

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**PULMONER VE EKSTRAPULMONER TÜBERKÜLOZLU
OLGULARDA RİFAMPİSİN DİRENCİNİ OLUŞTURAN *rpoB* GEN
MUTASYONLARININ DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE
GÖSTERİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ÜMİT ŞAHİN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MELTEM YALINAY ÇIRAK**

**ANKARA
HAZİRAN 2010**

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimimde emeği geçen, desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışmanım sayın Prof. Dr. Meltem Yalınay ırak başta olmak üzere çok değerli hocalarım Prof. Dr. Semra Kuştimur'a, Prof. Dr. Turgut İmir'e, Prof. Dr. Seyyal Rota'ya, Prof. Dr. Nedim Sultan'a, Doç Dr. Kayhan ağlar'a, Doç Dr. Ayşe Kalkancı'ya, Doç Dr. Işıl Fidan'a, Doç Dr. Funda Doğruman Al'a, emekli oğretim üyemiz Prof. Dr. Sevgi Türet'e ve çalışma arkadaşım, kardeşim Yasemin Işık'a, birlikte çalıştığım tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve laboratuvarımızda çalışan tüm görevli diğer arkadaşlarıma, beni yetiştiren, en zor anlarımda desteklerini esirgemeyen çok değerli ve fedakar aileme, eşime ve ocuklarıma.....

Sonsuz Teşekkürler.....

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
İçindekiler	ii
Kısaltmalar	iv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
1.1 Mikobakterilerin sınıflandırılması	3
1.2 Morfoloji	4
1.3 Kültür Özellikleri	5
1.4 Epidemiyoloji	7
1.5 Tüberküloz ve HIV/AIDS Hastalığı İlişkisi	9
1.6 Mikobakteri Türleri ve Klinik Özellikleri	11
1.7 İmmunopatogenez	20
1.8 Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı	24
1.9 Mikobakterilerin Tanımlanması	36
1.10 <i>M.tuberculosis</i> Enfeksiyonlarında Tedavi	62
1.11 Tüberkülozda İlaç Direnci	72
3.GEREÇ YÖNTEM	80
2.1 Kimyasal Bileşikler, Besiyerleri, Kitler	80
2.2 Aletler	82
2.3 Kullanılan <i>M.tuberculosis</i> Suşları	83
2.4 Yöntem	83
4.BULGULAR	91
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	95
6.KAYNAKLAR	107
7.ÖZET	117
8.SUMMARY	119
9.EKLER	212

Tablolar	121
Şekiller	122
10.ÖZGEÇMİŞ	123

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Acquired Immunodeficiency sendrom
BCG	Basillus calmette-querin
BOS	Beyin omurilik sıvısı
ÇİD-TB	Çok ilaca dirençli tüberküloz
ddNTP	dideoksi nükleotit trifosfat
dNTP	deoksi nükleotit trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzim linked-immunospot testi
EMB	Etambutol
E-MTD	Amplified <i>M. tuberculosis</i> Direct test
GLC	Gas-liquid chromatography
<i>GyrB</i>	DNA gyrase sub-unit B
HBV	Hepatit B virus
HCV	Hepatit C virus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HPLC	High-performance liquid chromatography
<i>hsp65</i>	65-kDa heat shock protein gene
INH	İzoniyazid
IS	Insertion sequences
ITS	Internal transcribed spacer

LAM	Lipoarabinomannan
MAC	<i>Mycobacterium avium intracellulare</i> kompleks
MIC	Minimal inhibitör konsantrasyon
MOTT	Mikobakterium tuberculosis dışı mikobakteriler
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
NAA	Nükleik asit amplifikasyon
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTM	Nontuberculous mycobacteria
PCR	Polimerase chain reaction
PNA/FISH	Peptide nükleik acid in situ hybridization
PPD	Purified protein derivative
PZA	Pirazinamid
RD	Region differences gene
RIF	Rifampisin
RGM	Hızlı Üreyen Mikobakteriler
RFLP	Restriction length polymorphism analyses
<i>rpoB</i>	RNA polimerase subunit B
SM	Streptomisin
SSCP	Single stranded conformation polymorphism analyses
TB	Tüberküloz
TDT	Tüberkülin deri testi
TLC	Thin-layer chromatography
TNF α	Tumor necrosis factor alfa

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tarihte bilinen en eski hastalıklardan birisi olup halen tüm dünyada görülen ve halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorundur. Günümüzde sadece gelişmekte olanlar değil gelişmiş ülkeler içinde çözülmesi gereken önemli bir problemdir (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre; dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'i *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektidir. Bunun yanı sıra yılda 2 milyon insan hastalık nedeniyle hayatını kaybetmekte ve her yıl 7-8 milyon yeni tüberküloz vakası tespit edilmektedir.

Tüberküloz dünyada en çok mortalite ve morbiditeye yol açan hastalık olması nedeniyle hastalıkla mücadelede epidemiyolojik verilerin büyük önemi vardır. Enfeksiyonun yayılımının önlenmesi ve spesifik tedaviye gecikmeksizin başlanması için *M.tuberculosis*'in tanımlanmasının mümkün olan en kısa sürede yapılması gereklidir. *Human immunodeficiency virus* (HIV) enfeksiyonları tüberküloz'un yayılmasına önemli katkı sağlamaktadır. Enfeksiyonun yayılımının önlenmesi ve spesifik tedaviye gecikmeksizin başlanabilmesi için *M.tuberculosis* basili mümkün olan en kısa sürede laboratuvar koşullarında gösterilmelidir. Tüberküloz'un tanısında kullanılan geleneksel yaklaşım, örneklerin asido-resistan boyama (ARB) ile boyanarak mikroskopik incelenmesi ve etkenin kültüre edilerek tanımlanmasıdır. Geleneksel yöntemler kullanılarak tüberküloz basilinın tespiti için, ARB yönteminde mililitrede 5-10 bin basil, kültür yönteminde ise birkaç basil olması yeterlidir. Ancak kültür yönteminde basillerin üreyerek gözle görünür koloni oluşturmaları 3-4 hafta kadar süre almaktadır. Bu nedenle tüberküloz tanısında geleneksel yöntemlerin yanında bunları tamamlayan

duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, çabuk sonuç veren, uygulaması kolay, pahalı olmayan moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler tanı yöntemi olarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve PZR'ın modifiye edilmesiyle birçok nükleik asit esaslı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde, klinik örneklerden *M.tuberculosis* varlığını araştırmak, kültürde üreyen mikobakterileri tür düzeyinde tanımlamak ve tüberküloz ilaçlarına karşı dirençle ilgili mutasyonların tespit etmek için NAA (Nükleik Asit Amplifikasyon) ve prob–hibridizasyon yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (2).

Tüberkülozun mortalite ve morbiditesinin yüksek olması, toplumsal sosyo-ekonomik düzeydeki kötüye gidiş, beslenme ve barınma koşullarının kötüleşmesi, *Human immunodeficiency virus* (HIV) gibi immun yetmezlik sendromlarının yaygınlaşması, hastalığın takip ve tedavisindeki aksaklıklar, seyahat koşullarının kolaylaşması nedeniyle hastalardan direk bulaşın ve dirençli olguların artması nedeniyle tüberküloz'un erken tanı ve tedavisi büyük önem arz etmektedir.

Moleküler yöntemlerden DNA dizi analizi rifampisine direnç oluşturan *rpoB* gen bölgesindeki oluşan mutasyonların saptanmasında, mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında, tüberküloz tedavisinin doğru ve etkili yapılmasında hızlı ve güvenilir bir tanı yöntemidir.

Bu çalışmada hastanemize başvuran tüberküloz pozitif hastaların akciğer ve/veya akciğer dışı klinik örneklerinden kültür sonrası elde edilen DNA'ların, DNA dizi analizlerinin yapılarak rifampisine karşı direnç oluşturan *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonları göstermek, varsa yeni oluşan mutasyonları tespit etmek ve rifampisin direnç oranını saptamak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Tarihteki en eski hastalıklardan biri olan tüberküloz, tüm dünyada halk sağlığını tehdit eden önemli sorunlardan biridir. Mısır ve Güney Amerika'da 5000-7000 yıl öncesine ait mumyalarda *M.tuberculosis* izlerine rastlanmıştır. *Mycobacterium bovis*'in hayvanlardaki varlığına ait kanıtlar insanlardakinden çok daha eski olup, günümüzden 17000 yıl önceki bizonlara aittir (3). İnsanlarda en sık hastalık yapan *Mycobacterium* türü, tüberküloz hastalığının etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'dir. *Mycobacterium* cinsi içinde 130'dan fazla tür vardır (patojen, saprofit, apatojen türler) (4).

1.5 Mikobakterilerin sınıflandırılması

Mycobacterium cinsi *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesi olup, diğer mikolik asit içeren cinsler ile ilişkisi vardır. Mikobakterium türlerinin yüksek G+C içerikleri (*M.leprae* hariç), diğer mikolik asit içeren *Gordonia*, *Tsukamurelle*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Corynebacterium* türleri gibidir (11). Mikobakteriler genel olarak hızlı ve yavaş üreyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. 1950' lerin sonuna doğru, Ernest Runyon, *M.tuberculosis* ve *M. bovis* dışındaki mikobakterileri, üreme hızlarını, pigment üretimlerini ve koloni morfolojilerini temel alarak, fotokromojenler, skotokromojenler non fotokromojenler ve hızlı üreyenler olarak 4 grupta sınıflandırmıştır.

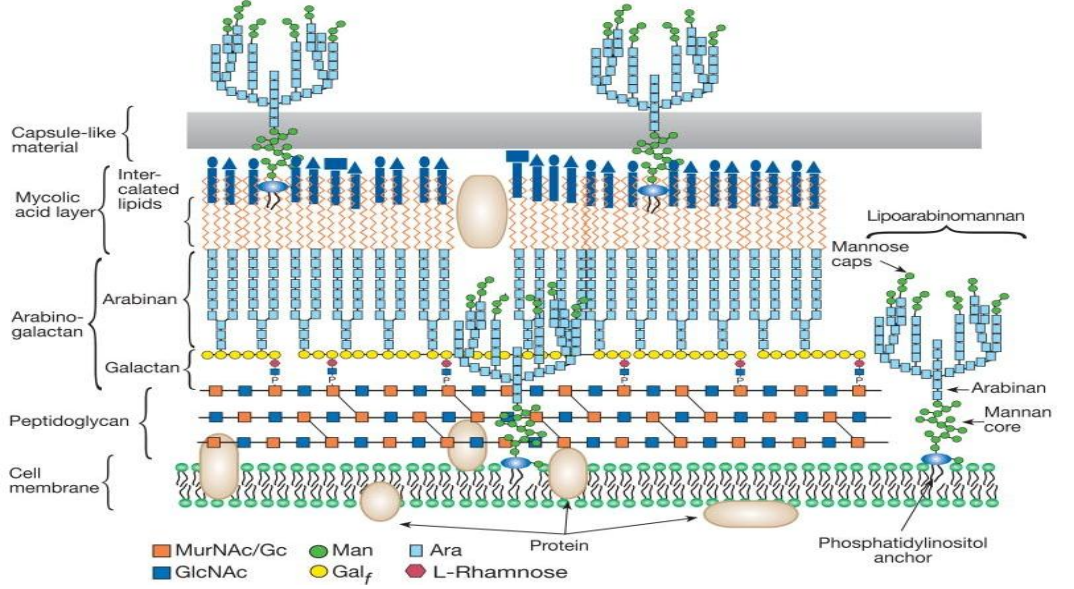
M.tuberculosis kompleks (MTBC) dışındaki mikobakteriler MOTT (mycobacteria other than *M.tuberculosis*) olarak isimlendirilir (4).

Patojen türlerin en önemlisi *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) olarak tanımlanan (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*) türüdür. *M.tuberculosis* kompleks (MTBC) deki farklı bakteriler genetik olarak >%95 DNA-DNA homolojisi gösterirler (6,4).

1.2 Morfoloji

Mikobakteriler aerop, sporsuz, hareketsiz, 0.2-0.6 µm eninde ve 1-10 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık basillerdir. Hücre duvarları diğer bakterilere göre daha kalın ve yüksek oranda lipid içerir. Hücre duvarının dış kısmında 60-90 karbonlu uzun ve dallı yağ asitlerinden oluşan ve bakteriye hidrofobik özellik kazandıran mikolik asit denilen yapı bulunur. Dıştan içe doğru, mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşan bu sağlam yapı bakteriyi zırh gibi sarar. Bu kalın hücre duvarı, mikroskopik inceleme amacıyla uygulanan bir çok boyanın hücre içine geçişini engellemesi yanında mikobakterileri güçlü asit ve bazlara, birçok toksik kimyasallara, antibakteriyellere karşı korur. Hücre duvarının yapısındaki mikolik asit karbon fuksini tutulmakta ve asit alkolde karbon fuksini bırakmamaktadır. Bu nedenle asido rezistan basil denilir. Asido dirençli boyanma özelliğinden duvar yapısındaki mikolik asit sorumludur (4). *M. tuberculosis* kompleks üyeleri hücre duvarındaki trehaloz-6-6-dimikolat (kord faktörü) maddesi varlığına bağlı olarak sıvı besiyerinde uzun kordonlar oluşturur. Virülan olmayanlarda ve MOTT'da ise kort faktörü bulunmaz (56, 4).

M. tuberculosis'in Hücre Duvarının Şematik Görünümü



1. 3 Kültür Özellikleri

Genel olarak ilk izolasyonda çoğu tür 37°C'de karanlıkta, %5-10 CO₂ varlığında ve nemli ortamda iyi ürer. Fakat optimal sıcaklık bazı türlerde (*M.ulcerans*, *M.marinum*, *M.haemophilum*) 30-32°C, bazılarında (*M.xenopi*) 42°C'dir. Koloni morfolojisi türler arasında büyük değişiklikler gösterir. S tipinde (*M.avium intracellulare*), R tipinde (*M.tuberculosis*) veya ikisinin arasında olabilir. Kolonilerden etrafa doğru yayılmış dallanan, filamentöz yapılar şeklinde görülebilir (*M.xenopi*) (57).

M. tuberculosis gliserinli besiyerinde (3 haftada) yüzeyde kalınca bir zar oluşturarak, yumurtalı ve katı besiyerinde ise 2-3 haftada hızlıca ürerler. Besiyerine konan gliserol üremeyi hızlandırır. Kültürde *M.tuberculosis* kolonileri, düzensiz, yüzeyleri pürtüklü, kuru, siğilimsi görünümlü, kirli beyaz, bazen sarımtırak renktedirler.

M. bovis, yumurtalı katı besiyerinde daha yavaş ürerler (4-8 haftada disgonik üreme). Gliserollü besiyeri üremelerini güçleştirir, bu nedenle geç önceleri yüzeyde zar yaparak sonraları dipte çökelti yaparak ürerler. Eğer yumurtalı, katı besiyerine gliserol yerine piruvat kullanılırsa üreme stimüle edilir. Yumurtalı besiyerinde küçük, yuvarlak, düzgün, hafif kabarık, nemli, beyazımtırak koloniler oluştururlar fakat pigment yapmazlar. Diğer *M.tuberculosis kompleks* üyelerinin tersine indirgenmiş oksijenli ortamda daha iyi ürerler.

M.africanum daha çok *M.tuberculosis* benzer şekilde yumurtalı besiyerinde mat, R tipi koloni oluştururlar (7).

Bazı türler mikroaerofilik şartlarda daha iyi ürerken bazıları düşük oksijen konsantrasyonlarına tahammül edemez. Mikobakterilerden bir kısmı pigment üretirken (kromojen), diğer bir kısmı pigment oluşturmazlar (nonkromojen). Pigment üretimi yalnız ışıklı ortamda (fotokromojen), hem ışıklı hemde karanlık ortamda (skotokromojen) olabilir. Genellikle mikobakterilerin bölünme zamanları uzun olup, bu süre türden türe değişiklik gösterir. Özellikle patojen türlerde üreme zamanı uzun, asit alkole dirençleri fazla, üreme sıcaklıkları sınırlıdır (4).

M. tuberculosis'in primer izolasyonunda hem sıvı hem katı besiyeri kullanmalıdır (26).

1-4 Epidemiyoloji

Küresel ve ulusal olarak öncelikli halk sağlığı sorunu olan tüberküloz dünyada en yaygın ve erişkinlerde HIV/AIDS den sonra en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalığıdır. Tüberküloz'un toplumdaki yayılımını izlemek için en iyi epidemiyolojik veri, enfeksiyon riskinin yıllık değişim miktarıdır (9).

Tüberküloz Dünya sağlık örgütü verilerine göre her yıl 700.000 kişi tüberküloz nedeniyle ölmekte ve her yıl 9 milyon yeni tüberküloz olgusu saptanmaktadır. Olguların %75'i ekonomik olarak üretken yaştadır. Tüberküloz olgularının %95'i ve tüberküloza bağlı ölümlerin %98'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Değişik toplumlarda tüberküloz enfeksiyonu ve hastalığın özellikleri son derece heterojendir. Bu nedenle hastalığın epidemiyolojisini anlamak tüberküloz'un tanısında, korunma yöntemleri ve rasyonel tedavilerin geliştirilmesinde hayati önem arz etmektedir (9,3).

Tüberküloz epidemiyolojisinin temel amaçları, risk altındaki toplulukları tanımlamak, enfeksiyonun yaygınlığını ve toplumdaki etkilerini tespit etmek, enfeksiyonun zaman içindeki değişimlerini, coğrafik dağılımını, kaynak ve bulaş mekanizmalarını belirlemek olarak sayılabilir (8).

Tüberküloz esas olarak bir akciğer hastalığı olup, tüberküloz basilinin en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Enfeksiyon aktif tüberkülozlu hastaların

öksürmesi ve hapşurması sonrası etrafa saçılan damlacık partikülleriyle oluşmaktadır. Bunun dışında basiller sindirim sistemi, deri, ürogenital sistem, konjunktiva ve emzirme yoluyla bulaşabilmektedir.

Dünya sağlık örgütünün 2005 verilerine göre dünyadaki tüberküloz hastalarının 3.5 milyonun balgam yaymasının pozitif olduğu ve aynı yıl dünyada 1.6 milyon kişinin tüberkülozdan hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Yine aynı yıl 8 milyon yeni tüberküloz hastası tespit edilmiştir. Dünyadaki tüberküloza bağlı ölümlerin %80'i 22 gelişmekte olan, % 28'i Afrika ülkelerinde görülmüştür. Gelişmekte olan ülkelerde önlenabilir ölümlerin %25'ini tüberküloz nedeniyle oluşturmaktadır. Dünyada her gün yaklaşık 5000 kişi tüberkülozdan ölmektedir. Geçtiğimiz 80 yılda ekonomik olarak gelişmiş toplumlarda hastalık giderek azalma göstermiştir (3). Ancak 1985'den sonra tüberkülozlu hasta sayısı tekrar artmaya başlamıştır. Bunun nedeni göçlerin artması, sosyo-ekonomik koşulların bozulması, beslenme barınma koşullarının kötüleşmesi, hastaların takip ve tedavisindeki ihmaller, devletlerin yanlış sağlık politikaları ve özellikle belli bölgelerdeki HIV vakalarındaki artış olarak gösterilmektedir. HIV pozitif hastalar tüberküloza oldukça duyarlıdırlar ve normal popülasyona oranla tüberküloz enfeksiyonuna yakalanma riski 20 kat daha fazladır.

Ülkemiz tüberkülozun hafif orta sıklıkta görüldüğü coğrafyada bulunmaktadır. Ülkemizde tüberkülozla mücadele 1950 yılından itibaren ciddi şekilde yapılmış olup, tüberküloz mortalitesi 262/100.000 iken, bu oran 2000 yılında 1.6/100.000'e düşmüştür. Ülkemizde tüberküloz vaka insidansı 2005 yılında 26/100.000 olup, bu insidans giderek azalmaktadır (9). DSÖ'nün hedefi,

2015 yılında tüberkülozlu yeni olgunun görülmemesi ve 2050 yılında ise tüberküloz hastalığının ortadan kaldırılmasıdır.

1-5 Tüberküloz ve HIV/AIDS Hastalığı İlişkisi

Enfekte ettiği insanları soldurarak, eriterek öldürdüğü için geçmişte Beyaz Veba olarak adlandırılan tüberküloz insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır (3). Kazanılmış Immün Yetmezlik Sendromu (AIDS) ise 1981 yılında tanımlanmış, bu hastalığın etkeni olarak 1983’de virus izole edilmiş ve etken HIV (Human Immün Deficiency) olarak adlandırılmıştır(12). 1980’li yılların sonuna gelindiğinde AIDS hastalığındaki artışa paralel olarak tüberküloz insidansında da hızlı artış gözlenmiştir(13). Tüberküloz aslında korunulabilen ve tedavi edilebilen bir hastalık olmasına rağmen, AIDS’li hastalarda en önemli mortalite ve morbidite nedeni olmuştur. Yalnız *M. tuberculosis*’le enfekte kişide ömrü boyunca tüberküloz hastası olma riski %10-20 iken, HIV ile ko–enfeksiyon olduğunda risk yıllık %10’a yükselmektedir. Özellikle eğitimin yetersiz olduğu az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, hastalığın kontrolü zorlaşmıştır. *M.tuberculosis* ve HIV ile koenfekte olan bireylerde latent tüberkülozun endojen veya ekzojen olarak aktifleşmesi artmaktadır. HIV enfekte kişilerde fırsatçı enfeksiyonlar geç dönemde görülmesine rağmen tüberküloz hastalığı herhangi bir dönemde görülebilir (14). HIV hem CD4 T lenfositleri hem de makrofajları enfekte ederek bu hücrelerin sayısının azalmasına ve fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur. CD4 T lenfositlerden salgılanan interferon- γ üretiminin bozulması sonucu

makrofaj fonksiyonlarını bozarlar. HIV makrofajlardan salgılanan TNF- α (Tumor Necrosis Faktör alfa)'yı azaltarak ve NK (Natural Killer) hücre aktivasyonunu yavaşlatarak granülom oluşumunu engellerler. *M.tuberculosis* ise HIV enfeksiyonunun gidişini hızlandırır ve viral yükü artırır. Bunun nedeni muhtemelen *M.tuberculosisin* TNF- α artışına neden olmasıdır. Genellikle görülen klinik yetişkin tip post primer tüberküloz formuna benzemektedir. En sık görülen ekstrapulmoner lokalizasyonlar plevra ve lenf nodlarıdır (14).

HIV enfekte bir hastada tüberküloz tanısını koymak oldukça zordur. Çünkü tüberkülozun nonspesifik semptomları olan ateş, halsizlik, gece terlemesi ve kilo kaybı AIDS hastalarında da görülmektedir. Ayrıca balgam yaymalarında ARB negatifliği TDT (Tüberkülin deri testi) negatifliği ve akciğer grafisinde atipik bulgular sıktır. Afrika'da HIV enfeksiyonu ile birlikte olan tüberküloz tükenmeyle karakterize "slim hastalığı" olarak tanımlanır. HIV enfekte kişilerde birçok fırsatçı enfeksiyon görülür. Bunlardan birisi, *M.avium intracellulare* complex ile oluşan enfeksiyonlar olup tüberküloza benzer bulgularla seyreder (3). HIV ile enfekte 36.1 milyon kişinin 1/3'ünün aynı zamanda tüberküloz enfeksiyonu ile de enfekte olduğu DSÖ tarafından saptanmıştır. Latent tüberkülozun bilinen en güçlü risk faktörü, HIV ile koenfeksiyondur (44,53).

1.6 Mikobakteri Türleri ve Klinik Özellikleri

1.6.1 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks(MTBC)

Mycobacterium tuberculosis, *M.bovis*, *M.africanum* ve *M.microti*, *M.canetti*, *M.pinnipedii* türlerinden oluşmaktadır ve yapılan DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda MTBC üyelerinin >%95 ortak DNA-DNA homolojisi gösterdikleri tespit edilmiştir. Bir hayvan patojeni olan *M.microti* dışındaki suşlar insanı enfekte edebilirler. Günümüzde yapılan *M.tuberculosis*' in tüm genomunun kullanıldığı karşılaştırmalı genomik çalışmalarda, MTBC'in diğer üyelerindeki eksik genom bölgeleri hakkında yeni bilgiler sağlamıştır. Mikobakterilerin tür seviyesinde tanımlaması, epidemiyolojik, halk sağlığı ve doğru tedavi seçenekleri açısından önemlidir. MTBC'de yer alan türlerin tanımlanmasında fenotipik yöntemler yanında, ileri moleküler teknikler sayesinde belirlenen genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır. Bu kompleks üyeleri aralarında yüksek derecedeki homolojiye rağmen, hem fenotipik özelliklerinde hem de özel DNA bölgelerinde yüksek seviyede polimorfizm gösterirler. Son yıllardaki moleküler yöntemlerdeki gelişmeler sayesinde *M.tuberculosis* genomunun genetik polimorfizmini saptamada IS elementlerinden IS6110 en değerli belirteçlerden biridir (3,6).

M.bovis sığırlar, köpekler, domuzlar, bazı av kuşları ve insanlarda hastalık oluşturur. *M.bovis* türlerinin çoğunda pirazinamide karşı doğal direnç söz konusudur. *M.tuberculosis* kompleks üyelerinin çoğunun tersine *M.bovis* türleri indirgenmiş oksijenli atmosferik koşullarda çoğalabilirler. Dünyanın birçok

bölgesinde *M.bovis* basillus calmette-querin (BCG) hala aşı amaçlı kullanılmaktadır.

M.africanum, tropikal Afrika'da insanda hastalık etkenidir ve *M.tuberculosis*'in gen dizilerindeki delasyon sonucu oluşmuştur. Kolonileri *M.tuberculosis*'e benzer, biyokimyasal ve fiziksel özellikleri *M .tuberculosis* ile *M.bovis* arasında yerleşmiştir.

