

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

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE
EDİLEN *MYCOBACTERIUM tuberculosis* KOMPLEKS (MTBK)
SUŞLARINDA ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ (ÇİD) İLE BERABER
İKİNCİ SEÇENEK ANTİ-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DA KARŞI
GELİŞEN YAYGIN İLAÇ DİRENCİNİN (YİD)
FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ**

Emel YARAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd.Doç.Dr. Toğrul NAĞIYEV

Bu çalışma **TF2013YL8** nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.

ADANA-2014

TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her zaman hoşgörülü davranan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Fatih KÖKSAL'a ve akademik tecrübelerinden faydalandığım, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Toğrul NAĞIYEV'e, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli Öğretim Üyeleri; Sayın Prof.Dr. Fügen YARKIN ve Sayın Prof.Dr. Akgün YAMAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yine yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan kıvanç duyduğum, başta bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN olmak üzere Ç.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki bütün çalışma arkadaşlarıma, ayrıca başta Öğretim Görevlisi Dr. Begüm KAYAR, Arş. Gör. Dr. Taylan BOZOK, Mehdi MARZİ, Gülfer YAKICI, Farhad KOHANSAL ve Fırat KARSLI olmak üzere bütün Tüberküloz Çalışma Grubuna teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de hep yanımda olan sevgili annem Zümrüt YARAR, babam Osman YARAR ve canım kız kardeşim Müge YARAR'a, desteklerinden ötürü sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi	5
2.1.1. Dünya’da Tüberküloz	5
2.1.1.1. Tüberküloz Basilinin Keşfi (1882)	5
2.1.1.2. Aşı (1921)	7
2.1.1.3. Kemoterapi (1940)	7
2.1.1.4. HIV ve Tüberküloz (1980)	8
2.1.1.5. ÇİD (1990)	8
2.1.1.6. DSÖ’nün Acil Durum İlanı ve Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri (DGTS) (1993)	8
2.1.1.7. YİD (2005)	9
2.1.1.8. Stop-TB Stratejisi (2006)	10
2.1.1.9. Expand-TB Projesi (2009)	10
2.1.1.10. TB’nin Kontrol Altına Alınmasının Hedefi (2025)	11
2.1.2. Türkiye’de Tüberküloz	11
2.2. Epidemiyoloji	12
2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri	14
2.3.1. Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı ve Bileşenleri	16
2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	17
2.4.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks (MTBK) Üyeleri	18
2.4.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>M. tuberculosis</i>)	18

2.4.1.2. <i>Mycobacterium bovis</i> (<i>M. bovis</i> (<i>M. bovis</i> BCG))	18
2.4.1.3. <i>Mycobacterium africanum</i> (<i>M. africanum</i>)	19
2.4.1.4. <i>Mycobacterium pinnipedii</i> (<i>M. pinnipedii</i>)	19
2.4.1.5. <i>Mycobacterium caprae</i> (<i>M. caprae</i>)	19
2.4.1.6. <i>Mycobacterium canettii</i> (<i>M. canettii</i>)	19
2.4.1.7. <i>Mycobacterium microti</i> (<i>M. microti</i>)	20
2.4.1.8. <i>Mycobacterium mungi</i> (<i>M. mungi</i>)	20
2.4.1.9. <i>Mycobacterium orygis</i> (<i>M. orygis</i>)	20
2.5. <i>M.tuberculosis</i> 'de Antijenik Yapı ve Virulans Faktörleri	20
2.5.1. Old Tuberkülin (OT)	21
2.5.2 Saflaştırılmış Protein Derivesi (Purified Protein Derivative-PPD)	21
2.5.3. Isı Şok Proteinleri-HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)	21
2.5.4. 65 kDa Protein	21
2.5.5. 19 kDa Lipoprotein	21
2.5.6. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)	22
2.6. Mikobakteriyel Lipidler	22
2.6.1. Lipoarabinomannan	22
2.6.2. WaxD	22
2.6.3. Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör)	22
2.6.4. Sülfolipidler (Sülfatidler)	22
2.6.5. Fosfatidil İnozitol Mannoizid (PIM)	22
2.7. Tüberküloz Basillerinin Metabolik Aktiviteleri	23
2.7.1. A Grubu Basiller (Sürekli Çoğalan Basiller)	23
2.7.2. B Grubu Basiller (Asit Ortam Basilleri)	23
2.7.3. C Grubu Basiller (Aralıklı Çoğalan Basiller)	23
2.7.4. D Grubu Basiller (Dormant Basiller, Persistan Basiller)	23
2.8. Tüberkülozda Klinik Tablo, İmmunoloji ve Patogenezi	23
2.8.1. Klinik Tablolar	23
2.8.1.1. Primer Tüberküloz	24
2.8.1.2. Miliyer Tüberküloz	24
2.8.1.3. Sekonder Tüberküloz	24

