



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
İZOLATLARINDA PİRAZİNAMİD DİRENCİNİN HIZLI
TESPİTİNDE KOLORİMETRİK YÖNTEMLERİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ahmet Uğur AKBAL

Samsun
Mayıs-2018



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
İZOLATLARINDA PİRAZİNAMİD DİRENCİNİN HIZLI
TESPİTİNDE KOLORİMETRİK YÖNTEMLERİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ahmet Uğur AKBAL

Danışman
Prof.Dr. Belma DURUPINAR

Samsun
Mayıs-2018

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ahmet Uğur Akbal tarafından Prof. Dr. Belma Durupınar Danışmanlığında hazırlanan “*Mycobacterium Tuberculosis* İzolatlarında Pirazinamid Direncinin Hızlı Tespitinde Kolorimetrik Yöntemlerin Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof.Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisi ile eğitimime katkıda bulunan ve deneyimi ile de bana mükemmel bir örnek olan tez danışmanım Prof. Dr. Belma Durupınar'a çok teşekkür ederim.

Berber yaptığımız çalışmalarda, bana aktardığı bilgi ve deneyimi ile destek veren ve yeni bir bilimsel bakış açısı kazandıran Prof. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim boyunca beni destekleyen ve katkıda bulunan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman Birinci'ye ve anabilim dalı öğretim üyeleri Doç.Dr. Yeliz Tanrıverdi Çaycı'ya, Yrd.Doç.Dr. Kemal Bilgin'e ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Aydın Deveci'ye teşekkür ederim.

Çalışmamızda kullandığımız izolatların sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Can Bıçmen'e ve Doç.Dr. İsmail Ceylan'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen asistan, doktora öğrencisi ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım ile anabilim dalı çalışanlarına ve mikrobiyoloji laboratuvar personeline çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmam sürecinde manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Prof. Dr. Feryal Akbal'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından PYO.TIP.1904.17.006 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARINDA PİRAZİNAMİD DİRENCİNİN HIZLI TESPİTİNDE KOLORİMETRİK YÖNTEMLERİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Amaç: Pirazinamid (PZA), tüberküloz(TB) tedavisinde çok önemli yeri olan primer ilaçlardandır. PZA'nın, *M. tuberculosis*'e sadece asit pH'da etkili olması sebebiyle, duyarlılık testlerinin yapılması diğer antiTB ilaçlara göre daha zordur. Bu nedenle çalışmamızda amacımız kolorimetrik yöntemlerin PZA duyarlılık tespitindeki etkinliklerinin araştırılması ve dirençli izolatlarda *pncA* gen mutasyonlarının tespiti olarak belirlenmiştir.

Materyal ve Metot: Çalışmada 15'i PZA'ya dirençli olmak üzere 30 klinik izolat ve iki referans izolat kullanılmıştır. Bütün izolatların PZA duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 referans yöntemi ile tespit edilmiştir. Kolorimetrik yöntemler olarak REMA (Rezasurin Mikroplate Assay), NRA (Nitrat Redüktaz Assay), MYRT (Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testi) ve KVRT (Kristal Viyole Renksizleştirme Testi) yöntemleri çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca PZA dirençli izolatlarda sekans analiziyle *pncA* genindeki mutasyonlar araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda kolorimetrik yöntemlerin referans yöntemle karşılaştırılmaları sonucunda uyum REMA ve NRA'da %93,3, MYRT'de % 90 ve KVRT'de % 93,3 olarak tespit edilmiştir. Dirençli olan 15 izolatın 13'ünde sekans analiziyle *pncA* gen mutasyonu tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmanın sonucunda, kolorimetrik yöntemlerden alınan sonuçların referans yönteminkilerle yüksek seviyede uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca ucuz ve kolay uygulanabilir yöntemlerdir. Bu sonuçlar, kolorimetrik yöntemlerin PZA duyarlılık tespitinde önemli alternatifler olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İlaç duyarlılığı; Kolorimetrik; Pirazinamid; *pncA*; Tüberküloz

Ahmet Uğur Akbal (Doktora Tezi)
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mayıs-2018

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF COLORIMETRIC METHODS IN QUICK DETERMINATION OF PYRAZINAMID RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATES

Aim: Pyrazinamide (PZA) is a primary drug with an important role in the treatment of tuberculosis (TB). Because of PZA is effective only at acid pH for *M. tuberculosis*, susceptibility tests are more difficult to perform than other anti-TB drugs. For this reason, the purpose of our work was to investigate the effectiveness of colorimetric methods to detect PZA susceptibility and to detect *pncA* gene mutations in resistant isolates.

Material and Method: In the study, 30 clinical isolates and 2 reference isolates were used, 15 of which were resistant to PZA. PZA susceptibility of all isolates were determined by the BACTEC MGIT 960 reference method. As the colorimetric methods, REMA (Resazurin Microplate Assay), NRA (Nitrate Reductase Assay), MGDA (Malachite Green Decolorisation Assay) and CVRT (Crystal Violet Decolorisation Assay) methods were included in the study. Also, mutations in the *pncA* gene were investigated by sequence analysis in PZA resistant isolates.

Results: As a result of comparison of colorimetric methods with the reference method, compliance was determined as 93,3% in REMA and NRA, 90% in MGDA and 93,3% in CVDA. In 13 of 15 resistant isolates *pncA* gene mutation was detected by sequence analysis.

Conclusion: As a result of the work, results from colorimetric methods were found to be at a high level of compliance with the reference method. They are also cheap and easily applicable methods. These results have shown that colorimetric methods can be important alternatives in detecting PZA sensitization.

Keywords: Colorimetric; Drug susceptibility; *pncA*; Pyrazinamide; Tuberculosis

Ahmet Uğur Akbal (Ph. D. Thesis)
Ondokuz Mayıs University - Samsun, May-2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ala	: Alanin
Arg	: Arginin
Asn	: Asparagin
Asp	: Aspartat
°C	: Santigrat derece
Cys	: Sistein
CV	: Kristal viyole
ÇİD-TB	: Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ETM	: Etambutol
Gly	: Glisin
INH	: İzonyazid
KVRT	: Kristal Viyole Renksizleştirme Testi
L	: Litre
Leu	: Lösin
LJ	: Löwenstein Jensen
Lys	: Lizin
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimol
MYRT	: Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testi
NK	: Negatif kontrol
NRA	: Nitrat Redüktaz Assay
NIC	: Nikotinamid
NPD	: Negatif Üretkif Değer
OADC	: Oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz
PCR	: Polimeraz Chain Reaction

pmol	: Pikomol
POA	: Pirazinoik asid
PPD	: Pozitif Prodüktif Değer
Pro	: Prolin
PZA	: Pirazinamid
PZase	: Pirazinamidaz
R	: Dirençli
REMA	: Rezasurin Mikroplate Assay
RIF	: Rifampisin
S	: Duyarlı
Ser	: Serin
sn	: Saniye
TB	: Tüberküloz
Thr	: Treonin
TL	: Türk lirası
Trp	: Triptofan
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromol
ÜK	: Üreme kontrolü
Val	: Valin
YİD-TB	: Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tüberkülozun Tarihçesi	2
2.2. Epidemiyoloji.....	5
2.3. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri	6
2.3.1. Morfolojik Yapıları	6
2.3.2. Hücre Duvarı Yapısı	6
2.3.3. Virülans Faktörleri	7
2.4. Tüberküloz Tanısında Kullanılan Mikrobiyolojik Yöntemler	8
2.5. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan Başlıca İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları.....	8
2.5.1. İzoniazid.....	8
2.5.2. Rifampin ve Diğer Rifamisinler	9
2.5.3. Etambutol	9
2.5.4. Florokinolonlar.....	10
2.6. Tüberküloz Tedavisinde Pirazinamid	10
2.6.1. Tüberküloz Tedavisinde Pirazinamidin önemi	11
2.6.2. Etki mekanizması.....	11
2.6.3. Direnç Mekanizması	14
pncA Mutasyonları.....	14
rpsA Mutasyonları.....	15
panD Mutasyonları.....	15
2.6.4. Dünyada ve Türkiye’de Pirazinamid Direnci	16
2.7. Anti Tüberküloz İlaçlara Karşı Direnç Tespitinde Kullanılan Yöntemler.....	16
2.7.1. Kolorimetrik Yöntemler.....	17

Nitrat Redüktaz Testi (Nitrate Reductase Assay-NRA).....	17
Resazurin Mikrotitrasyon Testi (Resazurin Microtiter Assay-REMA)	18
Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testi (MYRT)	18
Kristal Viyole Renksizleşme Testi (KVRT)	19
2.8. Pirazinamid Direncinin Tespitinde Karşılaşılan Zorluklar ve Nikotinamidin Pirazinamid Direnç Tespitinde Önemi.....	19
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. İzolatların Temin Edilmesi.....	20
3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	23
3.3. Bakteri İnokülasyonlarının Hazırlanması.....	23
3.4. Nikotinamidin Hazırlanması	23
3.5.2. Nitrat Redüktaz Testi (NRA) ile MİK Tespiti	25
3.5.4. Kristal Viyole Renksizleştirme Testi (CVRT) ile MİK Tespiti.....	27
3.6. pncA Gen Mutasyonlarının Dağılımının Tespiti.....	28
3.6.1. DNA Ekstraksiyonu	29
3.6.2. DNA'ların Nanodrop 1000 Spektrofotometre ile Ölçümü.....	30
3.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	30
Kullanılan primerler	30
PCR İşlemi	30
PCR Ürünlerinin Elektroforezi	31
3.6.4. Sekans Analizi.....	32
4. BULGULAR.....	32
4.1. REMA Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri.....	33
4.2. NRA Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri.....	35
4.3. MYRT Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri.....	36
4.4. KVRT Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri	37
4.5. pncA Gen Bölgesi İçin PCR İşlem Sonucu.....	38
4.6. DNA Sekans Analizi	38
4.7. Kullanılan Testlerin Maliyetleri.....	39
5. TARTIŞMA.....	41

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	60



1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis complex*'in en önemli üyesi olan *Mycobacterium tuberculosis*' in sebep olduğu bir infeksiyon hastalığıdır. TB sadece bakteriyal bir infeksiyon hastalığı olmanın ötesinde binlerce yıllık insanlık tarihinde toplumları derinden etkilemiş bir hastalık olup etkisini günümüzde de sürdürmektedir. Kimi zaman “beyaz veba” olarak, kimi zaman “romantik bir hastalık” olarak tanımlanan TB bir dönem ölümlerin başlıca sebebi olmuştur. 20. yy da geliştirilen tedavilerle azalma eğiliminde olsada AIDS'in ortaya çıkması ve dirençli vakaların çoğalması ile toplum sağlığı gündemindeki yerini korumaya devam etmektedir.

Tüberküloz tedavisinde primer ilaç sayısı son derece azdır. Az sayıda olan primer ilaçlara giderek artan oranlarda direnç gelişmesi tedavi seçeneklerini azaltan önemli bir sorundur. Dirençli vakaların erken tespitinin tedavi açısından önemi büyüktür. Pirazinamid (PZA), TB tedavisinde kullanılan primer ilaçlardan birisi olup, tedavi süresini önemli ölçüde azaltan önemli bir ilaçtır. Bu nedenle PZA direncinin erken tespiti tedavi açısından önem taşımaktadır. PZA direnç tespiti için çeşitli yöntemler üzerinde çalışılmakta ise de, uygulama güçlükleri ve maliyet gibi etkenler bu yöntemlerin rutin kullanımını engellemektedir.

Bu çalışmanın planlanma nedeni PZA'nın primer ilaç olarak TB tedavisindeki yeri ve ilişkili olarak direncin erken tespitinin önemidir. Bu bilgilerle çalışmamızın amacı, PZA direncini kolay, ucuz ve güvenilir olan kolorimetrik yöntemlerle saptamak ve etkinliğini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

TB tarih boyunca farklı adlarla anılmıştır. Verem, tükenme hastalığı, beyaz veba (White Plague) bunlardan birkaçıdır. Bazı araştırmacılara göre ilk tüberküloz enfeksiyonunun yaklaşık 9000 yıl önce Afrika'da ortaya çıktığına dair kanıtlar vardır. İnsanlar ve evcil hayvanlarda görülen hastalığın Afrika kumsallarındaki foklar ve deniz aslanları aracılığıyla Atlas Okyanusu üzerinden Güney Amerika'ya taşındığına inanılmaktadır (Hershkovitz ve ark., 2008; Wirth ve ark., 2008). Neolitik Çağ'daki insan kemikleri bakterilerin varlığını göstermektedir. 500.000 yıllık Homo erectus fosilinde tüberküloza özgü lezyonların kanıtlarının olduğuna ilişkin tartışmalı bir iddiada da bulunulmuştur (Roberts ve ark., 2009). Ancak 2014'te bildirilen bir genom araştırmasının sonuçları, tüberkülozun önceden düşünülenenden daha yeni olduğunu düşündürmektedir. Peru'nun güneyinde bulunan 1000 yıllık iskelet kalıntılarında bakterilerin genomlarının yeniden yapılandırılmasıyla yapılan yeni bir DNA araştırmasının sonuçları insan tüberkülozunun 6.000 yaşından daha yeni olduğunu göstermektedir (Hershkovitz ve ark., 2008; Wirth ve ark., 2008). Buna rağmen pek çok araştırmacı tarafından, 9000 yıllık iskeletlerde *Mycobacterium tuberculosis*'in varlığına dair belirtilerin bulunması, TB'un iddia edilenden daha eski bir hastalık olduğunun kanıtı olarak gösterilmektedir (Wirth ve ark., 2008).

Hastalığın belirtileri M.Ö. 3000 ile 2400 yılları arasına tarihlenen Mısır mumyalarında da bulunmuştur (Zink ve ark. 2003). Yine Firavun Akhenaten ve eşi Nefertiti'nin tüberkülozdan öldüğü tahmin edilmektedir. Ayrıca M.Ö. 1500 yıllarında Mısır'da tüberküloz hastanelerinin var olduğunu gösteren kanıtlarda mevcuttur (Madkour ve Warrell, 2004).

Eski Hindistan'da M.Ö. 1500 yıllarındaki Vedalar'da hastalıkla ilgili kayıtlar bulunmaktadır (Zysk, 1998).

Hipokrat'ın notlarında hastalığın (fitizis) belirtileri arasında ateş, renksiz idrar, kalın bir balgama neden olan öksürük ile susuzluk ve iştah kaybı sayılmaktadır. Hipokrat'ın döneminde bu hastalığın ailevi olduğuna inanılmaktaydı (Hippocrates, M.Ö. 400). Galen, akciğerlerde oluşan tüberküllerin tarifini yapmış ve bir dizi tedavi önerisinde bulunmuştur (Mc Clelland, 1909). Aretaeus ise hastalığın belirtilerini, "De causis et signis diuturnorum morborum" adlı metninde tanımlayan ilk kişidir. Ayrıca

yüksek irtifalı yerlere seyahat etmeyi, deniz yoluyla seyahat etmeyi, iyi bir diyetle beslenmeyi ve bol miktarda süt içmeyi önermiştir (Aretaeus, M.S. 1.yy).

Ortaçağda, tüberküloz konusunda önemli bir ilerleme kaydedilmemiştir. İbni Sina (Avicenna) ve El-Razi (Rhazes), hastalığın hem bulaşıcı hem de tedavisinin zor olduğuna inanmışlardır. Hristiyanlığın yayılmasıyla, Avrupa'da kutsal kişi olarak kabul edilen kralların dokunuşunun hastalığı iyileştirdiği düşünülmüş ve farklı ülkelerde farklı ritüeller geliştirilmiştir. 18 yy'a kadar bu inanış Avrupa'da gündemde kalmıştır (Maulitz ve Maulitz, 1973).

İtalyan doktor, filozof, matematikçi, coğrafyacı, astronom ve şair Girolamo Fracastoro (1476-1553) hastalığın bir virüsle yayıldığını iddia eden ilk kişidir. Ayrıca virüsün hastalığa maruz kalanlarda iki ya da üç yıl süreyle canlı kalabileceği ve çoğunlukla doğrudan temas veya enfekte kişinin boşaltım sıvıları yoluyla bulaşabileceğini öne sürmüştür (Brock, 1999). Alman doktor Franciscus Sylvius (1614-1672), bazı cilt ülserlerinin fitiziste görülen tüberküllere benzediğini fark ederek çeşitli tüberküloz formları (pulmoner, ganglioner) arasında ayırım yapan ilk kişi olmuştur (Sylvius, 1679). İngiliz doktor Richard Morton (1637–1698) ise, hastalığın gerçek sebebinin tüberküller olduğunu vurgulamıştır (Otis, 1920).

1720'de başka bir İngiliz doktor olan Benjamin Marten (1690–1752) tarafından hastalığın sebebinin, Anton van Leeuwenhoek tarafından 1695'te açıklananlara benzer şekilde, bazı mikroskobik canlılar olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu teorisi 162 yıl boyunca, Robert Koch bunun doğru olduğunu gösterene kadar, tıp çevrelerinde reddedilmiştir (Daniel, 2000).

1768'de Robert Whytt tarafından tüberküloz menenjitinin ilk klinik tanımı yapılmış ve 1779'da, bir İngiliz cerrahı olan Percivall Pott, adını taşıyan vertebra lezyonlarını tanımlamıştır (Whytt, 1768; Aufderheide ve ark., 1998). 1761'de Avusturyalı bir doktor olan Leopold Auenbrugger, tüberküloz teşhisi için, Fransız Jean-Nicolas Corvisart tarafından 1797'de yeniden keşfedilen bir yöntem olan, perküsyon metodunu geliştirmiştir (Daniel, 2000).

Zürihli bir tıp profesörü olan Johann Lukas Schönlein (1793-1864), "Systematik de speziellen Pathologie und Therapie" isimli kitabında hastalığın tanımlanması için "tüberküloz" sözcüğünün kullanılmasını önermiştir (Dubos, 1987).

18. ve 19 yy.'larda tüberküloz, özellikle şehirlerde çalışan işçiler arasında gittikçe yayılarak yaygınlık sıralamasında lepranın yerini almıştır (Aufderheide ve ark., 1998). William Woolcombe'un 1809 da yayınladığı bir çalışmada, 1790 ile 1796 yılları arasında İngiltere'nin Bristol kentinde meydana gelen 1,571 ölümün 683'ünün tüberküloz kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Yoksulluk ve felakete neden olan Sanayi Devrimi, hastalığın yayılması için en uygun ortamı yaratmıştır. 19 yy da Londra'da her 4,2 ölümden birisi tüberküloz sebebiyle olmuştur (Chalke, 1959). Bu yüzyılda tüberküloz "Beyaz Veba" olarak adlandırılmıştır (Madkour ve Warrell, 2004). Bu dönemde tüberkülozun, hastalıktan muzdarip kişilerin duyarlılığının artması ve hastalığın yavaş ilerlemesi sayesinde hastaların hayatlarını düzenleyebilmeleri için zaman kazandırması nedeniyle "iyi bir ölüm" e izin verdiği düşünülmüş ve "Romantik bir hastalık" olarak görülmüştür (Bourdelaı ve Bart, 2006).

19 yy. sonlarına doğru, bilimsel anlayışın ilerlemesiyle tüberkülozun nedeni ve tedavisine dönük olumlu ilerlemeler görülmeye başlanmıştır. Kendisi de tüberküloz sonucu hayatını kaybetmiş olan, stetoskobun kaşifi Fransız doktor René-Théophile-Hyacinthe Laennec (1781–1826), hastalığın kliniği ile ilgili yaptığı çok önemli çalışmalarla, özellikle oksültatif bulgularını ortaya koymuştur (Daniel, 2000).

