışmaları ile durumun açıklık kazanabileceği kanaatine varıldı.

RIF ile RBT arasındaki çapraz dirence ilişkin çeşitli araştırmalar Tablo 5.2'de özetlenmiştir.

Tablo 5.2. RIF ile RBT arasındaki çapraz direnç

Araştırmacı	Çalışma yılı	% çapraz direnç
Chikamatsu ve ark.	2009	27
Şenol ve ark.	2005	73
Uzun ve ark.	2002	88
Sarıbaş ve ark.	2002	46
Yuen ve ark.	1999	81

RIF ile RBT arasındaki çapraz direncin olup olmadığına ilişkin geçmiş yıllardaki yapılan çalışmalar da farklı oranlarda çapraz direnç belirtilmiştir. Ayrıca çalışılan mutant suşların ilaca karşı çapraz direnç yüzdeleri arasında en yüksek değer Yuen ve ark. (1998) %81, Uzun ve ark. (2002) da direnci %88 olarak belirtilmiş olmalarına rağmen Chikamatsu ve ark. (2009) tarafından %27 gibi düşük bir oran bildirmişlerdir. Uzun ve ark. (2002) ile Sarıbaş ve ark. (2002) tarafından ülkemizde aynı yılda yapılmış olan iki çalışma arasında farklı oranlar bildirildiği gözlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda, dahil ettiğimiz standart suş ile birlikte RBT'e karşı MİK değerleri dikkate alınmadan sadece duyarlılık göstermelerine bakıldığında yaklaşık %52 oranındadır. Sonuç olarak ülkemizde daha önceden yapılan çalışmalar ile bizim çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz direnç oranları arasında uyum gözlenmemiştir. Ancak 0.5 µg/ml ilaç konsantrasyonunda duyarlılık gösteren suşların oranı yaklaşık %43 olması Uzun ve ark. (2002), bulgularını desteklemektedir.

Uzun ve ark. (2002), tarafından yapılan çalışılan ile bizim yapmış olduğumuz çalışmanın moleküler alt yapısı bilinmemektedir, Bizim çalışmamız ile Türkiye'de yapılan diğer çalışmalar değerlendirilirken bu nedenle değerlendirirken kısıtlama getirmektedir.

Türkiye'deki diğer bir çalışma Cavusoglu ve ark. (2004), tarafından yapılmıştır; farklı MİK değerlerinde RBT karşı duyarlılık gösteren suşlar belirtilmiş ve bu suşların farklı mutantlar oldukları gösterilmiştir. Suşlardan bir tanesinin farklı mutasyon gösterdiğinin ifade edilmesi bizim düşüncemizi destekler niteliktedir.

CLSI, *M. tuberculosis* suşları için RBT etki düzeyi olan ≤ 0.5 µg/ml konsantrasyonunda çalışıldığında, ilaç etki göstermiyorsa; bunun mutant suşlardan veya çapraz dirençten kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda da farklı ilaç konsantrasyonlarında duyarlılık gösteren suşların belirlenmiş olması, suşların farklı bölgelerindeki mutasyonlar sonucu oluşan farklı tip mutantlar olabileceğini düşündürmektedir. Daha önceden yapılmış olan çalışmalarda belirtilen ilaç konsantrasyonları ve çapraz direnç oranlarındaki farklılık görülmesi bu düşüncemizi desteklemektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada RBT'ne karşı 0.5 µg/ml ilaç konsantrasyonunda duyarlılık gösteren suşların %43 olup bu verimiz CLSI tarafından belirtilen MİK değeri için geçerlidir. Dirençli suşlar genetik alt yapıları ile ilgili bilgi eksiklikleri direnç oranlarındaki farklılığın açıklanmasında kısıtlamaya neden olmaktadır.

Ülkeler ve hatta bölgeler arası farklı direnç paternlerinin saptanabilmesi nedeniyle, her ülkenin kendi direnç özellikleri ışığında tedavi protokollerini belirlemesi ve zaman zaman gözden geçirerek güncel epidemiyolojik verilerle bu protokolleri yenilemesi, tüberküloz tanı, takip ve tedavisinde görev alan kurumların işbirliği ve iletişim kurmasını gerekli kılmaktadır. Bunun yanı sıra ÇİDTB tedavisinde ikinci seçenek ilaç direncinin bilinmesinin bu hastalar için doğru tedavi protokollerinin planlanması, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DOTS-Plus) uygulamasının tedavi başarısının artması için zorunluluk olduğu inancındayız.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, daha önceki yıllarda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na gelmiş olan RIF dirençli olduğu bilinen suşlar, altın standart metot olarak kullanılan agar proporsiyon yöntemi ile *M. tuberculosis* üzerine etkisi araştırılmıştır.