M.microti tarla ve kır faresi gibi kemirgenlerden izole edilir ve kobaylarda, tavşanlarda, lamalarda, kedilerde ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda doğal olarak kazanılan tüberküloza neden olurlar. İmmün-kompetent ve immün-süpresif insanlarda tüberküloz etkeni olarak izole edilmiştir. Boyanmış yaymalarda ay çöreği gibi bir morfoloji gösterir ve normal olarak kültürde üremezler.

M.canetti'nin bütün *M.tuberculosis* kompleks üyelerinin atası olduğu sanılmaktadır. Doğu Afrika'daki ilk insanlarla aynı zamanda ortaya çıktığı ve kendi insan konaklarıyla birlikte uzun bir süre içerisinde evrim geçirdikleri düşünülmektedir. *M.canetti*'nin bir çocukta lenfadenite ve HIV (+) bir hastada jeneralize tüberküloza neden olduğu bildirilmiştir.

M.pinnipedii, *M.tuberculosis* kompleksin yeni bir üyesidir. Yüzgeç ayaklılarda, kobaylarda, tavşanlarda ve muhtemelen sığırlar ve insanlar için patojendir. Fok balığı basilleriyle oluşan enfeksiyonlar lenf nodlarında, akciğerlerde, plevra ve dalakta granümatöz lezyonlarla kendini gösterir ve yayılma eğilimindedir.

1.6.2 *M. avium intracellulare* kompleks (MAC)

Bu grupta *M.avium* ve *M.intracellularenin* türleri bulunur, fenotipik olarak ayırt edilemezler ancak genotipik olarak hücre duvar glikoproteinlerine göre 28 farklı alt türe ayrılırlar. MAC, ABD ve birçok gelişmiş ülkede en sık hastalık etkeni olan MOTT türüdür. İnsandan insana bulaş gösterilememiştir (54). MAC organizmaları, sudan, topraktan, bitkilerden ve çevresel etkenlerden izole edilebilirler. Genel olarak bu mikroorganizmaların patojeniteleri düşüktür. Önceleri kümes hayvanlarında ve domuzlarda enfeksiyon yaptığı düşünülmüş ancak 1940'lardan sonra immünkomprese hastalarda tüberküloz benzeri infiltrasyonlar, nodüler bronşektazi, nodüller ve infiltrasyonlar şeklinde farklı klinik tablo oluşturduğu görülmüştür. AIDS pandemisi nedeniyle MAC, insanlarda hastalık yapan en sık tüberküloz dışı mikobakteridir. MAC; AIDS hastalarında, kistik fibrozisli gençlerde, 1-5 yaşındaki çocuklarda enfeksiyon etkenidir ve 1-5 yaş grubundaki çocuklarda lokalize lenfadenitin önde gelen sebebidir. AIDS'li olmayanlarda MAC enfeksiyonları seyrek olmasına karşın AIDS'li hastalarda son derece yaygındır. MAC organizmaları heterojen koloni morfolojileriyle iyi bilinirler; parlak beyazımsı ve saydam koloniler oluştururlar. *M.avium* ve *M.intracellulare* DNA problemlerinin kullanılması, 16s rRNA gen dizileme ve 65-kDa ısı şok protein restriksiyon enzim paternlerinin analizi gibi genetik yöntemlerle kolaylıkla ayırt edilebilir. AIDS'li hastalarından izole edilen MAC organizmalarının %90'ından fazlası *M.avium*dur (6). MAC kompleksi içinde yer alan *M.paratuberculosis*, *M.lepraemurium* ve *M.silvaticum* türlerinin ise *M.avium*'un alt türleri olarak kabul edilmektedir. *M.avium paratuberculosisin*

kesin olmamakla beraber Chron hastalığı ile ilişkili olmasından şüphelenilmektedir. *M.avium silvaticum* geviş getiren hayvanlarda zorunlu patojendir (Johne Hastalığı).

1.6.3 *M.kansasii*

ABD ve birçok ülkede MOTT içinde akciğer hastalığı yapan MAC'tan sonra ikinci organizmadır. *M.kansasii*'nin yaptığı akciğer hastalığı, İngiltere ve Güney Amerika'da maden işçilerinde yaygın olup MAC'a bağlı akciğer hastalığından kemoterapiye daha iyi yanıt vermesiyle ayrılır (15,16,17). Klasik tüberküloza benzeyen kronik pulmoner hastalık *M.kansasii* enfeksiyonlarının en yaygın şeklidir ve sıklıkla üst lobları tutar. Ekstra pulmoner enfeksiyonlar nadirdir ve genellikle çocuklarda lenfadenit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kas-iskelet hastalığını içerirler. *M.kansasii* enfeksiyonları hücrel immünitesi ciddi şekilde bozuk olan hastalar veya AIDS'li hastalar dışında nadiren yayılma gösterir. *M.kansasii*'nin moleküler çalışmalar sonunda hepsi insanlarda hastalık oluşturabilen 5 genotipi tanımlanmıştır (15,18,19). Katı besiyerinde 35°C'de 2-3 haftada üreyen fotokromojenik bir mikobakteri türüdür, klasik antitüberküloz ilaçlara duyarlıdır.

1.6.4 *M.ulcerans*

Bugün *M.ulcerans* enfeksiyonu tüberküloz ve lepradan sonra insanlarda en sık görülen 3. mikobakteri kökenli hastalıktır. *M.ulcerans*, durgun suların altında çamurun içinde üreme eğilimindedir. Tipik olarak alt ekstremitelerde,

daha önce travmaya uğramış bölgelerde, deri altında ağrısız bir şişlik olarak başlar, nekrotik ülserasyonlar gelişir (Buruli ülseri) ve osteomyelite neden olabilir (22). *M.ulcerans* gliserollü L-J besiyerinde iyi ürer, azalmış oksijen basıncı BACTEC 460 sisteminde saptanma oranını artırır (20-21). Katı besiyerinde 32°C’de birkaç haftalık inkübasyon sonrasında üreyen ve kromojenik olmayan bir mikobakteri türüdür. İzoniazid ve etambutole dirençli, rifampin, streptomisin, kanamisin ve sikloserine duyarlıdır (4).

1.6.5 *M.marinum*

Genellikle bütünlüğü bozulmuş derinin kontamine su ve su ürünleriyle teması sonrasında, özellikle ekstremitelerde gözlenen granümatöz deri lezyonlarına neden olurlar. En tipik görünümü bir ekstremiteye sınırlı genellikle dirsek, diz ayak ve el parmaklarında tek bir papülonodüler lezyondur ve inkübasyondan 2-3 hafta sonra verriköz veya ülserle lezyonlar gelişir (16).Yüzme havuzu granülomlarının en önemli etkenidir. 35°C’de üremezken 25-32 °C’de en iyi ürer. *M.marinum* fotokromojendir, insanda ve balık izolatlarındaki farklılıklar 16S r-RNA hsp65 genlerinin sekans analizleri ile gösterilmiştir. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde disseminasyon, sinovit ve osteomyelit yaptığı bildirilmiştir (23).

1.6.6 *M.simiae*

M.simiae ilk olarak 1965’de maymunlardan izole edilmiştir. *M.simiae* niyasin sentezler ve fotokromojenite açısından testler yayılmadan doğru tanı

konulamaz. Işık altında pigment üretimi test edilmezse *M.tuberculosis* olarak yanlış olarak tanımlanabilir. Osteomyelit, kronik akciğer enfeksiyonları, dissemine hastalık gibi klinik formları nadirdir. Duyarlılığın değişken olması ve çoğul ilaç direncine sahip olması nedeniyle tedavi başarısı düşüktür (23,15,16).

1.6.7 *M.szulgai*

İlk olarak 1972de farklı bir tür olarak tanımlanmıştır. Dünyada yaygın olmasına rağmen doğal rezervuarı bilinmemektedir. Hastalık genellikle orta yaşlarda kronik pulmoner hastalık şeklinde seyreder. Ancak nadiren servikal adenit, kutanöz lezyonlar, tenosinovit, osteomyelit, bursit etkeni olabilirler (15,16,24). AIDS’li hastalarda ve immun yetmezlikli hastalarda yaygın enfeksiyonlar gösterirler. 16Sr-RNA gen dizi analizleri sayesinde *M. malmuense* ile yakın akraba olduğu tespit edilmiş olup, ayrımları basittir. *M.szulgai*; 37°C’de üretildiğinde skotokromojen, 25°C’de üretildiğinde ise fotokromojen özelliktedir. Rifampin, streptomisin ve etambutol kombine tedavisine iyi cevap verirler (3).

1.6.8 *M. haemophilum*

M. haemophilum ilk olarak 1978’de Hodgkin’li hastada tespit edilmiştir. *M. haemophilum* düşük ısıda (30°C’de) enfeksiyon oluşturan nonkromojen bir basildir. Üremek için ferrik amonyum sülfat veya hemin’e ihtiyaç duyan tek türdür. Bu nedenle çikolatamsı agarda iyi ürerler. %10 CO₂ ortamda 1-8 haftada ürerler. Klasik klinik tabloları, yaygın olarak ekstremitelerde küme

yada çoklu deri lezyonları şeklindedir ve apse, fistül, sellülit, osteomyelite ilerleyebilir. En sık görülen formu deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıdır (3,16).

1.6.9 *M.malmoense*

İlk olarak 1977'de izole edilmiştir. Bu tür genellikle toprak ve suda bulunur ve çocuklarda servikal lenfadenit, erişkinlerde kronik pulmoner hastalık şeklinde klinik tabloya neden olurlar. Erişkin akciğer enfeksiyonları pnömokonyozlarla ilişkilidir (15,16).

1.6.10 *M. xenopi*

M. xenopi türü optimal ısısı 45°C'dir dolayısıyla termofilik basillerdir. Kuşlar doğal rezervuarlarıdır. Hastanelerde su depolarından ve musluk sularından izole edilebilirler. Nasokomiyal enfeksiyonları ve kronik akciğer hastalığının oluşmasında altta yatan predispozan nedenlerin bulunması önemlidir. İmmün yetmezlikli hastalarda, septik artrit, spondilit gibi ekstrapulmoner enfeksiyon yapabilir (25).

1.6.11 *M.gordonae*

M.gordonae mikrobiyoloji laboratuvarlarında en çok karşılaşılan nonpatojen türdür. *M.gordonae* ile enfekte kişilerde yapılan klinik araştırmalarda, bu mikroorganizmanın immün sistemi baskılanmış kişilerde dahi patojen olmayan koloniler yaptığı gösterilmiştir. *M.gordonae* tween 80'i 5

günde hidrolize eder. Özel mikolik asit profiline sahiptir ve pirazinamid, nikotinamidi hidrolize edebilir. Son zamanlarda nadirde olsa menenjit, peritonit, hepatit ve akciğer enfeksiyonlarına sebep olduğu bildirilmektedir (3).

1.6.12 *M. scrofulaceum*

M. scrofulaceum 1980'lere kadar çocuklarda servikal lenfadenitin en sık sebebiydi. Bu tarihten sonra önceliği MAC enfeksiyonlarına bıraktı. *M.scrofulaceum*, MAC ile antijenik yapı, ilaç duyarlılığı ve klinik tablo benzerliği nedeniyle bir süre birlikte anılmaya başlandı. Bakteri vücuda oral olarak alınmakta, başta lenfadenit olmak üzere, akciğer enfeksiyonu, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Hastalığın seyri kişinin immun sistemi ve diğer hastalıkların eşlik edip etmemesine bağlıdır (3,15). Toprak ve su kaynaklı bu bakteriler, 25-37°C'de 4-6 haftada ürerler. Tedavilerinde eritromisin ve sulfanamidler etkilidir (3).

1.6.13 *M.shimoidei*

İlk olarak 1988'de kaviter akciğer lezyonunda tanımlanmıştır. Tek 16S rRNA gen dizisi ve 16S-23S RNA gen spacer bölgesi sayesinde kesin olarak tanımlanabilir. Biyokimyasal olarak *M.terrae* komplekse benzer ve bunlardan katalaz, β galaktozidaz testleriyle ayrılabilir. Bunlar 45°C'de üreyen termofilik bakterilerdir (27).

1.6.14 Hızlı Üreyen Mikobakteriler (RGM)

- I. *M.fortuitum* grup
- II. *M.chelonae/abcessus* grup
- III. *M.smegmatis* grup

Bu grubun önemli özelliği mikolik asit olarak bilinen uzun zincirli yağ asitlerinin bulunması, ilk izolasyonlarında katı besiyerleri içinde yedi gün içinde gözle görülür koloni oluşturmaları, 3 gün veya 2 hafta içerisinde arilsülfataz aktivitesi göstermeleri ve pigmentasyonlarının olmayışıdır.(29). Bu grupta en fazla izole edilenler *M.fortuitum*, *M.chelonae* ve *M.abcessus* türleridir. Boyamaya gösterdikleri direnç nedeniyle kültürde üremeleri olsa bile bazen ARB negatif sonuç verebilirler. Mikobakteri örneklerinin dekontaminasyonunda kullanılan NaOH, bu bakterilere toksik etki yapar. Genellikle enfeksiyonlar bakterilerin derin dokuya travma sonucu veya iatrojenik olarak invaziv girişimler sonucu oluşur. Bu enfeksiyonda predispozan faktörler, akalazyza, kistik fibrozis, lipoid pnömoni ve iyileşmiş tüberkülozdur. Gerek sağlık çalışanlarıyla ilgili salgınlar ve gerekse nazokomiyal enfeksiyonlar bildirilmiştir (30,33).

1.6.15 Tüberküloz Dışı Yeni Mikobakteri Türleri

M. bohemicum, *M. branderi*, *M. conspicuum*, *M. heckeshornense*, *M. heidelbergense*, *M.interjektum*, *M. intermedium*, *M. kubicae*, *M lacus*, *M. lentiflatum*, *M. palustre*, *M. parmense*, *M. sherrisii*, *M. triplex*, *M. tusciae* gibi yeni türler de mevcuttur.

1.7 Immunopatogenez

Mikobakteriler hücre duvarlarının zengin lipit tabakası sayesinde oldukça korunaklıdır. Kord faktörü denilen *trehaloz 6,6 dimikolat* sadece virülan suşlarda bulunan bir virülans faktörüdür. Mikobakteriler, makrofaj üzerindeki reseptörlere bağlanmayı sağlayan ligantlara sahiptir. Bu sayede makrofaj içerisine giren basiller, makrofajın öldürücü etkisinden korunmuş olurlar ve canlı kalırlar. *M.tuberculosis* ortama bolca amonyak salarak, hem lizozom-fagozom oluşumunu engeller hemde birleşme olsa dahi litik enzimlerin fonksiyonlarını bozarak etkisizleştirirler. *M.tuberculosis* tarafından üretilen trehaloz 2- sülfat türevleride fagozom- lizozom birleşmesini önler. Bu basiller hücre duvarındaki lipoarabinomannan ve fenolik glikolipidler sayesinde, makrofajlarca üretilen H₂O₂ ve diğer oksijen radikallerinin öldürücü etkisini bloke ederler. Lipoarabinomannan, hem oksijen radikallerini bloke eder hemde protein kinaz C'yi inaktive eder. Lipoarabinomannanın ucuna mannoz molekülünün bağlanması sonucu IL-10 sentezi uyarılarak immun yanıtın humoral yöne kaymasına ve TNF- α (tumor necrosis factor), IL-12 gibi sitokinlerin salınımı için uyarının azalmasına neden olur. TNF- α , IL-12

yapımının azalması, reaktif oksijen radikallerinin sentezinin azalmasına ve makrofajların öldürme fonksiyonların bozulmasına apoptosise neden olur (4).

Bu gün tüberküloza karşı immun yanıtta ve korunmada esas rolü hücrel immun yanıtın (Th1) oynadığı açıkça bilinmektedir. Bu yanıtta etkin hücreler CD4+T, CD8+T hücreleri, aktive olmuş makrofajlar ve dendritik hücreler olup bunlarla birlikte IFN- γ , IL12- ,TNF α gibi sitokinler önemli rol almaktadır. Enfeksiyondan yaklaşık 7-21 gün sonra doku aşırı duyarlılığı ve hücrel immüitenin gelişmesiyle birlikte, basillerin üremesi ve yayılması sınırlandırılmaya başlar. Basil taşıyan makrofajlar ve dendritik hücreler bir yandan başta IL12 olmak üzere proinflamatuere sitokinleri salgılayarak hücrel immun sistem hücrelerini (CD4+T, CD8+T) aktive ederek, hücrel proliferasyona diğer yandan da fagosite ettikleri basilleri aktive ettikleri hücrelere sunmaya çalışırlar. IL12'nin etkisiyle aktif lenfositler 3-9 haftada yeterli sayıya ulaşırlar ve bu hücreler enfekte dokuya giderek burada hem regülatör hem de efektör olarak fonksiyon görürler. Başta CD4+ T hücreleri olmak üzere Th1 yanıtın diğer aktif hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ makrofajları güçlü bir şekilde aktive eder. Aktif makrofajlar basilleri hapsederek fagozoma dönüştürler. Fagozom-lizozom birleşmesinin gerçekleşmesiyle lizozomal enzimler basil üzerinde litik etki gösterirler. Hücre içi basillerinin imhasında etkili olan reaktif oksijen molekülleri,reaktif nitrojen ara moleküller indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) yapımı da makrofaj aktivasyonunu indükler. Yapımı indüklenen diğer bir molekül tümör nekroze edici faktör (TNF- α) enfeksiyonun sınırlandırılmasında çok önemli rol oynar.

Aktif makrofajlar ve hücrel immun sistem hücrelerinin canlı basillerin bulunduğu ilk enfeksiyon odağında birikmesi sonucu tüberkül denen küçük granülomlar oluşmaya başlar. Primer Tüberküloz denilen bu dönemde yeterli konak savunmasının oluşturulduğu, basil üremesinin ve enfeksiyonun sınırlandırıldığı bir süreç olmakla birlikte basiller tamamiyle eradike edilememektedir. Oluşan granülomlar zamanla kalsifiye olmakta, uyur fazdaki basiller vücutta varlıklarını sürdürebilmektedir. Latent dönem de denilen bu dönemde primer enfeksiyon sırasında geliştirilen hücrel immun yanıt, konağı tüberkülozdan korumaya devam eder. Latent fazdaki basillerin konak bağışık yanıtını aşarak çoğalması ve yeni odaklara taşınması sonucu oluşan tüberküloza sekonder tüberküloz (reaktif) denir.

Genellikle akciğerin apikal bölgelerinde oluşan reaktif tüberküloz odakları basille immun sistem arasındaki etkileşimler sonucu granülomların oluşmasıyla sonuçlanır. Bu granülomlar zamanla nekroze olurlar ve yüzeye yakın granülomların oluşturduğu doku harabiyeti sonucu kavitasyonlar meydana getirirler. Bunun sonucu olarak tüberkülozun prototipik semptomu olan kanlı balgamla birlikte öksürüğe yol açarlar. İlerlemiş tüberkülozda immun profil oldukça farklıdır ve bu hastalarda Th2 sitokinlerinin (özellikle IL4) artışı, serum IgE düzeyindeki artışla ve akciğer kavitasyonunun büyümesiyle kuvvetli paralellik göstermektedir. Enfeksiyonun başlangıcında etkin olan Th1 yanıtının, ilerleyici hastalık fazında (pinömoni, intertisyel firozis) azaldığı ve bu dönemde IL4 ve Th1 yanıtının inhibütörü olan “transforming growth factor beta”(TGF- β) düzeylerinde belirgin artış olduğu görülmüştür. Tüberkülozun gelişiminde

anahtar olay Th1 yanıtının Th2'ye dönüşümüdür. Tüberkülozun çeşitli semptomları (ateş, kilo kaybı, doku hasarı), Th-1 yanıtının başlıca sitokinlerinden biri olan TNF- α 'nın salınımı sonucu ortaya çıkmaktadır.

TNF- α 'nın, IL4 seviyesinin yüksek olduğu enfeksiyon bölgesinde salgılanmasının doku hasarını indüklediği gösterilmiştir. TNF- α ve iNOS üretimlerinde belirgin azalma gösteren vakuollü makrofajlar aktif tüberkülozun baskın makrofaj tipidir. Bunlar CD4+T hücreleri üzerinde apoptotik etki gösterirler. Makrofajlar tarafından enfeksiyonun erken fazında üretilen az miktardaki PGE-2'nin, iNOS ifadesini arttırarak basil yükünün azalmasında etkin rol aldığı gösterilmiştir. Aktif tüberkülozdaki tipik vakuollü makrofajlarda PGE-2 yapımının artması sonucu Th1 hücrelerinin üzerinde immunosupresif etki oluşur. Yine vakuollü makrofajlarda, Th1 yanıtını baskılayan TGF- β yapımı da artmaktadır. Bu sitokin tüberkülozda akciğerdeki fibrotik değişikliklere neden olur (34-36).

1.8 Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı

Tüberküloz dünyada yaygın olarak görülen, halk sağlığını tehdit eden ve en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalığıdır. Çoğunlukla gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, Dünya nüfusunun 1/3'ü *M.tuberculosis* ile enfektedir. Yılda yaklaşık 2-3 milyon insanın tüberküloz nedeniyle ölmesi düşünüldüğünde tüberkülozun erken ve doğru tanısı son derece önem arz etmektedir.

Tüberkülozun kesin tanısı, hastalardan alınan klinik örneklerde ve dokularda tüberküloz basilinin gösterilmesiyle konur. Tanıda altın standart, *M.tuberculosis*in kültürde üretilmesidir (37,38). Tüberküloz laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler esas itibari ile bakteriyolojik tekniklere dayanır. Doğru tanı klinik örneğin uygun şekilde alınması, nakledilmesi ve işlenmesiyle mümkündür. Tüberkülozun yayılımının önlenmesi, epidemiyolojisinin aydınlatılması, tedavinin doğru ve uygun zamanda yapılması ilaç direncinin araştırılması klasik laboratuvar tanı yöntemleri yanında hızlı, güvenilir, özgüllüğü-duyarlılığı yüksek yeni kültür ve moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. Tüberküloz'un laboratuvar tanısı çeşitli aşamalardan oluşmaktadır.

1.8.1 Güvenlik ve örneklerin taşınma sorunları

M.tuberculosis'in hastalardan ve örneklerden nazokomiyal olarak geçişi, sağlık çalışanları açısından son derece önemlidir. İnsanlar için *M.tuberculosis*'in düşük efektif dozu (<10 basil) nedeniyle tüberkülozdan şüphelenilen veya bilinen tüberküloz olgularından alınan örnekler işleme alınırken enfeksiyöz kabul edilmeli ve uygun önlemler alınarak çalışılmalıdır (39).

Mikobakteriyel kontaminasyonun aerosol veya diğer şekillerinin önlenmesi; laboratuvarlarda tam anlamıyla fonksiyon gören biyolojik güvenlik kabinlerinin, güvenli santrifüjlerin ve dikkatlice uygulanan tekniklerin kullanılmasıyla başarılır. Yüksek risk taşıyan laboratuvarlarda, daha sıkı biyogüvenlik sağlayan seviye 3 laboratuvar araç gereçleri gereklidir. Laboratuvarlarda solunumla ilgili koruyucu cihazların ne zaman kullanılıp ne zaman kullanılmayacağı belirlenmeli ve risk değerlendirmesi yapılmalıdır. Örnekler ve kültürlerle ilgili bütün işlemler (kültür ekimi, yayma yapma, biyokimyasal testlerde ayıraç eklenmesi, santrifüj kapaklarının açılması) biyogüvenlik kabinlerinde yapılmalıdır. Biyogüvenlik kabini (BGK) dışına çıkarılacak örnekler, nakilden önce mutlaka kapakla kapatılmalıdır. Bankoları ve BGK'nin içini kapsayan tüm çalışma yüzeyleri çalışmaya başlamadan önce ve sonra uygun dezenfektanlarla temizlenmelidir. UV ışınları yüzey dezenfeksiyonu için faydalı ışınlardır. Personel, düzenli olarak Mantoux PPD cilt testi ile taranmalıdır. Cilt testi pozitif çıkanlar radyolojik ve klinik

incelemeye alınmalıdır. Olası aerosol oluşumu ile birlikte olan laboratuvar kazası durumunda personel olabildiğince uzun süre nefesini tutmalı, BGK'nın çalışıyor ve santrifüjlerin kapalı olduğundan emin olmalı ve odanın kapısını kapatarak en az 30 dakika ortamı terk etmelidir. PPD negatif olan personele kazadan 3-6 aydan sonra cilt testi yapılmalıdır. Mikobakterilerin taşınması ve nakledilmesi bazı kurallar ile mümkündür. Korunmanın başarılı olabilmesi için için; sıvı materyalin dışarıya sızmasını önleyecek şekilde paketlenmesi, nakil zincirinde çalışanları paketin zararlı içeriğine karşı uyarmak için paketin sembol ve etiketlerle işaretlenmesi, acil durumda paketin zararlı içeriğini belgeleyen bilgi, çalışanların acil durumlarda materyali tanıyabilmesi için eğitilmesi şarttır.