1869'da Jean Antoine Villemin, insan kadavrasından gelen tüberkülozlu maddeyi laboratuvar tavşanlarına enjekte edip tavşanları enfekte ederek, hastalığın gerçekten bulaşıcı olduğunu göstermiştir (Barnes, 1995).

24 Mart 1882'de, Berlin Fizyoloji Derneği'nde, Robert Koch, hastalığa bulaşıcı bir ajanın neden olduğunu açıklamıştır. Koch hastaların balgamını yeni yöntemle boyamış ve Koch basili olarak adlandırılan *Mycobacterium tuberculosis*'i ilk olarak göstermiştir (Aufderheide ve ark., 1998; Daniel, 2004). 1890'da Koch, bakterilerin saflaştırılmış protein türevi olan tüberkülini geliştirmiştir. Tüberkülinin bağışıklamada etkisiz olduğu kanıtlanmış olsada 1908'de Charles Mantoux tüberküloz tanısında etkin bir intradermal test olduğunu göstermiştir (Magner, 2002; Madkour ve Warrell, 2004).

Pekçok farklı tedavi yönteminin denenmesinden sonra 1944 yılında Albert Schatz, Elizabeth Bugie ve Selman Waksman, *M. tuberculosis*'e karşı ilk etkili antibiyotik olan ve *Streptomyces griseus* tarafından üretilen streptomisini izole etmişlerdir. Tedavide gerçek devrim 1952'de ilk oral antimikobakteriyel ilaç olan isoniazid'in geliştirilmesiyle başlamış olsa da, streptomisinin keşfi genel olarak

tüberküloz çağının başlangıcı olarak kabul edilmektedir. 1970' lerde rifampinin ortaya çıkması, iyileşme sürelerini hızlandırmış ve 1980' lere kadar tüberküloz vakalarının sayısını önemli ölçüde azaltmıştır (Daniel, 2004). İngiliz epidemiyolojisi uzmanı Thomas McKeown, streptomisinle yapılan tedavinin 1948-1971 yılları arasında ölüm oranını % 51 azalttığını göstermiştir. Yeni ilaçların bulunmasının yanı sıra yaşam şartlarının iyileştirilmesi, tıbbi hizmetlere ulaşımın kolaylaşması, hijyen şartlarının ve beslenmenin düzelmesi de hastalıkla mücadele de ilerleme kaydedilmesini sağlayan önemli unsurlardır (McKeown,1976).

2.2. Epidemiyoloji

Tüberküloz dünya genelinde insidansı ve mortalite oranı düşmekte olan bir hastalık olmasına rağmen, halen ölüm nedenleri arasında dokuzuncu sıradadır. 2016 yılına ait tahmini TB hasta sayısı 10.4 milyondur. Bunların % 90'ı yetişkin, % 65'i erkek, % 10'u HIV'li hastalardır. 2016'da 6.3 milyon yeni TB vakası bildirilmiştir. Bunlardan 476.774'i HIV pozitif TB vakalarıdır. TB insidansı her yıl yaklaşık % 2 oranında düşmektedir. Küresel olarak, TB ölüm oranı yıllık bazda yaklaşık % 3 oranında gerilemiştir.

2016'da, HIV negatif TB'lu hastalarda yaklaşık 1.3 milyon ölüm meydana gelmiştir. HIV pozitif TB'lu hastalarda ise, 374.000 ölüm gerçekleşmiştir. TB hastalarının yaklaşık % 16'sı bu hastalık sebebiyle ölmektedir. TB kaynaklı ölümlerin çoğu, erken teşhis ve uygun tedavi ile önlenmektedir. Her yıl milyonlarca insana TB teşhisi konulup başarıyla tedavi edilmesine rağmen tarama ve tedavide hala büyük eksikler mevcuttur.

Çok ilaca dirençli TB vakaları halen tehdit olmaya devam etmektedirler. 2016'da, çok ilaca dirençli 600.000 yeni TB vakası görülmüştür. Bu vakaların % 47'si Hindistan, Çin ve Rusya Federasyonu'ndadır (WHO Global Tuberculosis Report 2017).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 tüberküloz raporuna göre ülkemizde tüberküloz görülme insidansı yüz binde 18'dir. Bu oran 1990 da yüz binde 58; 2009 da ise yüz binde 29 idi (WHO Global Tuberculosis Report 2010; WHO Global Tuberculosis Report 2017).

2.3.Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri

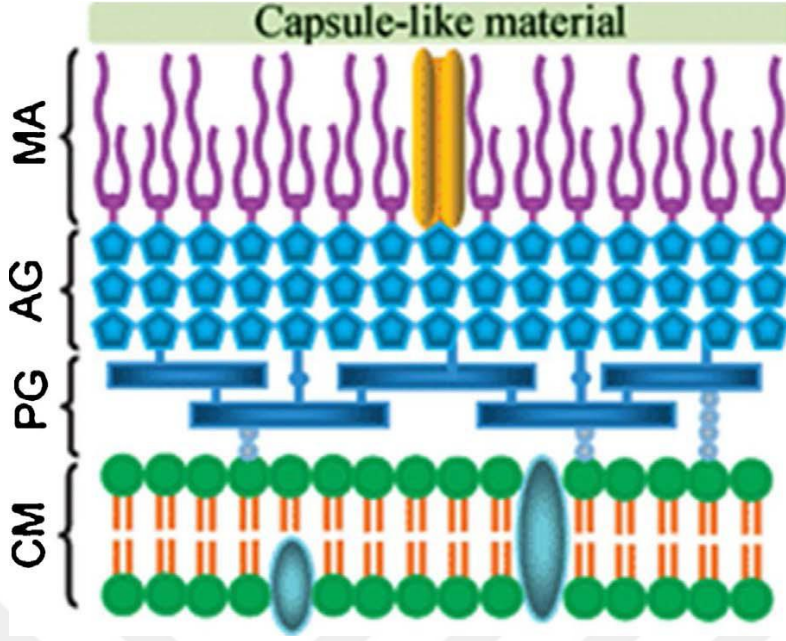
2.3.1.Morfolojik Yapıları

M. tuberculosis, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canneti*, *M. caprea*, *M. pinnipedi* de içeren *M. tuberculosis* kompleksin bir üyesidir (Koneman, 2017). Mikobakteriler *Corynebacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi bakterilerinde yer aldığı *Actinomycetales* sınıfındandır. Mikroskopik olarak düz veya hafif kavisli çubuklar halinde görülen, uzunluğu 1 ila 4 µm ve genişliği 0,3 ila 0,6 µm arasında olan, hareketsiz, sporsuz, zayıf gram pozitif, asite dirençli basillerdir (Sakamoto, 2012). *M. tuberculosis*, optimum koşullarda ortalama 12-24 saatte bir bölünen oldukça yavaş üreyen bir basildir. Neden bu kadar yavaş üredikleri çok iyi anlaşılamamış olsada hücre duvarının geçirgenliğinin az olması nedeniyle besin alımını sınırlandırması ve yavaş RNA sentezi sorumlu tutulmaktadır (Harshey ve Ramakrishnan, 1977; Sakamoto, 2012).

Mikobakteriler, fagositik hücreler, özellikle makrofajlar ve monositlerde çoğalan fakültatif intrasellüler bakterilerdir (Sakamoto, 2012).

2.3.2.Hücre Duvarı Yapısı

M. tuberculosis' in en önemli yapısal özelliği bileşiklere ve ilaçlara karşı olağanüstü güçlü bir bariyer sağlayan, aynı zamanda virulansta önemli rol oynayan, kendine has hücre duvarı yapısıdır (Delogu ve ark., 2013). İç zar çift fosfolipid tabakası ve periplazmik boşluğa uzanan glikolipidleri içerir. Esas hücre duvarı yapısı üç ana bileşenden oluşur: (i) peptidoglikanın çapraz bağlı bir polimeri, (ii) çok dallanmış bir arabinogalaktan polisakkarit ve (iii) uzun zincirli mikolik asitler. Dış membranı oluşturanlar, mikolik asit katmanının arasına giren, nonkovalent bağlı glikofosfolipidler ve balmumu içeren, çözücüyle ekstrakte edilebilen lipidlerdir. Kapsül en dış tabakayı oluşturur ve esas olarak proteinler ve polisakkaritlerden oluşur (Şekil 1). En etkili anti-TB ilaçlarından ikisi olan isoniazid mikolik asitlerin ve etambutol ise arabinogalaktanın sentezini hedeflemekte ve bu durum hücre duvarının önemini vurgulamaktadır (Abrahams ve Besra, 2016).



Şekil 1. *M. tuberculosis* hücre duvarı yapısı (Bhat ve ark.'dan, 2017) MA: Mikolik asit, AG:Arabinogalaktan, PG: Peptidoglikan, CM: Sitoplazmik membran

2.3.3. Virülans Faktörleri

Virülans faktörleri moleküler özelliklerine, işlevlerine veya hücrel lokalizasyonlarına göre kategorilere ayrılmıştır: (i) Kolesterol katabolizmasını içeren lipid ve yağ asidi metabolizması, (ii) Hücre duvarı proteinlerini, lipoproteinleri ve sekresyon sistemlerini içeren hücre zarf proteinleri, (iii) Oksidatif ve nitroztatif strese yanıtta sorumlu olanlar, fagosomu durduranlar ve apoptozu inhibe edenlerin dahil olduğu makrofajın antimikrobiyal etkilerini inhibe eden proteinler, (iv) Protein kinazlar, (v) Metalloproteazları da içeren proteazlar, (vi) Metal taşıyıcı proteinler, (vii) İki bileşenli sistemler, sigma faktörleri ve diğer transkripsiyonel düzenleyiciler de dahil olmak üzere gen ekspresyon düzenleyicileri, (viii) PE ve PE_PGRS aileleri de dahil olmak üzere, fonksiyonları bilinmeyen proteinler, (ix) Diğer virülans faktörleri (Forrellad ve ark.,2013).

M. tuberculosis bakteriyel patojenler arasında, hücre yüzeyinde çok sayıda karmaşık lipidler ve lipoglikanlar sergilediği için benzersizdir. Sahip olduğu bu özel hücre duvarı lipidlerinin patogeneze önemli bir rol oynadığı bilinmektedir; Bu nedenle, biosentezinden, parçalanmasından ve taşınmasından sorumlu genler, ilaç tasarımı için yeni hedefler sunan potansiyel virülans faktörleridir (Converse ve ark., 2003; Forrellad ve ark.,2013).

2.4. Tüberküloz Tanısında Kullanılan Mikrobiyolojik Yöntemler

M. tuberculosis'in mevcut teşhis yöntemlerinin bazılarının temelleri 19 yy.'a uzanmaktadır. Bu yöntemler genellikle basilin mikroskop altında tespitine dayanır (Oommen ve Banaji, 2017). Ancak erken teşhisin hastalığın mortalitesinde ciddi azalmaya sebep olması yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Halen kullanılan teşhis yöntemleri iki grupta toplanabilir:

- Aktif olarak çoğalan basillerin doğrudan tespitine dayalı direk yöntemler
- Basile karşı oluşan immün cevabın tespitine dayalı indirekt yöntemler.

Direk tespit yöntemleri olarak mikroskopi (EZN boyama, kinyon boyama, florokrom boyama), manuel kültür yöntemleri (Löwenstein Jensen, Middlebrook 7H9,7H10,7H11 besiyerlerine dayanan), otomatize kültür yöntemleri (MGİT 960, Bact/Alert), antijen tespiti ve nükleik asit saptama (Genexpert) sayılabilir.

Dolaylı tarama yöntemleri arasında ise bağışıklık cevabının saptanmasına dayanan tüberkülin cilt testi (TST) ve interferon-gama salınım testleri (IGRAs) bulunur.

Diğer yeni ve deneysel yöntemler arasında, uçucu organik bileşiklerin (VOCs) tespiti ve beta-laktamaz tespiti bulunmaktadır (Oommen ve Banaji, 2017).

2.5. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan Başlıca İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları

2.5.1. İsoniazid

1952'de klinik aktivitesi tanımlanan izoniazid (izonikotinic asit hidrazid, INH) günümüzde en sık kullanılan antitüberküloz ilaçtır (Robitzek ve Selikoff, 1952). Bir piridin halkası ve bir hidrazid grubundan oluşur. Önemli bakterisit aktivitesi nedeniyle, son 20 yılda artan sıklıkta direnç bildirilmiş olmasına rağmen, birinci basamak TB tedavi rejimlerinde yer alan çok önemli bir primer ilaçtır (Kolyva ve Karakousis, 2012).

INH, *M. tuberculosis*'in katG geni tarafından düzenlenen katalaz peroksidaz enziminin oksidatif aktivasyonunu gerektiren bir ön ilaçtır (Zhang ve ark., 1992). İlacın aktif hali, yağ asidi uzaması için gerekli olan yağ asit sentaz II sisteminin bir bileşeni olan NADH bağımlı enoil asil taşıyıcı protein (ACP) redüktazı inhA'ya bağlanarak inhibe eder. Böylece mikobakteri hücresinin duvarının temel bileşeni olan mikolik asit sentezi inhibe edilmiş olur (Banerjee ve ark., 1994; Quemard ve ark., 1995).

INH'de görülen direncin en sık sebebi inhA ve katG genlerinde görülen mutasyonlardır. katG'deki mutasyonla katalaz-peroksidazın ön ilacı aktive etme

kabiliyeti azaltılır (Marttila ve ark., 1998; Abate ve ark., 2001). inhA'daki mutasyonlar enzimin NADH'ye olan afinitesinin azalmasına neden olabilir (Musser ve ark., 1996; Basso ve ark., 1998). ndh, kasA ve ahpC genlerindeki mutasyonlar da dirençten sorumlu tutulmuşlardır. Ancak, INH dirençli tüm izolatların yaklaşık dörtte birinde bahsedilen genlerin herhangi birinde mutasyon tespit edilememiştir (Karakousis 2009).

2.5.2.Rifampin ve Diğer Rifamisinler

Rifamisinler bir İtalyan antibiyotik programının parçası olarak ilk defa 1957'de *Amycolatopsis mediterranei*'den izole edilmiştir (Sensi, 1983). Tüberküloz tedavi rejimine dahil edilmesiyle tedavi süresi 18 aydan 9 aya düşürülmüştür. Rifampin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve TB tedavisinde en yaygın kullanılan rifamisindir (Kolyva ve Karakousis, 2012).

Rifamisinler, lipofilik yapıları sebebiyle *M. tuberculosis* hücre zarından kolayca geçebilirler (Wade ve Zhang, 2004). Rifampin'in mikobakterileri, DNA'ya bağlı RNA polimeraza yüksek afinite ile bağlanıp transkripsiyonu inhibe ederek öldürdüğü düşünülmektedir. Ancak bu mekanizmanın ayrıntıları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Kolyva ve Karakousis, 2012).

M. tuberculosis'de INH monoresistans nispeten yaygın olmasına rağmen, tek başına rifampin direnci nadirdir ve rifampine dirençli izolatların % 90'dan fazlası aynı zamanda INH'e dirençlidir.

M. tuberculosis'de rifampine direnç 10^{-7} - 10^{-8} sıklığında görülmektedir ve genellikle RNA polimerazın alt birimlerini kodlayan rpoB genindeki tek nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Telenti ve ark., 1993). Bununla birlikte, rifampine dirençli izolatların küçük bir yüzdesi (<% 5), rpoB geninde herhangi bir mutasyon içermez. Bunlarda RNA polimerazın diğer alt ünitelerinde bir mutasyon olabileceği ya da direncin rifampin geçirgenliğindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Musser, 1995)

2.5.3.Etambutol

1961 yılında anti TB etkisi tespit edilen etambutol (EMB; dextro-2,2,6,6-tetraamino-3,4-dihidro-2H-1,2,4-triazin-3-ol) duyarlı TB vakalarında INH, RIF ve PZA ile birlikte kullanılmaktadır. EMB, öncelikli olarak aktif olarak çoğalan basili öldürür, sterilize edici etkisi ise zayıftır (Kolyva ve Karakousis, 2012).

EMB, hücre duvarı arabinan polimerizasyonunu inhibe ederek arabinogalaktan biyosentezi yolağını inhibe eder (Mikusova ve ark., 1995). Ayrıca RNA metabolizması, mikolik asitlerin hücre duvarı içine aktarılması, fosfolipid sentezi ve spermidin biyosentezi de dahil olmak üzere birçok diğer hücreysel yolağı da inhibe ettiğı gösterilmiştir (Kolyva ve Karakousis, 2012).

M. tuberculosis'de EMB'ye karşı gelişen direnç, genellikle embCAB operonundaki nokta mutasyonları ile ilişkilidir (Belanger ve ark., 1996). EMB' ye dirençli klinik izolatların çoğunda embB geninde mutasyonlar saptanır (Sreevatsan ve ark.,1997; Telenti ve ark., 1997; Ramaswamy). EMB direncinden sorumlu diğer mutasyonlar, rmlD, rmlA2 ve Rv0340 genlerindeki mutasyonlardır (Kolyva ve Karakousis, 2012). EMB'ye dirençli *M. tuberculosis* izolatlarının dörtte birinde, yukarıda tanımlanan genlerde mutasyonlara rastlanmaması, alternatif EMB direnç mekanizmalarını düşündürmektedir (Kolyva ve Karakousis, 2012).

2.5.4.Florokinolonlar

Florokinolonlar (moksifloksasin, gatifloksasin, sparfloksasin, levofloksasin, ofloksasin ve siprofloksasin), *M. tuberculosis*'e karşı mükemmel aktiviteye sahip bakterisidal antibiyotikler olup, günümüzde TB tedavisinde sekonder ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar.

Ayrıca yeni nesil florokinolonlar da (moksifloksasin, gatifloksasin) TB tedavisinin süresini kısaltmak amacıyla klinik olarak değerlendirilmektedirler (Kolyva ve Karakousis, 2012).

Florokinolonlar gyrA ve gyrB genleri tarafından kodlanan DNA giraz enzimini inhibe ederek etki ederler (Drlica ve Malik, 2003; Kolyva ve Karakousis, 2012).

M. tuberculosis'teki florokinolon direnci, en yaygın olarak, DNA giraz ile etkileşimde bulunan gyrA ve gyrB'nin kinolon direnci belirleyici bölgesi olan QRDR' deki mutasyonlar ile ilişkilidir (Ginsburg ve ark., 2003)

2.6. Tüberküloz Tedavisinde Pirazinamid

PZA bir nikotinamid analogu olup, 1936 yılında kimyasal olarak sentezlenmiş (Dalmer ve ark., 1936) ve 1952 yılında tüberküloz üzerine etkinliğı gösterilmiştir (Yeager ve ark., 1952). PZA 1970'lerden önce genellikle sekonder ilaç olarak ilaca dirençli veya tekrarlayan TB vakalarında kullanılmıştır. Bunda uzun süreli yüksek doz da kullanımının (3g/gün) hepatotoksisiteye sebep olmasının rolü vardır (Ying ve

ark.,2013). Ancak yapılan çalışmalarda, INH ile kombinasyonlarının yüksek seviyede sterilizasyonu sağladığı görülmüştür (Mc Cune ve Tompsett, 1956). Ayrıca düşük doz PZA ile yapılan çalışmalarda (1,5-2,0 g/gün) ciddi bir hepatotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Ying ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda PZA'nın neredeyse RIF kadar bakteri öldürücü olduğu ve PZA-RIF kombinasyonunun sinerjik etki göstererek tedavi süresini kısalttığı belirlenmiştir (Fox ve ark., 1999).