Son yıllarda artış gösteren ÇIDTB gibi tüberküloz tedavisinde birinci seçenek ilaç olarak kullanılan anti-TB ilaçlara alternatif olarak daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde RBT kullanılabileceği bildirilmektedir.

Bu kapsamda yapmış olduğumuz çalışma sonucunda kullanılan suş sayısının azlığı ve daha da önemlisi mutantların moleküler alt yapılarının bilinmemesinden kaynaklanan kısıtlamalardan dolayı kesin olarak bir sonuç elde edilememektedir. Daha sonraki çalışmalarda dirençle ilişkili moleküler alt yapılarının bilinmesinin yarar sağlayacağını düşünüyoruz. Ayrıca, farklı mutant suşlar ile yapılan çalışmalar ışığında RBT MİK değeri ve çapraz direnç konularının daha detaylı olarak ortaya konabileceği kanaatindeyiz.

ÖZET

Mycobacterium tuberculosis, yavaş üreme hızı ve yüksek oranda lipit taşıyan özel hücre duvarı nedeni ile diğer bakterilerden ayrılan önemli bir patojendir. Diğer bakterilere kıyasla doğal direnci yüksektir. Son yıllarda klinikte sorun oluşturan ilaç direnci hedef bölgeleri kodlayan gen alellerinde meydana gelen mutasyonla ilişkilidir.

Çalışma, rifampisin dirençli *M.tuberculosis*'e karşı rifabutinin *in vitro* etkinliği agar proporsiyon yöntemi ile araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında rifampisin dirençli olduğu bilinen 20 suş ve bir standart *M. tuberculosis* suşu olmak üzere toplam 21 *M. tuberculosis* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamızda 11(%52) suşun rifabutine duyarlı olduğu gözlemlendi. Yalnızca 0.5 µg/ml ilaç konsantrasyonunda duyarlılık gösteren suşların 9 (%43) olduğu gözlemlenmiştir. Ancak çalışmada kullanılan suş sayısının az olması ve moleküler alt yapılarının bilinmemesi nedeniyle rifabutin etkinliklerinin belirlenmesinde bir kısıtlama olarak değerlendirilmiş, konunun geniş kapsamlı çalışmalarla aydınlatılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *M.tuberculosis*, Rifabutin, Agar proporsiyon

SUMMARY

Mycobacterium tuberculosis, separated from other bacteria by reason of its slow reproduction rate and its cell wall contains high rate of lipid, is an important pathogen. Its natural resistance is higher than the other bacteria. In recent years, the drug resistance has been posing a problem in clinic applicaitons is associated with mutations emerging in gene alleles encoding target regions.

The purpose of this study is to investigate the in vitro effectiveness of Rifabutin against to Rifampisin resistant *M. tuberculosis* by means of agar proportion method.

Totally 21 *M. tuberculosis* strains, 20 strains are known to be resistant to Rifampisin and 1 standard *M.tuberculosis* strain, stocked at the Mycobacteriology Laboratory of the Department of Medical Microbiology of the Faculty of Medicine, Mersin University, were used in this study. It was observed that 11 (52%) strains studied are sensitive to Rifabutin when only sensitivities of them were examined without considering their MIK values. It was also observed that 9 (%43) strains of all strains studied are sensitive to Rifabutin in only 0.5 µg/ml drug consantration. However, the small number of strains used in this study and the lack of information related to their molecular infrastructure was evaluated as a constraint in determining Rifabutin effectiveness and it was concluded that the matter would be able to be illuminated with comprehensive studies.