1.8.2 Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Mikobakterilerin tanımlanmasında birçok farklı tipte klinik örnek kullanılabilir. Bu örneklerin çoğunluğu solunum sistemi (balgam, trakeal ve bronşial aspiratlar, bronkoalveoler lavaj, akciğer biyopsisi vb.) kaynaklıdır. Balgam örnekleri mümkün olduğu kadar çabuk incelenmeli bu mümkün değilse birkaç gün için buzdolabında +4°C'de saklanmalıdır. Bu örnekler buzdolabında en fazla 1 hafta muhafaza edilebilir. Balgam örnekleri için en geçerli olan 3 gün sabah balgamı alınmasıdır. Balgam örneğinin görünümü ve rengi laboratuvar formuna kaydedilmelidir. Tüberküloz basili balgamın cerahatli kısmında bulunur, bu nedenle yayma yapılacağı zaman özellikle balgamın sarı-gri ya da yeşil kısmından örnek alınmalıdır. Balgam örneklerinin alındığı mekanların özel olması ve bu yerlerin UV uygulanabilir olması gerekir. Balgam

çıkartmakta zorlanan yoğun bakım hastaları ve düşük hastalarda indüklenmiş balgam örnekleri alınabilir. Çocuklar balgam verirken zorlanabilirler. Bu yaş grubunda 3 gün (5-10ml) açlık mide sıvısı akciğer tüberkülozunun tanısında genellikle tercih edilen örnektir. Açlık mide sıvısı eğer 4 saat içinde işleme konulmayacaksa laboratuvarında 100 mg sodyum karbonat içeren steril, tek kullanımlık kaplara alınmalıdır. Nötralize edilmeyen örnekler kabul edilmez, çünkü mikobakteriler aside uzun süre dayanamazlar. Balgam çıkaramayan bazı hastalarda enefeksiyonu tanımlamak için bronşial aspiratlar, bronkoalveolar lavaj, akciğer biyopsi örnekleri gibi örnekler kullanılabilir. Akciğer dışı tüberküloz şüphesinde ise idrar, gastrik aspirat ve dokular, biyopsi örnekleri, plevral, perikardiyal, peritoneal sıvılar, BOS ve kemik iliği vb. örnekler alınabilir. Kemik tüberkülozu şüphesinde kemik biyopsisi, gastrointestinal sistem tüberkülozunda bağırsak biyopsisi, cilt tüberkülozunda cilt biyopsi örnekleri kullanılabilir. Peritoneal ve perikardiyal tüberküloz tanısını koyabilmek güçtür, genellikle laparoskopi veya biyopsi gibi invaziv girişimler gerekir. Kan gibi koagüle olma özelliğindeki örnekler (kemik iliği, sinoviyal sıvı, plevral, perikardiyal, peritoneal sıvılar) sülfatlanmış polisakkaritli antikoagülanlı tüplerle taşınırlar. EDTA'lı tüplere alınan örnekler kabul edilmemelidir. Çünkü EDTA mikobakteri üremesini inhibe etmektedir. Biyopsi örnekleri herhangi bir koruyucu veya tespit edici bir ajan içinde gönderilmemeli ve serum fizyolojik veya herhangi bir solüsyon içerisine konulmamalıdır. Kan ve dışkı örnekleri sadece immun sistemi baskılanmış hastalardan gönderilmelidir. Örnekler her zaman steril, sızdırmaz, tek

kullanımlık, uygun şekilde etiketlenmiş, laboratuvar onaylı, fiksatif içermeyen kaplar içinde toplanmalıdır. Mumlu kaplar yanlış ARB yayma sonuçlarına neden olduğundan kullanılmamalıdır. Eğer örneğin laboratuvara nakli 1 saatten fazla gecikirse (kan hariç) +4 dereceye konulmalıdır. Aynı şekilde laboratuvara ulaştıktan sonra işleme alınıncaya kadar buzdolabında tutulmalıdır. Laboratuvara gönderilen idrar örnekleri sabah ilk orta akım idrar örneği olmalı ve steril kaplara alınan örnekler 3 gün peşpeşe incelenmelidir. Sabah ilk idrar örneği en iyi sonucu verir. Kültür için genellikle minimum 40 ml idrar gereklidir. 24 saat biriktirilen veya miktarı az idrar örnekleri kabul edilmez. Orta akım idrarı alınamıyorsa katater kullanılmalıdır. Steril vücut boşluklarından (periton, plevral, perikard, sinovia sıvısı) alınan örnekler aseptik koşullarda toplanmalıdır. Kanlı örneklerin koagülasyonunu önlemek için anti koagulanlar kullanılabilir. BOS, peritoneal diyaliz sıvısı gibi örneklerde çok az sayıda bulunan mikobakterilerin kültürde üremesini ve tanımlanmasını sağlamak için örneklerin miktarının en az 5 ml olması gereklidir. Biyopsi örnekleri mümkünse en az 1 gr doku içermeli, steril kaplar içinde aseptik olarak toplanmalıdır. Tuzlu su veya diğer sıvılara batırılmamalı ve gazlı beze sarılmamalıdır. Biyopsi materyali lezyonun periferinden alınmalı hem 30 °C’de hem de 37 °C’de enkübe edilmelidir. Formalin içinde teslim edilen örnekler yayma ve kültür için kabul edilemez.

Apse içerikli irin aspiratı ya da yara örnekleri aseptik koşullarda mümkün olduğu kadar çok miktarda aspire edilmelidir. Yaygın mikobakteriyal enfeksiyonların çoğunluğu MAC’a bağlıdır bu yüzden eğer bu organizma

kandan izole edilirse her zaman klinik hastalıkla ilişkilidir. Eğer kan örnekleri transport edilecekse antikoagulan olarak sodyum polianetilen sülfat, heparin veya sitrat kullanılabilir. Kanın EDTA'lı tüpe alınması ve pıhtılaşmış kan kabul edilemez. Kanın katı besiyeri üzerine direkt inokülasyonu önerilmez. MAC isalotör santrifüj lizis tüplerinde uzun süre canlı kalabilir. Eğer kan örnekleri laboratuvarında hemen işleme alınmıyorsa oda sıcaklığında saklanmalıdır. Kan sedimentlerinin BACTEC-12B besiyerine inoküle edilmesi kontraendikedir. Çünkü içeriğinde bulunan polipropilen glikol komponenti mikobakteriler için inhibitör etki gösterir. Mikobakteriler üzerine benzer etki Septi-Chek AFB besiyeri ve Mycobacteria Growth Indicator Tuber (MGIT) sıvı besiyeri içinde bildirilmiştir. Yıllardan beri izolatör sistem ve radyometrik BACTEC 13A kan kültür şişeleri yegane güvenilir sistemler olup kan kültürü için idealdir. Son zamanlarda bu besiyerinin yerine MYCO/F LYTIC şişeleri veya MB/BacT ALERT kan besiyerleri kullanılmaktadır (40, 41).

Dışkı örnekleri (>1g), AIDS'li hastaların gastrointestinal sisteminde MAC saptanması için kullanılmaktadır. Direk yaymada ARB pozitif ise bu örneklerin kültürünün yapılması önerilir. Ancak dışkı yaymasının duyarlılığı %32-34 arasında olup aslında kültür kararının verilmesinde etkisi son derece sınırlıdır. Bu nedendir ki MAC tanımlanmasında ARB etkili bir yol değildir. Mikobakteriler için uygun olmayan örneklerin işleme alınması hem personel hem de ekonomik kaynakların kaybı demektir. Bu nedenle çok az miktarda olan örnekler tükürükten oluşan balgam, kurumuş silgeçler, biriktirilmiş balgam veya idrar, kapları kırılmış örnekler, toplama ve işleme alınması

arasındaki süre 7 günün üzerinde olan örnekler uygun olmayan örneklerdir. Bu nedenle çalışanlar uygun olmayan örnekler açısından eğitilmelidir.

1.8.3 Örneklerin İşlenmesi

Normalde steril olan doku örnekleri (BOS, plevra, perikart, periton, sinoviyal sıvılar, kemikiliği, kan) %85'lik tuzlu su veya %02'lik sığır albumini içerisinde ezilerek besi yerine inoküle edilebilirler. Steril vücut boşluklarındaki sıvılarda etken basil sayısı az olduğundan, mikobakteri üreme şansını artırmak için 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmalıdır.

Kontamine örneklerde, mikobakterilerin klinik örneklerden en iyi saptanmaları için bunları dekontaminasyon ajanlarından koruyan maddelerin ve diğer mikrobiyal ajanların ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. En sık kullanılan dekontaminant sodyum hidroksit, aynı zamanda mukolitik etkilidir. Uzun süre alkali ortam diğer bakterileri, mantarları ve mikobakterileri öldürdüğünden NaOH kullanırken dikkatli olunmalıdır. Kuvvetli dekontaminasyon sonucu klinik materyaldeki mikobakterilerin % 20-90 kadarı ölebilir (42). En sık kullanılan likefaksiyon–dekontaminasyon kombinasyonu NaOH–NALC (N-acetyl-L-cysteine)'dir. En yaygın kullanılan sindirme ve dekontaminasyon yöntemi; radyometrik BACTEC 460 TB sistemi ve yeni ticari sıvı besiyerli kültür sistemleriyle uyumlu NALC %2 NaOH yöntemidir (42). Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, laboratuvarındaki işlemler sırasında aerosollerle oluşabilecek kontaminasyonu engellemek için dikkatli olunmalı ve biyo-güvenlik kabinleri kullanılmalıdır.

1.8.4 Mikroskopik İnceleme

Mikroskop ile tüberküloz basillerinin saptanması, tüberküloz hastalığının tanısında en hızlı, en ucuz, en yararlı yöntemdir. Tüberküloz basilinin direkt olarak yaymada saptanabildiği en iyi örnek balgamdır. Mikroskopide ARB'ler yaklaşık olarak 1-10µm uzunluğunda, 0.2-0.6 µm genişliğinde tipik olarak silindir şeklinde kıvrımlı veya eğri çomaklar şeklinde görülür. Birkaç farklı versiyonu olmakla birlikte en çok kullanılan Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemidir. Burada boyanan bakterilere asit-alkol ile renksizleşmedikleri için bunlara ARB (Asido-Resistan Bakteri) denilir. Ülkemizde en yaygın kullanılan ARB yöntemi EZR'dir. Bu yöntemin duyarlılığı, balgamın kalitesine, içerdiği basil sayısına ve uygulanan tekniğin yeterliliğine bağlı olarak değişmektedir (37).

Tüberküloz bakterisi için Gram boyama uygun değildir. Gram boyamada mikobakteriler içi boş hayalet şeklinde veya boncuk şeklinde görülürler. Mikobakterilerin çeperlerinde bulunan yoğun mikolik asit nedeniyle karbon fuksin gibi boyaları özgül olarak tutarlar ve asit-alkol gibi güçlü bir çözücüde dahi boyalarını bırakmazlar. Aside dirençli bakterilerin boyanmasında genellikle iki tip boya tercih edilir.

- 1- Karbon fuksin boyaları : fuksinin karbolik asitle karışımıdır.
 - a. Ziehl-Neelsen yöntemi (sıcak teknik)
 - b. Kinyoun yöntemi (soğuk teknik)

2- Florokrom boya:

- a. Auromine O boyası
- b. Auromine-rhodamin boyası

Bazik fuksin esaslı boyama yönteminde en az 300 alan, florokrom boyama yönteminde ise en az 30 alan incelenmelidir (43,44).

Mikroskopik inceleme sağlıklı ve güvenilir bir sonuç elde edebilmek için sistematik bir şekilde yapılmalıdır. Tarama yaparken yayma alanının bir ucundan diğer ucuna yatay ya da dikey doğrultuda yapılmalıdır. Balgam yaymasında ARB'nin pozitif olabilmesi için örneğin 1ml'sinde 5.000–10.000 basil bulunması gereklidir. Özellikle kaviteli akciğer lezyonları yaklaşık 200 milyon basil içermektedir; bu nedendir ki kaviteli lezyonlarda kolaylıkla pozitif sonuç alınmaktadır. Tüberküloz tedavisi yapan kurumların balgamın direk mikroskopik inceleme sonuçlarına 24 saat içinde erişmeleri ilke olarak kabul edilmelidir. Balgam mikroskobisi pozitif olgular asıl bulaştırıcı olgular olduğu için tüberkülozun kontrolünde önemlidir. Kültür pozitif olgularda mikroskopik tanının duyarlılığı çeşitli faktörlere bağlı olmak üzere %40 ile %80 arasında değişmektedir. Klinik örnek içerisindeki yemek artıkları, boya parçacıkları, lamdaki çizikler, atipik bakteriler veya nokardiyalar, laboratuvar bulaşı gibi nedenlerle yanlış ARB pozitifliği saptanabilir. Diğer yandan yetersiz örnekler, balgam veya boyanmış preparatın iyi korunamaması, okuma hataları, kayıt hataları ve deneyimsiz personel nedeniyle yanlış negatif sonuçlara

rastlanabilir. Laboratuvar personellerinin *rhodococcus*, *nocardia* türleri ve *legionella micdadei* gibi mikobakteri dışı organizmalar ile *cryptosporidium* kistlerinin ve *isospora*, *cyclospora* ve *microsporidium* sporlarının değişik derecelerde Asido-Rezistan boyama özelliği gösterdiklerinin farkında olmaları gerekir. Son çalışmalara göre kinyoun'un karbol fuksin yöntemi, hem Ziehl Neelsen ve hem de florokrom yönteminden daha üstün değildir (45).

ARB'in görülmediği tüm yaymalar, aside dirençli basil görülmedi, ARB tespit edilen yaymalar ise, aside dirençli basil görüldü şeklinde rapor edilmeli ve 24 saat içerisinde sonuç klinisyene bildirilmelidir.

1.8.5 Kültür

Klinik örneklerde bulunan çok az sayıdaki (10-100/ml) basilleri saptamak için kültür yaymadan daha etkilidir. Mikobakterilerin üremesi için selektif (diğer bakteri ve mantarların üremesini inhibe eden) ve selektif olmayan sıvı, katı besiyerleri mevcuttur. Katı besiyerleri, yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri diye ikiye ayrılırlar. Yumurta bazlı besiyerleri; tam yumurta yada yumurta sarısı, patetes, gliserol, malaşit yeşili ve tuzların karışımından oluşmakta, günümüzde en bilinenleri Löwenstein Jensen (LJ) besiyeridir. Bu besiyerleri, mikobakterilerin üremesini zorlaştıran maddelerin etkisini bloke eden iyi bir tampon özelliğine ve uzun süreli (buzdolabında birkaç ay) raf ömrüne sahiptir. LJ besiyeri tüberkülozu tanımlamada yeterli olmakla birlikte, diğer mikobakterileri tanımlamada yetersiz kalmaktadır. LJ besiyerinde,

M.tuberculosis'in tipik koloni oluşturması nedeniyle ilk izolasyon çalışmalarında tercih edilmektedir (şekil1). *M.bovis* türü için gliserinsiz LJ besiyeri tercih edilmektedir. Agar bazlı besiyerleri, kimyasal olarak daha iyi tanımlanmışlar ve seffaftırlar, dolayısıyla kolonilerin inokulum akrefatlarından ayırt edilmesini, erken üreyen kolonilerin saptanmasına olanak sağlarlar. Koloniler yumurta bazlı besiyerinde 18-24 günde, bunlarda ise 10-12 günde görünür hale gelirler. Agar bazlı besiyerlerinden en sık kullanılanı Middlebrook 7H10 ve 7H11' dir. Bu besiyerleri kontaminantların üremesini bloke eder, ancak hazırlanmaları pahalı olmakta ve raf ömürlerinin (buzdolabında bir ay) kısa olması nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır (42). Middlebrook besiyeri MAC'ın üremesini hızlandıran %2 oranında gliserol içerir. *M.bovis*'den şüpheleniliyorsa %02'lik pirüvik asit eklenmesi faydalıdır (46). Middlebrook 7H9 ve Dubos Tween besiyerleri primer izolasyon, stok suşların alt kültürlerinin yapılması, ilaç duyarlılık testleri ve diğer deneylerde kullanılır.

Seçici besiyerleri, genellikle yumurta bazlı yada agar bazlı bir besiyeriyle birlikte kullanılmalıdır. Yumurta bazlı olanlara penisilin, siklohegzimid, nalidiksik asit ve linkomisin eklenerek, agar bazlı olanlara ise karbenisillin, polimiksin B, trimetoprim laktat, amfoterisinB eklenerek seçici besiyerleri elde edilir.

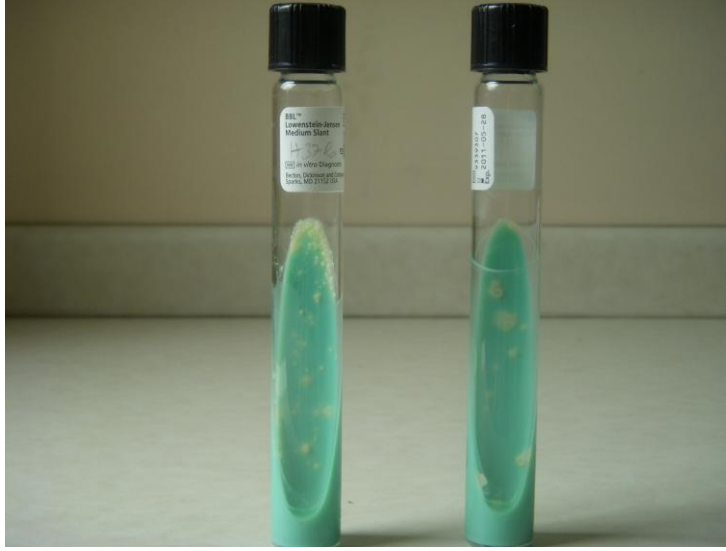
Bifazik besiyerleri, septi-check AFB (BD Biosciences, Sparks MD); zenginleştirilmiş (%25) CO₂'li ortamda 20 ml modifiye 7H9 sıvı besiyeri içeren, kapaklı bir şişeden oluşan mikobakteriyel kültür sistemidir. Tüp içine yerleştirilmiş çikolata agar, Middlebrook 7H11 agar ve modifiye L-J besiyeri

gibi üç farklı katı besiyerini içermektedir. İnokülasyondan önce kültür şişesine glikoz, pridoksal HCL, katalaz, bovin albümün, oleik asit (OADC) ve antibiyotikler PANTA (polimixinB, amfoterisinB, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin) içeren suplement eklenir. İnkübasyon süresi esnasında katı besi yerlerine inokülasyon için zaman zaman şişelere dokunulması gerekir. Bu besiyerinde üreme süresi radyometrik yöntemlere göre uzun olmasına rağmen klasik besiyerlerinden daha kısadır.

Sıvı besiyerleri hem mikobakterilerin primer izolasyonu hem de alt kültürlerinin yapılması için kullanılabilir. Sıvı bazlı kültürler, katı kültür ortamına göre daha hızlı sonuç verirler ve izolasyon oranları daha yüksektir. Bu besiyerlerinde ortama eklenen Tween 80 eklenmesi mikobakteri kümelerinin homojen dağılmasını sağlar. Günümüzde ticari olarak kullanılan MGIT (BD) ve MB Redox gibi basit şişe ve tüplerden oluşan sistemler yanında yarı otomatize sistemler (BACTEC 460 TB system, BD) ve tam otomatize sistemler (BACTEC 9000 MB ve BACTEC MGIT 960, ESP Culture System II ve MB/BacT ALERT 3D System gibi) geliştirilmiştir (59,60).

Hızlı, otomatize kültür yöntemlerine MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sistemi, BACTEC 9000 MB sistemi, MB/ BACT Myco ESP2 sistemleri örnek gösterilebilir. MGIT sisteminde radyoaktif madde kullanılmaması, tüm işlemlerin otomatik yapılmış olması, tiplendirme ve duyarlık testlerine olanak sağlaması avantajdır. BACTEC 460 TB sistemi DSÖ tarafından altın standart olarak kabul edilmiş yarı otomatize bir sistemdir. Bu yöntemle mikobakterilerin

primer izolasyonu, *M.tuberculosis* complex ve tüberküloz cinsi bakterilerin ayrımı, anti tüberküloz ilaçlara duyarlılık saptanması yapılmaktadır (3).



Resim 1: Lowenstein Jensen besiyerinde üreyen *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Rifampisine duyarlı) ve H37Rv (Rifampisine dirençli) referans suşlarının görünümü

1.9 Mikobakterilerin Tanımlanması

1.9.1 Fenotipik Testler

Mikobakteriler tür düzeyinde tanımlanmalıdır. Mikobakterilerin bir çok özelliğinin belirlenmesinde üreme hızları ve pigmentasyon özellikleri yol göstericidir. Mikobakterilerin tanımlanmasında geleneksel yöntemler yanında, mikolik asit analizleri, nükleik asit problemleri kullanılarak genetik araştırma ve nükleik asit dizi analizi yapılmalıdır. Tüberküloz hastalığının yaygınlığı ve enfektivitesi göz önüne alındığında, *M. tuberculosis complexin* hızlı, doğru tanımlanması önem arz etmektedir.

Mikobakterilerin tür tanımlanmasında; koloni morfolojileri, boyanma özellikleri ve biyokimyasal reaksiyonlar önemli bir yer tutar (47).

Üreme Hızı ve Pigment Üretimi

Üreme hızı, katı besiyerinde büyütme olmaksızın çıplak gözle görülebilen koloniler oluşması için gereken süreye denir. Yedi gün içerisinde gözle görülebilen koloni oluşturan mikobakterilere hızlı üreyenler, daha uzun sürede üreyenlere yavaş üreyen mikobakteriler denilir. 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması ile de hızlı üreyenler yavaş üreyenlerden ayrılır. Kültürler 30-37C°'de izlendiğinde, ısıyla ilgili üreme özellikleri belirlenebilir.

Mikobakteriler pigment üretmelerine göre üç grupta sınıflandırılır. Bunlardan fotokromojen mikobakteriler; karanlıkta üretildiğinde pigmentsiz, ışıklı ortamda üretildiğinde pigmenli koloni üretirler. Skotokromojen mikobakteriler ışıklı veya karanlık ortamda üretildiğinde sarı portakal renginde koloni oluştururlar. Non-kromojen mikobakteriler, ışıkta ve karanlıkta pigment yapmazlar ya da soluk sarı renkte pigment üretirler. Pigment üretimi için testler taze kültürlerden izole edilen kolonilerden yapılmalıdır. Işıktaki pigment oluşturma özelliği, oksijen ve sıcaklık parametreleri ile ilişkili bulunmuştur (48).

Arilsülfataz

Alkali ilave edildiği zaman kırmızı renge dönüşerek, kolaylıkla saptanabilen serbest fenolftalein oluşturan tripotasyum fenolftalein disülfatın aromatik halka ve sülfat grubu arasındaki bağı hidrolize eder. Arilsülfataz aktivitesi uzun süreli inkübasyondan sonra bütün mikobakterilerde saptanabilir. Ancak üç günlük inkübasyondan sonra yapıldığında *M. celatum* ve *M. xenopi* gibi yavaş üreyen mikobakterinin tanınmasında önemlidir.

Katalaz

Enzim varlığı kültüre H₂O₂ ilave edildikten sonra reaksiyon karışımı sonucu oluşan hava kabarcığının yüksekliğinin semikantitatif ölçümüne dayanan bir testtir. Niasin testi yapılamıyorsa *M. tuberculosis*'i diğer mikobakterilerden ayırmak için kullanılabilir.

Niasin Akümülayon Testi

Niasin (Nikotirik asit) NAD ve NADP koenzimlerinin biyosentezinde prekürsör olarak işlev görür. Bütün mikobakteriler nikotirik asit üretmelerine rağmen niasin birikimi siyonojen halidin kültür ortamına eklenmesiyle tespit edilir. *M. tuberculosis*'de nadiren negatiftir. *M. tuberculosis* tanımlanmasında niasin testi yanında katalaz testi mutlaka yapılmalıdır. Niasin testi kimyasal solüsyonlarla yapılabileceği gibi ticari kağıt striplerle de yapılabilir.

Nitrat Redüksiyonu

Mikrobakterilerin nitratları nitritlere indirgeme kabiliyetleri kantitatif olarak farklıdır. Besiyerinde bulunan nitritin üzerine sülfanilamid ve N-naphthylendyamine ilavesi sonucu pembe renk oluşması pozitifliği gösterir.

Pirazinamidaz

Bu enzim prazinamidi (PZA), pirazinoik asit ve amonyağa hidrolize eder. Bu test *M. marinum*'u *M. kansasii*'den ve *M. bovis*'i *M. tuberculosis*'ten ayırt etmede faydalıdır. Pirazinamidaz negatif *M. tuberculosis* izolatları PZA'ya dirençli kabul edilir.

Sodyum Klorür Toleransı

İçinde %5 NaCl içeren veya tuz bulunmayan LJ besiyerinde 30 veya 35C° de üreyebilen sadece *M. triviale* *M. abscesus* ve *M. fortuitum* için ayırt edici özelliktir.

Thiophene-2-Carboxylic Acid Hydrazide (T2H) ile Üremenin İnhibe Edilmesi

Bu test niasin pozitif *M. bovis*'i, *M. tuberculosis* ve diğer non-kromojenik yavaş üreyen bakterilerden ayırmak için kullanılır. *M. bovis* izolatları T2H'a duyarlı iken *M. tuberculosis* ve diğer non-kromojenik yavaş üreyen bakterilerin çoğu dirençlidir.

Tellürit Redüksiyonu

Tellürit redüksiyonu testi diğer non kromojenik mikobakterilerden *M. avium* ve *M. intracellulare*'yi ayırmak için kullanılır. Bazı hızlı üreyen bakterilerde pozitif sonuç gösterebilir (44).

Tween 80 Hidrolizi

Bazı mikobakteri türleri tarafında üretilen lipazlar, polyoxyethylene sorbitan monooleate (tween 80) deterjanı hidrolize ederler. Bu test yavaş üreyen NTM türleri arasındaki ayırım için kullanılır (44).

Üreaz Testi

Üreyi, amonyak ve CO₂'ye çevirme özelliği skotokromojen ve nankromojenlerin tanımlanmasında faydalıdır. *M. scrofulaceum* üreaz pozitifken *M. avium* ve *M. intracellulare* üreaz negatiftir. Üreaz testi özellikle pigment yapan *M. avium* suşlarının tanınmasında yardımcıdır. *M. gordonae* üreaz negatiftir. Bu testte besiyerinin pembe ve kırmızı renge dönüşümü pozitif olarak kabul edilir (44) .