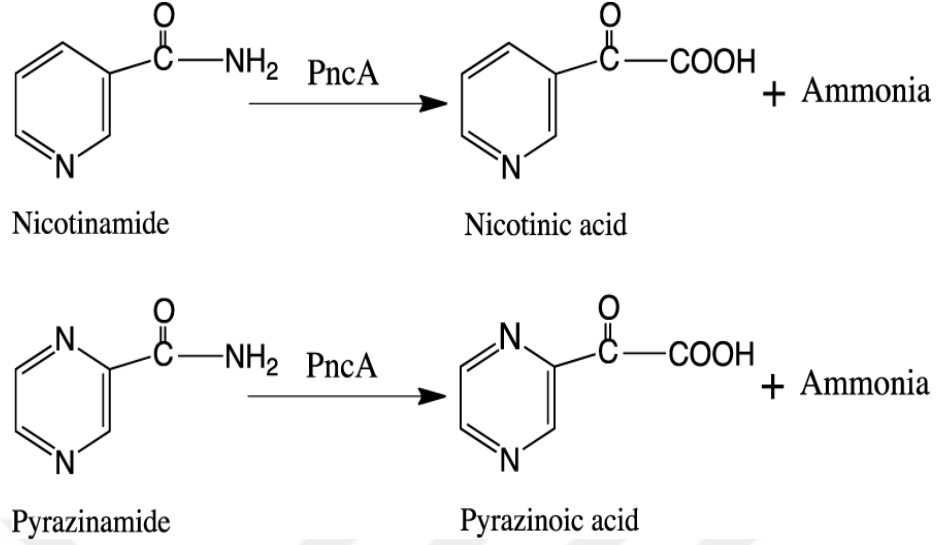
2.6.1.Tüberküloz Tedavisinde Pirazinamidin Önemi

PZA, TB tedavi sürecini 12 aydan 6 aya kadar düşürebilen önemli bir ilaçtır (British Thoracic and Tuberculosis Association, 1976; British Thoracic Association, 1982; Fox ve ark., 1999; Ying ve ark., 2013). Tedavi rejimlerine girdiğinden bu yana RIF, INH ve ETM ile birlikte TB tedavisinin vazgeçilmez primer ilacı olmaya devam etmektedir (Tasneen, 2011; WHO, 2011).

PZA, 6 aylık tedavinin ilk iki aylık yoğun fazında kullanılır. İki aydan uzun süre PZA verildiğinde ek fayda sağlamaz (Fox ve ark., 1999). Bunun sebebinin lezyonlarda oluşan asidik ortamın iki ay sonra azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Fox ve ark., 1999; Ying ve ark., 2013).

2.6.2.Etki Mekanizması

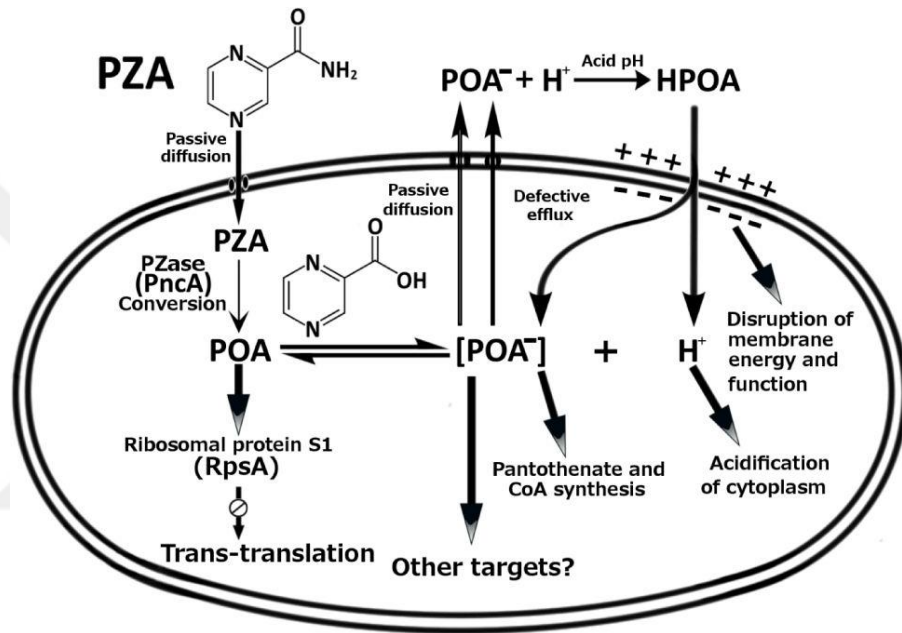
PZA, 70 yıldan uzun bir süredir kullanılmasına rağmen antiTB ilaçlar arasında etki mekanizması en az anlaşılanlardan birisidir (Zhang ve Mitchison, 2003). PZA'nın, diğer antibakteriyellerin aksine, çoğalan bakterilere değil çoğalmayan bakterilere etkili olması sentezlendiği ilk yıllardan bu yana klinisyenleri şaşkırtan bir ilaç olmasına neden olmuştur (Zhang ve ark., 2002; Hu ve ark., 2006). Ancak yapılan tüm çalışmalarda yüksek seviyede sterilizasyon etkisine rağmen, PZA nötr pH'da etkili olmayan bir ilaçtır. PZA asid pH'da (pH 5,5) ve sadece *M tuberculosis*'e etkilidir. Ayrıca, diğer TB ilaçlarının aksine, PZA'nın aktivitesi metabolik aktivitenin azalmasıyla artar (Tarshis ve Weed, 1953; Mc Dermott ve Tompsett, 1954; Mc Cune ve Tompsett, 1956; Mc Cune ve ark., 1956; Mitchison, 1985; Heifets ve Lindholm-Levy, 1990). Tedavi süresini kısaltmasının nedeni, asid ortamda lezyondaki bakterilere karşı yüksek sterilizasyon etkisine sahip olmasıdır (Mc Cune ve ark., 1966a; Mc Cune ve ark., 1966b). PZA, *M.tuberculosis*'deki *pncA* geni tarafından kodlanan pyrazinamidase (PZase)/nicotinamidase enzimi ile aktif formu olan pirazinoik aside (POA) dönüştürülen bir ön ilaçtır (Şekil 2) (Scorpio ve Zhang, 1996).



Şekil 2. Pirazinamid ve nikotinamid'in moleküler yapısı (Scorpio ve Zhang'den, 1996)

PZA'nın etki mekanizması Şekil 3'de görülmektedir (Zhang ve Mitchison, 2003; Zhang ve Wade, 2003). PZA, pasif difüzyon yoluyla basilin içine girer ve pncA tarafından kodlanan sitoplazmik PZase ile POA'e dönüştürülür. Daha sonra POA pasif difüzyon ve yetersiz bir efflux mekanizması yoluyla hücre dışına çıkarılır. POA hücre dışına çıkınca, eğer hücre dışı pH asidik (ör. PH 5.5) ise, POA'in küçük bir kısmı membrandan kolaylıkla geçebilen protonlanmış asit HPOA haline dönüşecektir. Asidik ortamla kolaylaştırılmış olan POA akışı, zayıf POA atılımının üstesinden gelerek, *M. tuberculosis* hücrelerinde POA birikimini sağlar. HPOA, protonları hücreye getirerek sitoplazmik asidifikasyona neden olabilir (Zhang ve ark., 1999). Buna ek olarak, POA, protonları hareket ettirici kuvveti çökerterek hücre membranının enerjisini keser ve bu yolla membran transportunu etkileyerek protein ve RNA sentezini inhibe eder (Zhang ve ark., 2003). Nötr pH'da *M. tuberculosis* içinde az miktarda POA bulunur. Çünkü POA'nın % 99,9'undan fazlası yüklü anyon formundadır ve hücrelere kolayca giremez ve hücrelerin dışında kalır (Zhang ve ark. 1999; Zhang ve ark. 2002). Bu gözlem, PZA'nın neden asidik pH'da etkili olduğunu ve PZA'nın MİK değeri ile asidik pH değeri arasındaki ilişkiyi açıklar (McDermott ve Tompsett, 1954). Asidik pH sadece POA'in hücre içine girişini ve birikmesini sağlamakla kalmaz aynı zamanda membran potansiyelini azaltır ve ilaç etkisi için gerekli olan çoğalma ve metabolizmanın inhibisyonunu sağlar (Zhang ve ark., 1999). POA'nın hücrenin içine difüzyonu pasif olarak gerçekleşirken, hücre dışına çıkarılması, çıkış pompasını çalıştırmak için enerji

gerektirdiğinden, bakterisidal etkinlik, bakteriyel enerji kaynakları en düşük olduğunda en fazladır (Zhang ve ark., 1999; Zhang ve ark. 2003). Bu durum ilk olarak, eski kültürlerin PZA'ya duyarlılıklarının, aktif olarak büyüyen genç kültürlerle göre daha fazla olduğunun görülmesiyle ortaya çıkmıştır (Zhang ve ark. 2002). Ayrıca beslenemeyen basillerde zar potansiyeli düşmekte ve PZA aktivitesi artmaktadır (Huang ve ark.,2007). Bu aç basillerde *pncA* gen ekspresyonunun artması sonucu POA dönüşümünün artarak basilin öldürülmesinin arttığı görülmüştür (Betts ve ark., 2002).



Şekil 3. PRZ etki mekanizması (Zhang ve Mitchison'den, 2003)

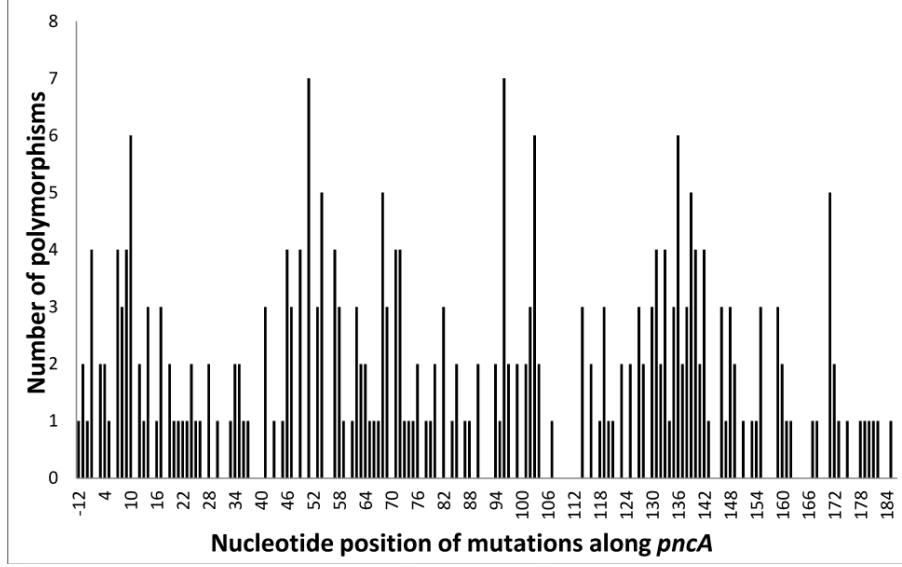
PZA'nın, *M. tuberculosis*'teki membran potansiyelini azaltması nedeniyle, enerji inhibitörlerinin PZA aktivitesini artırabileceği düşünülmektedir (Zhang ve ark. 2003). DCCD (F1F0-ATP sentaz inhibitörü), rotenon (NADH dehidrogenaz I Kompleksi inhibitörü) ve azid (sitokrom c oksidaz inhibitörü) gibi bazı enerji inhibitörlerinin yanı sıra CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), dinitrofenol DNP (Dinitro fenol), valinomisin ve siyanürün PZA aktivitesini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2003; Wade ve Zhang, 2006). Yeni bir ilaç olan ve F1F0 ATP sentaz inhibitörü olan bedaquilin'in bu şekilde PZA aktivitesiyle sinerjik etki gösterebileceği öne sürülmüştür (Andries ve ark., 2005).

2.6.3.Direnç Mekanizması

Başlangıçta, PZA direncinin *M. tuberculosis*'deki pirazinamidaz ve nikotinamidaz eksikliğinden kaynaklandığı gösterilmiş olsa da (Konno ve ark.,1967), sonraki çalışmalarda bu enzimlerin eksikliğinin, enzimleri kodlayan *pncA* genindeki mutasyondan kaynaklandığı anlaşılmıştır (Scorpio ve Zhang, 1996).

***pncA* Mutasyonları**

PZA'ya dirençli *M. tuberculosis* suşları tipik olarak PZase aktivitesini kaybeder (Konno ve ark.,1967). İn vitro çalışmalar, PZA direncine yol açan mutasyonların sıklığının 10^{-5} olduğunu göstermektedir (Stoffels ve ark., 2012). *M. tuberculosis*'de PZase aktivitesi kaybı ile PZA direnci arasında iyi bir korelasyon vardır ve (Konno ve ark.,1967; McClatchy ve ark., 1981; Trivedi ve Desai, 1987) PZase/nikotinamidaz kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar, PZA direncinin ana mekanizmasıdır (Scorpio ve Zhang, 1996; Scorpio ve ark., 1997). Tanımlanmış *pncA* mutasyonlarının büyük çoğunluğu aminoasid değişikliklerine sebep olan yanlış tanımlama mutasyonları (missense mutations) ve nükleotid ekleme veya delasyonları şeklindeki *pncA* yapısal genlerindeki spesifik olmayan mutasyonlardır (Scorpio ve ark., 1997; Zhang ve Telenti, 2000). *pncA* mutasyonları, gen boyunca çok çeşitli ve dağınıktır (Scorpio ve ark., 1997). *pncA* mutasyonlarının çeşitliliği, PZA direncine özgüdür ve anlaşılabilir değildir. *pncA* mutasyonlarının çok çeşitli ve dağınık olmasına rağmen, *pncA*'nın, 3-17, 61-85, 132-142 arasındaki bölgelerinde bir miktar kümelenme görülmektedir (Şekil 4) (Scorpio ve ark., 1997). Bu bölgeler, PZase enziminin katalitik bölgelerini ve metal bağlama yerlerini ihtiva eder (Du ve ark., 2001; Fyfe ve ark., 2009). PZA'ya dirençli *M. tuberculosis* suşlarının büyük çoğunluğunda (% 99.9) *pncA*'da mutasyonlar vardır (Zhang ve Mitchison, 2003; Somoskovi ve ark., 2007; Shenai ve ark., 2009). Ancak, *pncA* mutasyonları olmayan bazı PZA'ya dirençli suşlar da bildirilmiştir (Scorpio ve ark., 1997; Sreevatsan ve ark.,1997; Mestdagh ve ark., 1999; Cheng ve ark., 2000;).



Şekil 4. pncA mutasyonlarının dağılımı (Scorpio ve ark.'dan, 1997)

rpsA Mutasyonları

Son yıllardaki çalışmalarda, pncA mutasyonları olmayan bazı PZA'ya dirençli klinik izolatların rpsA'da mutasyona uğradığı gösterilmiştir (Feuerriegel, 2013; Scorpio ve ark., 1997; Shi ve ark., 2011). Araştırmalarda mutasyonların çoğunluğu rpsA'nın orta kısmında veya ilacın bağlanmasında etkili olan N terminal ucunda bulunmuştur (Feuerriegel, 2013). Örneğin, anlamlı pncA mutasyonları olmaksızın PZA'ya doğal olarak dirençli olan bir *M. tuberculosis kompleks* organizması olan *M. canettii*, Thr5Ala, Pro9Pro, Thr210Ala, Glu457Glu gibi çoklu rpsA mutasyonlarına sahiptir (Somoskovi ve ark., 2007; Feuerriegel, 2013). rpsA mutasyonları genellikle düşük seviyedeki PZA direnci ile ilişkilendirilmektedir (Ying ve ark.,2013).

panD Mutasyonları

PZA'ya dirençli bazı izolatlarda pncA ve rpsA'da mutasyonlar bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu izolatların bazılarında aspartat dekarboksilaz'ı kodlayan yeni bir gen olan panD bulunmuştur (Zhang ve ark., 2013). panD pantotenat ve ko-enzim A biyosentezinin bir öncüsü olan β -alaninin sentezinde görev alır. panD mutasyonları, PZA'ya doğal dirençli olan *M. canettii* suşlarında ve PZA'ya dirençli bir ÇİD-TB klinik izolatında tanımlanmıştır (Sambandamurthy ve ark., 2002). panD'nin PZA'nın bir hedefi olması ve panD'ye POA bağlanmasının, *M. tuberculosis*'de enerji üretimi ve yağ asidi metabolizması için gerekli olan merkezi metabolizma için kritik olan pantotenat ve ko-enzim A biyosentezini inhibe etmesi muhtemeldir (Ying ve ark.,2013).

Tespit edilen gen mutasyonlarına rağmen halen *pncA*, *rpsA* veya *panD*'de mutasyona sahip olmayan az sayıda PZA'ya dirençli suşlar olabileceği de düşünülmektedir (Ying ve ark., 2013).

2.6.4.Dünyada ve Türkiye’de Pirazinamid Direnci

PZA direncinin dünyadaki durumuna bakıldığında; Louw ve ark. (2006) Güney Afrika’da yaptıkları bir çalışmada, PZA mono rezistansını %2.1, çok ilaca dirençli olanlarda ise %53.5 olarak saptamışlardır. Heffernan (2006) Yeni Zelanda’da PZA monorezistansını %4.1; Cheng ve ark. (2000) Kanada’da PZA monorezistansını %2.8 olarak bildirmişlerdir. Yine farklı çalışmalarda çok ilaca dirençlilerde PZA direnç oranı %35-51 arasında bildirilmektedir (Mestdagh ve ark., 1999; Dewan ve ark.,2005; Mphahale, 2005;). WHO’nun 2016 Tüberküloz Raporuna göre direnç oranı % 3.1-42.1 arasında değişmektedir. Ancak PZA direncinin özellikle RIF direnciyle anlamlı şekilde ilişkili olduğu görülmektedir. RIF’e duyarlı vakalarda direnç oranı % 0.5-4.2 iken RIF’e dirençli olgularda PZA direnç oranı % 36.7-81.3 arasında değişmektedir.

Ülkemizdeki durum incelendiğinde, Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun Türkiye Verem Savaşı 2015 Raporu’nda PZA ile ilgili direnç durumu hakkında bir bilginin bulunmadığı görülmektedir. Ancak, yerel bazda yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Şenol ve ark. (2008)’nin İzmir’de, Özkütük ve ark. (2008) ’nin Manisa’da yaptıkları çalışmalarda, PZA mono rezistansı sırası ile, %3.1 ve %1,8; çok ilaca dirençlilerde PZA direnci ise Şenol ve ark. (2008)’nin çalışmasında %25.4 olarak tespit edilmiştir.