Key words: *M. tuberculosis*, Rifabutin, Agar proportion

KAYNAKLAR

- ALPASLAN A. (2003). Non-tüberküloz Mikobakteri İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı ve Duyarlılık Testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. 1.Baskı. Otak Form-Ofset, Samsun. sy. 389-396.
- ANDERSEN, P., MUNK, M.E., POLLOCK, J.M., DOHERTY, T.M. (2000). Specific Immune-Based Diagnosis Of Tuberculosis. *Lancet*, **356**:1099-104.
- ANTHONY, R.M., SCHUITEMA, A.R.J., BERGVAL, I.L., BROWN, T.J., OSKAM, L., KLATSER, P. (2005). Acquisition of Rifabutin Resistance by a Rifampicin Resistant Mutant of *Mycobacterium tuberculosis* Involves an Unusual Spectrum of Mutations and Elevated Frequency, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **4**: 9.
- Erişim:[<http://www.ann-clinmicrob.com/content/4/1/9>] Erişim tarihi:12.2.2011.
- BABACAN, F., ÖVER, U,. (2002). Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*. In: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*, Ed: WILLKE, T.A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. (2002). Nobel Tıp Kitabevi, sy.1675-1698.
- BA'RTFAI, Z., SOMOSKÖVI, A., KÖDMÖN, C., SZABO, N., PUSKA'S, E., LA'SZLO'NE, K., FARAGO, E., MESTER, J., PARSONS, M.L., SALFINGER, M. (2001). Molecular Characterization of Rifampin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA, *J. of Clinical Microbiology.*, **39**: 3736-3739.
- BAYLAN, O., KISA, Ö., ALBAY, A., DOĞANCI, L. (2003). Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Derg.*, **45**: 256-262.
- BD. (2011). BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, Kalite Kontrolü Prosedürleri, L007467, Rev. 10.
- BODMER, T., ZÜRCHER, G., IMBODEN P., TELENTİ, A. (1995). Mutation Position and Type of Substitution in The Beta-Subunit of The RNA Polymerase Influence In-Vitro Activity Of Rifamycins in Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, **35**: 345-348.
- BURMAN, W.J., GALLICANO, K., PELOQUIN, C. (1999). Therapeutic Implications of Drug Interactions in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus-Related Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, **28**: 419-430.
- CAVUSOGLU, C., DERİCİ, Y.K., BİLGİC, A. (2004). *In-vitro* Activity of Rifabutin Against Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Known *rpoB* mutations, *Clinical Microbiology and Infection*.**10**:162-165.
- CENGİZ, A.T. (1999). *Mycobacteriaceae*. In: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ed: USTAÇELEBİ, Ş., Güneş Kitabevi; Ankara. sy. 419-455.

- CDC. (2000). Centers for Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for the Use of Rifabutin or Rifampin for the Treatment and Prevention of Tuberculosis Among HIV-Infected Patients Taking Protease Inhibitors or Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *MWR Morb Mortal Wkly. Rep.*, **49**: 185-9.
- Erişim: [<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4909a4.htm>]. Erişim tarihi: 12.3.2011.
- CDC. (2010). Erişim: [http://www.cdc.gov/tb/topic/laboratory/Drug_testing.htm]. Erişim tarihi: 20.9.2010.
- CEYHAN, İ. (2011). Tüberkülozda Bakteryolojik Tanı, Laboratuvar Teknikleri Serisi, Mikobakteriyoloji Teknik Seri. RSHM. LAB. TB.01.
- CHIKAMATSU, K., MIZUNO, K., YAMADA, H., MITARAI, S. (2009). Cross-Resistance Between Rifampicin and Rifabutin Among Multi-Drug Sensitive *Mycobacterium tuberculosis* Strains. Erişim: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860266/>]. Erişim tarihi: 17.02.2011.
- ÇİFTÇİ, İ.H., ASLAN, M.H., AŞIK, G. (2011). Evaluation of Xpert MTB/RIF Results for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. *Mikrobiyol Bul.*, **45(1)**: 43-7.
- CLSI. (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard- 2nd Ed. CLSI Document M24-A, Pennsylvania. Erişim: [www.clsi.org/source/orders/free/m24-a2.pdf]. Erişim Tarihi: 27.04.2011.
- ÇELİK, N., EYÜBOĞLU A.F.Ö. (2000). Tüberküloz Dışı Mikobakteriyel İnfeksiyonlar. *Akciğer Arşivi*, **1**: 31-41.
- DAIL, D. H., HAMMAR, S. P., CAGLE, P. T. (2008). Dail and Hammar's Pulmonary Pathology: Nonneoplastic Lung Disease, Vol. I, 3rd Ed., *Springer*, sy. 317.
- DELLA-LATTA, P. (2004). Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Ed: ISENBERG, H.D. 2nd Ed. ASM Press, Washington, DC. Section 7.
- DICKINSON, J.M., MITCHISON, D.A. (1987). *In vitro* Activity of New Rifamycin Against Rifampicin-Resistant *M. tuberculosis* and MAIS-Complex *Mycobacteria*. *Tubercle.*, **68**:177-82.
- DIN. (2011). Erisim: [<http://www.din.de/cmd?level=tpl-home&contextid=din>]. Erisim tarihi:21.04.2011.
- DRENNAN, J.C., GUIDERA, K.J. (2002). Pediatric Orthopaedics, Section 9. *Orthopedics*. Ed: FITZGERALD R.H., KAUFER H., MALKANI A.L. *Elsevier Health Sciences*, sy. 783-784.
- DURMAZ, R. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemler/ Son Gelişmeler. *ANKEM Derg*, **24(Ek 2)**: 64-70.
- FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. (2007). 1. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Ed. St. Louis, Mosby, sy. 478-510.