NAP Testi (Nitro- α -Acetylamino- β -Hydroxypropriophenone) Deneyi

Radyometrik BACTEC yöntemine adapte edilmeye çalışılmıştır (44). Bu testte kullanılan p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksipropio-fenon'un mikobakterilerin gelişimi üzerine inhibitör etkisi vardır. Bu madde *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin gelişimini etkilemez veya çok az etkilerken, *M. tuberculosis*'in

gelişimini seçici olarak inhibe eder. NAP testi *M.tuberculosis kompleksini* diğer mikobakterilerden ayırabilir. Ancak mutlaka diğer testlerle desteklenmesi gerekir.

Mikolik Asit Analizleri

Mikolik asit analizleri yeni mikobakteri türlerinin tanımlanmasında önemlidir. Mikolik asitler mikobakteriyel hücre duvarının lipit içeriğinin önemli bir komponentidir. Hücre duvarının mikolik asit yapısı türler arasında değişiklik gösterir. Mikolik asit türleri, barındırdığı karbon atomu sayısı ve farklı fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak değişir. Mikolik asit esterlerinin High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC)'si çoğu mikobakteri türlerinin tanımlanmasında hızlı ve uygun yöntemdir. Ayrıca Thin-layer chromatography (TLC) ve gas-liquid chromatography (GLC) yöntemleriyle de farklı türdeki mikobakteriler arasındaki mikolik asit yapıları tanımlanabilir (49).

Demir tutulumu

Yalnızca *M. fortuitun* ve *M. phlei* gibi hızlı üreyen türlerde demir uptake'i olumludur. Koloni renginin paslı kahverengi veya sarımsı kahverengi olması pozitif olarak kabul edilir.

1.9.2 Genotipik Testler

Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yaklaşım, klinik örneklerden doğrudan hazırlanan materyallerin ARB boyamasından sonra direk olarak mikroskopik incelenmesi veya sıvı-katı besiyerlerinde ekimde üreyen basillerin tanımlanması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemlerden ARB boyama hızlı, ucuz, pratik bir tanı yöntemi olmasına rağmen duyarlılığı azdır. Diğer bir klasik yöntem olan kültür yöntemi altın standart kabul edilmesine rağmen bu yöntemde basilin üreme süresinin 4-8 haftalık uzun bir periyot gerektirmesi nedeniyle; tanı için daha duyarlı, spesifik, güvenilir ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi gereği duyulmuştur (1). 1980'li yılların ortalarında Kary. B. Mullis tarafından geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği bilim çevrelerinde bir devrim olarak kabul edilmiştir. PZR daha sonraki yıllarda modifiye edilerek nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde seçilmiş bir gen bölgesinin dış ortamda kısa süre çoğaltılması ve görüntülenmesi işlemleri yapılmaktadır. PZR metodunun mikrobiyolojide kullanım gerekçeleri belirtilirken özellikle geç ve güç üreyen etkenlerin tanımlanmasında kullanım hedeflenmiştir. Bu özellik dikkate alındığında Mycobacterium genusunda bulunan *M.tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*) ve *M.tuberculosis* dışı bakteriler (MOTT) aklı gelmektedir. Günümüzde klinik örneklerden direkt olarak *M.tuberculosis* varlığınının gösterilmesi ve kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanması, tüberküloz ilaçlarına duyarlılıklarının araştırılması,

ilaça dirençli olguların tespiti, dirençle ilgili mutasyonların saptanması amacıyla NAA ve prob hybridizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (1).

M.tuberculosis H37Rv'nin tam bir genom dizini 4,411,529 bp'den oluşur ve yaklaşık olarak 4000 gen bulunur. *M.tuberculosis*, nokta mutasyondan çok "insertion sequence" hareketinin sebep olduğu değişken genomu ile mükemmel bir klonal populasyon yapısına sahiptir (30,31,32). NAA esaslı en eski ve en bilinen yöntem PZR tekniğidir. Günümüzde farklı amaçlar için geliştirilen çeşitli modifiye yöntemlere rağmen hala en çok kullanılan PZR yöntemi in-house PZR tekniğidir. In-house PZR tekniği hasta örneklerinden direkt olarak *M. tuberculosis'in* tanısı için pek çok laboratuvarında uygulanmaktadır. Bu metodun kültür metodlarına kıyasla kısa sürede sonuç vermesi ve maliyetinin ucuz olması gibi avantajları vardır. Ancak protokollerde kullanılan kimyasalların tam bir standartizasyonunun bulunmaması nedeniyle yanlış negatiflikler, kontaminasyona fazla açık olması nedeniyle yanlış pozitiflikler dezavantajlarıdır. Ayrıca bu metodların uygulanması için çalışacak teknik elemanların çok iyi yetiştirilmiş olması ve çalışırken çok dikkatli çalışmaları gerekmektedir. Çoğunluğu geleneksel PZR'dan modifiye edilerek geliştirilen gerek DNA'yı gerekse RNA'yı hedef alan NAA ve prob hybridizasyon yöntemlerinin sayısı hızla artmaktadır. Günümüzde tüberküloz dahil pek çok etkenin teşhisinde kullanım alanı bulmakta ve ticari otomatize sistemler geliştirilmektedir. *M.tuberculosis complex* tanımlanmasında en sık kullanılan hedef bölge IS 6110 DNA dizisi veya rRNA'nın çoğaltılmasıdır. PZR

teknolojilerinin mikobakterilerde esas kullanım amacı dirençli *M.tuberculosis* bakterilerinin hızlı tanımlanmasıdır (1)

PZR ile rpoB (RNA polimarese subunit B) geninde saptanan mutasyonlar rifampisin direncini gösterir. Rifampisine dirençli izolatların %90'ı aynı zamanda INH'e de dirençli olduğundan rifampisin direncinin belirlenmesi, ÇİD-TB olgularının erken tanınmasını sağlar. Bu metodların tüberküloz tanısındaki üstünlükleri özellikle kültür bazlı metodların tanıda yetersiz kaldığı ekstra pulmoner tüberküloz olgularında ortaya çıkmaktadır.

Moleküler yöntemlerden PZR; ters transkriptaz (Reverse transcriptase) PZR, ligaz zincir reaksiyonu (LCR), strand displacement amplifikasyon (SDA) yöntemleri gibi tekniklerden oluşmaktadır. *M.tuberculosis* genomunda birçok kopyası bulunan IS 6110 ve hsp65 geni, bu yöntemlerle amplifiye edilen başlıca genlerdir. Bu yöntemler baz alındığında çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir. Bunlar arasında Amplified MTD (Gen Probe- San Diego, CA, USA) ve Amplicor MTB'yle (Roche Molecular Systems,Basel,Switzerland) 16S ribozomal RNA; BD Probe Tec ET'yle (Becton Dickonson, Sparks, MD) ise IS6110 geni amplifiye edilmektedir. Amplifikasyon esaslı yöntemlerin duyarlılıkları özgüllüklerine göre daha düşüktür. Bunun nedeni klinik örnekte basilin homojen dağılmaması, nükleik asit ekstraksiyonunun yeterli olmaması ya da ortamda amplifikasyonu önleyici bir faktörün bulunmasıdır. Özgüllüklerini etkileyen ve yalancı pozitifliğe yol açan esas faktör ise klinik örneğin kontaminasyonudur.

Son yıllarda *M.tuberculosis kompleks* üyelerinin tanımlanmasında ve ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde birçok yöntem rutin tanı laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu testler arasında PZR esaslı restriksiyon enzim analizi (PRA), DNA prob ve DNA dizi analizi yöntemleri sayılabilir. 16S ribozomal DNA'nın farklılık gösteren bölgesini tanıyan AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA , USA), 16S ve 23S ribozomal RNA'ları arasındaki türe özgü fragmanları tanıyan Line prob yöntemleri (INNO-LiPA Mycobacteria-Innogenetics,Ghent,Belgium) ticari olarak geliştirilmiş hibridizasyon esaslı DNA prob yöntemlerinin örnekleridir. DNA dizi analizi, katı faz hibridizasyon, gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) ve mikroarray yöntemi; *M.tuberculosis'de* ilaç direncinin saptanmasında kullanılan moleküler esaslı yöntemlerden önde gelenleridir (3). Katı faz hibridizasyon esaslı testlerden 'Line Probe Assay' (INNO-LiPA Rif TB Assay-Innogenetics, Ghent, Belgium), *M.tuberculosis*'in *rpoB* geninin en sıklıkla mutasyon görülen bölgelerine karşı geliştirilmiş probları sayesinde kısa sürede rifampin direncinin saptanmasına imkan veren ticari bir kittir. Çoğunluğu geleneksel PZR'dan modifiye edilen, gerek DNA'yı gerekse RNA'yı hedef alan NAA ve prob-hibridizasyon yöntemleri hızla kullanıma girmektedir.

1.9.2.1 Gerçek Zamanlı PZR (Real- time PCR)

Gerçek zamanlı PZR tekniği amplifikasyon anında ürün oluşumunun izlenmesi ve kalıp DNA miktarının tahmini temeline dayanmaktadır. Bu sistemde fluorescent deteksiyon kimyasallar, amplifikasyon sinyal değişimlerini algılayan ve monitörleyen, bilgisayar programlarıyla destekli sistemler geliştirilmiştir. Günümüzde Gerçek zamanlı PZR'da; TaqMan prob sistemi, SYBR Green prob sistemi ve beacon prob sistemi kullanılmaktadır. Mevcut gerçek zamanlı PZR, tür ayırımında, nükleotit polimorfizimlerinin saptanmasında ve tedavi esnasında etken yükünün belirlenmesinde yeterli olmaktadır. Mikobakteri türleri için günümüzde kullanılan gerçek zamanlı PZR esaslı ticari sistemler bulunmaktadır. Roche Diagnostic Systems tarafından geliştirilen LightCycler, BIO-RAD firmasının ürünü iCycler, Applied Biosystems tarafından geliştirilen ABI Prism 7700 Detection system ve Abott diagnostik tarafından modifiye edilen ABI Prism 7000 sistemleri gerçek zamanlı PZR esaslı sistemlere örnektirler. Bu sistemler çoğunlukla bakterinin, 16S rRNA bölgesini kodlayan gen bölgesi (rDNA) veya IS 6110 gen bölgesini hedef alır. Sonuçta floresan ışımaların ölçülmesiyle tanıya yardımcı olunur.

Bu sistemlerin üstünlükleri olarak, PZR sonrasında elektroforeze gereksinim duyulmaması, kapalı sistem olduğundan kontaminasyon riskinin düşük olması, PZR'da kullanılacak karışımların hazır olması, duyarlılık ve özgülüğünün yüksek olması, çok kısa (1-3 saat) sürede sonuç vermesi sayılabilir (1).

1.9.2.2 Ligaz Zincir Reaksiyonu (Ligase chain reaction ; LCR)

NAA esaslı bir PZR tekniğidir. Görüntülemeye prob kullanıldığından prob hibridizasyon olarak adlandırılır. Bu teknikte; ısıya dayanıklı DNA ligaz enzimi, iki ileri primer ve bunların komplementeri iki primer olmak üzere toplam dört primer kullanılır. DNA Ligaz enzimi yüksek seviyede spesifik olduğundan, yanlış baz eşleşmelerine imkan vermezler. Teknik olarak klasik PZR'a göre daha özgül yaklaşımdır.

Ticari olarak LCR bazlı sistemlerden biri; LCx MTB Assay (Abbott Lab. USA)'dır. Bu test *M. tuberculosis*'nin *protein antijen b* genini kodlayan yarı otomatize bir sistemdir. Bu sistemin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça tatminkar düzeydedir. Klinik örneklerde %70-90, kültürlerde %85-99, pozitif mikroskopi örneklerinde %90-100 oranında duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (1).

1.9.2.3 Self-sustained sequence-replication (3SR)

Genellikle PZR ve NAA esaslı tekniklerin çoğunda hedef bölge DNA'dır. DNA'nın laboratuvar şartlarında stabil olması nedeniyle, sürekli laboratuvar kaynaklı bulaşa neden olmaktadır. Self-sustained sequence-replication (3SR); transkripsiyon esaslı bir NAA yöntemidir. Bu teknik, hasta serumlarında HIV'in (insan immün yetmezlik virusu) tanısı ve virüs yükünü tanımlamada oldukça faydalı olmuştur. Bu teknik üç tane enzimin aktivitesine bağlıdır. Bu enzimler; retro virus kökenli revers transkriptase, faj kökenli T7 RNA Polimeraz ve bakteri kökenli ribonükleaz H enzimleridir.

- 1) T7 promotoruna sahip primer, kalıp RNA'nın 3' ucuna tutunması
- 2) RT enzimiyle cDNA oluşması
- 3) RNAase H aktivitesiyle RNA-cDNA hibridindeki RNA'ların kesilmesi
- 4) İkinci primerlerin cDNA'nın 5' ucuna bağlanması
- 5) T7 RNA polimeraz aktivitesiyle, cDNA'dan transkripsiyonla RNA sentezlenmesi
- 6) Yeni sentezlenen RNA'larla, RNA sentezi sürekli devam eder. Bu tekniğin en önemli avantajı, izometrik sabit ısıda (41°C) reaksiyonun gerçekleşmesi, PZR'a göre daha kısa sürede sonuç vermesi ve duyarlılığının standart RT PZR'a göre yüksek olmasıdır (1).

1.9.2.4 Transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA)

Bu metot, transkripsiyon esaslı NAA yöntemidir ve izometrik ısıda, bir saat gibi kısa sürede RNA ve DNA hedeflerini bir milyon kat çoğaltabilmektedir. Burada RT ve RNA polimeraz enzimleri kullanılmaktadır. Bu metottaki aşamalar 3SR yöntemindekiyle benzerdir. En son aşamada ürünler prob teknolojisiyle gösterilir. Transkripsiyon esaslı yöntemlerin PZR yöntemine üstünlüğü amplifikasyon problemlerinin oluşmasıdır. Oluşan RNA laboratuvar ortamında DNA'ya göre daha stabil olduğundan kontaminasyon zinciri kırılır. Reaksiyon sonrası oluşan ürün miktarı çok yüksek olduğundan, duyarlılığı oldukça yüksektir (1).

1.9.2.5 Zincir Ayrıştırma Çoğaltma (Strand displacement amplification; SDA)

SDA tekniği ekzonükleaz aktivitesi yetersiz DNA polimeraz, fosforothiotanıtma bölgesine sahip restrüksiyon endonükleaz ve iki farklı primer aktivitesi ile gerçekleşir. İlk iki primer PZR'daki gibi ileri ve geri primerleri şeklinde ancak restrüksiyon enzim tanıtma bölgesine sahiptir. İkinci primerler, birinci primerlerin açtığı restrüksiyon enzim tanıtma bölgesine hızla bağlanırlar. Hedef DNA'nın denatürasyonu sonrası ileri ve geri primerlerle hemifosforothiolanmış DNA hibridini oluştururlar. Sentezlenen ipler ayrıştırılır ve yeni sentezlenecek DNA için kalıp oluşturur. SDA esaslı geliştirilen, ilmik aracılığıyla çoğaltma (loop-mediated isothermal amplification; LAMP) yöntemi tanıtı umut vaat etmektedir. Bu metotda iç ve dış primerler kullanılır ve reaksiyonun olması için dört primerin aynı anda bağlanması gerekir. LAMP duyarlılığı bu nedendir ki standart PZR'a göre yüksektir. Reaksiyon sonunda oluşan magnezyum pirofosfat sayesinde DNA artışı enzimatik ya da spektrofotometrik olarak belirlenip, kantitatif sonuç verilebilir.

SDA esaslı ticari sistemlerden biri, BD probe Tec ET (Becton Dickinson Biosciences)'dir. Bu sistem floresan deteksiyon sistemiyle birleştirilmiştir ve *M.tuberculosis complex'in* IS6110 geni ile 16S rRNA geni (rDNA) birlikte çoğaltılır. Bu yöntemle çalışılan solunum yolu örneklerinde duyarlılık (%88-100), özgüllük (%85-100) arasında bulunmuştur (1).

1.9.2.6 Prob Hibridizasyon ve Sinyal Amplifikasyon Teknikleri

Bu yöntemlerde problemlerin sinyalle işaretli olması ve sinyallerin ölçümüyle değerlendirme yapılması nedeniyle sinyal amplifikasyon yöntemleri denilir. Genel olarak bu sistemde iki prob sistemi kullanılır ve birinci prob hedef nükleotide bağlanırken, sinyal taşıyan ikinci prob; birinci proba bağlanır. Bağlanma anında ışınma gerçekleşir, sinyal oluşur ve oluşan sinyaller ölçülerek sonuçlar değerlendirilir. Bu sistemlerin modifiye edilmiş şekilleri mevcuttur. ELISA testine benzeyen modifiye hali branched DNA (bDNA) yöntemidir. Burada hedef DNA'ya spesifik problemlerin olduğu ortama hedef DNA eklenir, spesifik problemlerle DNA hibridize edilir. Ortama bDNA'lar, uygun problemler eklenerek, bDNA'nın problemlere ve alkalen fosfataza bağlanması sağlanır. En son olarak ortama alkalen fosfatazla reaksiyona giren ve renk oluşumuna neden olan kromojen madde eklenir. Bu yöntem sıklıkla virolojide (özellikle HIV-HBV-HCV) hastaların viral yükünü belirlemede kullanılmaktadır (1).

Diğer bir Prob Hibridizasyon ve Sinyal Amplifikasyon tekniği ise, hibrit yakalama (hybrid capture) yöntemidir ve bir çok yönden ELISA'a benzer. Bu teknikte prob olarak hedef bölgeye spesifik RNA'lar kullanılır ve elde edilen DNA-RNA'lar katı fazdaki antikor ortamına aktarılır, son olarak kromojen madde eklenir. Sonuçta renkli ürünlerin miktarı ölçülerek sonuçlar değerlendirilir. Yakın zamanda geliştirilen yeni hibridizasyon tekniği de peptide nucleic acid in situ hybridization (PNA-FISH) 'dur. Bu teknikte *M.tuberculosis complex*'in 16S RNA'larını hedef alan floresansla işaretli peptid

nükleik asit probları kullanılır. Klinik örneklerden tür tanımlanması ve ayrımı yapılabilmektedir.

Nükleotid çoğaltılması yapılmaksızın sadece prob tekniği kullanılarak kültür örneklerinden bakteriler izole edilebilir ancak bunların direk klinik örneklerde duyarlılıkları düşük seviyededir (The Accu Probe System; Gen-Probe, San Diego California).

NAA' u ile birlikte sinyal amplifikasyon ve prob esaslı ticari sistemlere örnek olarak Cobas Amplicor MTB ve Line Probe Assay verilebilir. Bu sistemlerde özellikle bakterinin 16S yada 23S RNA gen bölgesine özgül ve biotinle de işaretli primerler kullanılarak amplifikasyon sağlanır. Oluşan ürünler *M.tuberculosis*' in spesifik proplarının bağlı olduğu manyetik parçacıklarla yakalanır. Bu sistemde görüntülemeye yardımcı olarak avidin ve kromojen kullanılır ve sonuçlar fotometrik olarak değerlendirilir. Bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü klinik örnekleri tipine göre değişir. Solunum yolları örneklerinde duyarlılık %60-86, özgüllük ise %90-98 civarındadır (1).

1.9.2.7 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, mikobakterilerin yavaş ve uzun sürede üremeleri nedeniyle bu bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında, ilaç dirençlerinin saptanmasında ve salgın hastalıklarda tip tayininde büyük fayda sağlar. Bu yöntemde bakterilerin korunmuş gen bölgelerine uygun primerler kullanılarak analiz gerçekleştirilir. DNA dizi analizi dört aşamadan oluşur. Bu aşamalar,

- 1) Klinik materyallerden ve kültür örneklerinden nükleik asit (DNA; RNA) izolasyonu
- 2) Elde edilen nükleik asitlerin çoğaltılması (amplifiye edilmesi)
- 3) Ürünlerin işaretlenmesi, elektroforetik olarak ayrıştırılması ve lazer yardımıyla okunması
- 4) Okunan bilginin bilgisayar yardımıyla kaydedilerek anlamlı DNA dizilerine dönüştürülmesi ve elde edilen nükleik asit dizilerinin daha sonra uluslararası gen bankalarındaki dizilerle kıyaslanarak sonuçların değerlendirilmesi şeklindedir.

DNA dizi analizi yönteminde sıklıkla Sanger'in zincir sonlandırma tekniği kullanılmakta olup, bu teknikte DNA sentezi anında ortamdaki dideoksinükleotit trifosfat'ın (ddNTP) diziyeye eklenerek diziyi sonlandırması esasına dayanır. Çeşitli korunmuş genlerin polimorfizmi 32 kDa proteinini kodlayan gen, süperoksit dismutazı kodlayan *sod* geni, DNA giraz subunit B'yi kodlayan *gyrB* geni, RNA polimerazı kodlayan *rpoB* geni, "internal transcribed spacer" 16S-23S dizisi ve stoplazmik membrandaki protein salgılayan bölgeyi kodlayan *secA1* geni gibi genler araştırılmıştır. Mikobakterilerin tanımlanmasında dizi analizi için en sık kullanılan gen bölgeleri, 16S rRNA, hsp65, *gyrB*, *rpoB*, *secA* ve internal transcribed spacer (ITS)'dir.

16SrRNA gen dizilerinin ayrımı ve dizi analizi için yapılacak işlemler mükemmel seviyede tanımlanmıştır. Kontaminasyonu azaltmak ve özgüllüğü artırmak için mikobakterilere spesifik primerler dizayn edilmiştir. Bu amaçla

16S rRNA gen dizisini içine alan 1030 bç'lik bir bölgeyi kapsayan 285 ve 264 primerleri amplifikasyonda kullanılır.16S rRNA genleri tüm genomun sınırlı korunmuş bölgesini yansıtır ve belirtecin moleküler saati oldukça yavaştır. En son ayrılan türler bu yüzden birbirlerine oldukça benzer 16S rRNA gen dizisi içerirler. Rutin ayırmda suşlar, örnek suş dizileriyle karşılaştırılarak 16S rRNA hypervariable A bölgesine göre tanımlanmalıdır.

Hsp65 geninin bir bölümünün dizi analizinde 441bç'lik bir bölgenin (396-836 arası nükleotit) amplifikasyonu için TB11 ve TB12 primerleri kullanılmaktadır (1).

1.9.2.8 DNA Microarray

Bu metod küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunması ve DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan gen çip teknolojisidir. Bu yöntem birçok yönüyle dot-blot hibridizasyon yöntemine benzerlik gösterir. Bu testte işaretli ürünler farklı oligonükleotid prob içeren dar bir alanda spesifik problemlerle hybridize edilir. İşaretli sinyaller gerçek zamanlı PZR'daki gibi miktar ölçülerek değerlendirilir. Fazla sayıda probun elde edilmesi mikroorganizmaların genetik dizilimlerinin hızla ortaya konması ve bunların gen bankasına sunulmasına paralel olarak tanıda kullanımları artmaktadır. Bu metod klinik örneklerde *M.tuberculosis* türlerinin tanısında kullanılmakla birlikte daha çok ilaç direncinin belirlenmesinde tercih edilmektedir.

M.tuberculosis genomu için ticari olarak üretilmiş (operon/Qiagen) nükleik asit setlerini içeren birçok mikroarray çipleri bulunmaktadır (1).

1.9.3 Serolojik Tanı

Serolojik testler, basit, ucuz, karmaşık ekipman gerektirmeyen, ekonomik, her laboratuvarında uygulanması uygun testlerdir. Bu testler yeterince solunum yolları örneği veremeyen, direkt mikroskopileri negatif olan hastalarda ve klinik örnek vermeleri zor olan çocuklarda tüberküloz tanısında faydalı olabilir. En yaygın kullanılan serolojik testler; *M.tuberculosis*'e karşı oluşan humoral yada T hücre temelli hücresel immun yanıtın ve serum dışındaki örneklerde lipoarabinomannan (LAM) antijenlerin saptanması esasına dayanır. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), immunokromatografik testler günümüzde en sık kullanılan serolojik testlerdir.

1.9.3.1 Mikobakteri Antijenleri

Mikobakterilerin hücre duvarında glikolipid yapısında antijenler bulunmaktadır. Bu glikolipidler ;

- 1- **PGL** antijen (phenol glycolipit veya triglycosyl phenolphthiocerol dimycocerosate)
- 2- **DAT** (2,3 – diacyltrehalose)
- 3- **TAT** (2,3,6 – triacyltrehalose)

4- **CF** (cord factor veya trehalose-6,6'-dimycolate)

5- **SL-I** (2,3,6,6'-tetraacyl trehalose 2'-sulphate)

Hücre duvarında bulunan antijenler dışında hücre dışına salınan A38 ve A30 gibi sitoplazmada bulunan antijenler de tespit edilmiştir. Mikobakteri kültür filtratlarından α -antijen, MPB51, MPB64, MPB70, MPB83, MPB57 ve birçok protein ekstrakte edilmiş ve klonlanmıştır. BCG'nin kültür filtratları iki boyutlu elektroforezle incelenmiş ve Ag85 kompleksi ile MPB51'in immun dominant antijenler olduğu bildirilmiştir (10).

1.9.3.2 Mikobakterilerin Serolojik Tanısında Kullanılan Testler Antijen Tespitine Dayanan Testler

Bu testler *M.tuberculosis*'in karbonhidrat ve glikolipid kısımları bulunan protein antijenleri ve yapısal özellikteki antijenler tanımlanmıştır. Mikobakterilerin plazma membranında bulunan antijenler: Antijen5, Lipoarabinomannan (LAM), sitoplazmik antijenler ve diğer antijenleri tespit eden çeşitli serolojik test kitleri hazırlanmıştır. Bunlar;

İdrar, balgam ve serumda lipoarabinomannan (LAM) tespiti ile Tüberküloz tanısı:

LAM, mikobakterilerin hücre duvarında bulunan bir lipopolisakarittir ve doğal mikobakteri enfeksiyonu sırasında antikor yanıtını indüklemektedir. İdrar

örneklerinde bulunan tüberküloz basillerini tespit etmek için LAM'ı kantatif olarak tespit eden testler geliştirilmiştir. Akciğer ve akciğer dışı örneklerde LAM'ı tespit etmek amacıyla dipstik metodu kullanılmaktadır. Balgam yaymalarında bu testin duyarlılığı %93, özgüllüğü ise %95'dir. İdrarda anti-LAM ELISA testi ile alınan %45.8 pozitifliğin ve %77.9 negatifliğin doğru sonuçlandığı tespit edilmiştir (10).