2.7. Anti Tüberküloz İlaçlara Karşı Direnç Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Genel olarak kabul görmüş standart ilaç duyarlılık yöntemleri proporsiyon yöntemi, mutlak konsantrasyon yöntemi ve direnç oranı metodudur. Bu yöntemler, yavaş büyüyen *M. tuberculosis* kolonilerinin görsel olarak tespit edilmesine dayanmaktadır ve sonuç alınması 6 hafta sürmektedir. Bu durum tedavinin erken başlatılması ve bu sayede bakteriyel yükün azaltılması için çok önemli olabilecek sürenin kaybı demektir (Kohli ve ark.,2016). BACTEC 460 TB sistemi, MGIT 960, BacT/ALERT 3D veya ESP kültür sistemi gibi sıvı besiyeri temelli otomatikleştirilmiş kültür sistemleri kısa sürede sonuç verebilen sistemler olmalarına rağmen, pahalı

altyapı ve ekipman gerektirirler. Bu nedenle fakir ve gelişmekte olan ülkelerde teminleri veya yaygınlaştırılmaları zor görünmektedir. Line prob testi ve Xpert MTB/RIF gibi moleküler temelli araçlar, uzmanlık gerektirebilir ve ölü organizmalardan DNA'yı seçerek aktif enfeksiyonu ayırt etmeyebilir (Dinnes ve ark.,2007). Mikroskopik gözlemler ilaç duyarlılık bakılması hızlı ve ucuz olmakla birlikte eğitilmiş personel gerektirir (Bwanga ve ark., 2009; Kohli ve ark.,2016).

2.7.1.Kolorimetrik Yöntemler

Kolorimetrik duyarlılık yöntemleri minimal laboratuvar imkanlarıyla yapılabilecek şekilde kolay, ucuz ve güvenilir duyarlılık tespit yöntemleri olarak son yıllarda çeşitli çalışmalarda sık sık karşımıza çıkmaktadır. Yöntemlerin uygulama şekilleri birbirinden farklı olsa da temel prensip, çoğalan basilin besiyeri içindeki renkli indikatör maddeyi metabolize ederek renk değişikliğine sebep olmasıdır. Nitrat Redüktaz Testi (NRA), Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi (REMA), Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testi (MYRT), Kristal Viyole Renksizleştirme Testi (KVRT) üzerinde çalışılan yöntemlerin bir kaçıdır.

Standartlaştırılmış, ticari bir analiz henüz mevcut değildir ve halen rutin tanı testleri olarak kullanılmamaktadırlar. Ancak konvansiyonel ilaç duyarlılık testleriyle karşılaştırıldığında, bu yöntemler izoniazid, rifampin, etambutol ve streptomisine direnç tespitinde iyi çalışıyor gibi görünmektedir (Angeby ve ark., 2002; Palomino ve ark.,2002; Farnia ve ark., 2008; Çoban, 2014).

Nitrat Redüktaz Testi (Nitrate Reductase Assay-NRA)

Bu yöntem ilk defa 1996'da Rusya'nın başkenti Moskova'da bulunan Merkez Tüberküloz Araştırma Enstitüsünde Golyshevskaya ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Golyshevskaya, 1996). Uluslararası düzeyde ilk klinik çalışmalardan birisi Angeby ve ark. (2001) tarafından yapılmıştır. Yöntemin kimyasal mekanizmasını 1879 da keşfeden J.P. Griess'e atfen "Griess yöntemi" olarak da isimlendirilmektedir (Griess, ve Bemerkungen, 1879). Ancak bazı kaynaklar yöntemin 1989 yılında Emil Kalfin (Ulusal Akciğer Hastalıkları Enstitüsü, Sofya, Bulgaristan) ve Andreas Engibarov (Ulusal İnfeksiyon ve Parazit Hastalıkları Enstitüsü, Sofya, Bulgaristan) tarafından geliştirildiğini öne sürmektedirler (Panaiotov ve Kantardjiev, 2002; Kalfin, ve Engibarov, 1989).

Yöntem *M. tuberculosis*'in nitratı nitrite indirgemesine dayanır. Bu amaçla %0,1'lik potasyum nitratlı besiyerleri kullanılır ve nitrit varlığı, Griess ayracı (1 pay %50'lik HCl, 2 pay %0.2'lik sulfanilamide ve 2 pay %0.1'lik n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride'den oluşur) kullanılarak gerçekleşen bir renk değişikliği ile tespit edilir (Kent ve Kubica, 1985; Ängeby ve ark.,2001).

Resazurin Mikrotitrasyon Testi (Resazurin Microtiter Assay-REMA)

Resazurin, ilk defa 1929'da Pesch ve Simmert tarafından sütteki bakteri içeriğini ölçmek için kullanılmıştır. Hem aerobik hem de anaerobik solunum için hücre yaşayabilirlik testlerinde bir oksidasyon indirgenme göstergesi olarak kullanılır (Chen ve ark., 2015). Resazurin mavi renkli bir boyadır ve indirgendiğinde kırmızı renkli resorufine dönüşür (Bueno, 2002). Başlangıçta ticari olarak "Alamar Blue" ticari markası (Trek Diagnostic Systems, Inc) altında piyasaya sürülmüştür. Alamar blue *M. tuberculosis* için ilaca duyarlılık testi olarak ilk defa Palamino ve Portaels (1999)'in çalışmasında kullanılmıştır. Ardından Palamino ve ark. (2002) tarafından standardize edilmiştir.

Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testi (MYRT)

Trifenilmetan boya ailesinin üyesi olan malaşit yeşili güçlü bir antibakteriyel, antifungal ve antiparazitik ajandır (Alderman, 1985). Mikobakteriler, malaşit yeşiline nispeten dirençli oldukları için, kontaminantların büyümesini önlemek amacıyla, başta Löwenstein-Jensen olmak üzere mikobakteriyel katı besiyerlerinde kullanılmaktadır (Tarshis ve ark.,1955). Erken tarihli bir araştırma da, mikobakteriyel hücre duvarındaki malaşit yeşilini indirgeyen enzimlerin, basilin malaşit yeşiline karşı direnç kazanmasını sağlayacağı öne sürülmüştür. Bu hipotez, mikobakteriyel hücre duvarının lipid fraksiyonunda biriken malaşit yeşilinin azalmasının gözlenmesine dayanmaktadır (Tarnok ve Czanik, 1959). Daha yakın tarihli bir araştırma da ise , malaşitin yeşilimsi renginin kaybolmasından mikobakteriyel hücre duvarının membran fraksiyonundaki bir proteinin sorumlu olduğu gösterilmiştir (Jones ve Falkinham, 2003). Farnia ve ark. (2008)'nın çalışmasıyla yöntem standardize edilmiştir.

Kristal Viyole Renksizleşme Testi (KVRT)

Kristal viyole (CV), antimikrobiyal ve memeli hücreleri için toksik etkisi olan bir trifenilmetan boyadır. Ancak bakteri ve mantarların aksine, mikobakterilerin CV'ye dirençli olduğu düşünülmektedir. Bu CV direncinin CV'nin azaltılması ve bu bakterilerin lipid fraksiyonundaki sekestrasyonunun bir sonucu olabileceği öne sürülmüştür. CV'nin renksizleşmesine indirgenmesi sebep olmaktadır. Ayrıca su ile taşınan patojen mikobakterilerin de CV'yi renksizleştirdiği gösterilmiştir (Jones ve Falkinham, 2003). CV, ilk defa Çoban (2014) tarafından *M. tuberculosis*'de INH ve RIF dirençli izolatların tespitinde kullanılmıştır.

2.8. Pirazinamid Direncinin Tespitinde Karşılaşılan Zorluklar ve Nikotinamidin Pirazinamid Direnç Tespitinde Önemi

PZA direnç tespitinde en önemli zorluk, PZA'nın kültür ortamında ve nötral pH'larda *M. tuberculosis*'e etkisiz olmasıdır. Ancak in vitro ortamlarda asid pH (pH 5,5)'daki besiyerlerinde yarı uyur durumdaki basilleri öldürebilmektedir. PZA direncinin tesbitindeki bu zorluk sebebiyle, direnç tespiti rutin olarak laboratuvarlarda yapılamamaktadır. Bu olumsuz durumu ortadan kaldırmak için PZA direncinin tesbitinde otomatize sistemler devreye girmiştir. Mevcut referans yöntemlerden birisi olan radyometrik BACTEC 460 TB, asid sıvı besiyerleri kullanan, güvenilir ancak pahalı bir sistemdir. Daha yeni bir referans yöntem olan BACTEC MGIT 960 sistemi ise, kısa sürede sonuç alınabilen, önceden alt kültür için inokülasyona gerek göstermeyen bir yöntem olarak ön plana çıkmıştır. Ancak bu da yüksek maliyetli bir sistemdir. PZA'nın TB tedavi rejimindeki yerinin vazgeçilmez oluşu, direnç gelişiminin tespitinde kolay uygulanabilen, hızlı ve ucuz yöntemlerin geliştirilmesini önemli hale getirmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda, PZA direnç tespitinde bir pirazinamid analogu olan nikotinamidin kullanılabilmesi görülmüştür. Nikotinamid, bir PZA analogu olup anti tüberküloz aktivite göstermesine rağmen birlikte kullanıldığında, INH ile antagonizma gösteren bir kimyasaldır (Chorine, 1945; McKenzie ve ark.,1948; McDermott ve Tompsett, 1954). Bu sebeple tüberküloz tedavi rejimlerine girememiştir (Jordahl ve ark., 1961). Brander (1972) tarafından, yüksek doz nikotimanid kullanılarak PZA direnç durumunun güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği gösterilmiştir. Kalish ve ark. (1978)'da çalışmalarında benzer sonuçları elde etmişlerdir.

Nikotinamid ve PZA'nın her ikisi de ön ilaç olup, aynı zamanda pirazinamidaz olarak da adlandırılan nikotinamidaz enzimi tarafından, aktif formları olan nikotinoik asid ve pirazinoik aside dönüştürülürler. PZA'yı aktif form olan pirazinoik aside dönüştürmek için asid pH'lı (pH5,5) besi yerleri gerekirken, nikotinamidi nikotinoik aside dönüştürmek için bakteriyal çoğalmayı engellemeyen fizyolojik pH' lar yeterli olmaktadır. Bu durumda, duyarlılık testlerinde PZA kullanımındaki sınırlamaların nikotinamid ile aşılabileceği görülmektedir (Murray, 2003). Nitekim Martin ve ark.(2006, 2008) ile Mirabal ve ark. (2010)'nın nikotinamid kullanarak yaptıkları çalışmalarda bu yönde olumlu sonuçlar alınmıştır.

PZA direnç tespitinde kullanılmakta olan BACTEC MGIT 960 sistemi, kısa sürede sonuç veren, otomatize bir yöntem olmasına rağmen maliyeti yüksek olan bir sistemdir. Dolayısıyla direncin tespitinde hem kısa sürede uygulanabilecek hem de ucuz bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Daha önce INH ve RIF için kullanılmış olan pek çok alternatif yöntemden özellikle kolorimetrik yöntemler kolay uygulanabilmeleri ve düşük maliyetli olmaları nedenleriyle bu noktada ön plana çıkmaktadırlar

Bu yöntemlerden Nitrat Redüktaz Testi (NRA)'nin duyarlılık ve özgüllüğü BACTEC MGIT 960 sistemiyle karşılaştırıldığında sırasıyla; Martin ve ark. (2008) tarafından %91 ve %94; Mirabal ve ark. (2010) tarafından % 93.75 ve % 97.76 olarak tespit edilmiştir. Rezasurin Mikroplak Testiyle (REMA) yapılan çeşitli direnç tespit çalışmalarının BACTEC MGIT 960 sistemiyle karşılaştırılmalarında duyarlılık %98.8-100, özgüllük %98-100 değerleri arasında bildirilmiştir (Martin ve ark., 2006; Campanerut ve ark., 2011). Mirabal ve ark. (2010) Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testiyle (MYRT) BACTEC MGIT 960 testini çalışmalarında karşılaştırmışlar ve duyarlılığı % 97.76, özgüllüğü % 93.75 olarak tespit etmişlerdir. PZA direncinin tespiti için henüz kullanılmamış bir yöntem olan Kristal Viyole Renksizleştirme Testi (KVRT) ise, Çoban (2014) tarafından INH ve RIF için denenmiş ve referans yöntem ile INH için % 94.5, RIF için % 96.3 uyumlu bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. İzolatların Temin Edilmesi

Bu çalışmada toplam 32 *M.tuberculosis* izolatu (30 klinik izolat, 2 referans izolat) kullanılmıştır. Klinik izolatlar iki farklı merkezden temin edilmiş olup 23 izolat İzmir Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma

Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan, 7 izolat ise Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

Klinik izolatların 13'ü çok ilaca dirençli (ÇİD), 5'i İNH dirençli, biri RIF dirençli ve 11'i primer ilaçlara duyarlıdır. Kullanılan izolatlardan 15'i PZA'ya dirençli 15'i ise PZA'ya duyarlıdır. PZA'ya dirençli izolatlardan bir tanesi PZA'ya monodirençli izolattır. İzolatların PZA duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 referans yöntemiyle tespit edilmiştir (Tablo 1).

Çalışmada kullanılan referans izolatlar *M. tuberculosis* H37Rv (Antitüberküloz ilaçlara duyarlı izolat) ve *M. tuberculosis* ATCC 35828 (PZA dirençli izolat)'dir. Tüm izolatlar kullanılıncaya kadar Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde -40⁰C'de saklanmışlardır. Çalışmadan önce bütün izolatlar, üremeleri için Löwestein-Jensen (LJ) besiyerine pasajlanmış ve 3 hafta 37⁰C'de bekletilmişlerdir. Elde edilen taze koloniler çalışmada kullanılmışlardır.

Tablo 1. Klinik izolatların anti TB ilaçlara duyarlılık durumları **STR:** Streptomisin, **INH:** İzoniazid, **RIF:** Rifampisin, **ETM:** Etambutol, **PZA:** Pirazinamid

İZOLAT NO	STR	INH	RIF	ETM	PZA
1	R	R	R	R	R
2	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R
4	R	R	R	R	R
5	S	S	S	S	S
6	R	R	R	R	R
7	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S
14	S	R	R	S	S
15	R	R	S	S	R
16	S	R	S	S	S
17	R	R	S	S	S
18	R	R	R	S	R
19	S	S	S	S	R
20	R	R	R	R	R
21	S	R	R	S	R
22	S	S	S	S	S
23	S	R	R	S	R
24	S	S	S	S	S
25	R	R	R	R	R
26	R	R	R	R	R
27	R	R	R	R	R
28	S	S	R	S	R
29	S	R	S	S	S
30	R	R	S	S	S
H37Rv	S	S	S	S	S
ATCC 35828	S	S	S	S	R

3.2.Besiyerlerinin Hazırlanması

Çalışmada Middlebrook 7H9 besiyeri kullanıldı. Besiyeri üreticinin önerdiği miktar ve şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Yine üretici firmanın önerdiği miktarda gliserol eklendi. Otoklavda sterilize edildikten sonra steril distile su ile % 0,1'lik hazırlanan kasiton ve % 10 OADC (oleic asit, albümin, dekstroz, katalaz) eklendi. NRA testi için kullanılacak besiyerlerine, son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde potasyum nitrat eklendi. Hazırlanan besiyeri 96 kuyucuklu steril mikropklara her kuyucukta 100 µl olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.Bakteri İnokülümünün Hazırlanması

Bakteri inokülümünün hazırlanması için 5 ml Middlebrook 7H9 besiyeri içeren vidalı kapaklı steril Falcon tüpleri hazırlandı. Tüplerin içine 10-15 kadar steril cam boncuk konuldu. LJ besiyerindeki taze kültürlerden alınan koloniler bu tüplere aktarıldı. Tüplerden sızıntı olmaması için kapak kısımları parafinle sarıldı ve daha sonra, 60 sn vorteksledi. Ardından dik konumda 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek partiküllerin ve aerosollerin çökmesi sağlandı. Tüplerdeki süpernatant başka bir steril tüpe aktarılarak Mc Farland 1 olacak şekilde bulanıklığı ayarlandı. Middlebrook 7H9 besiyeri ile 1:15 oranında dilüe edilerek 96 kuyucuklu steril mikropklara, her kuyucukta 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Bütün işlemler Sınıf 2 seviyesindeki biyogüvenlik kabininde ve kişisel koruyucu ekipman kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.Nikotinamitin Hazırlanması

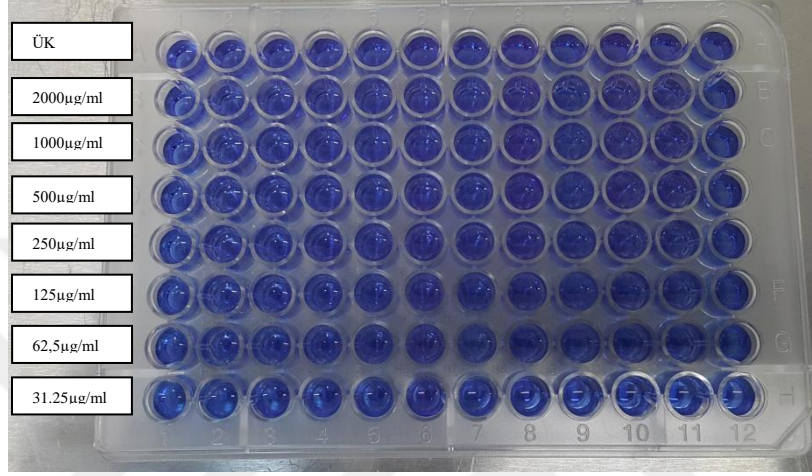
Çalışmada PZA yerine, PZA analogu olan ve fizyolojik pH'da çalışabilen nikotinamid (NIC) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) kullanıldı. NIC stok solüsyonu distile su ile 40 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Filtrelenerek sterilize edildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.5.Nikotinamid MİK Değerinin Saptanması

3.5.1.Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi (REMA) ile MİK Tespiti

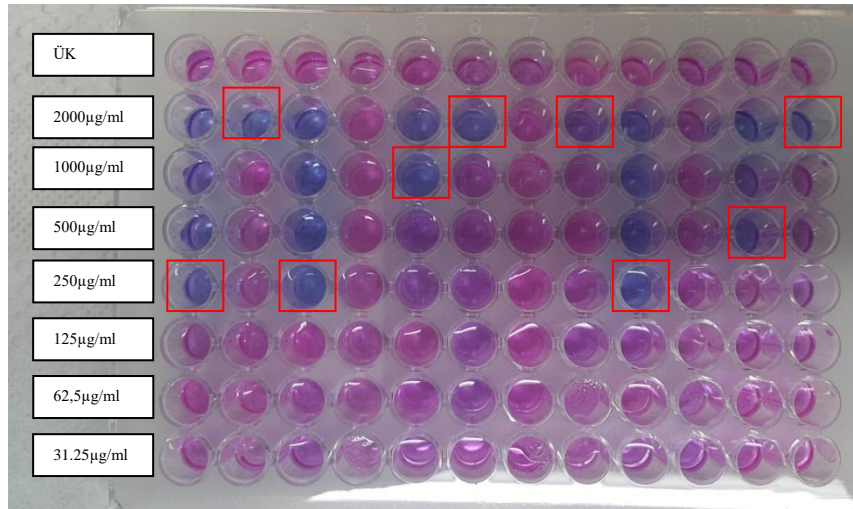
Test için 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikro plaklar kullanıldı. Plaklarda her bir bakteri için bir adet kontrol kuyucuğu ve yedi adet test kuyucuğu yereldi. Hazırlanan besiyerlerinden her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Kontrol kuyucuğuna yalnız besiyeri ve bakteri inokülümü konuldu. Test kuyucuklarına NIC eklendi ve

pipetaj yöntemiyle konsantrasyonu 2000-31.25 µg/ml arasında olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bakteri inokülümleri her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi. Plaklar yedi gün 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bütün kuyucuklara % 0,02'lik rezasurinden (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 30 µl eklendi ve plaklar tekrar 37°C'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 5).