2.8.1.3.1 Endojen Reaktivasyon	25
2.8.1.3.2. Ekzojen Reinfeksiyon	25
2.8.1.4. Ekstrapulmoner Tüberküloz	25
2.8.2. Konağın Savunma Mekanizması ve İmmun Cevap	25
2.8.2.1. Doğal İmmun Cevap	25
2.8.2.2. Tüberkülozda İmmünoloji	25
2.9. Tüberküloz İlaçlarının Etki Mekanizmaları ve Anti-TB İlaçlar	27
2.9.1. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan Anti-TB İlaçlar	27
2.9.1.1. Birinci Seçenek Anti-TB İlaçlar	27
2.9.1.1.1 Streptomisin (STR)	28
2.9.1.1.2. İzoniazid (INH)	28
2.9.1.1.3. Rifampisin (RIF)	29
2.9.1.1.4. Etambutol (EMB)	29
2.9.1.1.5. Pirazinamid (PZA)	30
2.9.1.2. İkinci Seçenek Anti-TB İlaçlar	31
2.9.1.2.1. Para-amino Salisilik Asit (PAS)	31
2.9.1.2.2. Etionamid	32
2.9.1.2.3. Protionamid	32
2.9.1.2.4. Sikloserin	32
2.9.1.2.5. Tiasetazon	32
2.9.1.2.6. Kanamisin	32
2.9.1.2.7. Amikasin	33
2.9.1.2.8. Kapreomisin	33
2.9.1.2.9. Viomisin	33
2.9.1.2.10. Florokinolonlar	33
2.9.1.3. Tüberküloz'da İlaç Direnç Tanımları	34
2.9.1.3.1. Yeni Olguda İlaç Direnci	34
2.9.1.3.2. Tedavi Görmüş Olguda İlaç Direnci	35
2.9.1.3.3. Çok İlaça Dirençli Tüberküloz (ÇİD-TB)	
[multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB)]	35
2.9.1.3.4. Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz (YİD-TB)	
[extensive drug resistant tuberculosis (XDR-TB)]	35

2.10. Tüberküloz Tanı Yöntemleri	35
2.10.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Mikrobiyolojik Tanısı	35
2.10.1.1. Fenotipik Yöntemler	35
2.10.1.1.1. Mikroskopi	35
2.10.1.1.2. Kültür Ortamında İzolasyon Yöntemleri	36
2.10.1.1.2.1. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi ve NAP Testi	36
2.10.1.1.3. Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri	37
2.10.1.1.3.1. Mutlak (Absolute) Konsantrasyon Yöntemi	37
2.10.1.1.3.2. Rasyo (Ratio) Yöntemi	37
2.10.1.1.3.3. Proporsiyon Yöntemi	38
2.10.1.2. Moleküler Yöntemler	38
2.10.1.2.1. IS6110-PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	38
2.10.1.2.2. Spoligotyping (Spacer oligonucleotide typing)	38
2.10.1.2.3. MIRU-VNTR (Mycobacterial interspersed repetitive unitvariable number of tandem repeat)	39
2.10.1.2.4. Real-Time PCR	39
2.10.1.2.4.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi SYBR Green I	42
2.10.1.2.4.2.Özgül Belirleme Sistemi	43
2.10.1.2.4.2.1. “TaqMan Probe” Yöntemi	43
2.10.1.2.4.2.2. Moleküler Boncuk Yöntemi	44
2.10.1.2.4.2.3. Hibridizasyon Prob Yöntemi	44
2.10.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in Radyolojik Tanısı	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	46
3.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi	46
3.1.1. Örnek Grupları	46
3.1.1.1. Birinci Grup	46
3.1.1.2. İkinci Grup	47
3.1.2. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi	47
3.1.2.1. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemine Hazırlık	47