Tüberkülozun endemik olduğu alanlarda, özellikle akciğer tüberkülozunun diğer indikatörlerle birlikte olduğunda anti-LAM negatifliğinin pratik önemi vardır. Anti-LAM ELİSA testi yayma sonuçlarıyla değerlendirildiğinde yayma pozitif akciğer tüberkülozlu olgularının %90.6'sında ve yayma negatiflerin %52.5'inde doğru olarak tanı konmuştur. İdrar dışında akciğer tüberküloz hastalarının balgam ve serumunda bulunan mikobakteri antijenlerini veya antikorlarını tespit eden immun blotlama ve immunassay testleri geliştirilmiş ve bu testler hızlı tanıda kullanılmıştır.

Vücut sıvılarındaki antijenin tespiti için sandviç ELISA, inhibisyon ELISA, lateks aglütinasyon ve zıt pasif hemaglütinasyon yöntemine dayanan yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin çoğunda mikobakterilerden ekstrakte edilen glikolipidler PPD, Antijen 5 (38 kDa), Antijen A60, 45/47 kDa'luk antijenler, antijen Kp90, 30 kDa'luk antijen, P32 antijeni, *kord faktörü* (trehaloz dimikolat) ve *LAM* antijen olarak kullanılmaktadır. *M.tuberculosis*'e özgül antijenleri tespit eden testlerin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir. Klinik örneklerde *M.tuberculosis*'e ait tüberkülostearik asit tespiti ile karboksilik asitlerin kromatografik profilleri birleştirilip klinik ve kültür

sonuçları ile karşılaştırılan çalışmalarda erişkin akciğer tüberkülozunda duyarlılık %95, özgüllük %91 olarak belirlenmiştir. Tüm bu yöntemler teknik olarak ileri donanım ve uzmanlık gerektirir.

BOS'ta dolaşan antijenleri tespit için ELISA teknikleri kullanılmış ancak duyarlılıkları düşük seviyede kalmıştır. Yine BOS'ta dolaşan antijenleri tespit için revers pasif hemaglutinasyon yapılmış ve duyarlılık %91.1, özgüllük %99 olarak bildirilmiştir. Immun-blot testi ile BOS'ta dolaşan mikobakteri antijenlerinin özellikleri belirlenmiş ve en fazla 30-32 ve 71 kDa'luk antijenlerin bulunduğu bildirilmiştir (10).

Antikor Tespitine Dayalı Tüberküloz Tanı Yöntemleri

Tüberkülozlu hastaların serumunda mikobakteri antijenlerine karşı oluşan antikorlar monoklonal ve poliklonal olarak tespit edilir ancak çevredeki mikobakterilerle çapraz reaksiyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar doğurabilir. Bu tür serolojik testlerde kullanılan antijenik proteinler (A65, A60, A38, A14, A19, A90, A34 ve A55 kDa'luk antijenler) ve polisakkaritler (LAM, PGP) dışında ısı şok proteinleri, diaçil trehaloz, ekskretuar-sekretuar antijenler ve saflaştırılmış protein türevleri hızlı bir tanı testi geliştirmek için ELISA tekniğine uygun bir çok antijen denenmiştir. *M.tuberculosis*'in saflaştırılan protein deriveleri (PPD) veya *M.bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin)'den elde edilen A60 gibi yarı saflaştırılmış antijenler kullanılmıştır. Bu antijenlerin özgüllükleri düşüktür. A5, A6 ve rekombinant teknolojiyle elde edilen saf proteinlerin özgüllükleri daha iyi ancak duyarlılıklarının düşük olduğu tespit

edilmiştir. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan antikor tespit esasına dayanan ticari testler; MycoDot (LAM / Dot-blot testi), Detect- TB (Rekombinant protein peptit / ELISA), Pathozyme Myco (38 kDa ve LAM / ELISA), Pathozyme TB plus (38 kDa ve 16 kDa / ELISA), Antigen A60 (Antijen-60 / Membran) ve ICT tuberculosis (rekombinant / Membran) 'dir. Bunlar içinde duyarlılık ve özgüllüğü en yüksek olan Pathozyme TB plus testidir.

Tüberküloz hastalarının kan, plazma veya serumlarında bulunan antikorları tespit etmek amacıyla immunokromotografik yöntemli hızlı invitro testler (InstaTest TB, TB STAT-PAK ve ICT diagnostics, BIO-ANALYTICS TB gibi) geliştirilmiştir. Tüberküloz tanısında çok antijenli serolojik testler mikroskopi kadar duyarlı olabilir.

Süperoksit dismutaz (SOD), *M.tuberculosis* tarafından salgılanan önemli bir proteindir. *M.tuberculosis H37Ra*, *M.tuberculosis H37Rv*, *M.bovis BCG*, *M.vaccae*, *M.smegmatis*, *M.avium*, *M.scrofulaceum* gibi mikobakterilerin süperoksit dismutazı kullanılarak saflaştırılmış ve anti-SOD antikorların oluşturulması sağlanmıştır.

Tüberkülozun serolojik tanısında bu antikorlar immun presipitasyon ve ELISA testlerinde kullanılmıştır. Tüberküloz menenjitli olgularda, BOS'da anti-BCG salgılayan hücreleri tespit eden ELISA testlerinin kullanılması duyarlılığı artırabilir. Yine BOS'da anti-PPD IgG antikorlarının kantitatif ölçümünde hücre-ELISA metodu kullanılabilir.

Pulmoner ve ekstra pulmoner tüberkülozlu hastalarda antikor saptamaya dayalı ticari serolojik testlerle yapılan çalışmalar sonucunda bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleriyle ilgili veriler uyumsuzdur ve hiçbirisi mikroskobinin yerini alacak yeterlilikte değildir.

DSÖ'ye göre Tüberküloz tanısında kullanılacak serolojik testin duyarlılığı %80'in özgüllüğü ise %95'in üzerinde olmalıdır. Serolojik tanı (antijen veya antikor saptama) pek çok enfeksiyon hastalığında kullanılmasına rağmen tüberküloz tanısında 1. grup tarama testi olarak duyarlı, spesifik ve pratik olmayı şimdiye kadar başaramamıştır. Günümüzde mevcut olan serolojik testlerin hiçbirisi Amerika veya Avrupa'da henüz onaylanmamıştır. Bu nedenle şu an için bu testlerin tüberküloz tanısında önemli bir katkısı yoktur ancak tarama amaçlı kullanımları faydalı olabilir.

1.9.3.3 Diğer Testler

İnterferon gamma(IFN γ) üretiminin ölçülmesi

Periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerin invitro şartlarda uyarılıp, duyarlılaşan T lenfositlerden salınan interferon gamma (IFN γ) üretiminin ELISA ile ölçümü esasına dayanır (enzim linked-immunospot testi/ ELISPOT). Bu test invitro şartlarda mononükleer hücrelerin izolasyonunun zor ve pahalı olması nedeniyle kullanımı sınırlıdır.

PPD yanıtı sonrası kanda gamma interferon (IFN γ) tespiti yapan (CSL/ QuantiFERON TB) testler geliştirilmiş olup, bu testlere interferon gamma

salınım testleri (IGSA) denir. Bu testlerin duyarlılıkları %90, özgüllükleri %95-98 olarak değerlendirilmiştir (Bu testlerde PPD, lenfositleri uyarıcı olarak görev yapmaktadır) .

İnvivo deri testlerinde PPD'ye alternatif olarak ESAT-6 (erken salınan Tüberküloz antijeni-early secretory antijen TB) ve CFP10 (koloni oluşturan protein) gibi antijenler T lenfositleri uyarıcı olarak kullanılmıştır. ESAT6 antijenlerini, tüberkülozlu vakalarda T lenfositler tanırken, BCG ile aşılı veya aşısız sağlıklı kişilerin T lenfositleri tanımazlar. Bu nedenle İnterferon gamma (IFN γ) ölçümü Tüberküloz tedavisinin izlenmesinde yararlı olabilir (10).

MPB 64 Tansdermal Yama Testi

MPB64 *M. tuberculosis*'in özgül bir antijenidir ve aktif tüberkülozlu vakaları tespit etmek için transdermal yama testi olarak uygulanır.Yama testinde 72 saat sonra pozitif sonuç alınır ve pozitiflik bir hafta kadar sürer. Bu test tüberküloz tedavisi sonrasında ve tüberkülin testi pozitif, tüberküloz olmayan vakalarda negatiftir. Bu test aktif tüberküloz vakalarını belirleme yanında tedavinin izlenmesinde de yararlıdır (10).

Tüberkülin Deri Testi

Tüberkülin deri testi *M.tuberculosis* ile oluşan enfeksiyonların varlığını göstermek için uzun yıllar kullanılan tek yöntem olmuştur. Bu test, enfeksiyon veya BCG aşısı yoluyla basille karşılaşan kişilerde gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonunun ortaya çıkarılması esasına dayanır. Pozitif test; immunitiyi,

enfeksiyonun varlığını yada yokluğunu göstermez ancak kişinin tüberküloz basili ile karşılaştığını ve infekte olduğunu belirtir. Tüberkülin maddesi sıvı besiyerlerinde üretilen *M.tuberculosis* basillerinin çöktürülmesiyle elde edilir. Bu testte, old tüberkülin veya saflaştırılmış protein Purified Protein Derivate (PPD) kullanılmaktadır. PPD uluslararası standartlara uygun şekilde hazırlanır ve 1TU (tüberkülin ünitesi) 0.00002mg PPD proteinine eşdeğerdir. 0.1ml solüsyonda bulunan 5 TU dozundaki PPD günümüzde en yaygın uygulanan ve en iyi yorumlanan tüberkülin test materyalini oluşturmaktadır. Mantoux metodu olarak bilinen standart tüberkülin testinde 0.1 ml PPD solüsyonu deri içersine enjekte edilir ve enjeksiyon yerinde 6-10 mm çapında bir kabarcık görülürki, bu testin doğru uygulandığının kanıtıdır. Tüberkülin deri testi 48-72 saat sonra değerlendirilir. Test değerlendirilirken, enjeksiyon yerindeki eritem değil endürasyon çapı ölçülerek mm şeklinde ifade edilir. Genel olarak endürasyon çapının 10mm ve üzerinde olması pozitif, 5-6 mm olması şüpheli, 5mm'den az olması negatif olarak ifade edilir. Tüberkülin testi, ciddi enfeksiyonlar (ağır tüberküloz vakaları, ciddi viral ve bakteriyel nfeksiyonlar), metabolik hastalıklar (kr.renal yetmezlik vb), canlı viral aşılar, lenfod sistem hastalıkları (lenfoma, lösemi, sarkoidoz), ilaçlar (kortikosteroidler, immunosupressivler), yanıklar, cerahi girişimler gibi durumlarda yalancı negatif sonuç verirler. Tüberkülin testi BCG aşısına bağlı olarak pozitif olabilir. Bu nedenle ülkemizde PPD değerlendirilirken; BCG aşısı olmayanlarda pozitiflik sınırı 10mm, BCG aşısı olanlarda pozitiflik sınırı 15mm olarak kabul edilmektedir. BCG'ye bağlı pozitiflik genellikle 3-5 yıl sürmekte ve 10 yılda

tamamen kaybolmaktadır. Daha önce tüberküloz enfeksiyonu geçirenlerde zamanla PPD pozitifliği azalabilir ve PPD testi negatif çıkabilir. Bunlara test bir hafta sonra tekrarlanırsa, 10 mm'den büyük veya ilk testten 6 mm daha büyük PPD endürasyonu tespit edilirse bu olaya booster reaksiyonu denilir. Bunun anlamı PPD testinin gerçekte pozitif olduğudur (9).

1.10. *M.tuberculosis* Enfeksiyonlarında Tedavi

Tüberküloz'un tedavisinde kullanılan ilaçların keşfi 20. yüzyılın en önemli tıbbi gelişmeleri arasındadır.

1.10.1 Tedavide kullanılan ilaçlar

I-Birinci grup ilaçlar

İzonizid (INH), *Rifampisin* (RİF), *Prazinamid* (PZA), *Streptomisin*(ST) ve *Etambutol* (EMB)'dur. *Etambutol* dışındakilerin hepsi bakterisidal etkilidir. Birinci grup ilaçlar, genellikle tek doz uygulanan ve daha az toksik olan ilaçlardan oluşur. Akciğer Tüberkülozunda 3 tip basil popülasyonu vardır. Bunlar:

- 1-Metabolik olarak aktif olan, nötral pH da ve hafif alkali ortamda çoğalabilen açık kavitedeki basiller
- 2-Makrofajların içinde fagozomlarda bulunan, intrasellüler, asidik (pH 5.5) ortamda yavaş olarak çoğalan basiller

3-Kronik Tüberkülozlu hastaların kapalı kazeöz lezyonlarında bulunan basiller

Streptomisin (ST), açık kaviteelerde ekstrasellüler olarak hızlı üreyen bakterilere etkili ancak kazeöz lezyonlardaki ve makrofaj içindeki basillere etkisi yoktur.

İzonizid (INH), *Rifampisin* (RIF), her üç grup basillere de etkilidir. *Rifampisin* (RIF), kazeöz lezyonlardaki yavaş üreyen basillere en etkili ilaçtır. *Prazinamid* (PZA), asidik ortamda aktifleşen bir ilaç olduğundan yalnızca makrofajların içindeki basillere etkilidir (4-9).

İki veya daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli *M.tuberculosis* suşlarına çoğul ilaç direnci (ÇİD-TB) gösteren suşlar denir. Klinik olarak en önemli çoklu ilaç direnci; *İzonizid* (INH) ve *Rifampisin* (RIF) direncinin birlikte bulunmasıdır. ÇİD-TB olgularında; birinci grup ilaçlara ilaveten kullanılan ve tedavi süreleri uzun olan ikinci grup ilaçlar kullanılmaktadır.

II) İkinci Grup İlaçlar

Sikloserin, *Etionamid*, *Tiasetazon*, *Amikasin*, *Kanamisin*, *Kapreomisin*, *PAS*, *Rifabütin* ve *Florokinolonlar*'dır (4-8-9).

İzonizid (INH):

Tüberküloz basillerine en etkili ilaçtır. Oral ve parenteral olarak kullanılabilen, emilimi iyi, merkezi sinir sistemide dahil olmak üzere dokulara iyi dağılan, ucuz ve iyi tolere edilebilen bir ilaçtır. Aktif olarak hızlı çoğalan basillere öldürücü etki gösterir. Karaciğerde (KC) asetilasyon yolu ile metabolize olur ve bu asetilasyon hızı ilacın yarı ömrünü değiştirir. INH' in en sık yan etkisi, pyridoxin (B6 vit) metabolizmasında etkileşim sonucu, periferik nöropati yapmasıdır. Nöropati, daha çok alkoliklerde diyabetiklerde ve beslenme bozukluğu olanlarda görülmektedir. Bu yan etki günde 25 mg piridoksin alımı ile önlenabilmektedir. Hepatit, INH kullanımına bağlı gelişen en önemli yan etkidir. İlacın kullanımından iki hafta sonra ortaya çıkan KC enzimlerindeki yükselme bir kaç haftada kendiliğinden düzelebilir. Normalin 3-5 misli yükselen KC enzimlerinin olduğu vakalarda ilaç toksitesinin olduğu düşünülür ve ilaç kesilir (8-9).

Rifampisin (RİF)

İzoniazid (INH) gibi metabolik olarak aktif basillere daha etkilidir. Gastrointestinal sistem (GİS)' den asit pH'da daha iyi emildiğinden; antiasitlerle ve yemeklerle alındığında emilimleri, etkinlikleri azalır. RIF aç karnına alındığında; bütün vucutta iyi dağılmakta, pulmoner ve ekstrapulmoner bölgelerdeki tüberküloz olgularında güçlü bakterisidal etki göstermekte ve inflamasyon varlığında merkezi sinir sistemi tüberkülozundada güçlü

bakterisidal etkisini sürdürmektedir. INH, RIF'e göre daha erken bakterisidal etki gösterirken RIF, INH'a göre daha sterilizan etkilidir. Rifampisin düzensiz alındığında allerjik reaksiyonlara neden olmakta ve grip benzeri tablo, trombositopeni, renal yetmezlik oluşturmaktadır. Bu ilaç KC'de sitokrom P450 enzimini aktive etmekte çeşitli ilaç etkileşimlerine neden olmaktadır. Oral kontroseptif ve oral antikoagülan gibi ilaçların etkisini azaltarak klinik sorunlar oluşturabilir. HIV enfeksiyonunda anti-retroviral tedavide proteaz inhibitörleri ve/veya reverse transkriptaz inhibitörleri kullanılacaksa hastalara rifampisin içermeyen tüberküloz tedavi protokolü başlanmalıdır. Bu olgularda rifampisin türevi rifabutin kullanılabilir (8-9).

Pirazinamide (PZA)

Gerekli tedavi süresini kısaltma yeteneği nedeniyle modern tüberküloz tedavisinde INH ve RIF'den sonra en önemli 3. ilaç PZA'dır. PZA, pirazin-2-karboksilik asitin amid türevi bir ön ilaçtır, pH 7.0-7.4 'de hiç etkisi yoktur ve asidik ortamlarda bakterisidal etkisi artmaktadır. Pirazinamid dokularda çok iyi bir sterilizan etki göstermekte olup, bu özelliğiyle erken bakterisidal etkili diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığında çok iyi sonuçlar alınmasını sağlar. Özellikle kazeöz lezyonlardaki basillere güçlü sterilizan etki göstermektedir. En fazla görülen yan etkisi, hiperürisemidir ve en sık görülen semptomu artraljidir. İlacın aktif şekli pirazinoik asit, ürik asidin böbrek tübüllerinden atılımını engeller. Diğer nadir görülen yan etkisi hepatitdir ve tedavi sonrasında düzelmesi uzun zaman almaktadır (8-9).

Etambutol (EMB)

Oral olarak alındığında, iyi emilen, tedavi edici dozlarda alındığında çok fazla toksik olmayan bir ilaçtır. Klinikte fazla kullanılmayan ancak yüksek dozda güçlü bakterisidal etkili bu ilacın en önemli özelliği, diğer antitüberküloz ilaçlara direnç gelişimini önlemesidir. Özellikle INH ve/veya ST direncinin yaygın olduğu bölgelerde, bu ilaçların yerine kullanılmaktadır. Etambutol büyük ölçüde böbrek yoluyla temizlendiğinden, böbrek yetmezliği vakalarında doz ayarına gidilmelidir. EMB'nin en önemli yan etkisi, optik nörit ve görme bozukluğudur (8-9).

Streptomisin (ST)

Bütün aminoglikozidlerde olduğu gibi bakterilerin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanarak protein sentezini engelleyerek etki gösterirler. Genel olarak günde bir kez ve enjektabl olarak uygulanırlar. Santral sinir sistemine iyi penetre olmazlar. Böbrek toksiteleri nedeniyle hastalara uygulanırken böbrek fonksiyon testlerinin kontrol edilmesi gerekir. Bu oluşan nefrotoksitite diğer aminoglikozitlerden daha sıklıkta olmaktadır. Özellikle non-steroid anti inflamatuvar ilaçlarla birlikte kullanılması nefrotoksititeyi daha da artırmaktadır. Streptomisine bağlı oluşan en önemli toksitite işitme kaybı ve vestibüler fonksiyon bozukluğudur. Streptomisin, INH, RIF; PZA'nın yanında 4. ilaç olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde Streptomisin dirençli vakalarda, streptomisin yerine etambutol kullanılmaktadır (8-9).

1.10.2 Tüberküloz Tedavisinin Genel İlkeleri

a- Tüberküloz tedavisinde direnç gelişimini önlemek için tedaviye, duyarlı olduğu bilinen en az iki ilaçla başlamak gerekir.

b- Tüberküloz tedavisinde birinci seçenek ilaçlar iki evrede ve yeterli sürede uygulanmalıdır. Farklı ilaçlar, farklı basil topluluklarını daha fazla etkilemektedir. Başlangıç evresinde 2-3 ay süreyle, 3-5 ilaç birlikte kullanılmalı ve böylece hızlı çoğalan basiller yok edilmelidir. İdame tedavisi döneminde ise 4-6 aylık sürede 2-3 ilaçla geride kalan,yavaş çoğalan basiller yok edilerek hastalığın tekrarlanması engellenmelidir.

c- Tedavi; etkili rejimlerin, kısa süreli ve yakın gözlem altında uygulanmasına dayandırılmalıdır. Günümüzde tüberkülozda temel sorun, hastaların düzenli ve yeterli bir süre ilaçlarını kullanmalarının sağlanamamasıdır. Bunun sonucu olarak dirençli vakalar oluşmakta ve bu direnç kazanan basiller hasta olmayan kişileri de enfekte etmektedir. Bu nedenle DSÖ, hastaların mümkünse ilk 2-3 aylık başlangıç tedavilerinin hastahane ya da başka bir sağlık biriminde yapılmasını önermektedir.

d- Başarısız bir tedavi kombinasyonunda ilaç eklenmemeli, tedavi tekrar uzmanlarca düzenlenmelidir.

1.10.3 Tüberküloz'da Tedavi Rejimleri

a. Daha önce tedavi görmemiş yeni Tüberküloz olgularında

Başlangıç Tedavisi : INH+RIF+PZA+EMB veya SM iki ay hergün (iki ayın sonunda ARB pozitif ise bu süre 3 aya çıkarılır)

İdame Tedavisi: INH+RIF dört ay hergün

b. Daha önce tedavi görmüş ve yeniden hastalanmış olgular veya tedavilerine 2 ay veya daha fazla ara verip dönenler

INH+RIF+PZA+EMB+SM iki ay

INH+RIF+PZA+EMB bir ay

INH+RIF+EMB (5 ay) şeklinde uygulanır.

c. Akciğer dışı Tüberküloz olguları (Tüberküloz menenjit, milier tüberküloz, ürogenital tüberküloz, bağırsak tüberkülozu, perikard ve plevral tüberküloz, kemik tüberkülozu)

Başlangıç Tedavisi: INH+RIF+PZA+EMB veya SM iki ay hergün

İdame Tedavisi: INH+RIF 7-10 ay hergün

d. Çocuk Tüberkülozu

Başlangıç Tedavisi: INH+RIF+PZA iki ay hergün

İdame Tedavisi: INH+RIF dört ay hergün

e. ÇİD-TB şüpheli, tedavisi başarısız olanlar ve kronik olgular

Bu olgularda tedavinin daha az toksik, daha ucuz ve daha etkili olması için minör ve/veya yeni geliştirilmiş antitüberküloz ilaçlarla belirli merkezlerde yapılmalıdır. Bu tip tedavi genellikle 18-24 ay kadar sürebilir ve gerektiğinde cerrahi tedaviye gidilebilir.

f. Özel Durumlarda Tüberküloz Tedavisi

Gebelik durumunda streptomisin kullanılmamalıdır. Diğer ilaçlar normal dozunda kullanılmalı, tüberkülozlu annenin bebeğine doğumdan sonra derhal BCG aşısı yapılmalı ve INH profilaksisine alınmalıdır. Anne bebeğine süt verebilir.

Oral kontraseptiv alan kişiler rifampicin içeren tüberküloz tedavisi alacaklarsa ya başka bir doğum kontrol hapı kullanmalı ya da kullanılan doğum kontrol hapındaki östrojen miktarı 50 µg'ın altında olmalıdır.

Hepatit virüs taşıyıcılığı, geçirilmiş akut hepatit ve alkol kullanımı tedavide değişikliği gerektirmez. Kronik karaciğer hastalarında;

2 ay SM+INH+RIF+EMB ve altı ay INH+RIF veya

iki ay INH+SM+EMB ve 10 ay HMB+INH tedavisi önerilmektedir.

Renal yetmezliklerde en güvenilir protokol 2 ay INH+RIF+PZA ve 6 ay INH+RIF'tir.

Diyabetik hastalarda ve HIV pozitif kişilerde tedavide genellikle değişiklik yapılması önerilmemektedir ancak özellikle diyabetiklerde tedavi süresinin uzun tutulması önerilmektedir.

g. Tüberküloz Tedavisinin İzlenmesi

Akciğer tüberkülozunun tanısında olduğu gibi takibinde de en etkili yöntem bakteriyolojik incelemedir. Tedavinin yoğun döneminden sonra yani ikinci ayın sonunda, dördüncü ayın sonunda ve tedaviyi kesmeden önce 6 ve 8. aylarda mutlaka balgam yaymaları incelenmelidir. Genellikle vakaların çoğunluğunda tedavinin ikinci ayının sonunda balgam yaymaları negatifleşir. Eğer balgam yayması pozitif olursa başlangıç tedavisi 1 ay uzatılır ve hastanın ilaçları düzenli alıp almadığı kontrol edilir. Tedavinin 5. ayı sonunda hala balgam yayması pozitif olan hastalar büyük olasılıkla ÇİD-TB vakalarıdır. Bu vakaların tedavi protokolleri değiştirilmeden ÇİD-TB tedavisi yapan merkezlere gönderilmelidir.