Şekil 5. REMA testinde rezasurün konulduktan sonraki görüntü ÜK: Üreme kontrolü

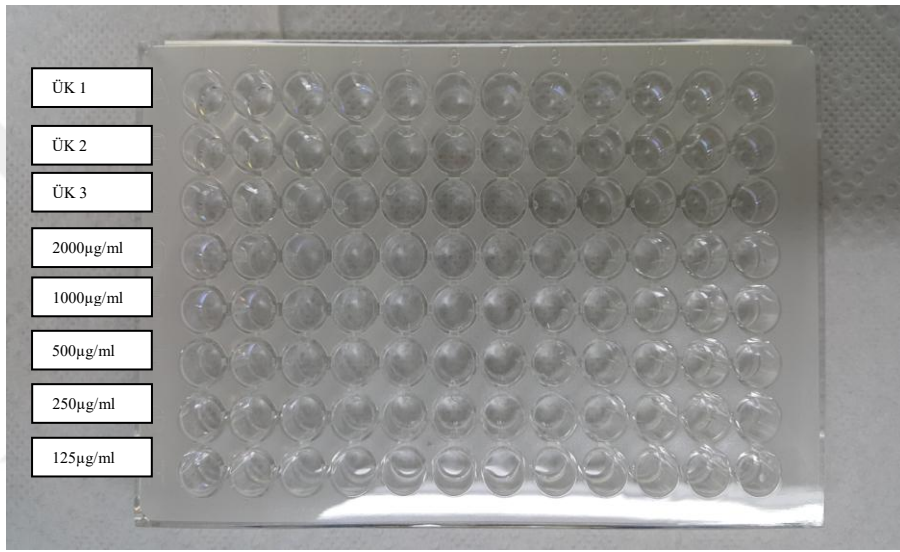
İnkübasyon süresince her gün plaklar kontrol edildi. Kontrol kuyucuğunda mavi rengin kırmızı-pembe rene dönüşmesi üreme göstergesi olarak kabul edilerek test sonlandırıldı. Üreme olmadığı için rengin maviden kırmızı-pembe rene dönmediği son kuyucuk MİK değeri olarak tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. REMA testinin plak görünümü ÜK: Üreme kontrolü; Mavi renkli kuyucuklar: üreme yok; Kırmızı-pembe kuyucuklar: üreme var; İşaretlenmiş kuyucuklar: MİK değerleri

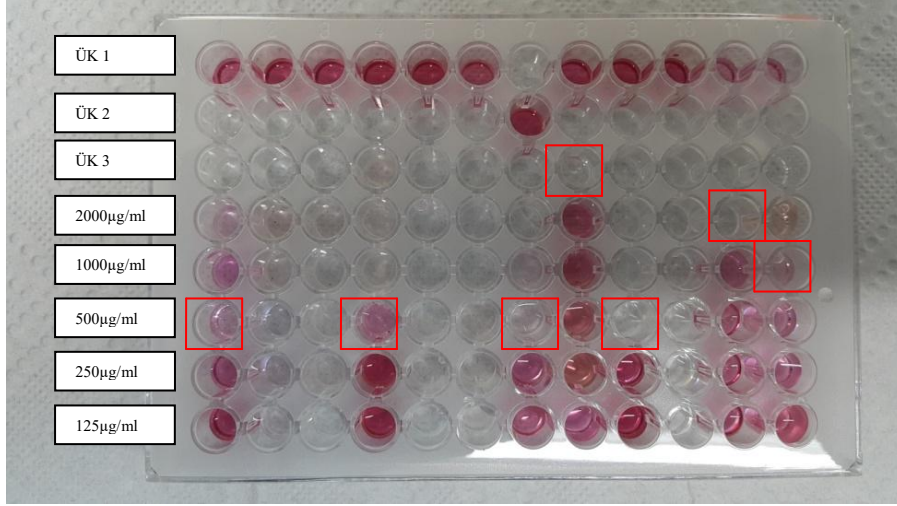
3.5.2.Nitrat Redüktaz Testi (NRA) ile MİK Tespiti

Test için 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikro plaklar kullanıldı. Plaklarda her bir bakteri için üç adet kontrol kuyucuğu ve beş adet test kuyucuğu kullanıldı. Hazırlanan potasyum nitratlı besiyerlerinden her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Kontrol kuyucuklarına yalnız besiyeri ve bakteri inokülümü konuldu. Test kuyucuklarına NIC eklendi ve pipetaj yöntemiyle konsantrasyonu 2000-125 µg/ml arasında olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bakteri inokülümleri her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi (Şekil7).



Şekil 7. NRA testinde Griess ayracı konulmadan önceki görüntü ÜK: Üreme kontrolü

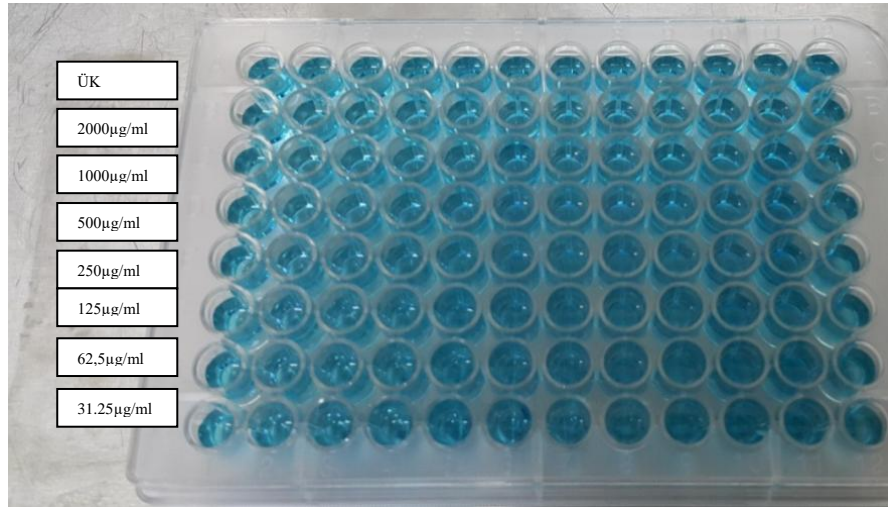
Plaklar yedi gün 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra birinci kontrol kuyucuklarına 50 µl Griess ayracı (1 pay %50'lik HCl, 2 pay % 0,2'lik sulfanilamide ve 2 pay % 0,1'lik n-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride'den oluşur) eklendi. Kontrol kuyucuğunda kırmızı-mor renk görüldüğünde test kuyucuklarına da aynı miktarda Griess ayracı konuldu. Test kuyucuklarında renk değişiminin olması bakteri üremesini ve dolayısıyla direnci göstermekte olup, renk değişiminin olmadığı son kuyucuk MİK değeri olarak kabul edildi. Kontrol kuyucuğunda renk değişiminin olmaması durumunda işlem 10. ve 14. günlerde 2. ve 3. kontrol kuyucukları kullanılarak tekrarlandı (Şekil 8).



Şekil 8. NRA testinde plak görünümü **ÜK:** Üreme kontrolü; **Renksiz kuyucuklar:** üreme yok; **Kırmızı-mor kuyucuklar:** üreme var; **İşaretlenmiş kuyucuklar:** MİK değerleri

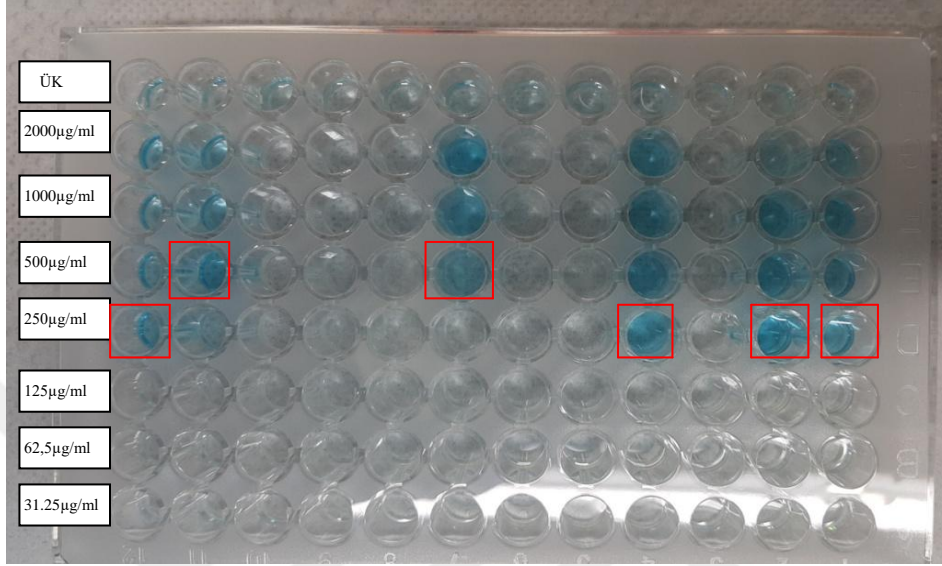
3.5.3. Malaşit Yeşili Renksizleştirme Testi (MYRT) ile MİK Tespiti

Test için 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikro plaklar kullanıldı. Plaklarda her bir bakteri için bir adet kontrol kuyucuğu ve yedi adet test kuyucuğu yereldi. Hazırlanan besiyerlerinden her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi. Kontrol kuyucuğuna yalnız besiyeri ve bakteri inokülümü konuldu. Test kuyucuklarına NIC eklendi ve pipetaj yöntemiyle konsantrasyonu 2000-31.25 µg/ml arasında olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bakteri inokülümleri her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Yedi gün 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra bütün kuyucuklara 0,05mg/ml konsantrasyondaki malaşit yeşilinden 30 µl eklendi. Plaklar tekrar 37°C'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 9).



Şekil 9. Malaşit yeşili renksizleştirme testinde malaşit yeşili boyası konulduktan sonraki görüntü **ÜK:** Üreme kontrolü

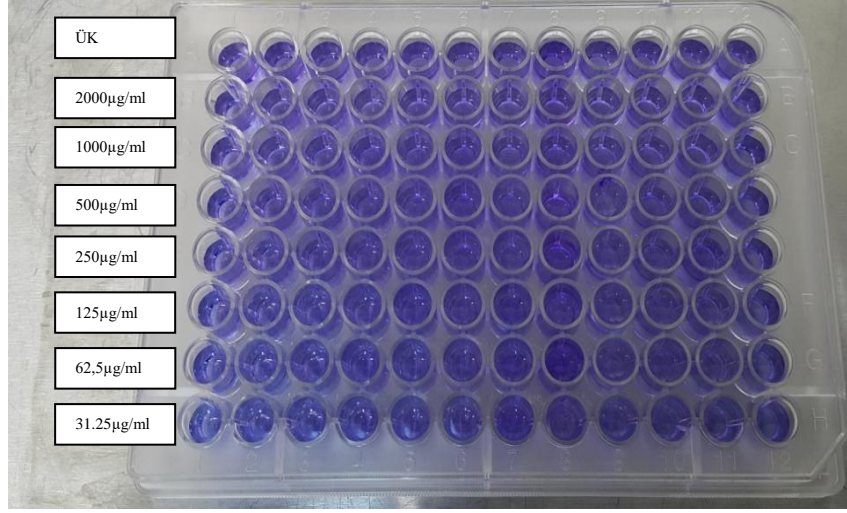
İnkübasyon süresince her gün plaklar kontrol edildi. Kontrol kuyucuğunda yeşil rengin solması üreme göstergesi olarak kabul edilerek test sonlandırıldı. Üreme olmadığı için yeşil rengin solmadığı son kuyucuk MİK değeri olarak tespit edildi (Şekil 10).



Şekil 10. Malaşit yeşili renksizleştirme testinde plak görünümü **ÜK:** Üreme kontrolü; **Yeşil renkli kuyucuklar:** üreme yok; **Renk giderimi olan kuyucuklar:** üreme var; **İşaretlenmiş kuyucuklar:** MİK değerleri

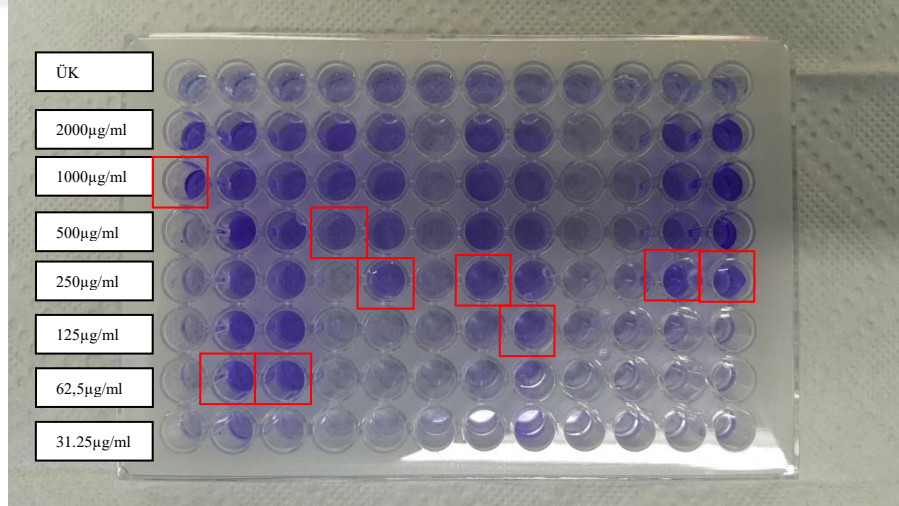
3.5.4. Kristal Viyole Renksizleştirme Testi (CVRT) ile MİK Tespiti

Test için 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikro plaklar kullanıldı. Her bir bakteri için bir adet kontrol kuyucuğu ve yedi adet test kuyucuğu kullanıldı. Hazırlanan besiyerlerinden her kuyucuğa 100 µl dağıtıldı. Kontrol kuyucuğuna yalnız besiyeri ve bakteri inokülümü konuldu. Test kuyucuklarına NIC eklendi ve pipetaj yöntemiyle konsantrasyonu 2000-31,25 µg/ml arasında olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan bakteri inokülümlerinden her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde ilave edildi. 37°C'de yedi gün inkübe edildi. Daha sonra bütün kuyucuklara 0,025mg/ml konsantrasyondaki kristal viyole boyasından 25 µl eklendi ve plaklar tekrar 37°C'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 11).



Şekil 11. Kristal viyole renksizleştirme testinde kristal viyole boyası konulduktan sonraki görüntü **ÜK:** Üreme kontrolü

İnkübasyon süresince her gün plaklar kontrol edildi. Kontrol kuyucuğunda mavi rengin solması üreme göstergesi olarak kabul edilerek test sonlandırıldı. Üreme olmadığı için mavi rengin solmadığı son kuyucuk MİK değeri olarak belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Kristal viyole renksizleştirme testinde plak görünümü **ÜK:** Üreme kontrolü; **Mavi renkli kuyucuklar:** üreme yok; **Renk giderimi olan kuyucuklar:** üreme var; **İşaretlenmiş kuyucuklar:** MİK değerleri

3.6.pncA Gen Mutasyonlarının Dağılımının Tespiti

PZA'ya dirençli 15 izolatda pncA gen mutasyonlarının tespiti amacıyla sekans analizi yapıldı.

3.6.1.DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Middlebrook 7H9 besiyerinde üreyen taze kolonilerden DNA ekstraksiyon kiti (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Thermofisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem aşağıdaki şekilde uygulandı:

1. Middlebrook 7H9 besiyerinde üremiş olan taze kültürlerden santrifüj tüplerine her tüpe 1,5 ml olacak şekilde, transfer edildi.
2. 10 000x g de 2 dakika santrifüj edildi. Pellet lizozim ile resüspanse edildi.
3. 180 µl lizozim digestion buffer/lizozim (son konsantrasyonu 20mg/ml) eklendi ve vortekslendi.
4. 37 °C de 30 dakika bekletildi.
5. 20 µl proteinaz K eklenip vortekslendi.
6. 200 µl PureLink™ Genomic lizis/ binding buffer eklendi ve vortekslendi.
7. 55 °C de 30 dakika bekletildi.
8. 200 µl % 100 etanol eklendi ve 5 sn vortekslendi.
9. Yaklaşık 640 µl lizat spin kolona koyuldu.
10. 10 000 x g devirde 1 dakika oda ısısında santrifüj edildi.
11. Alt toplama kabı atılarak yenisi kullanıldı ve 500 µl wash buffer 1 eklendi ve 10 000 x g devirde 1 dakika santrifüj edildi.
12. Alt toplama kabı yeniden atıldı ve yenisi konularak 500 µl wash buffer 2 eklendi ve maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
13. Toplama tüpleri atılarak spin kolonlar 1,5 ml lik ependorflara konuldu.
14. 30 µl elufion buffer konuldu ve oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra maksimum hızda 1.5 dakika santrifüj edildi.
15. Elde edilen DNA lar -20 °C de saklandı.

3.6.2.DNA'ların Nanodrop 1000 Spektrofotometre ile Ölçümü

İzolatların DNA ekstraksiyonu sonrası DNA konsantrasyonlarının ölçümü 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılarak yeterli miktarda DNA elde edildiği görülmüş oldu.

3.6.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kullanılan primerler

pncA geninin tespiti için 200 nm HPLC, PF 5'GGCGTCATGGACCCTATATC3' ve PR 5'CAACAGTTCATCCCGGTTTC3' primerleri kullanıldı (Córdoba ve ark.,2013).

PCR İşlemi

pncA geninin araştırılması için PCR yöntemi kullanıldı. Amplifikasyon karışımı için, 5 µl 10x Taq buffer, 2,5 µl PF (10 pmol), 2,5 µl PR (10 pmol), 1 µl dNTP, 4 µl MgCl₂, 0,25 µl Taq pol (5u/ µl) kullanıldı ve hesaplandığı şekilde 29,75 µl ultra distile su eklendi. Vorteks sonrası karışım her birinde 45 µl olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve her tüpe 5 µl DNA eklendi. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde ayarlandı (Tablo 2).

Termal cycler cihazına (Thermo Scientific, AKC) yerleştirildi. Amplifikasyon programı olarak ilk denatürasyon için 95 °C de 3 dk., denatürasyon için 95 °C de 30 sn., primer bağlanma için 57 °C de 30 sn., uzatma için 72 °C de 1 dk. olacak şekilde 35 siklüs çalışıldı. Son olarak 72 °C de 10 dk. son uzatma yapılarak PCR sonlandırıldı (Tablo 3).

Tablo 2. Amplifikasyon karışımı

	Son Konsantrasyon	Miktar
PCR Tamponu	10x Taq Buffer	5 µl
PF (Primer Forward)	10 pmol	2,5 µl
RP (Primer Reverse)	10 pmol	2,5 µl
dNTP	200 µM	1 µl
MgCl ₂	1,5 mM	4 µl
Taq DNA polimeraz	5u/ µl	0,25 µl
DNA	1 µg	5 µl
Distile Su	Ultra saf	29,75 µl
Toplam	50 µl	50 µl

Tablo 3. PCR amplifikasyon programı

95 °C de 3 dk. ilk denatürasyon

95 °C de 30 sn. DNA denatürasyonu

57 °C de 30 sn. primer bağlanması

72 °C de 1 dk uzatma aşaması

72 °C de 10 dk. son uzatma

} 35 döngü

PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için % 1'lik hazırlanan agaroz jele 0,5'lik hazırlanmış TAE tamponu eklendi. Son olarak 12 µl etidyum bromid konuldu. 10 µl PCR ürünü 2 µl DNA yükleme solüsyonu ile karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. 40 dakika 80 volt elektrik akımında yapılan elektroforezle DNA'lar yürütüldü. Sonuçlar UV transilüminatör kaynağı altında görüntüleme cihazında incelendi. DNA bölgesinin incelenmesiyle hedef bölgenin amplifiye olduğu görüldü.