- FZ-BORSTEL. (2011). Erisim: [<http://www.fz-borstel.de/cms/forschungszentrum/abt-pneumologie/klinische-pneumologie/molekulare-Mykobakteriologie/projekte.html>]. Erisim tarihi: 19.03.2011.
- ESEN, N., GÜNDÜZ, A.T. (2003). Dokuz Eylül Üniversitesinde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarında İlaç Direnci (2000-2002). *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **33**:337-342.
- GANDHI, N.R., MOLL, A., STURM, W.A., PAWINSKI, R., GOVENDER, T., LALLOO, U., ZELLER, K., ANDREWS, J., FRIEDLAND, G. (2006). 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*, **368**:1575-1580.
- GEDİKOĞLU, S. (1997). *Mycobacterium tuberculosis*'in hücre yapısı. *Enfeksiyon Derg.*, (4:Ek yayım): 13-17.
- GIAMPAGLIA, C.M.S., MARTINS, M.C., INUMARU, V.T.G., BUTUEM, I.V., TELLES, M.A.S. (2005). Evaluation of A Rapid Differentiation Test for The *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Selective Inhibition with p-nitrobenzoic Acid and thiophene-2- carboxylic Acid Hydrazide. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **9**: 206–209.
- GIAMPAGLIA, C.M.S., MARTINS, M.C., CHIMARA, E., OLIVEIRA, R.S., VIEIRA, G.B.O., MARSICO, A.G. (2007). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* From Other *Mycobacteria* with p-nitrobenzoic Acid Using MGIT960. *Int J Tuberc Lung Dis.*, **11**: 803-807.
- GOLOUBEVA, V., LECOCO, M., LASSOWSKY, P., MATTHYS, F., PORTAELS, F., BASTIAN, I. (2001). Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for Direct and Indirect Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* From Respiratory Specimens in A Siberian Prison Hospit. *J. of Clinical Microbiology.*, **39**:1501-1505.
- GUPTE, S. (2006). Textbook of Medical Microbiology. Jaypee Brothers Publishers, sy. 191.
- GÜMÜŞLÜ, F. (2006). Türkiye Tüberküloz Kontrol Programı. 6. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Ankara, sy. 22-27.
- GÜMÜŞLÜ, F., BEYAZIT, L., GÜMÜŞ, A. (2007). Türkiye'de Verem Savaşı 2007 raporu.
- HALL, G.S., HOWARD, B.J. (1994). *Mycobacteria*. In: *Clinical and Pathogenic Microbiology*. Ed: KEISER, J.F., SMITH, T.F., WEISSFELD, A.S., TILTON, R. (1994), 2nd Ed. St. Louis, sy. 503-529.
- HUEBNER, R.E., SCHEIN, M.F., BASS, J.B. Jr. (1993). The Tuberculin Skin Test. *Clin Infect Dis.*, **17**: 968-75.
- HWANG, H., CHANG, C., CHANG, L., CHANG, Y., CHEN, Y. (2003). Characterization of Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, **52**: 239-245.
- JARLIER, V., NIKAIDO, H. (1994). Mycobacterial Cell Wall: Structure and Role in Natural Resistance to Antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* 123, sy. 11-18.