Tedavinin izlenmesinde bakteriyolojik ve radyolojik yöntemler birlikte kullanılmalı ve tek başına radyolojik tetkiklerle takip yapılmamalıdır. Özellikle akciğer dışı tüberküloz olgularında klinik bulguların yanında sedimentasyon hızının da kontrol edilmesi gerekir.

h. İlaç yan etkilerinin izlenmesi

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçların en önemli yan etkisi hepatotoksitedir. Tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçlardan INH+RIF ve PZA hepatotoksik özelliktedir. Bu hastalar karaciğer enzimleri yönünden ve bilirubin değerleri açısından sürekli takip altında tutulmalıdır. Hepatotoksitite tanısı alan hastaların tümünün tedavisi kesilmeli ve karaciğer

enzimleri normale döndükten sonra tüm ilaçlar tam dozda yeniden başlanmalıdır. Tüberküloz tedavisi esnasında işitmenin azalması ve/veya denge kusuru gelişen olgularda streptomisin hemen kesilmeli ve bir daha kullanılmamalıdır.

EMB'ye bağlı olarak görmede azalma ve renk ayrımı bozuklukları (optik nörit) hakkında hastalar uyarılmalı ve bu durumun geliştiği hastalarda EMB hemen kesilmelidir. RIF'e bağlı lökopeni ve akut renal yetmezlik durumlarında ilaç kesilmeli ve bir daha kullanılmamalıdır.

i. Koruyucu Tedavi (kemoproflaksi)

Koruyucu tedavi infekte olmuş ve hastalanma şansı yüksek olan kişilerde hastalığı önlemek amacıyla yapılır. Kemoproflaksi'de temel ilaç INH'tır. Erişkinlerde 300mg/gün, çocuklarda 10mg/kg/gün dozunda INH 6-12 ay arasında kullanılmaktadır. Bu tedavinin başarı şansı %60 civarındadır. INH proflaksisi sırasında hastaların, ilaçları düzenli ve yeterli bir şekilde alıp almadığı ve yaşlı hastalar hepatiti açısından takip edilmelidir.

INH Proflaksisi

- 1- Tüberkülozlu hastayla temaslılar
- 2- BCG aşısı olmayan PPD + 0-6 yaş arası çocuklar
- 3- Son yıllarda yapılmış BCG'si olmadığı halde PPD + ve risk faktörleri taşıyan hastalar (HIV enfeksiyonu, silikozis, diyabetikler, kronik böbrek

yetmezliği, TNF α tedavisi alacaklar, uzun süre steroid tedavisi gerektirenler, lenfomalılar, gastrektomi operasyonu geçirenler)

- 4- Son 2 yıl içinde tekrarlanan PPD değerlerinde 10 mm'den fazla artış olanlar (9).

1-11 Tüberkülozda İlaç Direnci

Tanımlar:

Yeni olguda ilaç direnci: Hiç tüberküloz tedavisi almamış ya da bir aydan daha kısa süreli tedavi almış hastadaki saptanan ilaç direncidir ve bulaş yoluyla alınmıştır. Primer direnç oranının yüksek olması o toplumda uygulanmakta olan tüberküloz korunma ve kontrol önlemlerinin yetersiz olduğunu göstermektedir (10-73).

Tedavi görmüş olguda ilaç direnci: Bir aydan daha fazla tüberküloz tedavisi görmüş hastalardaki ilaç direncidir. Edinilmiş ilaç direnci denilebilir. Bulaş yoluyla alınmış ya da tedavi anında kazanılmıştır. Sekonder direnç, uygun olmayan tedaviye bağlı olarak yeni mutantların gelişimi sonucu oluşur ve bu direncin artışı uygulanmakta olan tüberküloz tedavisinin yetersizliğini gösterir (10-73).

Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD - TB) yada multi- drug resistant tüberküloz: İzonyazid (INH) ve rifampisin (RIF)'e birlikte direnç gösteren hastalardaki direnci tanımlar.

Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD – TB) yada extensive drug resistance tüberküloz: İzonyazid (INH) ve rifampisin (RIF)'e dirence ek olarak bir

kinolon ve birde enjektabl ilaca (amikasin, kanamisin, kapreomisin) direnç saptanmasıdır (58).

Mikobakterilerde gelişen ilaç direnci; primer direnç yani dirençli basille hastalanma ya da tedavi sırasında gelişen sekonder direnç şeklinde olabilir. *M.tuberculosis*'te en sık gözlenen direnç mekanizması, antimikobakteriyel ilaçları aktive eden veya kendileri ilaçların hedefi olan enzimlerde meydana gelen mutasyonlardır. Mikobakterilerdeki mutasyon oranları diğer bakterilerle kıyaslandığında 10 misli daha fazladır. INH ve etionamid mikolik asit yapısını bozan anti tüberküloz ilaçlardır (4).

Anti tüberküloz ilaçlar tek başlarına kullanıldıklarında başlangıçta klinik yanıt alınmasına rağmen ortalama üç aylık bir süre içinde direnç ortaya çıkmaktadır. Anti-tüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimine yol açan en önemli tedavi yanlışı, tedavi başarısızlığında tedaviye tek ilaç eklenmesidir. Bunun yanında yetersiz doz, sayı ve uygun olmayan kombinasyonda ilaç kullanımı, biyoyararlanımı kanıtlanmamış ilaçların kullanımı, anti-tüberküloz ilaçların düzenli temin edilememesi ve bu ilaçların başka endikasyonlarda kullanılması, yetersiz hasta eğitimi ve hastaların iyi takip edilememesi gibi nedenlerle ilaçlara direnç gelişmektedir.

Çoğul ilaç direnci (ÇİD/ MDR) ifadesi, izoniazid ve rifampisine aynı anda dirençli basilin neden olduğu tüberküloz olgularında kullanılır. Primer direnç aslında sekonder direncin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Sekonder direnç gelişmiş basilleri taşıyan hastanın basilleri bulaştırdığı hasta olmayan kişilerde gelişen tüberkülozda primer dirençten söz edilir (58).

Mikobakterilerin hem doğal hemde kazanılmış direncinde pompa proteinlerinin de rol aldığı, bunlardan *Tap* ve *P55'in* aminoglikozid, *EfpA'nın* izoniazid ve *LfrA'nın* kinolon direnci ile ilişkili olduğu çalışmalarda ortaya konmuştur.

M.tuberculosis'in klinikte sorun oluşturan ilaç direnci, tedavide kullanılan ilaçların hedef bölgeleri olan molekülleri kodlayan genlerde mutasyon sonucu gelişmektedir. Yine bu basillerin diğer bir çok bakterinin aksine plazidleri olmadığından direnç genleri bir, bakteriden diğer bakteriye aktarılamaz. Birbirinden bağımsız ortaya çıkan mutasyonların birikimi sonucu ÇİD-TB enfeksiyonları oluşmaktadır. Son yıllarda aşırı ilaç dirençli (XDR-TB) tüberküloz olarak adlandırılan ve hem birinci grup, hem de ikinci gruptaki belli ilaçlara dirençli vakalara rastlanmıştır. DSÖ, XDR-TB'yi rifampin, izoniyazide ek olarak ikinci grup ilaçlardan florokinolonlara da direnç gösteren ve ikincil grup ilaçlardan enjeksiyon yoluyla uygulanan antibiyotiklerden kapreomisin, amikasin ve kanamisin en az birine dirençli izolatlar olarak tanımlamıştır (58).

1-İzoniasid (INH) Direnci

***katG* Gen Mutasyonu**

INH, mikolik asit biyosentezinde rol alan enoyl ACP redüktaz enziminin aktivitesini inhibe edilmektedir. INH normalde inaktif formda olup, *M.tuberculosis'in katG* geni tarafından kodlanan katalaz- peroksidad enzimi tarafından aktive edilerek hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir. İşte *katG* genindeki mutasyon sonucu inaktif formdaki INH aktif forma dönüşmemekte

ve etki gösterememektedir. Bu mekanizma INH direncinin %50-70'inden sorumludur (3).

***inhA* Gen Mutasyonu:**

Mikolik asit biyosentezinde rol alan enoyl ACP redüktaz, *inh* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gende oluşan mutasyon sonucu sürekli olarak mikolik asit sentezlenmektedir ve izoniazidin etkinliğini ortadan kaldırmaktadır. Bu tip direnç INH direncinin %25'ini oluşturmaktadır (3).

INH dirençli suşlarda, *katG* geninde %67.8, *inhA* geninde %20.4 oranında mutasyon gözlenmiştir ve *katG* için ACC315. kodonda, *inhA* için TGA 209 nolu kodonda en sık mutasyon saptanmıştır (50).

***ahpC* Gen Mutasyonu**

Klinik izolatlardaki INH direncinin %10-15'inden sorumludur. INH'nın aktif formunu inhibe eden alkil hidroperoksit redüktaz enziminin bu dirençten sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (3).

2-Rifampin (RIF) Direnci:

Rifampisin, bakterinin *DNA*'ya *bağımlı RNA polimerazının* potent inhibitörüdür. Rifampin, RNA polimerazın β -sub ünitesine bağlanarak mRNA sentezini inhibe etmektedir. RIF'e dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin %95'inden fazlasında dirençten, RNA polimeraz enziminin β -sub ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533 kodonlar arasındaki 81 bç (baz çifti)

uzunluğundaki yüksek sıklıkta değişken bölgedeki mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar sorumludur. Yine *rpoB* genini kodlayan bu bölge dışında 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlardada mutasyonlar gösterilmiştir. RIF dirençli vakaların %34-57'inde *rpoB* geninin 531. kodonundaki ser531Leu mutasyonu saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyon izlemektedir. Kodon 531, 526, ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzeyde rifampisin direncine (MIC \geq 64 μ g/ml) neden olurken, 514 ve 533. kodon mutasyonları genellikle düşük düzeyde mutasyonlardır. Rifampine dirençli türlerin tümünde rifapentin'ede çapraz direnç görülmektedir (50). Sanic ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 227 vakanın 216'ında *rpoB* geninde 8 farklı kodonda 20 farklı nokta mutasyon, iki delesyon ve bir insersiyon tespit etmişlerdir ve *rpoB* geni için en sık TTG531. kodonda mutasyon tespit edilmiştir.

3-Streptomisin Direnci:

M.tuberculosis'de streptomisin'e karşı direnç, ribozomda ilacın hedef bölgesinde oluşan mutasyonlar sonucu gelişir. Mutasyonlar genellikle, ribozomal küçük alt ünite S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde oluşurlar ve streptomisin direncinin %50'sinden sorumludurlar. Ayrıca 16S ribozomal RNA'nın bir bölgesini kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlarda streptomisin direncinden sorumludur. Bu da streptomisin direncinin %20'sini oluşturmaktadır (3). *rpsL* proteinindeki aminoasit değişikliği yüksek düzeyde (MIC>500 μ g/ml) streptomisin direnci oluştururken, *rrs* genindeki mutasyonlar

orta düzeyde (MIC<250 µg/ml) S T direnci oluşturur (50). Streptomisine direnç gelişmesi durumunda, diğer aminoglikozitlere çapraz direnç gelişmez ve streptomisin yerine kullanılabilirler (4).

4-Etambutol (EMB) direnci:

EMB, arabinozil transferazın özgül hedefidir. EMB arabinozun, arabinogalakton ve lipoarabinomannana polimerize olmasına aracılık eden arabinozil transferaz enzimini bloke ederek arabinogalakton ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engeller.

Arabinozil transferaz enzimini kodlayan, *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kilo baz çiftlik bir operon şeklinde organize olmuştur. Etambutole dirençli türlerde *embB* genindeki en sık mutasyonlar, 306. kodondaki missense mutasyonlardır. EMB direncinin %47-65'inden *embB* genindeki mutasyonlar sorumludur. Yine Phe285 Leu, Phe330 val ve Thr 630 İl diğer sık olan mutasyonlardır. Met306Leu, Met306Val,Phe330Val ve Thr631 le mutasyonlarında EMB için MIC değerleri genellikle daha yüksektir.

5-Pirazinamid (PZA):

Pirazinamide duyarlı *M.tuberculosis* suşları, pirazinamidi aktif formu olan pirazinoik aside çeviren pirazinamidaz enzimi üretirler. *M:tuberculosis* de bu enzimi kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar, piraziamidaz aktivitesinin kaybına neden olurlar. Bu olay pirazinamid direncinin %72-94'ünden

sorumludur. *pncA* geninin üç bölgesindeki mutasyonlar (3-17, 61-85 ve 132-142 kodonlar arası) belli bir kümeleşme gösterirler. Bu mutasyonlar dışında, delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonları da görülmektedir.

PZA'ya doğal dirençli olan *M.bovis BCG* türlerinde *pncA* geninin 169. kodonunda *M. tuberculosis* türlerindeki histidin yerine aspartik asit gelmiştir.

6-Florokinolon direnci:

Florokinolonların hedefi DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve ATP bağımlı Tip-II DNA topoizomeraz olan, DNA giraz enzimidir. Bu enzimin inhibe edilmesiyle, DNA'nın süpersarmal yapısı bozulur ve bakteri hayatını devam ettiremez. İnsan DNA'sı bu durumdan etkilenmez. DNA giraz enzimi AveB alt ünitelerinden oluşmuş bir heterodimerdir. Bu üniteler *gyrA* ve *gyrB* genlerince kodlanırlar ve dirençli vakalarda bu gen bölgelerinde mutasyonlar saptanmıştır. Tüberküloz tedavisinde etkili olan, siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve sparfloksasin birinci grup tüberküloz ilaçlarına alternatif olarak kullanılmaktadır. Yüksek düzeyde siprofloksasin direnci, *gyrA* geninin 90. kodonu civarındaki mutasyonla ilişkili bulunmuştur. Yüksek düzeyde florokinolon direnci saptanan türlerde, bu bölgedeki 40 aminoasitlik Quinolone rezistance determining region (QRDR) olarak adlandırılan gen bölgesinde mutasyonlar bulunmaktadır. *M. tuberculosis* türlerindeki kazanılmış florokinolon direncinin %75-94'ünden, QRDR bölgesindeki *gyrA* mutasyonları sorumludur (50).

7-Etionamid Direnci:

Etionamid, etkisini mikolik asit biosentezini bloke ederek gösterir. Bu dirençte etkili olan gen bölgesi *inhA* gen bölgesidir. Ancak dirençli *M. tuberculosis* suşlarındaki mutasyon oranları belli değildir (50).

2-GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kimyasal Bileşikler, Besiyerleri, Kitler

Tris (Amiesco, ABD)

Borik asit (Scharlau, İspanya)

Etilendiamin tetraasetik asit (Carlo Erba)

Agaroz (Sigma, ABD)

Yükleme tamponu

Etidyum Bromid (10mg/ml distile su içinde)

dNTP (Bioron, Almanya)

Primerler

Buffer (Bioron, Almanya)

Taq polimeraz (Bioron, Almanya)

MgCl₂ (Bioron, Almanya)

Lowenstein Jensen besiyeri (Orbak)

Formamit (Applied Biosystems, ABD)

Isopropanol (Sigma, ABD)

BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, ABD)

Invisorb® Spin PCRapid Kit for purification of PCR-fragments (Invitek, Almanya)

0.5M EDTA hazırlanışı:

Disodium EDTA. 2H₂O 186.1gr

Distile su ile 1L' ye tamamlandı.

NaOH ile pH 8 olarak ayarlandı.

5X TBE hazırlanışı

Tris base 54gr

Boric acid 27.5gr

EDTA 0.5M 20ml

Distile su ile 1000ml' ye tamamlandı.

%2' lik Agaroz jel hazırlanışı:

1X TBE 75ml

Agaroz 1.5 gr

Yükleme Tamponu:

Orange G 25mg

Gliserol 3ml

5X TBE 2ml

H₂O 5ml

2.2 Aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Japonya)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Vorteks (MS2 minishaker, IKA)

Mikropipetler (Gilson, Fransa)

Yatay elektroforez

Isı döngü aletleri (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD)

ABI Prism310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD)

Mikrosantrifüj ve soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)

Isı bloğu (Bio TDB100, Boeco, Almanya)

Jel görüntüleme sistemi (Syngene, Ingenius, ABD)

pHmetre (Accumet, AB15, Fisher)

Manyetik karıştırıcı (Jenway 1000, hotplate & Stirrer, İngiltire)

Distile su cihazı (Seralpur PRO90C)

2.3 Kullanılan *M.tuberculosis* Suşları

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran hastalara ait klinik örneklerden, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında pasajlanarak üretilen ve tüberküloz pozitif olarak değerlendirilen 30 tane *M.tuberculosis* suşu çalışılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Tüberküloz Laboratuvarında üretilen H37Ra (rifampisine duyarlı) ve H37Rv (rifampisin dirençli) *M.tuberculosis* suşları kullanılmıştır.

2.4 Yöntem

Mikrobiyoloji laboratuvarında Löwenstein Jensen besiyerinde kültürde üreyen örnekler mikroskopta incelendi.. ARB pozitif olanların kültürlerinden DNA izolasyonu için kültür materyali 1.5ml'lik plastik konik tüplere (Eppendorf) alındı. Alınan örneklerden spin kolon yöntemiyle hazır kit protokolüne uygun olarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar LA1 ve LA2 primerleri kullanılarak rpoB gen bölgesinin içinde bulunduğu geniş bir bölgeye protokollere uygun şekilde in-house PZR ile çoğaltıldı ve %2'lik agaroz jelde görüntülenerek DNA bantları gösterildi. Elde edilen DNA, atıklardan temizlenerek daha saf DNA elde edildi. Saflaştırılmış DNA, rpoB gen bölgesine uygun primerlerin (*rpoB101F*- *rpoB101R*) ve buna uygun PZR protokolünün kullanıldığı sekans öncesi PZR ile çoğaltıldı. PZR'da kullanılan iki oligonükleotitten oluşan primerler, 2201 ile 2611 (Gen Bank accession no. L27989) arasındaki 411 bp'lik (rpoB genine ait 81bp çok değişken bölgeyi

içeren) bir bölgeyi tanımlamaktadır. Sekans PZR ile elde edilen ürünler presipitasyona tabi tutuldu. Presipitasyon sonrası örnekler formamid eklenerek DNA'nın çözünmesi sağlandı. Tüm örnekler için (formamid eklenmiş) DNA'lar, 95°C'de 3 dakika daha sonra buz üzerinde 2 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler için DNA'lar "ABI-PRISM 310 genetic analyzer" cihazının kullanım talimatına uygun şekilde döngüsel dizi analizi tepkimesi için cihaza yüklendi. DNA'nın gen dizileri, uygun bilgisayar programları kullanılarak uluslararası gen bankalarındaki gen dizileriyle karşılaştırılarak dizilerde oluşan farklılıklara göre mutasyonların olup olmadığı değerlendirildi.

2.4.1 Kalıp DNA'nın Ekstraksiyonu (elde edilmesi)

1 Yeterli miktarda bakteri kolonisi (içinde serum fizyolojik bulunan) 1.5ml'lik plastik konik tüplere alınır ve süspanse edilir.

2 -Süspanse haldeki örnekler 12000 rpm'de, 15 dak. santrifüj edilir ve santrifüj sonrası üst kısım dökülür

3 -1.5ml'lik plastik konik tüplerin dibindeki materyal üzerine 400 µl resuspanسیون buffer eklenir (bakterilerin hücre duvarlarının yıkımı sağlanır) ve vortekslenir.

4 -Bu süspanسیون 95°C'de 20 dak. ve üzerine proteinaz K (20 µl) eklenerek 68°C de 20 dak.bekletilir (Bakteri DNA'sının hücre dışına çıkması sağlanır).

5 -Sonra 400 µl binding buffer eklenir (serbestleşen DNA'lar yakalanır) ve hafifçe vortekslenir.

6 -1.5ml'lik plastik konik tüplerdeki materyal filtrelili tüplere aktarılır (DNA'nın silikon yapıdaki filtrelere tutunması sağlanır) ve 10.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilir.

7 -Sonra iki kez spin kolonlar yıkama tamponu ile yıkanır ve 10.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilir, alt kısım dökülür.

8 -Spin kolondaki alkolü uzaklaştırmak için 14.000 rpm'de, 4 dak. santrifüj yapılır.

9 -Spin kolon üzerine (Spin kolondaki DNA'nın yeni tüplere çözünmesi için) 80-100 µl elution buffer eklenir ve 1 dak. beklendikten sonra 10.000 rpm'de santrifüj yapılarak DNA'nın 1.5ml'lik plastik konik tüplerin tabanına çökmesi sağlanır.

2.4.2 PZR Primerleri

Tablo 1: PZR'da kullanılan primer çiftlerinin dizileri, uzunlukları ve birleşme sıcaklıkları

<i>Primer adı</i>	<i>Primer dizisi (5'→3')</i>	<i>Ürün uzunluğu (baz çifti)</i>	<i>Birleşme sıcaklığı(°C)</i>
<i>LA1</i>	TCGACGCTGGAGAAGGACAACACC	1017	60
<i>LA2</i>	GTCCCAGGAAGGGAATCATCGCGG	1017	60
<i>rpoB101F</i>	TACGGTCGGCGAGCTGATCC	411	57
<i>rpoB101R</i>	TACGGCGTTTCGATGAACC	411	57

2.4.3 PZR için karışımın hazırlanması

PZR için optimum $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonları belirlendi. Her örnek için, 1X tepkime tamponu ($MgCl_2$ 'süz) (Bioron), 1,5 mM $MgCl_2$ (Bioron), 200 μ M dNTP (Bioron), 0.1 μ M LA1, 0.1 μ M LA2 primerleri ve 0.026U/ μ l Taq polimeraz enzimini içeren 32.5 μ l karışım hazırlandı ve PZR tüplerine aktarıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR tüplerine aktarılan 32,5 μ l karışımın üzerine klinik örneklerden elde edilen DNA'dan 2.5 μ l eklendi. Thermal Cycler (ısı döngüsü) cihazı, protokole uygun olarak PZR döngüleri ve sıcaklık ayarları aşağıdaki şekilde yapıldı (74).

95°C	3 dakika	1 döngü	(denatürasyon)
95°C	20 saniye	} 45	(denatürasyon)
60°C	20 saniye		(bağlanma)
72°C	45 saniye		(uzama)
72°C	7 dakika		

PZR döngüleri tamamlandıktan sonra çoğaltılan DNA ürünlerinin her birinden 4 μ l alındı ve 3 μ l yükleme tamponu ile karıştırıldı. Bu karışımlar %2'lik agaroz içeren jele 1. ve sonuncu kuyucuklara moleküler ağırlık standardı (marker), diğer kuyucuklara sırasıyla örneklere ait DNA'lar yüklendi. Sonra 100V- 80 amp akımda 45 dak.elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası Etidyum bromür ile örnekler boyanarak DNA bantlarının görünür hale gelmesi sağlandı. Boyanan örnekler UV ışık altında 1017 bç'lik DNA

bantlarının fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamında kaydedildi. Kaydedilen görüntüdeki bantların seviyeleri moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak tespit edildi. Pozitif bantların olduğu örnekler PZR atıklarının DNA'dan ayıklanması için saflaştırmaya alındı.

2.4.4 Amplifikasyon Sonrası DNA'nın Saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılmasında, dizi analizi tepkimelerini etkileyen ortamda kullanılmayan nükleotit ve primerlerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. *LAI-LA2* PZR ürünleri "Invisorb® Spin PCRapid Kit for purification of PCR-fragments" saflaştırma sistemi ile protokol-1' de önerildiği şekilde saflaştırıldı.

1. PZR ürünlerinin bulunduğu tüplere direkt olarak 130 µl Buffer P eklendi ve hafif olarak karışmaları sağlandı.
2. Karışım hazırlanan kolonlara yerleştirilen spin filtreler aktarıldı, 1 dak. inkübe edildi.
3. Spin kolon filtreli tüpler 10 000 rpm' de 30 saniye santrifüj edildi, alt kısım boşaltıldı.
4. Filtreler üzerine 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 10 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
5. Sonra filtre edilen sıvı boşaltıldı. Yıkama tamponundaki etanolün tamamen uzaklaştırılması için 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
6. Daha sonra spin filtreler 1.5ml' lik plastik konik tüplere yerleştirildi.

7. Filtre üzerine gelecek şekilde 20 µl Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında en az 3 dakika bekletildi, 10. 000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı ve böylece DNA'nın elution tüplerine (1.5ml'lik plastik konik tüplere) aktarımı sağlandı.

2.4.5 Döngüsel Dizi Analizi Tepkimesi

Bunun için BigDye Terminator v3.1 kullanıldı. Toplam 20 µl' den oluşan karışım, dNTP, ddNTP ve Taq polimeraz, 1X tampon ve 0.160 µM rpoB primerleri (rpoB101F, rpoB101R) içermektedir. Dizi analizi tepkimesinde incelenecek örnek sayısına göre, bu karışımın katları hazırlandı. PZR tüplerine 17 µl dağıtıldı, üzerine 3 µl saflaştırma ürünleri (DNA) eklendi ve dizi analizi tepkimesi için ısı döngü (thermal cycler) cihazına yerleştirildi (75).

96°C 10 saniye	}	25 döngü
50°C 5 saniye		
60°C 4 dakika		

2.4.6 Döngüsel Dizi Analizi Ürünlerinin Presipite Edilmesi ve Formamid ile Çözülmesi:

Presipitasyon için sodyum asetat yöntemi kullanıldı.