3.6.4.Sekans Analizi

Elde edilen PCR ürünleri, üreticinin önerdiği protokole göre, NucleoSpin Gel and PCR clean up (Macherey Nagel, Germany) kiti ile saflaştırılmıştır. Ardından Bigdye Cycle Sequencing Kit v3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) sekans kiti ve PCR işleminde kullanılan primerler kullanılarak ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) otomatik sekans cihazı ile sekans analizine tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 32 izolatın (30 adet klinik, 2 adet referans) REMA, NRA, MYRT ve KVRT ile belirlenen nikotinamid MİK değerleri PZA duyarlılık durumları ile karşılaştırılmıştır. İzolatların PZA duyarlılık durumları BACTEC MGIT 960 yöntemiyle saptanmıştır. Elde edilen MİK değerleri Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. İzolatların PZA duyarlılık durumları ve kolorimetrik testlerde elde edilen Nikotinamid MİK değerleri (Gölgeli alanlar referans yöntemle uyumsuz sonuçları göstermektedir)

İzolat Numarası	PZA Duyarlılık	REMA (µg/ml)	NRA (µg/ml)	MYRT (µg/ml)	KVRT (µg/ml)
1	R	>2000	1000	>2000	>2000
2	R	2000	>2000	2000	>2000
3	R	>2000	>2000	>2000	1000
4	R	2000	>2000	>2000	>2000
5	S	250	250	250	250
6	R	>2000	2000	500	>2000
7	S	250	250	250	125
8	S	250	500	250	250
9	S	250	500	250	125
10	S	250	500	250	250
11	S	250	250	250	62,5
12	S	250	500	250	250
13	S	250	250	250	250
14	S	1000	500	1000	250
15	R	250	1000	125	250
16	S	250	500	250	250
17	S	250	1000	250	62,5
18	R	1000	>2000	>2000	>2000
19	R	>2000	>2000	>2000	>2000
20	R	1000	1000	1000	500
21	R	1000	250	125	125
22	S	250	250	250	62,5
23	R	2000	1000	500	1000
24	S	250	250	250	250
25	R	2000	2000	500	500
26	R	1000	>2000	>2000	>2000
27	R	>2000	>2000	>2000	>2000
28	R	>2000	2000	1000	500
29	S	250	500	250	250
30	S	250	500	250	62,5
H37Rv	S	125	500	250	125
ATCC 35828	R	>2000	2000	>2000	>2000

4.1.REMA Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri

MİK değerlerinin REMA yöntemiyle saptanması sonucunda PZA dirençli 15 klinik izolatın 6'sında MİK değeri >2000 µg/ml; 4'ünde 2000 µg/ml; 4'ünde 1000 µg/ml; 1 izolatta ise 250 µg/ml olarak bulunmuştur. PZA duyarlı izolatlarda ise MİK

değeri bir izolatta 1000 µg/ml; 14 izolatta 250 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Tablo 5 incelendiğinde kritik konsantrasyon değerinin 250 µg/ml olduğu görülmektedir. Bu testte MİK değeri 250 µg/ml üzerinde olan izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. Ancak referans yöntemle dirençli olduğu tespit edilen bir izolatın MİK değeri 250 µg/ml; referans yöntemle duyarlı tespit edilen bir izolatın ise MİK değeri 1000 µg/ml olarak bulunmuştur. Referans izolatlardan H37Rv'nin MİK değeri 125 µg/ml; ATCC 35828'in MİK değeri >2000 µg/ml olarak belirlenmiştir. Testlerin ortalama sonuçlanma süresi ortalama 10.7 gün (8-13 gün) olmuştur (Tablo 13).

Tablo 5. MGIT 960 yöntemiyle duyarlılık durumları tespit edilen 30 izolatın REMA yöntemiyle bulunan Nikotinamid MİK değerlerinin dağılımı

MİK	>2000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Dirençli (n:15)	6	4	4	0	1	0	0	0
Duyarlı (n:15)	0	0	1	0	14	0	0	0

REMA yöntemiyle elde edilen sonuçlar referans yönteminkilerle karşılaştırılmış ve duyarlılık, özgüllük, PPD (Pozitif Produktif Değer), NPD (Negatif Produktif Değer) ve % uyumları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. REMA testi ile elde edilen sonuçların referans yöntem (MGIT 960 yöntemi) sonuçları ile karşılaştırılması **PPD:** Pozitif Produktif Değer, **NPD:**Negatif Produktif Değer

İlaç	REMA	Referans Yöntem		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Uyum (%)
		R	S					
NIC	R	14	1	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3
	S	1	14					

4.2.NRA Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri

NRA yöntemiyle MİK değerlerinin tespiti sonucunda PZA dirençli 15 klinik izolatın 7'sinde MİK değeri >2000 µg/ml; 3'ünde 2000 µg/ml; 4'ünde 1000 µg/ml; 1 izolatta ise 250 µg/ml olarak bulunmuştur. Duyarlı izolatların MİK değerleri ise; bir tanesinde 1000 µg/ml; 8 izolatta 500 µg/ml; 6 izolatta 250 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Tablo 7'de kritik konsantrasyonun 500 µg/ml olduğu görülmektedir. Bu testte MİK değeri 500µg/ml üzerinde olan izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. Ancak referans yöntemle dirençli olduğu tespit edilen bir izolatın MİK değeri 250 µg/ml; referans yöntemle duyarlı tespit edilen bir izolatın MİK değeri ise 1000 µg/ml olarak bulunmuştur. Referans izolatlardan H37Rv'nin MİK değeri 500 µg/ml; ATCC 35828'in MİK değeri ise 2000 µg/ml olarak belirlenmiştir. Testlerin sonuçlanma süresi ortama 8 gün (7-10 gün) olmuştur (Tablo 13).

Tablo 7. MGIT 960 yöntemiyle duyarlılık durumları tespit edilen 30 izolatın NRA testiyle bulunan Nikotinamid MİK değerlerinin dağılımı

MİK	>2000	2000	1000	500	250	125
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Dirençli (n:15)	7	3	4	0	1	0
Duyarlı (n:15)	0	0	1	8	6	0

NRA yöntemiyle elde edilen sonuçlar referans yönteminkilerle karşılaştırılmış ve duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve % uyumları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8. NRA testi ile elde edilen sonuçların referans yöntem (MGIT 960 yöntemi) sonuçları ile karşılaştırılması **PPD:** Pozitif Produktif Değer, **NPD:** Negatif Produktif Değer

İlaç	NRA	Referans Yöntem		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Uyum (%)
		R	S					
NIC	R	14	1	93,3	93,3	93,3	93,3	93,3
	S	1	14					

4.3.MYRT Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri

MYRT yöntemiyle MİK değerlerinin tespiti sonucunda PZA dirençli 15 klinik izolatın 7 tanesinde MİK değeri >2000 µg/ml; 1 tanesinde 2000 µg/ml; 2 izolatta 1000 µg/ml; 3 izolatta 500 µg/ml; 2 izolatta ise 125 µg/ml olarak bulunmuştur. Duyarlı izolatların MİK değerleri ise bir izolatta 1000 µg/ml; 14 izolatta 250 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Tablo 9 incelendiğinde kritik konsantrasyon değerinin 250 µg/ml olduğu görülmektedir. Bu testte MİK değeri 250 µg/ml üzerinde olan izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. Ancak referans yöntemle dirençli olduğu tespit edilen 2 izolatın MİK değeri 125 µg/ml; referans yöntemle duyarlı tespit edilen bir izolatın MİK değeri ise 1000 µg/ml olarak bulunmuştur. Referans izolatlardan H37Rv'nin MİK değeri 250 µg/ml; ATCC 35828'in MİK değeri ise >2000 µg/ml olarak belirlenmiştir. Testlerin sonuçlanma süresi ortama 12.2 gün (8-14 gün) olmuştur (Tablo 13).

Tablo 9. MGIT 960 yöntemiyle duyarlılık durumları tespit edilen 30 izolatın MYRT testiyle bulunan

Nikotinamid MİK değerlerinin dağılımı

	>2000 µg/ml	2000 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31.25 µg/ml
Dirençli (n:15)	7	1	2	3	0	2	0	0
Duyarlı (n:15)	0	0	1	0	14	0	0	0

MYRT yöntemiyle elde edilen sonuçlar referans yönteminkilerle karşılaştırılmış ve duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve % uyumları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10. MYRT testi ile elde edilen sonuçların referans yöntem (MGIT 960 yöntemi) sonuçları ile karşılaştırılması **PPD:** Pozitif Produktif Değer, **NPD:** Negatif Produktif Değer

İlaç	MYRT	Referans Yöntem		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Uyum (%)
		R	S					
NIC	R	13	1	86,6	93,3	92,8	87,5	90
	S	2	14					

4.4.KVRT Yöntemi ile Tespit Edilen Nikotinamid MİK Değerleri

KVRT yöntemiyle MİK değerlerinin tespiti sonucunda PZA dirençli 15 klinik izolatin 8'inde MİK değeri >2000 µg/ml; 2'sinde 1000 µg/ml; 3'ünde 500 µg/ml; bir izolatta ise 250 µg/ml; 1 izolatta ise 125 µg/ml olarak bulunmuştur. Duyarlı izolatların MİK değerleri ise 9 izolatta 250 µg/ml; 6 izolatta 125 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Tablo 11'de görüldüğü gibi kritik konsantrasyon 250 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu testte MİK değeri 250 µg/ml üzerinde olan izolatlar dirençli olarak kabul edilmiştir. Ancak referans yöntemle dirençli olduğu tespit edilen bir izolatin MİK değeri 250 µg/ml; bir izolatin MİK değeri ise 125 µg/ml olarak bulunmuştur. Referans izolatlardan H37Rv'nin MİK değeri 125 µg/ml; ATCC 35828'in MİK değeri ise >2000 µg/ml olarak belirlenmiştir. Testlerin sonuçlanma süresi ortama 11.3 gün (8-14 gün) olmuştur (Tablo 13).

Tablo 11. MGIT 960 yöntemiyle duyarlılık durumları tespit edilen 30 izolatin KVRT testiyle bulunan Nikotinamid MİK değerlerinin dağılımı

MİK	>2000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Dirençli (n:15)	8	0	2	3	1	1	0	0
Duyarlı (n:15)	0	0	0	0	9	6	0	0

KVRT yöntemiyle elde edilen sonuçlar referans yönteminkilerle karşılaştırılmış ve duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve % uyumları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 12'de sunulmuştur.

Tablo 12. KVRT testi ile elde edilen sonuçların referans yöntem (MGIT 960 yöntemi) sonuçları ile karşılaştırılması **PPD:** Pozitif Produktif Değer, **NPD:** Negatif Produktif Değer

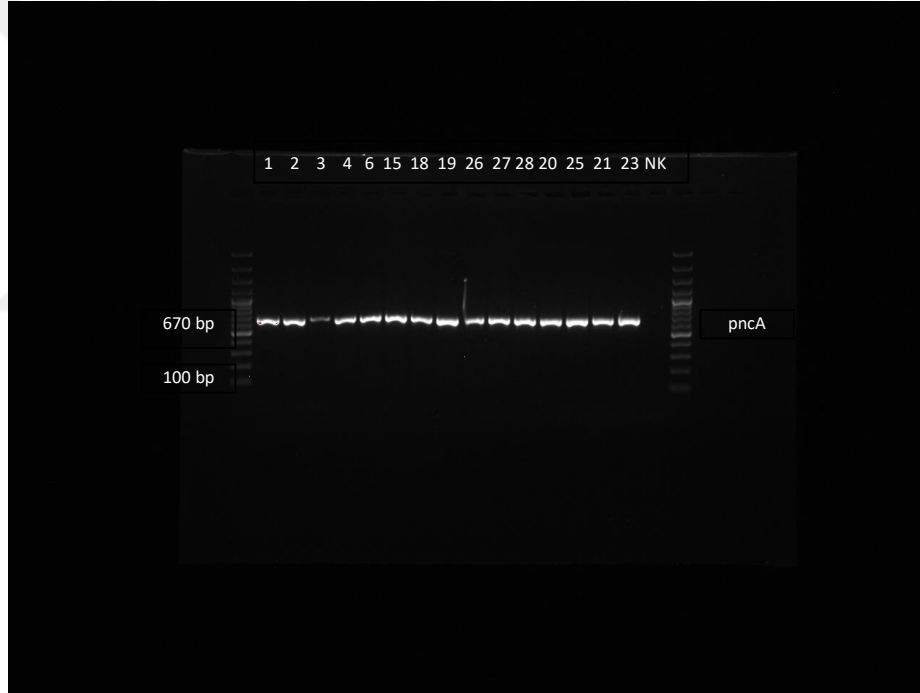
İlaç	KVRT	Referans Yöntem		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)	Uyum (%)
		R	S					
NIC	R	13	0	86,6	100	100	88,2	93,3
	S	2	15					

Tablo 13. Testlerin ortalama sonuçlanma süreleri

	7. Gün	8. Gün	9. Gün	10. Gün	11. Gün	12. Gün	13. Gün	14. Gün	15. Gün	Ortalama
REMA	-	3	5	5	7	4	6	-	-	10.7
NRA	20	-	-	10	-	-	-	-	-	8
MYRT	-	2	2	5	4	4	6	4	4	12.2
KVRT	-	4	-	7	4	5	6	4	-	11.3

4.5. pncA Gen Bölgesi İçin PCR İşlem Sonucu

PZA dirençli 15 izolatın pncA genleri PCR yöntemiyle sonucunda, 670 bp fragment uzunluğundaki bandlarda tespit edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Dirençli izolatlarda pncA geninin PCR ile elde edilen görüntüsü, **NK:** Negatif Kontrol (İzolat numaraları Tablo 1 deki izolatlarla uyumludur)

4.6. DNA Sekans Analizi

pncA genindeki mutasyonlar, BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) kullanılarak vahşi tip *M. tuberculosis* pncA gen dizisi ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Tanımlanan tüm mutasyonlar, her iki şeridin dizilerinde görülmüştür (Tablo 14).

Tablo 14.PZA dirençli *M. tuberculosis* izolatlarında pncA gen mutasyonları

İzolat Numarası	Nükleotid Değişiklikleri	Aminoasid Değişiklikleri
1	228,(A →C)	Cys-138 → Arg
2	Mutasyon tespit edilemedi	Mutasyon tespit edilemedi
3	457,(C →G)	Thr-135 → Arg
4	637,(G →C)	Ser-67 → Trp
6	627,(A →T)	Gly-24 → Asp
15	Mutasyon tespit edilemedi	Mutasyon tespit edilemedi
18	413,(T →C)	Leu-119 → Pro
19	241,(C →T)	Val-175 → Lys
26	25,(T →G)	Ala-21 → Val
27	11,(T →G)	Ala-130 → Val
28	22,(T →C)	Thr-38 → Asn
20	613,(T →C)	Ala-163 → Val
25	644,(G →A)	Val-46 → Ala
21	248,(C →T)	Ala-163 → Val
23	13, (T →G)	Asp-12 → Gly

4.7. Kullanılan Testlerin Maliyetleri

PZA duyarlılıklarının tespitinde kullandığımız referans yöntem olan BACTEC MGIT 960 ile gerçekleştirilen PZA duyarlılık testinin izolat başına maliyeti yaklaşık 67.14 TL olarak hesaplanmıştır. Kullanılan kolorimetrik yöntemlerin test edilen izolat başına maliyetleri ise yaklaşık olarak, REMA için 7.39 TL, NRA için 8.53 TL, MYRT için 7.39 TL ve KVRT için 7.52 TL'dir (Tablo 15).

Tablo 15. Duyarlılık testlerinin yaklaşık maliyetleri (izolat başına)

TEST	BACTEC MGIT 960 PZA	REMA	NRA	MYRT	KVRT
BACTEC MGIT 960 PZA Besiyeri (2 adet)	42 TL	-	-	-	-
BACTEC MGIT 960 PZA Kiti	20 TL	-	-	-	-
LJ besiyeri(1 adet)	2.28 TL	2.28 TL	2.28 TL	2.28 TL	2.28TL
Falcon 50 cc tüp(1 adet)	1 TL	1 TL	1 TL	1 TL	1 TL
Pipet ucu10 µl -100 µl(2 adet)	0.74 TL	0.74 TL	0.74 TL	0.74 TL	0.74 TL
Pipet ucu 100 µl -1000 µl(2 adet)	1.12 TL	1.12 TL	1.12 TL	1.12 TL	1.12 TL
Plak(1 izolat için)	-	0.8 TL	0.8 TL	0.8 TL	0.8 TL
7H9 Besiyeri (gram maliyeti)	-	0.65 TL	0.65 TL	0.65 TL	0.65 TL
NIC (gram maliyeti)	-	0.27 TL	0.27 TL	0.27 TL	0.27 TL
Rezasurin(miligram maliyeti)	-	0.5 TL	-	-	-
Griess ayracı (mililitre maliyeti)	-	-	0.8 TL	-	-
Potasyum Nitrat (gram maliyeti)	-	-	0.87TL	-	-
Malaşit yeşili (miligram maliyeti)	-	-	-	0.53 TL	-
Kristal viyole (miligram maliyeti)	-	-	-	-	0.66 TL
TOPLAM MALİYET	67.14 TL	7.36 TL	8.53 TL	7.39 TL	7.52 TL

5. TARTIŞMA

PZA ilk defa 1936 yılında kimyasal olarak sentezlenmiş olsada tüberküloza etkinliği 1952 yılında tespit edilmiştir. Başlangıçta, hepatotoksik etkisi kullanımıyla ilgili şüphelere neden olmuş. Ancak daha sonra düşük dozlarda da etkinliğinin olduğu görülmüş ve hızlı bir şekilde TB tedavi rejimlerine girmeye başlamıştır. (Dalmer ve ark., 1936; Yeager ve ark., 1952; Mc Cune ve Tompsett, 1956). Özellikle tedavi süresini kısaltması ve diğer anti TB ilaçlarla sinerjik etki oluşturması ilacın önemini daha da artırmıştır (British Thoracic and Tuberculosis Association, 1976; British Thoracic Association, 1982; Fox ve ark., 1999; Ying ve ark, 2013).

Bütün antibiyotiklerde olduğu gibi PZA için de ilacın kullanımıyla birlikte direnç problemi araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. Ancak PZA kültür ortamlarındaki nötral pH'larda *M. tuberculosis*'e etkili olmayıp ancak asidik ortamda (pH 5,5) etkili olmaktadır. Bu durum direncin klasik direnç tespit yöntemleri kullanılarak tespitinin yapılmasını zorlaştırmaktadır. Her ne kadar BACTEC MGIT 960 gibi otomatize sistemlerle bu sorun ortadan kaldırılmaya çalışılsa da bu sistemlerin pahalı olması rutin olarak kullanımını engellemektedir. PZA direnç tespitindeki bu zorluklar INH ve RIF gibi primer ilaçlara göre, bu alanda fazla çalışılmamasının ve yeni yöntemler geliştirilmemesinin nedeni olmuştur.