- KÖKSAL, İ. (2000). Tüberkülozda Tanı. Erişim:[<http://www.ttb.org.tr/STED/sted0200/02002.html>]. Erişim Tarihi:04.05.2011.
- KIYAN, M. (1999). *Mycobacteriaceae*. In: *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ed: USTAÇELEBİ, Ş., Güneş Kitabevi, Ankara, sy. 4419-437.
- KİRAZ, N. (2003). Antitüberküloz İlaçlara Direnç Mekanizmaları ve Yeni İlaçlar. Erişim:[http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Nuri_Kiraz.pdf]. Erişim Tarihi:18.02.2011.
- KOCABAŞ, A. (1996). Akciğer Tüberkülozu. In: *İnfeksiyon Hastalıkları*. Ed: TOPÇU, W.A., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, sy. 396-443.
- KORKMAZ, G., BALCI, İ., BAYRAM, A., KARSLIGİL, T. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Kökenlerinin Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Saptanmasında Bactec ve Agar Proporsiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg.*, sy. **20**: 714.
- MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R. (2005). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed, Churchill Livingstone, sy. 2852-2886.
- MAZA, L.M., PEZZLO, M.T., SHIGEI, J.T., PETERSON, E.M. (2004). Color Atlas of Medicalbacteriology. ASM Press, Washington DC, sy. 64-83.
- METCHOCK, B.G., NOLTE, F.S., WALLACE, R.J. (1999). *Mycobacterium*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Ed: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. ASM Press, Washington DC, sy. 399.
- MILLER, N., INFANTE, S., CLEARY, T. (2000). Evaluation of The LiPA *Mycobacteria* Assay For Identification of *Mycobacterial* Species From Bactec 12B Bottles. *J Clin Microbiol.*, **38**: 1915-9.
- MURRAY, P.R., KOBAYASHI, G.S., FALLER, M.A., ROSENTHAL, K.S. (1994). Medical Microbiology. 2nd Ed. St. Louis, sy. 320-334.
- MWINGA, A., FOURIE P.B. (2004). Prospects For New Tuberculosis Treatment in Africa. *Tropical Medicine and International Health*, sy. 827-832.
- O'BRIEN, R.J., SPIGELMAN, M. (2005). New Drugs For Tuberculosis: Current Status and Futur Prospects. *Clin Chest Med.*, **26**: 327-340.
- OKAMOTO, S., TAMARU, A., NAKAJIMA, C., NISHIMURA, K., TANAKA, Y., TOKUYAMA, S., SUZUKI, Y., OCHI, K. (2007). Loss of A Conserved 7-methylguanosine Modification in 16S rRNA Confers Low-Level Streptomycin Resistance in Bacteria. *Molecular Microbiology*, **63**: 1096-1106.
- OTKUN, M. (2001). Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. *Klimik Derg.*, **14**: 71-82.
- ÖZTÜRK, R. (2003). Tüberkülozda Doğal Direnç ve Risk Faktörleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun: sy. 58-73.