- Döngüsel dizi analizi ürünlerinin bulunduğu tüpler üzerine 3 µl sodyum asetat ve 50 µl %100 soğuk etanol konuldu, karışım elle yavaş şekilde vurularak homojenize edildi.
- PZR tüplerindeki örnekler 1.5 ml'lik plastik konik tüplere aktarıldı

- c. Sonra bu karışım 20 dak, -20 °C'de buzdolabında bekletildi.
- d. Örnekler bu sürenin sonunda hemen 14.000rpm'de 20 dak. santrifüj edildi.
- e. Santrifüj sonrası sıvı kısım dikkatlice pipetle boşaltıldı ve üzerine 250 ml oda ısısında bekletilmiş, % 70'lik etanol eklendi .
- f. 14.000 rpm'de 5 dak.santrifüj yapıldı ve sıvı kısım pipetle tüpün cidarına yapışmış DNA'dan uzaklaştırıldı.
- g. Daha sonra epandorf kapakları 20 dak.açık bırakılarak alkolün uzaklaşması sağlandı.
- h. 1.5ml'lik plastik konik tüplerin çeperindeki DNA'yı çözmek için, 20 µl formamid eklendi ve 10 dak. oda ısısında bekletildi.
- i. Sonra kapiller jel elektroforezi için kullanılan tüplere aktarıldı ve elektroforeze kadar -20°C'de saklandı.

2.4.7 Kapiller jel Elektroforezi

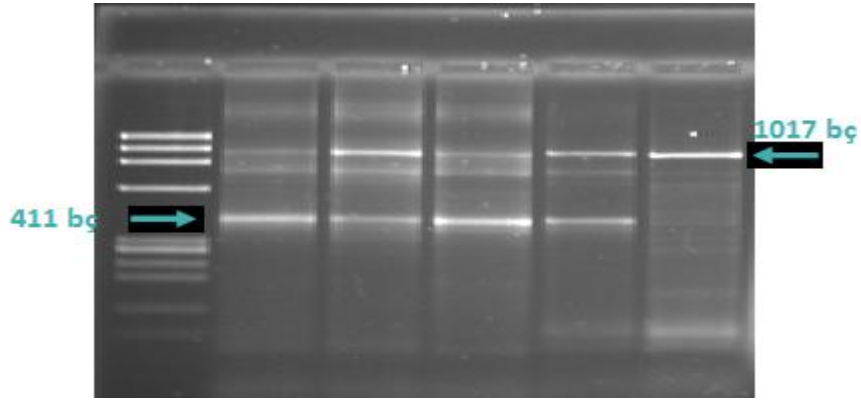
- 1- Formamid eklenmiş DNA'lar 95°C'de 3 dakika denatürasyona maruz bırakıldı ve sonra buz üzerinde 2 dakika tutuldu.
- 2- Daha sonra "ABI Prism310 Genetic Analyzer" cihazına yüklenen DNA' lar kapiller jel elektroforez sisteminde yürütüldü.DNA dizileri cihaz tarafından kromotogram dosyaları şeklinde kaydedildi.

2.4.8 DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi)

rpoB 101F-rpoB101R primerleri kullanılarak elde edilen DNA dizilerine ait, veriler “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) web sayfasındaki BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) programı kullanılarak gen bankası veri tabanı ile karşılaştırıldı. *M.tuberculosis* olarak tanımlanan suşlar çeşitli programlar kullanılarak rpoB gen bölgesinin baz dizisi incelenerek rifampin direncine neden olan kodonlar incelenerek oluşan mutasyonlar saptandı.

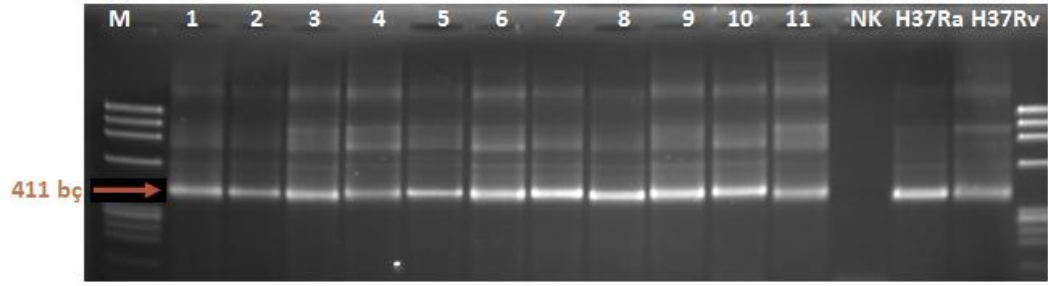
3. BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Rutin Laboratuvarı'na 2006–2010 yılları arasında gönderilen klinik örneklerden ARB ve kültür sonuçları pozitif olan 30 hasta örneği çalışmaya alındı. Klinik örneklerden DNA elde edilmesini takiben, LA1- LA2 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. PZR'de elde edilen 1017 bp büyüklüğündeki DNA bantları %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 2).



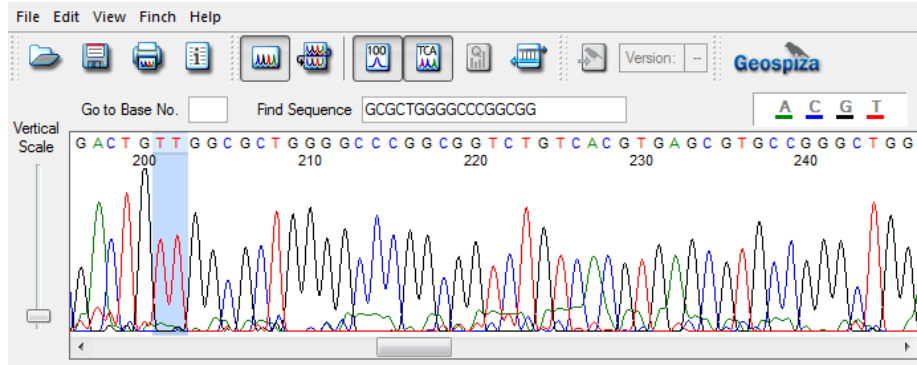
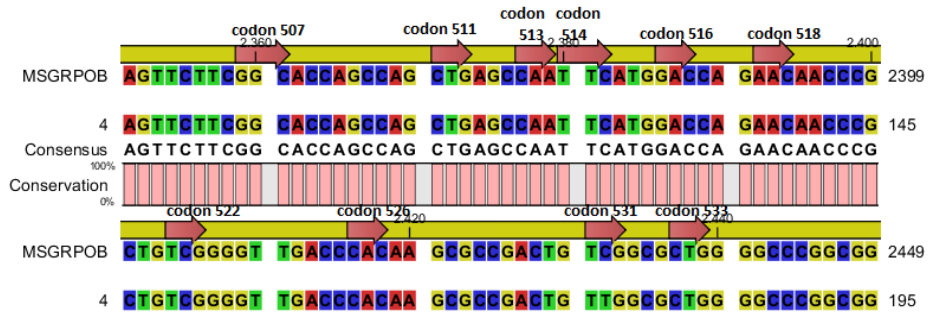
Şekil 2: *M. tuberculosis* suşlarının LA1-2 primerleri ile çoğaltılan 1017 bp'lik ve rpoB 101 F-R primerleri ile çoğaltılan 411 bp'lik DNA'nın, agaroz jel görüntüleri (1. moleküler ağırlık standardı., 2-6. klinik örneklere ait DNA bantları)

Pozitif olarak tespit edilen örneklere ait DNA'lar ve rifampisine direnç genlerini kodlayan *rpoB* gen bölgesini tanımlayan *rpoB* 101 F (forward) ve R (reverse) primerleri kullanılarak sekans öncesi PZR yapıldı. Sekans öncesi PZR'de elde edilen 411 bp büyüklüğündeki DNA bantları %2'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil-3). Tüm örneklerin MTBC ailesine ait olduğu tespit edildi.



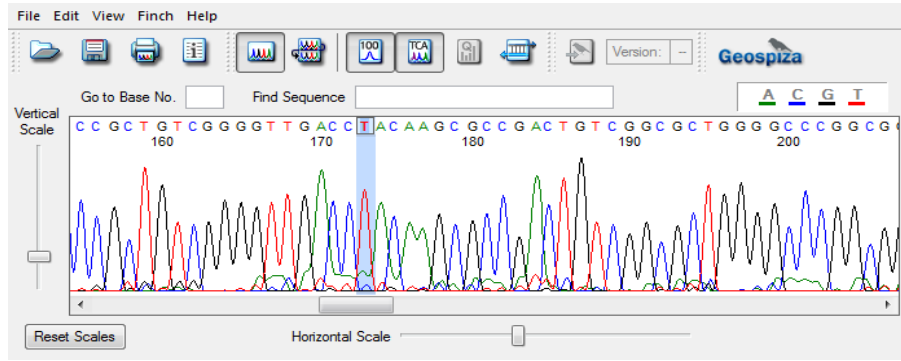
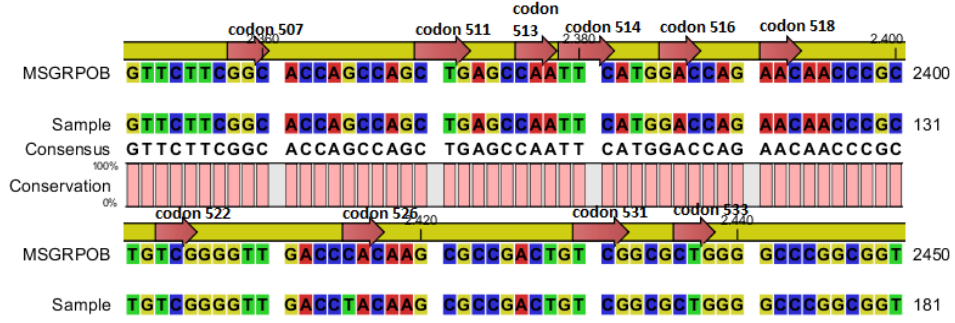
Şekil 3: *M. tuberculosis* suşlarının 411 bp'lik *rpoB* gen bölgesinin PZR sonrası agaroz jelde bant görüntüleri (moleküler ağırlık standardı,1-11.bantlar klinik örneklere ait DNA bantları, negatif kontrol, H37Ra-H37Rv pozitif kontrol suşlarına ait DNA bantları görülmektedir).

DNA dizi analizi sonrası her örneğin hem forward hem de reverse baz dizileri, rifampisin direncini oluşturan mutasyonların belirlenmesi için değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda; incelemeye alınan 30 klinik örnekten 28 tanesinde dizilerde hiç bir farklılık gözlenmedi. Bu çalışmada farklılık saptanan iki örnekten birinde *rpoB* gen bölgesini kodlayan 507-533. kodonlardan (27 kodonluk bölge), 531. kodona ait baz dizisinde farklılık (önceden tanımlanmış mutasyon) saptandı (Şekil-4).



Şekil - 4: *M. tuberculosis* suşlarında rpoB gen bölgesinde 531. kodonda TCG (Ser) → TTG (Leu) değişimi sonucu oluşan mutasyonun gösterilmesi

Diğer bir örnekte ise *rpoB* gen bölgesini kodlayan 526. kodona ait baz dizisinde farklılık (önceden tanımlanmış mutasyon) saptanmıştır (Şekil-5).



Şekil 5: *M. tuberculosis* suşlarında *rpoB* gen bölgesinde 526. kodonda CAC(His) → TAC(Tyr) değişimi sonucu oluşan mutasyonun gösterilmesi

Bu çalışmada 30 klinik örnekten 2 tanesinde (%6.66) önceden tanımlanmış rifampisin direnci tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüberküloz geçmişi çok eski tarihlere dayanmasına rağmen, bugün hala güncelliğini koruyan bir enfeksiyon hastalığıdır. Etkenin kesin olarak bilinmesine ve tedavide etkili ilaçların kullanılmasına rağmen hala yüksek seviyede morbidite, mortaliteye sebep olmaktadır (58). DSÖ çalışmalarının en önemli hedefi, 1990 yılı verileriyle 2015 yılı verileri karşılaştırıldığında ölüm oranlarının ve prevalansın yarıya düşürülmesi, hastalık insidansındaki artışın durdurulması hatta tersine çevrilmesidir. DSÖ'ü verilerine göre yeni tüberküloz olgularının en yüksek olduğu ülkeler sırasıyla Hindistan, Çin, Endonezya, Güney Afrika ve Nijeryadır. DSÖ Avrupa raporuna göre, Avrupa kıtası ülkelerinde 2006 yılında 422.830 tüberküloz olgusu (48/100.000) saptanmıştır. 2006 yılında Avrupa Birliğinin 34 ülkesinde tüberküloz insidansı 17/100.000 olarak belirlenmiş ve en yüksek insidans oranı Romanya, Bulgaristan ve Baltık ülkelerinde görülmüştür. Ülkemizde Verem Savaş Daire Başkanlığının 2008 yılı raporuna göre toplam tüberkülozlu hasta sayısı 20.526, olgu hızı 28/100.000 nüfus, yeni olgu sayısı 18.544 ve tedavi görmüş olgu sayısı 1982'dir(69). 2003 yılından itibaren tüberküloz insidansında düşmeler görülmüştür. Verem Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre yıllar içinde ülkemizde de tüberküloz insidansında düşmeler olmuş ve 1991 yılında insidans 44/100.000 iken, 2006 yılında bu oran 25.4 /100.000'e kadar gerilemiştir. Günümüzde tüberküloz tedavisindeki en önemli sorun ilaç direncinin oluşmasıdır. Tüberküloz INH, RIF, EMB ve SM gibi majör tüberküloz ilaçları ile yarım asırdır tedavi edilmesine rağmen, tüberküloz ilaç direnci önemli

evrensel bir sorun olarak güncelliğini korumaktadır (65). Tüberküloz olgularının sayıca yüksek olduğu bölgelerde, tüberkülozlu hasta sayısına paralel olarak dirençli tüberküloz olgu sayısında artmaktadır. Bu artışta, verilen tedavi protokollerinin uygunsuzluğu, hastaların ilaçları kullanmada dirençli olmaları, yetersiz tedavi ve takipler, toplumsal sosyo ekonomik düzeydeki dengesizlikler, hastaların yaşadığı coğrafyanın olumsuzlukları, yaş ve cinsiyet farkları, hastalığın epidemiyolojik olarak araştırılmasındaki imkansızlıklar ve tedavinin tecrübeli ekiplerce yapılmaması rol oynamaktadır. Tüberküloz ilaç direnci (ÇİD-TB) değerlendirildiğinde, dünyada en yüksek oranlar Azerbaycan (%22.3), Moldova (%19.4), Ukrayna (%16), Rusya (%15) ve Özbekistan (%14.8) gibi ülkelerde rapor edilmiştir. Direnç oranları Rusya, Kore ve Peru gibi ülkelerde artarken, ABD ve Hong Kong'da azalmaktadır (65). Ülkemizde çoğul ilaça dirençli tüberküloz olgularının prevalansı yeni olgularda %3-5, önceden tedavi görmüş olgularda %15-20 civarında bulunmaktadır. Bu oran Batı Avrupa ülkelerine göre yüksektir(76). Dünyada tüm olgular değerlendirilerek yapılan çalışmalarda rifampisin direnci %6,3 (4.4-7.8), ÇİD-TB %5.3 (%3.9-6.6)'dür.

Tüberküloz sağaltımında en güçlü antitüberküloz ilaç rifampisindir. Rifampisine dirençli kökenlerin %90'dan fazlası aynı zamanda izoniyazid direnci de taşımaktadır. Bu sebeple rifampisin direncinin gösterilmesi ÇİD-TB olgularının tanısı için belirleyici olmaktadır (61,66). Rifampisin yarı sentetik, bakterisidal etkili bir ilaçtır. Rifampisin, bakterinin *DNA*'ya bağımlı *RNA polimeraz* enziminin potent inhibitörüdür. Rifampisin, *RNA polimerazın* β alt ünitesine bağlanarak mRNA sentezini inhibe etmektedir. RIF'e dirençli *M.*

tuberculosis kökenlerinin %95'inden fazlasında dirençten, *RNA polimeraz* enziminin β alt ünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533 kodonlar arasındaki 81 baz çifti) uzunluğundaki yüksek sıklıkta değişken (kor bölgesi) bölgedeki tek nükleotid mutasyonları, küçük delesyonlar ve insersiyonlar sorumludur (62,63,66).

Türkiye'de tek başına rifampisine primer direnç %5-15, sekonder direnç %15-58 olarak saptanmıştır (63).

Ülkemizde 1990-2004 yılları arasında yapılan bir çok çalışmanın ortak sonuçları değerlendirildiğinde, ortalama primer RIF direncin %9.3 ve sekonder RIF direncinin %36.4 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada rifampisine karşı oluşan ilaç direncinin de giderek azaldığı gösterilmiştir.

Ülkemizdeki 1990-2004 yılları arasında bildirilmiş INH ve RIF'e karşı başlangıç ve sekonder direnç oranlarının yıllara göre dağılımı tablo.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Ülkemizde bildirilmiş INH ve RIF'e karşı başlangıç ve sekonder direnç oranlarının yıllara göre dağılımı(64)

YIL	Olgu sayısı (n)	Başlangıç direnci (%)		Sekonder direnç(%)		Kaynak
		INH	RIF	INH	RIF	
1990	952	8.9	6.5	32.8	24.7	Özkara ve ark.
1990 - 95	550	14.5	5.2	40.8	30.2	İlgazlı ve ark.
1992	785	5.1	10.8	30	36.2	Tahaoğlu ve ark.
1993 – 95	295	11.1	6.1	44.2	37.2	Koşar ve ark.
1993-95	2161	8.8	12.5	35.5	38.4	Sevim ve ark.
1994	439	12.4	5.4	45	35.2	Kılıçarslan ve ark.
1994-95	120	4.1	2.5	24.4	45.3	Ortaköylü ve ark.
1995	677	5.9	21.6	30.2	43	Altınbaş ve ark.
1995-97	282	8.2	16.8	32.5	42.4	Oğul ve ark.
1995-97	605	8.4	17.4	34.8	37	Özşahin ve ark.
1999-2000	365	14.8	3.0	-	-	Kartaloğlu ve ark.
1999-2004	385	19.9	4.1	26.1	10.1	Doğan ve ark.
Ortalama		10,2	9,3	34,2	34,6	

Ülkemizde Uçar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 264 ilaç dirençli tüberküloz olgusundan %10.1' inde tek başına rifampisin direncinin olduğunu tespit etmişler. Yine bu çalışmada yıllara göre tüberküloz ilaç direncinin dağılımını incelemişler ve daha önceki çalışmalara paralel olarak tek ilaca direnç oranının giderek azaldığını göstermişlerdir. RIF ilaç direncini 2003'de 12.5, 2004'de 13.2, 2005'de 11.1, 2006'da 8.4 olarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonuçları Tablo 3 de gösterilmiştir (65).

Tablo.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> izolatlarının yıllara göre major anti tüberküloz ilaçlara karşı direnç oranları(65)											
İlaç	2003		2004		2005		2006		Total		p
	(n=88)		(n=114)		(n=341)		(n=548)		(n=1091)		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
INH	12	13.6	16	14	54	15.8	52	9.5	134	12.3	0.038
RİF	11	12.5	15	13.2	38	11.1	46	8.4	110	10.1	0.272
EMB	3	3.4	22	19.3	20	5.9	24	4.4	69	6.3	<0.001
SM	33	37.5	26	22.8	44	12.9	69	12.6	172	15.8	<0.001
İNH + RİF	6	6.8	10	8.8	33	9.7	28	5.1	77	7.05	0.064
İNH-RİF- EMB-SM	3	3.4	6	5.3	10	2.9	13	2.4	32	2.9	0.415
ÇİD-TB	9	10.2	16	14	43	12.6	41	7.5	109	9.98	0.074
En az bir ilaca direnç	41	46.6	40	35.1	82	24	101	18.4	264	24.2	<0.001

DSÖ'nün dünya genelinde 1994-2007 yılları arasındaki ilaç direnç sürveyansı tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Dünya genelinde 1994-2007 yılları arasındaki ilaç direnç sürveyansı (58)

	Rifampisin direnci	ÇİD direnci
Yeni olgularda	% 3.7 (2.8- 4.5)	% 2.9 (2.2-3.6)
Tedavi görmüş olgularda	% 17.5 (11.1-23.9)	% 15.3 (9.6-21.0)
Tüm olgularda	% 6.3 (4.4-7.8)	% 5.3 (3.9-6.6)

Bu tabloya göre rifampisin direnci yeni tüberküloz olgularında %3.7, tedavi görmüş olgularda % 17.5 olarak tespit edilmiştir. İlaç tedavisi alan olgularda her iki (RIF ve ÇİD-TB) direncin, ilaç tedavisi almayanlara göre önemli düzeyde arttığı görülmektedir. Bu artış etkili ve yeterli tüberküloz tedavisinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Ülkemizin yedi farklı bölgesinden 2003-2006 yılları arasında izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının major antitüberküloz ilaçlara direnç oranlarının araştırıldığı çalışmalarda, bölgeler arasında direnç oranlarında farklılıklar gözlenmektedir. Bu yedi farklı bölgede yapılan çalışmalara göre INH için % 4.2–33, RIF için % 1.2–22.6, EMB için %0–18.8, SM için %1.5–29.0, ÇİD–TB için % 3.8–14.7 arasında farklı direnç oranları saptanmıştır (65). Farklı bölgelerin incelendiği bu çalışmaya göre ülkemizde RIF direnci; en fazla % 32.1 oranıyla Akdeniz bölgemizde, en az RIF direnci ise %4.8 oranıyla Güneydoğu Anadolu bölgemizde olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmaya göre ülkemizdeki

ÇİD-TB direnci; en fazla % 39,3 oranıyla Akdeniz bölgemizde, en az ÇİD-TB direnci %4.3 oranıyla Ege bölgemizde olduğu saptanmıştır (65).

Ülkemizdeki major antitüberküloz ilaçlara karşı oluşan direncin bölgelere göre dağılımı tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo-5.: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> izolatlarının bölgelere göre major antitüberküloz ilaçlara karşı direnç oranları															
İlaç	İç Anadolu (n=392)		Karadeniz (n=146)		Ege (n=419)		Akdeniz (n=28)		Marmara (n=20)		Doğu Anadolu (n=64)		Güneydoğu (n=21)		P
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
İNH	48	12.2	30	20.5	33	7.9	9	32.1	4	20	6	9.3	4	19.04	<0.001
RİF	38	9.7	25	17.1	29	6.9	9	32.1	3	15	5	7.8	1	4.8	<0.001
EMB	23	5.9	20	13.7	15	3.6	6	21.4	2	10	3	4.7	0		<0.001
SM	69	17.6	28	19.2	51	12.1	9	32.1	4	20	5	7.8	6	28.6	0.006
İNH-RİF	28	7.1	18	12.3	15	3.6	7	25	3	15	5	7.8	1	4.8	<0.001
İNH- RİF- EMB-SM	13	3.3	8	5.5	3	0.7	4	14.3	1	5	3	4.7	0		<0.001
ÇİD-TB	41	10.4	26	17.8	18	4.3	11	39.3	4	20	8	12.5	1	4.8	<0.001
En az bir ilaç direnç	105	26.8	47	32.2	77	18.4	13	46.4	6	30	7	10.9	9	42.8	<0.001

İNH: İzoniazid, RİF: Rifampisin, EMB: Etambutol, SM: Streptomisin, ÇİD-TB: Çok ilaca dirençli tüberküloz(65)

1999-2002 yılları arasında dünyanın 75 farklı coğrafik bölgesinden hiç tüberküloz tedavisi almamış 55.779 tüberkülozlu olgunun analizi sonrasında, bir

yada daha fazla ilaca karşı direnç oranı %10.2 olduğu belirlenmiş ve en fazla oran Kazakistan'da tespit edilmiştir. Ortalama primer direnç oranları INH için % 5.9, SM için % 6.3, RIF için % 1.4 ve ETB için % 0.8 olarak bulunmuştur. Ortalama ÇİD-TB oranı ise % 1.1 olarak değerlendirilmiştir. Ortalama sekonder direnç oranları INH için %14.4, SM için % 11.4, RIF için % 8.7 ve ETB için % 3.5'dir. Ülkemiz tüberkülozun hafif orta sıklıkta görüldüğü coğrafyada bulunmaktadır. Ülkemizde 2005 yılında yapılan çalışmada her bir tüberküloz ilacı için toplam direnç oranları tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Türkiye'de 2005 yılı ilaç duyarlılık testi çalışılan hastalarda her bir tüberküloz ilacı için toplam direnç sonuçları*

	Yeni hasta (n= 3237)		Tedavi görmüş (n= 508)		Tüm hastalarda (n= 3745)	
	Dirençli	%	Dirençli	%	Dirençli	%
İzoniazid	291	9.0	139	27.4	430	11.5
Rifampisin	144	4.4	107	21.1	251	6.7
Ethambutol**	97	3.0	51	10.0	148	4.0
Streptomisin**	227	7.0	77	15.2	304	8.1
ÇİD (MDR)	101	3.1	90	17.7	191	5.1

** Etambutol için 3 yeni, 1 tedavi görmüş; streptomisin için 1 yeni, 1 tedavi görmüş hastanın ilaç duyarlılık testi sonucu bulunmamaktadır. ÇİD: Çok ilaca dirençli (73).

Tüberküloz enfeksiyonunun yaş ve cinsiyet ile ilişkisi bilinmektedir. Zira hastaların yaklaşık %75'i ekonomik olarak üretken çağları olan 15-25 yaşları

arasındadır ve bir çok coğrafyada tüberküloz oranı erkeklerde kadınlara oranla daha yüksektir.

Bu çalışmada incelenen klinik örneklerin 20 tanesi erkek (%66.66), 10 tanesi kadın (%33.33) hastalara aitti. Hastaların ağırlıklı yaş ortalamalarını 53.22 olarak saptandı. Hastaların yaş dağılımları irdelendiğinde, 13 (%43.333)'ü 30 ve 30 yaş altı, 11 (%36.666)'i 30-60 yaş, 6 (%20)'sı 60 yaş üzerinde olduğu belirlendi ve çoğunluğunun immun sistemin zayıf olduğu yada üretken çağdaki hastalardan oluştuğu görüldü. Çalışmadaki elde edilen bu veriler ülkemizdeki verilerle uyumlu olduğu gözlemlendi.