Son yıllarda bu problemin çözülmesinde en öne çıkan yöntemlerden birisi PZA'nın analogu olan ve anti TB etkisi olmasına rağmen INH ile antagonistik etkisi sebebiyle tedavi rejimine girememiş olan NIC'in kullanılmasıdır (Chorine, 1945; McKenzie ve ark.,1948; McDermott ve Tompsett, 1954; Jordahl ve ark., 1961). Brander (1972) ve Kalish ve ark. (1978) tarafından yapılan çalışmalarda yüksek doz NIC kullanılarak PZA direnç durumunun güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda anti TB ilaçlara karşı direnç tespitinde referans yöntemlere önemli birer alternatif olarak kolorimetrik yöntemlerin öne çıktığı görülmektedir. Bu yöntemlerin basit ve ucuz olması, temel laboratuvar imkanları ile dahi yapılabilir olması gelişmekte olan ülkeler için önemli bir alternatif haline gelmelerini sağlamaktadır. Ek olarak NIC kullanılarak yapılan PZA direnç tespitinde kolorimetrik yöntemlerden de olumlu sonuçlar alındığı görülmektedir. Ancak bu alanda

yapılan çalışma sayısı da oldukça sınırlıdır. Martin ve ark.'nın iki, Mirabal ve ark.'nın bir çalışması bu alanda öne çıkan nadir çalışmalardandır.

Martin ve ark. (2006)'nın çalışmasında, NIC kullanılarak yapılan REMA yönteminde kritik MİK değeri 250 µg/ml olarak; referans yöntemle karşılaştırmasında ise duyarlılık % 100, özgüllük % 98 olarak tespit edilmiştir.

Martin ve ark. (2008)'nin diğer bir çalışmasında ise NIC kullanılarak yapılan NRA yönteminde MİK değerleri 1000 µg/ml ve 500 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Duyarlılık % 91, özgüllük %94 olarak; 250 µg/ml MİK değerinde ise duyarlılık %91, özgüllük %71 olarak bulunmuştur.

Mirabal ve ark. (2010)'nın çalışmalarında NIC, hem NRA yönteminde hem de MYRT'de kullanılmıştır. NRA'da kritik MİK değeri 500 µg/ml olarak alınmıştır. Bu değer referans yöntemle karşılaştırıldığında duyarlılık % 93.75, özgüllük %97.6 olarak tespit edilmiştir. MYRT'de ise kritik MİK değeri 250 µg/ml olarak tespit edilmiş ve referans yöntemle karşılaştırıldığında duyarlılık % 93.75, özgüllük % 97.6 olarak bulunmuştur.

Diğer bir yöntem Çoban (2014) tarafından çalışılan KVRT'dir. PZA duyarlılığı çalışılmamıştır. Ancak, bu yöntem kullanılarak yapılan INH ve RIF direnç tespiti çalışmalarında referans yöntemle uyum INH için % 94.5-98.1 arasında; RIF için ise uyum % 96.3-100 arasında değişmiştir (Çoban, 2014; Çoban ve ark., 2015; Çoban ve ark.,2016a; Çoban ve ark., 2016b). Bu yöntem ilk kez bizim çalışmamızda PZA direnç tespitinde kullanılmıştır.

Bütün bu çalışmalar kolorimetrik yöntemlerin genelde anti TB ilaçların direnç tespitinde önemli bir yere sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca bu çalışmalarda PZA yerine NIC'in kullanılmış olması PZA'dan kaynaklanan dezavantajları da ortadan kaldırmaktadır.

Çalışmaların çoğunluğunda bakteri inokülümleri 1:10 oranında kullanılmışken bizim çalışmamızda bakteri inokülümlerinde 1:15 oranında kullanılmış ve sonuçların daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda REMA yöntemiyle alınan sonuçlar referans yöntemi ile karşılaştırıldığında duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve uyum % 93.3 olarak (Tablo 6); NRA yöntemiyle alınan sonuçlar referans yöntemi ile karşılaştırıldığında da duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve uyum % 93.3 olarak tespit edilmiştir (Tablo 8).

REMA yönteminde referans yöntemde dirençli olan bir izolat duyarlı, duyarlı bulunan bir izolat dirençli olarak tespit edilmiştir. NRA’da da benzer şekilde dirençli olan bir izolat duyarlı, duyarlı bulunan bir izolat dirençli olarak bulunmuştur.

MYRT yöntemiyle alınan sonuçlar ise referans yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılık % 86.6; özgüllük % 93.3; PPD %92.8; NPD % 87.5 ve uyum % 90 olarak tespit edilmiştir (Tablo 10). Referans yöntemde dirençli olan iki izolat MYRT’de duyarlı, referans yöntemde duyarlı bulunan bir izolat ise MYRT’de dirençli olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarda alınan sonuçlar ile uyum göstermektedir.

NIC kullanılarak yapılan PZA duyarlılık tespitince ilk defa kullanılan KVRT yöntemiyle alınan sonuçlar referans yöntemde elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmış ve duyarlılık % 86.6; özgüllük % 100; PPD % 100; NPD % 88.2 ve uyum % 93.3 olarak tespit edilmiştir (Tablo 12). Referans yöntemde dirençli görünen iki izolat KVRT’de duyarlı olarak bulunmuştur.

Testlerin sonuçlanma süreleri; REMA için ortalama 10.7 gün, NRA için ortalama 8 gün, MYRT için ortalama 12.2 gün, KVRT için ortalama 11.3 gündür (Tablo 13).

İzolatların duyarlılık durumları toplu olarak incelendiğinde referans yöntemde duyarlı olan 14 numaralı izolat REMA ve MYRT’de dirençli olarak tespit edilmiştir. 15 numaralı, dirençli bulunan izolat REMA, MYRT ve KVRT’de duyarlı olarak bulunmuştur. 17 numaralı izolat referans yöntem sonucuna göre duyarlı olarak görünmesine rağmen NRA’da dirençli olarak saptanmıştır. Referans yöntemle dirençli saptanan 21 numaralı izolat da NRA, MYRT ve KVRT’de duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Daha önce yapılmış kolorimetrik çalışmalarda MİK testi kritik konsantrasyonları REMA için 250 µg/ml; NRA için 500 µg/ml ve MYRT için 250 µg/ml olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da REMA’da referans yöntemde dirençli bulunan 6 izolatın MİK değerleri > 2000 µg/ml; 4 izolatın MİK değeri 2000 µg/ml; 4 izolatın MİK değeri 1000 µg/ml; 1 izolatın MİK değeri 250 µg/ml; referans yöntemde duyarlı olan 14 izolatın MİK değeri 250 µg/ml; bir izolatın MİK değeri 1000 µg/ml olarak tespit edilmiştir. H37Rv referans izolatın MİK değeri 125 µg/ml; ATCC 35828 referans

izolatın MİK değeri ise >2000 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Bu bulgularla REMA için MİK testi kritik konsantrasyonu 250 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 5).

NRA'da referans yöntemde dirençli bulunan 7 izolatın MİK değeri > 2000 $\mu\text{g/ml}$; 3 izolatın MİK değeri 2000 $\mu\text{g/ml}$; 4 izolatın MİK değeri 1000 $\mu\text{g/ml}$; bir izolatın MİK değeri 250 $\mu\text{g/ml}$; referans yöntemde duyarlı olan 6 izolatın MİK değeri 250 $\mu\text{g/ml}$; 8 izolatın MİK değeri 500 $\mu\text{g/ml}$; bir izolatın MİK değeri 1000 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. H37Rv referans izolatın MİK değeri 500 $\mu\text{g/ml}$; ATCC 35828 referans izolatın MİK değeri ise 2000 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da NRA yönteminde MİK testi kritik konsantrasyonunun 500 $\mu\text{g/ml}$ olduğu görülmektedir (Tablo 7).

MYRT'de referans yöntemde dirençli bulunan 7 izolatın MİK değeri > 2000 $\mu\text{g/ml}$; 1 izolatın MİK değeri 2000 $\mu\text{g/ml}$; 2 izolatın MİK değeri 1000 $\mu\text{g/ml}$; 3 izolatın MİK değeri 500 $\mu\text{g/ml}$; 2 izolatın MİK değeri 125 $\mu\text{g/ml}$ olarak; referans yöntemde duyarlı olan 14 izolatın MİK değeri 250 $\mu\text{g/ml}$; bir izolatın MİK değeri 1000 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. H37Rv referans izolatın MİK değeri 250 $\mu\text{g/ml}$; ATCC 35828 referans izolatın MİK değeri ise > 2000 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda MYRT yöntemiyle MİK testi kritik konsantrasyonu 250 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 9).

KVRT'de referans yöntemde dirençli bulunan 8 izolatın MİK değeri > 2000 $\mu\text{g/ml}$; 2 izolatın MİK değeri 1000 $\mu\text{g/ml}$, 3 izolatın MİK değeri 500 $\mu\text{g/ml}$, bir izolatın MİK değeri 250 $\mu\text{g/ml}$; bir izolatın MİK değeri 125 $\mu\text{g/ml}$ olarak; referans yöntemde duyarlı olan 9 izolatın MİK değeri 250 $\mu\text{g/ml}$; 6 izolatın MİK değeri ise 125 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. H37Rv referans izolatın MİK değeri 125 $\mu\text{g/ml}$; ATCC 35828 referans izolatın MİK değeri ise > 2000 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda KVRT'de MİK testi kritik konsantrasyonunun 250 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 11).

Çalışmamızda, elde ettiğimiz sonuçların referans yöntemle karşılaştırmasında yöntemlerin tamamında uyumun % 90 ve üzeri olduğu görülmektedir. Bu sonuç önceki çalışmalarla uyumludur. Ayrıca PZA direnç tespitinde ilk defa kullanılan KVRT'nin, referans yöntemle uyumunun (%93.3), çalışmada kullanılan diğer yöntemlerle aynı düzeyde olduğu ve başarılı bir şekilde PZA direncini tespit edebildiği görülmüştür.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2016 Tüberküloz Raporu'nda PZA direncinin özellikle RIF direnciyle anlamlı şekilde ilişkili olduğu, RIF'e duyarlı vakalarda direnç oranı % 0.5-4.2 iken RIF'e dirençli olgularda PZA direnç oranının % 36.7-81.3 arasında değiştiği belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda da 28 numaralı izolat sadece RIF dirençli bir izolat olup (Tablo 1) dört yöntem tarafından da PZA dirençli olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Referans yöntemde PZA duyarlı olarak tespit edilmiş 14 numaralı izolat REMA ve MYRT yöntemlerine göre dirençli, NRA ve KVRT yöntemlerine göre ise duyarlı olarak bulunmuştur.

15 numaralı izolat referans yöntemde PZA dirençli olarak tespit edilmiştir. Ancak REMA, MYRT ve KVRT yöntemlerine göre duyarlı olarak tespit edilmiş ve bu üç yöntemin duyarlılık tespitinde yetersiz kaldığı gözlenmiştir. Direnç sadece NRA yöntemi ile tespit edilebilmiştir.

21 numaralı izolatta direnç yalnız REMA testi ile gösterilebilmiştir (Tablo 4).

Kullanılan izolatlarda PZA monorezistan tek izolat 19 numaralı izolat olup tüm kolorimetrik yöntemler tarafından dirençli olarak tespit edilmiştir (Tablo 4).

Testler sonuçlanma sürelerine göre değerlendirildiğinde en hızlı sonuç veren testin ortalama 8 gün ile NRA olduğu görülmüştür. NRA'da sonuçlanma sürelerinin 7 ila 10 gün arasında değiştiği görülmektedir. REMA ve KVRT'nin ortalama sonuçlanma süreleri birbirine yakındır. REMA'da ortalama süre 10.7 gün, KVRT'de ise ortalama 11.3 gün olup her ikisinde de testlerin sonuçlanma süreleri 8 ila 13 gün arasında değişmektedir. MYRT'de ise ortalama sonuçlanma süresi 12.2 gün olup bütün testler 8 ila 15 gün arasında sonuçlanmıştır. BACTEC MGIT 960 ile yapılan PZA duyarlılık testlerinin sonuçları incelendiğinde ise; testlerden sonuç alınma sürelerinin 7-28 gün arasında değiştiği görülmektedir. Bu bulgular kolorimetrik yöntemlerin hızlı sonuç alma konusunda referans yönteme alternatif oluşturabileceğini göstermektedir (Tablo 13).

PZA'ya dirençli klinik izolatlarda PZase aktivitesinin kaybı ile pncA mutasyonları ve PZA direnci arasında çok iyi bir korelasyon gözlenmektedir. Bu durum, pncA mutasyonunun *M. tuberculosis*'teki PZA direncinin ana mekanizması olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda PZA dirençli 15 izolatta *pncA* gen sekansı da yapılmış ve 13 izolatta *pncA* mutasyonu tespit edilmiş ve PZA dirençli izolatlardaki mutasyonların *pncA* geni boyunca dağıldığı görülmüştür. 2 ve 15 numaralı izolatlarda herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (Tablo 14).

pncA gen mutasyonu tespit edilemeyen 15 numaralı izolatta direnç sadece NRA yöntemi ile tespit edilebilmiştir. Bilinmeyen nedenlerden dolayı bu izolattaki PZase aktivite kaybının diğer üç yöntem tarafından tespit edilemeyecek limitlerde olması mümkündür.

Ayrıca sadece REMA ile dirençli olarak tespit edilen 21 numaralı izolat içinde benzer durum söz konusu olabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar *pncA* mutasyonu bulunmayan izolatlarda *rpsA*, *panD* genlerinde mutasyonlar olabileceğini göstermektedir. *pncA* gen mutasyonu tespit edilemeyen 2 ve 15 numaralı izolatlarda diğer gen mutasyonlarının da araştırılması düşünülebilir.

Referans yöntem olan BACTEC MGIT 960'da PZA duyarlılığının saptanması için özel olarak imal edilmiş PZA besiyerleri ve PZA kiti (OADC ve PZA içeren) gerekmektedir. Ancak bu malzemeler BACTEC MGIT 960 kullanan laboratuvarlarda bile çoğu zaman mevcut olmayan malzemelerdir. Buna karşın kolorimetrik yöntemlerde kullanılan malzemelerin çoğu her mikrobiyoloji laboratuvarında bulunabilecek malzemelerdir. Kullanılan kimyasalların bir kısmı laboratuvarında her zaman bulunmakta olan (kristal viyole, malaşit yeşili gibi) bir kısmı ise kolayca temin edilebilen ve raf ömrü uzun süreli olan malzemelerdir (rezasurin, griess ayracı kimyasalları vb).

NRA yöntemi hızlı olmasına rağmen kullanılması gereken kimyasal malzeme miktarının en fazla olduğu testtir. NRA'da besiyerine potasyum nitrat eklenmesi ve Griess ayracının hazırlanması için de üç ayrı kimyasal malzeme gerektirmektedir. Diğer üç testte ise besiyerlerinin hazırlanması için özel malzeme gerekli olmayıp sadece kendi araçları yeterlidir. Özellikle kristal viyole her laboratuvarında kolayca bulunabilecek kimyasallardandır.

PZA duyarlılık tespitinde referans yöntem olarak kullandığımız BACTEC MGIT 960'da izolat başına maliyeti yaklaşık 67.14 TL olarak hesaplanmıştır. Kullanılan kolorimetrik yöntemlerin maliyetleri ise yaklaşık olarak, test edilen izolat başına REMA için 7.39 TL, NRA için 8.53 TL, MYRT için 7.39 TL ve KVRT için 7.52 TL'dir (Tablo

15). Referans yöntemle kolorimetrik yöntemler arasındaki maliyet farkı 8-9 kat arasında değişmektedir. NRA’da maliyetin biraz daha fazla olmasının sebebi besiyeri hazırlanmasında fazladan potasyum nitrat kullanılması ve Griess ayracının yapımı için üç ayrı kimyasal gerektirmesidir. Tespit edilen bu maliyetlerin çok sayıda testin aynı anda yapılmasıyla daha da düşeceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda; kullanılan kolorimetrik yöntemlerin tamamının hızlı, kolay uygulanabilir, uygulayıcının fazla bir eğitim almasını gerektirmeyen, pek çok mikrobiyoloji laboratuvarında mevcut bulunan malzemelerle ve kimyasallarla gerçekleştirilebilen ve ucuza maledilen yöntemler olduğu gösterilmiştir. Ancak bu yöntemlerin uygulanmaları sırasında bulaşma ve kontaminasyon riskine karşı azami kişisel koruma önlemlerinin alınması ve sınıf II biogüvenlik kabini kullanılmasının gerekliliği unutulmamalıdır.

REMA ve NRA antiTB ilaçların duyarlılık durumlarının tespitinde uzun süredir çeşitli çalışmalarda denenmiş ve iyi sonuçlar alınmış yöntemlerdir. Her ne kadar NRA, REMA’ya göre hazırlanması daha zor olmasına rağmen, hızlı sonuç vermesi açısından avantajlıdır.

MYRT kolay uygulanan ve düşük maliyetli bir yöntem olarak, bir süredir antiTB ilaçlarla denenmektedir ve iyi sonuçlar alınmaktadır.

KVRT diğer yöntemlere göre çok yeni bir yöntemdir. Son çalışmalar, antiTB ilaçlarda direnç tespitinde başarılı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda, PZA direnç tespitinde referans yöntemle yüksek uyumluluk göstermiştir. Ayrıca düşük maliyeti, kolay uygulanması ve hızlı sonuç alınması sayesinde hem referans yöntemlere hem de diğer üç yönteme iyi bir alternatif olabilir.

Çalışmamız kolorimetrik yöntemlerin PZA duyarlılık tespitinde ki etkinliğini araştırmak amacıyla yapılmış olup izolat sayısı bu nedenle sınırlı tutulmuştur. Bundan sonraki çalışmaların daha fazla sayıda izolatla ve çok merkezli olarak yapılması düşünülebilir. Böylece kolorimetrik yöntemlerin referans yöntemlerle uyumu konusunda mevcut literatür bulgularına katkı sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abate G, Hoffner SE, Thomsen VO, Miörner H. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in katG. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20(5): 329-333.
- Abrahams KA, Besra GS. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. Parasitology 2016;15:1-18.
- Alderman DJ. Malachite green: a review. J. Fish Dis 1985;8:289–298.
- Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Gohlmann H, Neefs J, Winkler H, Van Gestel J, Timmerman P, Zhu M, Lee E, Williams P, de Chaffoy D, Huitric E, Hoffner S, Cambau E, Truffot-Pernot C, Lounis N, Jarlier V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science 2005; 307:223–227.
- Ängeby K, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. J Clin Microbiol 2002;40(2): 553–555.
- Aretaeus. De causis et signis diuturnorum morborum MS 1. yy.
- Aufderheide AC, Conrado RM, Odin L. The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology Cambridge University Press 1998:130.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1994; 263(5144): 227-230.
- Barnes DS. The Making of a Social Disease: Tuberculosis in Nineteenth-century France. University of California Press 1995; 39-41.
- Basso LA, Zheng R, Musser JM, Jacobs WR Jr, Blanchard JS. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. J Infect Dis 1998;178(3): 769-775.
- Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusová K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(21): 11919-11924.
- Betts J, Lukey P, Robb L, McAdam R, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. Mol Microbiol 2002; 43:717–731.