- PIERSIMONI, C., NISTA, D., BORNIGIA, S., DE SIO, G. (1998). Evaluation of A New Method For Rapid Drug Susceptibility of *Mycobacterium avium* Complex Isolates By Using The Mycobacteria Growth Indicator Tube. *J Clin Microbiol.*, **36**: 64-67.
- PFYFFER, G.E., BROWN-ELLIOTT, B.A, WALLACE, R.J., VINCENT, V., JOST, K.C. (2003). *Mycobacterium*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. Ed: MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., PFALLER, M.A., YOLKEN, R.H., 8th ed. ASM Press, Washington, sy. 532-585.
- RAMASWAMY, S., MUSSER, J.M. (1998). Molecular Genetic Basis of Antimicrobial Agent Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis.*, **79**: 3-29.
- RATTAN, A., KALIA, A., AHMAD, N. (1998). Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerg Infect Dis.*, **42**: 195-207.
- SARIBAŞ, Z., KOCAGÖZ, T., ALP, A., GÜLALP, A. (2003). Rapid Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Heteroduplex Analysis and Determination of Rifamycin Cross-Resistance in Rifampin-Resistant Isolates. *J. of Clinical Microbiology.*, **41**: 816-818.
- SATANA, D., COBAN, A.Y., UZUN M.(2010). Testing Susceptibility of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* to Second-Line Drugs by Use of Blood Agar, *J. of Clinical Microbiology.*, **48**:4291-4293.
- SENOĞ, G., ERBAYCU, A., ÖZSÖZ, A. (2005). Incidence of Cross Resistance Between Rifampicin and Rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Izmir, *Journal of chemotherapy*, sy. 380-384.
- SIGMA-ALDRICH. (2011). Erişim:[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=R3530|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&lang=en_US]. Erişim tarihi:2.1.2011.
- SOMOSKOVI, A., PARSONS, L.M., SALFINGER, M. (2001). The Molecular Basis of Resistance to Isoniazid, Rifampin, and Pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.*, **2**: 164-8.
- TANSEL, Ö. (2006). Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. Erişim: [http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Ozlem_Tansel.pdf]. Erişim tarihi: 15.10.2010.
- TORTOLI E. (2003). Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: The New Mycobacteria of The 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**: 319-354.
- TUBERCULOSIS JOURNAL. (2010). Erişim: [<http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792%2808%2970022-2/abstract>]. Erişim tarihi: 1.12.2010.
- UZUN, M. (1996). Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Karşılaşılan Problemler. In: *1. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu*. Ed: TÜMBAY E., Bursa, sy. 23-7.
- UZUN, M., ERTURAN, Z., ANĞ, Ö.(2002). Investigation of Cross-Resistance Between Rifampin and Rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains, *Int. J. Tuberc. Lung DIS.*, **6**: 164-165

- UZUN, M. (2003). Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri.
Erişim:[[http:// www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Meltem_Uzun.pdf](http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Meltem_Uzun.pdf)]. Erişim tarihi: 15.12.2010.
- UZUN, O., ÜNAL, S. (2002). Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları II. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. sy. 821-903.
- ÜLGER, M. (2007). Mersin İlinde İzole Edilen Streptomisin Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi İzolatların *rpsL* ve *rrs* Gen Bölgesi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi, Yüksek Lisans Tezi.
- WALLACE, R.J. (2000). Antimycobacterial Agents. ‘Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, sy. 436-438.
- WANGER, A., MILLS, K. (1996). Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin and Streptomycin By Using E-test. *J. of Clinical Microbiology.*, **34**: 1672-1676.
- WILLIAMS , D.L., SPRING, L., COLLINS, L., MILLER, L.P., HEIFETS, L.B., GANGADHARAM, P. R. J. and GILLIS, T.P. (1998). Contribution of *rpoB* Mutations to Development of Rifampicin Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **42**:1853-1857.
- WINN, W.C., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., KONEMAN, E.W., PROCOP, G.W., SCHRECKENBERGER, P.C., WOODS, H.L. (2006). Mycobacteria. Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. Lippincott Company, Philadelphia. sy. 1065-1126.
- YANG, B., KOGA, H., OHNO, H., OGAWA, K., FUKUDA, M., HIRAKATA, Y., MAESAKI, S., TOMONO, K., TASHIRO, T., KOHNO, S. (1998). Relationship Between Antimycobacterial Activities Of Rifampicin, Rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* Mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **42**: 621-628.
- YAYLI, G., SÖZEN, H., AĞALAR, C. (2003). Isparta Yöresinden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Antitüberküler İlaçlara Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem. Derg.*, 47. Cilt, **33**: 24-30.
- YUEN, L.K.W., LESLIE, D., COLOE, P.J. (1999). Bacteriological and Molecular Analysis of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Australia, *J. of Clinical Microbiology.*, **37**: 3844-3850.
- YÜKSEL, P. (2005). Pirazinamide Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Kökenlerinde *PncA* Genindeki Mutasyonların Araştırılması, Tez No: 2002K120500.
- YOSHIDA, S., SUZUKI, K., IWAMOTO, T., TSUYUGUCHI, K., TOMITA, M., OKADA, M., SAKATANI, M.(2010). Comparison of rifabutin susceptibility and *rpoB* mutations in Multi-Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by DNA Sequencing and the Line Probe Assay, *J Infect Chemother.*, **16**:360–363.