Tüberkülozda rifampisin direncine sebep olan *rpoB* gen bölgesiyle ilgili mutasyonlar en sık 531, 516, 526 ve 513. kodonlarda gözlenmektedir. RIF dirençli vakaların %34-57'inde *rpoB* geninin 531. kodonundaki Ser 531 Leu mutasyonu saptanmıştır. Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzeyde rifampisin direncine neden olurken; 514, 511, 516, 518, 522, 529 ve 533. kodon mutasyonları genellikle düşük düzeyde mutasyonlardır. Rifampisine düşük düzeyde dirence neden olan mutasyonları bulunduran suşlar, rifabutın ve yeni RIF olan KRM 1648'e duyarlı olabilmektedir (71).

Tüberküloz dünyada en sık Çin ve Hindistanda görülmektedir. Jun Yue, Wei Shi ve arkadaşlarının Çin'de yaptıkları RIF direnciyle ilgili *rpoB* gen çalışmasında, Ser-531 (% 41), His-526 (% 40) ve Asp-516 (% 5) kodonlarda mutasyon tespit etmişler. Yine Ramaswamy ve Musser'in Çin'de yaptıkları çalışmada benzer şekilde 531. kodonda (%41), 526. CAC (His)→GCC(Ala) kodonda (% 36) mutasyon tespit etmişlerdir (62). Çin'de Wang. Y.C, Zhu. R.Y ve

arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada yüksek seviyede en sık *rpoB* gen mutasyon paternini Ser531 Leu (% 55.6) olarak saptamışlar, benzer olarak bu mutasyonun Polonya’da (%37.5), Vietnam’da (%40.4) ve Almanya’da (% 41.7) olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde Manisa’da 2007 yılında Özkütük ve Sürücüoğlu’nun yaptıkları bir çalışmada en sık 531 (%67), 516 (%9) ve 526. (%5) kodonlarda *rpoB* gen mutasyona rastlanmıştır (61). İzmir’de yapılan bir çalışmada RIF dirençli suşlarda 531 (%56.1), 526 (%19.5) ve 516.(%7.3) kodonlarda mutasyon saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada; RIF’a dirençli 227 suşun 216 (%95.2)’sında *rpoB* geninde 8 farklı kodonda 20 farklı nokta mutasyonu, 2 delesyon ve 1 insersiyon tespit edilmiştir (71).

Malatya’daki ÇİD-TB’lu suşlarda yapılan çalışmalarda RIF’e dirençli kökenlerde sırasıyla 531 (%47.6), 516 (%23.8), 526 (%14.3) ve 513. (%14.3) kodonlarda mutasyon belirlenmiştir. 516. kodonda mutasyon saptanan 5 suşun 3’ünde aynı zamanda 527. kodonda, 1’inde 572. kodonlarda da mutasyonlar kaydedilmiştir.

Çavuşoğlu ve arkadaşları Ege Bölgesinden izole edilen 41 rifampisine dirençli *M.tuberculosis* izolatında en sık mutasyonları 531. kodonda(%56.1), 526. kodonda (%19.5) saptamışlar ve en sık görülen aminoasit değişikliğini Ser 531 Leu (%46.3) olarak tespit etmişlerdir (63).

Rifampisin direncini belirleyen *rpoB* geni mutasyonlarının % 95’ini 531 ve 526. kodonlarda görülmektedir. 533. kodondaki mutasyonlar ise dirençte minor rol oynamaktadır (67).

Bu çalışmada tüberküloz oldukları tespit edilen 30 hastaya ait klinik örneklerden elde edilen DNA'larla yapılan dizi analizi sonrasında, 28 olgunun DNA dizilerinde rifampisin direncini gösteren bölgelerde hiç bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak 531. kodonda TCG (ser)→TTG(Leu) ve 526. kodonda CAC(His)→TAC(Tyr) olmak üzere iki tane yüksek düzeyde rifampisin direncine ait mutasyonları gösteren (aminoasit değişikliği) baz dizi farklılıkları tespit edilmiştir. Burada saptanan rifampisin direnç oranı %6.66'dır. Elde edilen sonuçlar, rpoBgen mutasyonlarının % 95'ini oluşturan 531. ve 526. kodonlarla ve ülkemizdeki primer rifampisin direnç oranlarıyla (%5-15) uyumlu olduğu görüldü.

Tüberküloz ilaç direnci saptanan olguların tedavileri zor ve maliyeti yüksektir (duyarlı tüberküloz tedavisininin 100 katı). DSÖ'nün dirençli olgu tedavisinde kullanılmasını önerdiği ikinci kuşak ilaçlar pahalı ve toksik olup, uzun süreli tedavi gerektirmektedir (70). Tüberküloz tedavisindeki gecikmeler hastalığın ilerlemesine, hatalı tedaviler hastanın hayatına mal olmaktadır. Bu nedenle ki hastaların tanısının erken ve doğru konulması, tedavilerinde tecrübesi kanıtlanmış merkezlerce yapılması hayati önem arz etmektedir.

Tüberkülozda ilaç direncinin azaltılmasında tedavideki ve sosyo kültürel düzeydeki olumsuzlukların düzeltilmesi yanında, ilaç direnç çalışmalarına ağırlık verilmesi, direncin epidemiyolojik boyutunun belirlenmesi gerekir.

Moleküler yöntemler *M.tuberculosis*'in hızlı tanısı ve direnç tanımlanmasında önemlidir. DNA dizi analizi rifampisine ilaç direnci ile ilişkili genlerindeki mutasyonların gösterilmesi, tüberküloz hastalığında doğru tedavi

protokollerinin belirlenebilmesi için referans yöntem olarak önerilmektedir.
Tüm Dünyada yaygın olduğu düşünölen çoğul ilaç dirençli olguların tespiti için
yeni çalışmaların yapılmasına DNA dizi analizi katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

- 1- Bulut Y. Trabzon mikobakteri günleri. Moleküler tanı yöntemleri ve yenilikler.2009;16-21
- 2- Özkara, Ş.V. *Tüberküloz Sempozyumu ve VI.Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri*. Dünyada ve Türkiye’de Tüberkülozi.18-21 Ekim.2007;15-21
- 3- Kocagöz T. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.Topçu A. W. , Söyletir. G. , Doğanay. Mikobakterum türlerinin genel özellikleri.3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 2277-2311.
- 4- Özkuyumcu, C, Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakterioloji El Kitabı. Mikobakterium. 2009;76-93.
5. American Thoracic Society.Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases.Am Rev Respir Dis 1981; 123: 343–358.
- 6- Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chemist 2001; 47(5): 809-814.
- 7- Bilgehan H, Klinik mikrobiyolojik tanı. Mycobacteriumlar.4. baskı. İzmir: Fakülteler kitabevi, 2004: 36; 571-594
- 8- Özkara Ş. Klinisyenler için tüberküloz kılavuzu. Iseman.DM.Tüberküloz epidemiyolojisi.1.baskı. Ankara:Nobel Tıp kitabevleri, 2002; 97-125

9- Kılıçarslan Z. Türk Torax derneği Akciğer hastalıkları temel bilgiler. Özlü T, Metintaş M, Ardıç S. Tüberküloz. 1.baskı.Ankara: Başak matbacılık, 2008;323-339

10-Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmoner disease. Med. Clin. N. Am. 1959; 43:273-290.

11- Coville, P. S. ve F. G. Witebsky. 2005. Nocardia and other aerobic actinomycetes, p. 1137-1180. In S. P. Boriello, P. R. Murray, and G. Funke (ed.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology, 10th ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom.

12- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, orozlan S et al. Human immunodeficiency viruses. Science. 1986 may 9; 232(4751):697

13- Chaisson RE, Slutkin G. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis. 1989 Jan; 159(19): 96-100

14- Palmero DJ. Tuberculosis and HIV/AIDS. Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, eds. Tuberculosis 2007.

15- American Thoracic Society. 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J. Respir. Crit. Care Med. Suppl. 156:S1-S25

16- Falkinham, J.O. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9:178-216.

17- Corbett, L. Ve M. Raviglione. 2005. Global burden of tuberculosis: past, present, and future, p. 3-12. In S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and

W. R. Jacobs, Jr.(ed.), Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. ASM Pres, Washington, D. C.

18- Picardeau, M., G. Prod'hom, L. Raskine, M. P. Lepenneç ve V.Vincent. 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J. Clin. Microbiol. 35:25-32.

19- Yamauchi, T., P. Ferrieri ve B. F. Anthony. 1980. The etiology of acute cervical adenitis in children: serological and bacteriological studies. J. Med. Microbiol. 13:37-43.

20- Palomino, J: C., A. M. Obiang, L. Realini, W. M. Meyers ve E Portaels. 1998. Effect of oxygen on growth of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. J. Clin. Microbiol. 36:3420-3422.

21- Yeboah-Manu, D., T. Bodmer, E. Mensah-Quainoo, S. Owusu, D. Ofori-Adjei ve G. Pluschke. 2004. Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. J. Clin. Microbiol. 42: 5875-5876.

22- Portaels, E, K. Chemlal, P. Elsen, P. D. R. Johnson, J. A. Hayman, J. Hibble, R. Kirkwood ve W. M. Meyers. 2001. *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiwot. 20:252-264

23- Rota S. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*: Topçu AW, Söyletir G,Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp; 2002; 1691-1697.

24- Tortoli E, G.Besozzi, C. Lacchini, v. Penati, M.T. Simonetti ve S. Emier.1998.Pulmonary infection due to *M.szulgai*: case report and rewiev of the literature.*Eur.Respir.j*.11:975-977 Kaynak:196

- 25- Sniadack, D. H., S. M. Ostroff, M. A. Karlix, R. W. Smithwick, B. Schwartz, M. A. Sprauer, V. A. Silcox ve R. C. Good. 1993. A nosocomial pseudo outbreak of *Mycobacterium xenopi* due to a contaminated potable water supply: lessons in prevention. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 14:636-641
- 26- Butler, W. R., S. P. O'Connor, M. A. Yakus, R. W. Smithwick, B. B. Plikaytis, C. W. Moss, M. M. Floyd, C. L. Woodley, J. O. Killburn, E S. Vadney ve W. M. Gross. L. 1993. *Mycobacterium celatum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:539-548.
- 27- Koukila-Kahkola, P., L. Paulin, E. Brander, E. Jantzen, M. Eho-Remes ve M. L. Katila. 2000. Characterization of a new isolate of *Mycobacterium shimoidei* from Finland. *J. Med. Microbiol.* 49:937-940.
- 28- Smith, D. S., P. Lindholm-Levy, G. A. Huitt, L. B. Heifets ve J. L. Cook. 2000. *Mycobacterium terrae*: case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. *Clin. Infect. Dis.* 30:444-453.
- 29- Rota S. Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel Tıp; 2008; 2302-2311
- 30- Beam, E. R. ve G. P. Kubica. 1968. Stimulatory effects of carbon dioxide on the primary isolation of tubercle bacilli on agar containing medium. *Am. J. Clin. Pathol.* 50: 395-397.
- 31- Dhillon, S. S. ve C. Watanakunakom. 2000. Lady Windermere syndrome: middle lobe bronchiectasis and *Mycobacterium avium* complex infection due to voluntary cough suppression. *Clin. Infect. Dis.* 30:572-575.

- 32- Joseph, S., E. Vaichulis ve V. Houk. 1967 Lack of auramine rhodamine fluorescence of Runyon group IV mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95:114-115.
- 33- Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1983; 5:657–679.
- 34- Haas DW. Mycobacterial Diseases, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000. p:2576
- 35- Hernandez-Pando R, Chacon-Salinas R, Serafin-Lopez J, ve Estrada I. Immunology, pathogenesis, virulence. In: Palominoo JC, Leao SC, Ritacco V(eds). *Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care*. Bourcilliercamps.com, Tuberculosis-Textbook.com, 2007. p:157.
- 36- Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: Novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:687.
- 37- Ceyhan İ, “Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı”, Refik Saydam Hızlısıhha Merkezi Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, 2007 Ankara.
- 38- Özyurt M., “Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Kullanılan Moleküler Ticari Tanı Sistemleri”. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
- 39- Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

- 40- Crump, J. A., D.C. Taner, S.Mirrett, C. M. McKnight ve L. B. Reler. 2003. Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 systems for detection of mycobacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 41:1987-1990
- 41- Havlik, J. A., B. Metchock, P. William, S. Fan ve S. Thompson. 1992. Disseminated Myco-bflctenum avium complex infection: clinical identification and epidemiologic trends. *J. Infect. Dis.* 165:577-580.
- 42- Kent, P. T. ve G. P. Kubica. 1985. *Public Health Mycobacteriology : a Guide for the Level 111 Laboratory.* U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.
- 43- Metchock BG, Nolte FS. Mycobacterium In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology.* Washington ASM: 1995, 400-437.
- 44- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria In:(Eds.) Koneman EW, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbiology,* Philadelphia, Lipincott; 2006:1090-1124.
- 45- Somoskovi, A., J. E. Hotaling, M. Fitzgerald, D. O'Donnell, L. M. Parsons ve M. Salfinger. 2001. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest* 120:250-257.
- 46- Dixon, J.m.s. ve E.H:Cuthbert.1967.İsolation of tubercul bacilli from uncentrifuged sputum on pyruvic acid medium. *Am.Rev.Respir.Dis.*96: 119-122

- 47- Springer B, Stockman L, Teschner K, Glenn D, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 2296-2303.
- 48- Tsukamura M. Relationship between photochromogenicity and test temperature in Mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1981; 14: 225-226.
- 49- Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: The new Mycobacteria of the 1990's. *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16 (2): 319 - 354.
- 50- Saniç A. IV. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kursu. Durmaz R. Mycobacterium tuberculosisde direnç ve patogenezin araştırılmasında moleküler yöntemlerin yeri. Malatya, 3-7 eylül 2007;163-177
- 51- Sarıbaş Z, Haşçelik G. Trabzon mikobakteri günleri. Rutin tanıda hangi yöntemleri seçelim. 2009; 138-141
- 52- Çetin.M , Günaydın. M, Saniç. A. Mycobacterium Tuberculosis Kompleksinde izoniyazid ve rifampisin direncinin real-time PCR ile hızlı tanısı ANKEM Derg 2008;22(1):32-36
- 53- Sepkowitz KA, Raffallı J, Riley L, Timothy E et al. Tuberculosis in the AIDS Era. *Clin Microb Rev* 1995; 8: 180-199.
- 54- Murray P, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (Ed). Mycobacterium. In *Medical Microbiology*. St Louis, Missouri, 2002, 366-377.
- 55- Kısa Ö. Trabzon mikobakteri günleri .İmmunoserolojik tanı yöntemleri. 2009;23-27

56- Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S, Bekiroglu N. Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A media for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in laboratories with A high prevalence of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:314–317.

57- Kıyan M: Mycobacteriaceae.Ustaçelebi Ş, CengizTA (Eds).Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara.1999; 419-456.

58-Özkara Ş. Trabzon mikobakteri günleri.Dünyada ve Türkiyede ilaç direnci; ilaç direnci olan hastaya yaklaşım.2009;61-65

59- Isenberg, H. D., R.F. D' Amato, L. Heifets, P. R. Murray, M. Scardamaglia, M. C. Jacobs, P. Alperstein ve A.Niles. 1991. Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. J. Clin.Microbiol. 29:1719-1722.

60- Pfyner, G. E., C. Cieslak, H. M. Welscher, P. Kissling ve S. Rüsç-Gerdes. 1997. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimen by using the automated BACTEC 9000 MB System and comparison with radiometric and solid culture systems. J. Clin.Microbiol. 35: 2229-2234.

61- Özkütük .N, Sürücüoğlu .S, Biçmen .C, Gazi .H, Kurutepe .S, değerli .K, Ecemiş .Manisada izole edilen rifampisine dirençli M.tuberculosis kökenlerin moleküler epidemiyolojisi İnfeksiyon Dergisi (*Turkish Journal of Infection*) 2008; 22 (1): 35-41

62) Yue J, Shi. W, Xie J. Li Y, Zeng .E, and Wangl. H Mutations in the rpoB Gene of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from China journal of clinical microbiology, May 2003, p. 2209–2212

- 63) Tansel. Ö. Antitüberküloz ilaçlara karşı direnç mekanizmaları ve Türkiye'deki durum . Klimik2003XI. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi
- 64) Doğan.Ö.T, Özşahin S.L, Kaya. S, Bakıcı. M.Z, Yıldız A.I Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'nde 1999 Yılından İtibaren Takip Edilen Ardışık 385 Olguda Anti Tüberküloz İlaç Direnci C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 26 (2): 81 – 84, 2004
- 65) Uçar.E, Kılıç.A, Ceyhan. İ, Yılmaz. S, Kılıç. S, Tahran. G. Ülkemizin yedi farklı bölgesinden 2003 – 2006 yılları arası izole edilen M.tuberculosis suşlarının major antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Mikrobiyoloji bul. 2010; 44: 11 – 19
- 66) Hauck1.Y, Fabre.M, Vergnaud1.G, Soler.C and Pourcell. C Comparison of two commercial assays for the characterization of rpoB mutations in Mycobacterium tuberculosis and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published June 11, 2009
- 67) Wang.Y.C, Zhu. R.Y, Xu.Y.Y, Zhao.M.Q, Liu. Y.H , Li.B and Chen.J.D Molecular characterization of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* Guangdong, China. Jpn. J.Infect. Dis, 62, 272-274, 2009
- 68) Ersoz. G. “Çok İlaç Dirençli Tüberküloz Epidemiyolojisi”. Ekmud 2. Kongresi, 2008 Sf: 103-107
- 69) Dündar.D, Sönmez.G, Mycobacterium tuberculosis Kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları, XIV. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (25-29 Mart 2009,
- 70) Durmaz.R, Mycobacterium tuberculosisde direnç sorunu, ANKEM Derg 2005;19(2):107-110.

71) Durmaz.R,Çoklu dirençli tüberkülozda direncin belirlenmesinde laboratuvar tanı, 2. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu, 11-14 Mart 2009, Ankara

72) Yüce A, Şener A. T.Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.Topçu A. W. , Söyletir. G.,Doğanay.Akciğer Tüberkülozu. 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008;832-859

73) Öztoprak.N,Türkiye'deki ve Dünya'daki ÇİD-TB Direnci, 2. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu, 11-14 Mart 2009, Ankara

74) Herrera L, Jimenes S, Valverde A, Garcia Avanda MA, Saez-Nieto JA. Molecular analysis of rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolated in Spain (1996-2001) Description of new mutations in the rpoB gene and review of the literature.İnternational journal of antimicrobial agents 21 (2003) 403-408.

75) Bostanabad S Z, Bahrmand A, Titovi L, Taghikhanı M. Identification of mutations in the *rpoB* encoding the RNA polymerase Betasubunit in rifampicine-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Iran Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2007; 55(4): 370-377

76) Kılıçarslan Z. Dünyada ve Türkiyede tüberküloz. ANKEM Derg 2007;21(Ek 2):76-80.

ÖZET

Tarihin en eski hastalıklarından biri olan tüberkülozun tedavisinde etkili ilaçların kullanılmasına rağmen günümüzde tedavideki başarısızlıkların temelinde, tüberkülozda uygulanan tedavi protokollerinin yanlışlığı ve ilaçlara karşı direnç gelişimi yatmaktadır.

Tüberkülozda ilaç direnci, dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunudur. İlaç direnci, yanlış tedavi sonrası oluşabileceği gibi, dirençli hastaların enfeksiyonu çevrelerine bulaştırmaları sonucu meydana gelmektedir.

Rifampisin ve izoniyazid, tüberküloz tedavisinde birincil olarak kullanılan ve tedavide en etkili ilaçlardır. RİF dirençli olguların yaklaşık olarak %90'ı INH direnciyle birlikte ve bu nedenle RIF direnci çoğul ilaç direnci de tanımlamaktadır.

Bu çalışmada kültürü ve direk mikroskopisi pozitif olarak tespit edilen 20'si erkek (%66.66), 10'u kadın (%33.33) olmak üzere 30 klinik örneğin kültürlerinden DNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen DNA'ların DNA dizi analizi ile baz dizileri belirlendi. Veriler uluslararası gen bankalarındaki rifampisine direnç oluşturan gen bölgelerine ait baz dizileriyle karşılaştırıldığında rifampisin direnciyle ilgili mutasyonların görüldüğü (507-533 kodon) kodonlardan 531.kodonda TCG (Ser) → TTG (Leu) mutasyonu (aminoasit değişimi) ve 526. kodonda CAC(His) → TAC(Tyr) mutasyonu (aminoasit değişimi) olmak üzere toplam 30 tane olgudan iki (%6.66) olguda

RIF direnci saptandı. Bu verilerle ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda elde edilen RIF direnç verileri kıyaslandığında oranlar daha düşük seviyede olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin çalışılan hastaların primer tüberküloz hasta grubu olduğu düşünülmektedir.

Hızlı tanı ve ilaç direnci ile ilgili mutasyonlarının saptanmasında moleküler yöntemler önemlidir. Moleküler yöntemlerden DNA dizi analizinin *M.tuberculosis*'in tür düzeyinde tanımlanmasında, etkili tedavi protokollerinin oluşturulmasında, RIF direncini oluşturan mutasyonların hızlı olarak tespitinde yararlı olacağı düşünülmektedir. Tüm dünyada yaygın olduğu düşünülen ÇİD-TB olgularının tespiti için de yeni çalışmaların yapılmasına DNA dizi analizi katkı sağlayacaktır.

SUMMARY

Although the use of the effective drugs in the treatment of tuberculosis which is one of the oldest diseases in history, nowadays the main reasons of the failure of tuberculosis treatments are the false treatment protocols and the development of drug resistance.

The drug resistance in tuberculosis is a major public health problem in our country as in the world. It may occur whether as a result of false treatment or the contamination of the infection through resistant patients to people around them.

Rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) are the primary and most effective drugs used in the treatment of tuberculosis. Approximately 90 % of RIF-resistant cases also show resistance to INH. Because of this reason RIF-resistance is also defined as multi-drug resistance.

In this study, DNA isolations were performed from cultures of the 30 patients [(20 males (66,66%) and 10 females (33,33%)] whose direct microscopies and cultures were positive. After DNA was obtained, base sequences were determined by DNA sequence analysis. Our data were compared with the international gene bank data concerning base sequences which are responsible for rifampicin resistance. According to these data mutations causing rifampicin resistance occur between the codons of 507 and 533. In our study, in 2 of 30 cases (6,66%) mutations related rifampicin resistance were identified. One mutation was in 531th codon (TCG(ser) →TTG(leu)/aminoacid change) and the other was in 526th codon (CAC(His) →TAC (Tyr) / amino acid change). As we compare our rifampicin resistance ratio (6,66%) with other studies in Turkey, our

result seems to be lower. The reason of the lowest resistance ration in our study is thought to be the patients included who all have primary tuberculosis.

Molecular methods are important for rapid diagnosis and determination of drug resistance related to mutations. DNA sequence analysis which is one of the molecular methods is thought to be useful in the identification of *M.tuberculosis* at the species level, in the determination of the effective treatment protocols and in rapid diagnosis of rifampicin resistant mutations. It will also contribute to new studies for the detection of MDR-TB cases that are believed to be widespread all over the world.

EKLER

1-Tablolar

Tablo 1: PCR’da kullanılan primer çiftlerinin dizileri, uzunlukları ve birleşme sıcaklıkları

Tablo 2: Ülkemizde bildirilmiş INH ve RIF’e karşı başlangıç ve sekonder direnç oranlarının yıllara göre dağılımı

Tablo 3. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının yıllara göre major anti tüberküloz ilaçlara karşı direnç oranları

Tablo 4: Dünya genelinde 1994-2007 yılları arasındaki ilaç direnç sürveyansı

Tablo-5. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının bölgelere göre major antitüberküloz ilaçlara karşı direnç oranları

Tablo 6. Türkiye’de 2005 yılı ilaç duyarlılık testi çalışılan hastalarda her bir tüberküloz ilacı için toplam direnç sonuçları

2-Şekiller

Şekil 1: Lowenstein Jensen besiyerinde üreyen *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Rifampisine duyarlı) ve H37Rv (Rifampisine dirençli) referans suşlarının görünümü

Şekil 2: *M. tuberculosis* suşlarının LA1-2 primerleri ile çoğaltılan 1017 bp'lik ve rpoB 101 F-R primerleri ile çoğaltılan 411 bp'lik DNA'nın, agaroz jel görüntüleri

Şekil 3: *M. tuberculosis* suşlarının 411 bp'lik rpoB gen bölgesinin PZR sonrası agaroz jelde bant görüntüleri

Şekil - 4: *M. tuberculosis* suşlarında rpoB gen bölgesinde 531. kodonda TCG (Ser) → TTG (Leu) değişimi sonucu oluşan mutasyonun gösterilmesi

Şekil 5: *M. tuberculosis* suşlarında rpoB gen bölgesinde 526. kodonda CAC(His) → TAC(Tyr) değişimi sonucu oluşan mutasyonun gösterilmesi

ÖZGEÇMİŞ

Eylül 1963 yılında Kırşehir / B.Durmuşlu Köyünde doğdum

İlk öğrenimimi köyümde tamamladım.

Orta öğrenimimi Kırıkkale’de tamamladıktan sonra 1981 yılında Kırşehir Eğitim Enstitüsü Fen Bilimlerin’de eğitimimi sürdürdüm.

1982 yılında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesin’de tıp eğitimime başladım

1988 yılında mezun oldum.

1988-1990 yıllarında Ağrı / Eleşkirt Devlet Hastanesi

1990-1992 yıllarında Erzurum / Ceylanoğlu S.O

1992-2005 yıllarında Gaziantep Şehitkamil S.O’ı ve Çocuk Hastanesi acil servisinde pratisyen hekim olarak görev yaptım.

2005-Ağustos 2006 yılları arasında Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Anestezi ve Reaminasyon bölümünde araştırma görevlisi olarak çalıştım.

Ağustos-2006’da Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak uzmanlık eğitimine başladım.