- Bhat ZS, Rather MA, Maqbool M, Lah HU, Yousuf SK, Ahmad Z. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed Pharmacother* 2017 Nov;95:1520-1534.
- Bourdelaïs P, Bart KH. *Epidemics Laid Low: A History of what Happened in Rich Countries*. JHU Press 2006;15.
- Brock TD. *Milestones in Microbiology* ASM Press 1999;1546-1940.
- Brander E. A simple way of detecting PZA resistance. *Tubercle* 1972;53:128–131.
- British Thoracic Association. A controlled trial of six months chemotherapy in pulmonary tuberculosis. Second Report: Results during the 24 months after the end of chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:460–462.
- British Thoracic and Tuberculosis Association. Short-course chemotherapy in pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1976; ii:1102–1104.
- Bueno C, Villegas ML, Bertolotti SG, Previtali CM, Neumann MG, Encinas MV. The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. *Photophysics and Photochemical Reaction. Photochemistry and Photobiology* 2002;76 (4): 385–390.
- Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis, *BMC Infect Dis* 2009;9: 67.
- Campanerut PAZ, Ghiraldi LD, Sposito FLE, Sato DN, Leite CQF, Hirata MH, Hirata RDC, Cardoso RF. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *J Antimicrob Chemother* 2011;66: 1044–1046.
- Chalke HD. Some historical aspects of tuberculosis. *Public Health* 1959;74 (3): 83–95.
- Chen J L, Steele TW, Stuckey DC. Modeling and application of a rapid fluorescence-based assay for biotoxicity in anaerobic digestion. *Environmental science & technology* 2015;49(22), 13463-13471.
- Cheng S, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. pncA Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(3):528–532.
- Chorine V. Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre *Mycobacterium*. *Comp Rend Acad Sc* 1945; 220: 150–151.
- Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, Leary JA, Bertozzi CR, Cox JS. Mmp L8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6121-6.

- Cuevas-Córdoba B, Xochihua-González SO, Cuellar A, Fuentes-Domínguez J, Zenteno-Cuevas R. Characterization of *pncA* gene mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexico. *Infect Genet Evol* 2013;19:330-334.
- Çoban AY, Birinci A, Ekinçi B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24(3):304-306.
- Çoban AY. A new rapid colourimetric method for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to isoniazid and rifampicin: a crystal violet decolourisation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109(2): 246-249.
- Çoban AY, Akbal AU, Uzun M, Durupinar B. Evaluation of four colourimetric susceptibility tests for the rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110(5):649-654.
- Çoban AY, Akbal AU, Bicmen C, Albay A, Sig AK, Uzun M, Selale DS, Ozkutuk N, Surucuoglu S, Albayrak N, Ucarman N, Ozkutuk A, Esen N, Ceyhan I, Ozyurt M, Bektore B, Aslan G, Delialioğlu N¹, Alp A. Multicenter evaluation of crystal violet decolorization assay (CVDA) for rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2016;16(6):39050.
- Çoban AY, Akbal AU, Uzun M, Cayci YT, Birinci A, Durupinar B. Evaluation of crystal violet decolorization assay for minimal inhibitory concentration detection of primary antituberculosis drugs against *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016;10:1-6.
- Dalmer, O, Walter, E, Firma, E. Merck in Darmstadt. Verfahren zur Herstellung von Abkömmlingen der Pyrazinmonocarbonsäure. Patentiert im Deutschen Reiche vom 8 Juli 1934 ab. Germany patent. 632 257 Klasse 12 p Gruppe 6 M 127990 IV a/12 p 1936.
- Daniel T. The impact of tuberculosis on civilization. *Infect Dis Clin N Am*. Basel: Karger 2004;18 (1): 157–65.
- Daniel TM. Pioneers of Medicine and Their Impact on Tuberculosis. *Boydell & Brewer* 2000; 8:44-60.
- Delogu G, Sali M, Giovanni Fadda G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5.
- Demers AM, Venter A, Friedrich SO, Rojas-Ponce G, Mapamba D, Jugheli L, Sasamalo M, Almeida D, Dorasamy A, Jentsch U, Gibson M, Everitt D, Eisenach KD, Diacon AH. Direct Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* for Pyrazinamide by Use of the Bactec MGIT 960 System. *J Clin Microbiol* 2016 May;54(5):1276-81.

- Dewan P, Sosnovskaja A, Thomsen V. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9: 170-4.
- Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniowski F, Lalvani A. A systemic review of rapid diagnostic test for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol. Assess* 2007; 11:1–314.
- Drlica, K, Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* 2003;3(3):249-282.
- Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim SH. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* 2001;40:14166–14172.
- Dubos, RJ; Dubos J. *The White Plague: Tuberculosis, Man, and Society*. Rutgers University Press 1987;79,83,84
- Farnia P, Masjedi MR, Mohammadi F, Tabarsei P, Farnia P, Mohammadzadeh AR, Baghei P, Varahram M, Hoffner S, Ali Akbar Velayati AA. Colorimetric Detection of Multidrug-Resistant or Extensively Drug-Resistant Tuberculosis by Use of Malachite Green Indicator Dye' *J Clin Microbiol* 2008;46(2):796–799.
- Feuerriegel S, Koser CU, Richter E, Niemann S. *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(6):1439-40.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Virulence* 2013;1;4(1):3-66.
- Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:S231–279.
- Fyfe PK, Rao VA, Zemla A, Cameron S, Hunter WN. Specificity and mechanism of *Acinetobacter baumannii* nicotinamidase: implications for activation of the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:9176–9179.
- Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infectious Diseases* 2003;3(7): 432-442.
- Griess, JP, Bemerkungen Z. Über einige Azoverbindungen. *Ber. Deutch. Chem. Ges* 1879;12:426–428.
- Golyshevskaja VI, Korneev AA, Chernousova LN, Selina LG, Kazarova TA, Grishina TD, Safonova SG, Puzanov VA, Nikolaeva GM, Fadeeva NI. New microbiological Techniques in diagnosis of tuberculosis. *Probl Tuberk* 1996;(6):22-25.

- Harshey RM, Ramakrishnan T. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 1977; 129: 616–622.
- Heffernan H. Antituberculosis drug resistance in New Zealand. Antibiotic Reference Laboratory Communicable Disease Group ESR, Porirua 2006.
- Heifets LB, Lindholm-Levy PJ. Is pyrazinamide bactericidal against *Mycobacterium tuberculosis*? *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:250–252.
- Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee Y-C, Gernaey AM, Galili E, Eshed V, Greenblatt CL, Lemma E, Bar-Gal GK, Spigelman M. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE* 2008; 3 (10): 10-15.
- Hippocrates. Of the Epidemick. MÖ. 400.
- Hu Y, Coates AR, Mitchison DA. Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:317–322.
- Huang Q, Chen ZF, Li YY, Zhang Y, Ren Y, Fu Z, Xu SQ. Nutrient-starved incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemotherapy* 2007; 53:338–343.
- Jones, JJ, Falkinham JO. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2323–2326.
- Jordahl C, Des Prez R, Deuschle K, Muschenhelm C, Mcdermott W. Ineffectiveness Of Nicotinamide And isoniazid in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1961; 83: 899–900.
- Juan-Carlos Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(8):2720–2722.
- Kalfin, E, Engibarov A.. Guidelines for microbiological diagnosis of infections caused by mycobacteria. In M. Stoianova and G. Mitov (ed.), *Handbook of instructions for microbiological diagnosis of bacterial infections*, vol. 1. Ministry of Public Health, Sofia, Bulgaria 1989;118–127.
- Kalich, R, Gerloff W, Neubert R, Ulber H. Determination of the sensitivity of mycobacteria to pyrazinamide and nicotinamide. *Z. Erkr. Atmungsorgane* 1978;151:103–112.

- Karakousis, PC. Mechanisms of Action and Resistance of Antimycobacterial Agents. In: Antimicrobial Drug Resistance. D. L. Mayers, Springer 2009;271-291.
- Kent, PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga1985;96-103.
- Kohli A, Bashir G, Fatima A, Jan A, Wani N, Ahmad J. Rapid drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to first-line antitubercular drugs by nitrate reductase assay: A comparison with proportion method. Int J Mycobacteriol 2016;5:469 –474.
- Kolyva AS, Karakousis PC. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance. Cardona PJ, Editor, New Approaches to Fighting Against Drug Resistance. London, InTech 2012.
- Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Seventh Edition 2017.
- Konno K, Feldmann FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 1967; 95:461–469.
- Louw GE, Warren RM, Donald PR, Murray MB, Bosman M, Van Helden PD, Young DB, Victor TC. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10(7):802–807.
- Madkour, M. Monir; D. A. Warrell . Tuberculosis. Birkhäuser 2004; 6:11-12.
- Magner, LN. A History of the Life Sciences. CRC Press 2002;273.
- Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK. A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. Antimicrob Agents Chemother 1998;42(9): 2443-2445.
- Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 327–331.
- Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. J Antimicrob Chemother 2008; 61:123–127.
- Maulitz RC, Maulitz SR The King's Evil in Oxfordshire. Med Hist 1973;17(1):87-89.

- McDermott, W, Tompsett R.. Activation of PZA and nicotinamide in acidic environment in vitro. *Am. Rev. Tuberc* 1954;70:748–754.
- McKenzie, D, Malone L, Kushner S. The effect of nicotinic acid amide on experimental tuberculosis of white mice. *J. Lab. Clin. Med* 1948;33: 1249–1253.
- McClelland C Galen on Tuberculosis. *The Physician and Surgeon*. Detroit and Ann Arbor: Keating and Bryant 1909;31:400–404.
- McKeown T. *The Role of Medicine: Dream, Mirage or Nemesis?* (The Rock Carlington Fellow, 1976). London, UK: Nuffield Provincial Hospital Trust 1976; 82.
- McClelland C. Galen on Tuberculosis. *The Physician and Surgeon* (Detroit and Ann Arbor: Keating and Bryant) 1909;31:400-404.
- Mc Clatchy JK, Tsang AY, Cernich MS. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 20:556–557.
- Mc Cune RM Jr, Tompsett R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J Exp Med* 1956; 104:737–762.
- Mc Cune RM Jr, Mc Dermott W, Tompsett R. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* 1956; 104:763–802.
- Mc Cune RM, Feldmann FM, Lambert HP, McDermott W. Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J Exp Med* 1966;123:445–468.
- Mc Cune RM, Feldmann FM, McDermott W. Microbial persistence. II. Characteristics of the sterile state of tubercle bacilli. *J Exp Med* 1966;123:469–486.
- Mc Dermott W, Tompsett R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environment in vitro. *Am Rev Tuberc* 1954; 70:748–754.
- Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, De Smet KA, Portaels F, Van den Eeckhout E. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* Locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2317-9.
- Mikusová K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(11): 2484-2489.

- Mirabal NC, Yzquierdo SL, Lemus D, Madruga M, Yoslane Milian Y, Echemendía M, Takiff H, Martin A, Van der Stuyf P, Palomino JC, Montoro E. Evaluation of Colorimetric Methods Using Nicotinamide for Rapid Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2010; 48(8):2729–2733.
- Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short course chemotherapy. Tubercle 1985; 66:219–225.
- Mphahlele MT. Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South-African pulmonary tuberculosis patients University of Bergen, MPhil thesis 2005.
- Murray MF. Nicotinamide: An Oral Antimicrobial Agent with Activity against Both *Mycobacterium tuberculosis* and Human Immunodeficiency. Virus Clinical Infectious Diseases 2003;36:453-460.
- Musser, JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995;119; 8(4): 496-514.
- Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis 1996;173(1):196-202.
- Otis EO. Pulmonary tuberculosis. W.M. Leonard 1920;28.
- Oommen S, Banaji N. Laboratory diagnosis of tuberculosis: Advances in technology and drug susceptibility testing. Indian J Med Microbiol 2017;35(3):323-331.
- Özkütük N, Ecemiş T, Sürücüoğlu S. Manisa Bölgesinde Pirazinamid-Monorezistan *Mycobacterium Tuberculosis*” Mikrobiyol Bul 2008;42:585-590.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(8):2720–2722.
- Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 1999;18:380–383.
- Panaiotov S, Kantardjiev T. Nitrate Reductase Assay for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002 Oct; 40(10): 3881–3882.
- Pesch KL, Simmert U. Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions. Milchw. Forsch 1929; 8: 551.

- Quémard A, Sacchetti JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR Jr, Blanchard JS. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 1995;34(26): 8235-8241.
- Roberts CA, Pfister LA, Mays S. Letter to the editor: Was tuberculosis present in *Homo erectus* in Turkey? *Am J Phys Anthropol* 2009;139 (3): 442–444.
- Robitzek, EH, Selikoff IJ. Hydrazine derivatives of isonicotinic acid (rimifon marsilid) in the treatment of active progressive caseous-pneumonic tuberculosis; a preliminary report. *Am Rev Tuberc* 1952; 65(4): 402-428.
- Sakamoto K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vet Pathol* 2012;49(3):423-39.
- Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, Russell RG, Derrick S, Collins FM, Morris SL, Jacobs WR Jr. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 2002; 8:1171–1174.
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 1996; 2:662–667.
- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:540–543.
- Sensi, P. History of the development of rifampin. *Rev Infect Dis* 1983,3: 402- 406.
- Shenai S, Rodrigues C, Sadani M, Sukhadia N, Mehta A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing. *Indian J Tuberc* 2009;56:82–90.
- Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE 3rd, Wang H, Zhang W, Zhang Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011; 333:1630–1632.
- Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, Kaswa M, Goh KS, Rastogi N, Salfinger M. Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* mutation in “*Mycobacterium canettii*” and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. *J Clin Microbiol* 2007;45:595–599.
- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR Jr, Telenti A, Musser JM. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(8): 1677-1681.

- Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:636–640.
- Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, Wintjens R, Bifani P. Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:5186– 5193.
- Sylvius. *Opera Medica*.1679.
- Şenol G, Coşkun M, Gündüz AT, Biçmen C, Gayaf M, Özsöz A. İzmir Göğüs Hastalıkları Hastanesinde Çok İlaç Dirençli Tüberküloz Olgularında Pirazinamid Direncinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008;42: 591-597.
- Tarnok I, Czanik P. Malachite green reducing enzyme in mycobacteria. *Nature* 1959;183:549–550.
- Tarshis MS, Weed WA Jr. Lack of significant in vitro sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide on three different solid media. *Am Rev Tuberc* 1953;67:391–395.
- Tarshis MS, Parker MV, Dunham WB. Blood media for cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. X. Results with malachite green, penicillin and sodium tellurite and comparison of the blood agar-MGP, blood agar-PST and Lowenstein-Jensen media under routine diagnostic conditions. *Acta Tuberc Scand*1955; 31:92–105.
- Tasneen R, Li SY, Peloquin CA, Taylor D, Williams KN, Andries K, Mdluli KE, Nuermberger EL. Sterilizing Activity of Novel TMC207- and PA-824-Containing Regimens in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:5485–5492.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341(8846): 647-650.
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997;3(5): 567-570.
- Trivedi SS, Desai SG. Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis*—a test of sensitivity to pyrazinamide. *Tubercle* 1987; 68:221–224.
- Wade, MM. ve Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* 2004;9: 975-994.

- Wade MM, Zhang Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:936–941.
- WHO. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization; Geneva 2011.
- WHO. Global Tuberculosis Report. 2010.
- WHO. Global Tuberculosis Report. 2016
- WHO. Global Tuberculosis Report. 2017.
- Whytt R. Observations on the Dropsy in the Brain. Edinburgh: Balfour, Auld & Smellie 1768;46.
- Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, Soolingen D, Rüsche-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P, Niemann S. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathogens* 2008; 4(9):1-10.
- Yeager R, Munroe W, Dessau F. Pyrazinamide (Aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1952; 65:523–534.
- Ying Z, Wanliang S, Wenhong Z, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr* 2013;2(4):1–12.
- Zhang N, Torrelles JB, McNeil MR, Escuyer VE, Khoo KH, Brennan PJ, Chatterjee D. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol Microbiol* 2003;50(1): 69-76.
- Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang WH, Y Z. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections* 2013; 2(6):1-5.
- Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol* 1999; 181:2044–2049.
- Zhang, Y. Telenti, A. Genetics of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press Washington, DC: 2000;235-254.
- Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol* 2002;51:42–49.

- Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:6–21.
- Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:790–795.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992;358(6387): 591-593.
- Zink A, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich A. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2003; 4 (1):359–367.
- Zysk KG. 1998. *Medicine in the Veda: Religious Healing in the Veda*. Motilal Banarsidass Publ 1998;12,32.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet Uğur Akbal
Doğum Yeri : Elazığ
Doğum Tarihi :20.11.1970
Medeni Hali : Evli
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,1994

Çalıştığı Kurumlar

- 1994-2001 Samsun Çarşamba Kızılot Sağlık Ocağı
- 2001-2012 Samsun Acil Sağlık Hizmetleri Şube Müdürlüğü
- 2012- Samsun İl Sağlık Müdürlüğü

E-posta : auakbal@gmail.com

Yayınlar

Makaleler:

Seroprevalence of Hepatitis E in A Tertiary Care Hospital, Journal of Microbiology & Experimentation, 2015, 2(2): 00043

Evaluation of the Prevalence of Hepatitis A in Samsun Vicinity, Viral Hepatitis Journal 2015; 21(1): 23-27

Evaluation of four colourimetric susceptibility tests for the rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro. 2015;110(5)

Evaluation of crystal violet decolorization assay for minimal inhibitory concentration detection of primary antituberculosis drugs against *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro.2016; 111(7)

Multicenter evaluation of crystal violet decolorization assay (CVDA) for rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Scientific Reports 2016;6, 16

Yeni Antibakteriyeller Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi (Kabul edildi, yayınlanması bekleniyor)

Bildiriler:

Evaluation of Attitudes and Practices of Hand Hygiene Among Employees at Maternity and Children's Hospital in Samsun, 14. World Sterilization Congress (6-9 Kasım 2013)

Effect of melatonin on in-vitro cytotoxicity of acrylic resin, filler particulate composite resin and thermoplastic material, EuroPerou8, 2015,London, Journal of Clinical Periodontology, June 2015, special issue, volume 42,129

Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının hızlı tespiti için yeni kolorimetrik bir yöntem; kristal viyole renksizleştirme testi, VII.Tüberküloz Sempozyumu (3-7.11.2014)

Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının hızlı tespitinde malaşit yeşili renksizleştirme testinin (MYRT) değerlendirilmesi, VII.Tüberküloz Sempozyumu (3-7.11.2014)

Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının hızlı tespitinde nitrat redüktaz testinin (NRT) değerlendirilmesi, VII.Tüberküloz Sempozyumu (3-7.11.2014)

Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının hızlı tespiti için rezasurin mikroplak testinin (RMPT) değerlendirilmesi, VII.Tüberküloz Sempozyumu (3-7.11.2014)

Primer Antitüberküloz İlaçların MİK'lerinin Kristal Viyole Renksizleştirme Testi (KVRT) İle Tespiti, 7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu/8-10 Mayıs 2015 Mersin

Çok İlaca Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Hızlı Tespitinde Kristal Viyole Renksizleştirme Testinin (KVRT) Değerlendirilmesi: Çok Merkezli Bir Çalışma, 7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu/8-10 Mayıs 2015, Mersin

Mycobacterium Tuberculosis'de Etambutol ve Streptomisin Direncinin Hızlı Tespiti İçin Yeni Bir Yöntem; KVRT, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 17-20 Kasım 2016,Antalya