3.1.2.2. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi Uygulanışı	48
3.2. Fenotipik İncelemeler	49
3.2.1. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi	49
3.2.1.1. Karbol Fuksin Yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN))	49
3.2.1.1.1. EZN Boyasının Hazırlanışı	50
3.2.1.1.2. EZN Boyama İşlemi (ARB/AARB Boyama)	50
3.2.2. Kültür Ortamında İzolasyon	51
3.2.2.1. Lowenstein-Jensen (LJ) Agarda Kültür	51
3.2.2.2. BACTEC MGIT 960 Sisteminde Kültür	51
3.2.2.2.1. BACTEC MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960 Sistemi	52
3.2.2.2.1.1. MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)	52
3.2.2.2.1.2. BACTEC MGIT Growth Supplement (BACTEC MGIT Çoğalma Destekleyicisi)	52
3.2.2.2.1.3. MGIT PANTA Antibiotic Mixture (BBL MGIT PANTA antibiyotik karışımı destekli)	52
3.2.2.3. NAP Testi (Para Nitro Benzoik Asit Reaktif (p-NBA)) Yorumu ve Hazırlanışı	52
3.2.2.3.1. NAP Testinin Uygulanışı	53
3.2.2.4. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi	54
3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri (ADT)	55
3.2.3.1. Birinci Seçenek İlaçlara Karşı Direnç Durumunun BACTEC MGIT 960 Otomatize Sistemi ile Tespiti	55
3.2.3.1.1. Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması	55
3.2.3.1.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz MGIT Tüplerinin Hazırlanması	55
3.2.3.2. İkinci Seçenek Anti-TB İlaçlara Karşı İlaç Direncinin LJ Agar Proporsiyon Yöntemi ile Tespiti	56
3.2.3.2.1. LJ Besiyerinin Hazırlanması	56
3.2.3.2.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerinin Döküm İşlemi ve İlaç Konsantrasyonları	58

3.2.3.2.3. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerine Ekim İşlemi	58
3.3. Genotipik İnceleme	59
3.3.1. Real-Time PCR	59
3.3.1.1. DNA Ekstrasyonu	59
3.3.1.1.1 Real-Time PCR İçin Mickle Ekstraksiyon	59
3.3.1.1.2. MTB Real-Time PCR Ekstraksiyon Protokolü	61
3.3.1.2. Real-Time PCR Amplifikasyon	61
3.4. Elde Edilen Sonuçların Yorumlanması ve İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR	63
4.1. Fenotipik İnceleme Bulgularının Değerlendirilmesi	63
4.2. Multipleks Real-Time PCR Bulgularının Değerlendirilmesi	65
4.3. Fenotipik İnceleme ve Real-Time PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	65
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	76
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. YİD-TB vakaları	10
Şekil 2.2. 2011 yılında tahmin edilen TB insidansı	13
Şekil 2.3. Ülkelere göre TB olgularında HIV testi uygulaması	13
Şekil 2.4. Mikobakterilerde hücre duvar yapısı	17
Şekil 2.5. Mikobakterilerin şematik sınıflandırılması	17
Şekil 2.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infeksiyonunun seyri (3 aşaması)	27
Şekil 2.7. Sybr Green yöntemi	42
Şekil 3.1. Mpt64 kart testi: TB pozitif	54
Şekil 3.2. Mickle cihazı	60
Şekil 3.3. CFX96 Real Time PCR cihazı	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. DSÖ'ye göre tüberküloz vaka sayısı	11
Çizelge 2.2. Mikobakterilerin genel özellikleri	15
Çizelge 2.3. Tüberküloz tedavisinde kullanılan anti-TB ilaçlar	28
Çizelge 2.4. Birinci seçenek anti-TB ilaç mutasyonları	30
Çizelge 2.5. İkinci seçenek anti-TB ilaç mutasyonları	34
Çizelge 2.6. DSÖ'nün ÇİD-TB için önerdiği tedavi rejimleri	34
Çizelge 3.1. P-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) test sonucu ve immünokromatografik TB Ag Mpt64 kart test sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi	54
Çizelge 3.2 MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları	56
Çizelge 3.3. MTB/MDR/XDR amplifikasyon karışımı protokolü	62
Çizelge 3.4. Multipleks Real-Time PCR ile ÇİD ve YİD MTBK tespitinde kullanılan mutasyonlar SYBR Green I	62
Çizelge 4.1. Fenotipik inceleme sonuçlarının gruplara dağılımı	63
Çizelge 4.2. ÇİD MTBK örneklerinin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması	63
Çizelge 4.3. Fenotipik inceleme ve Real-Time PCR sonuçlarının karşılaştırılması ve gruplara dağılımı	66
Çizelge 4.4. Fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen suşların Real-Time PCR ile ÇİD MTBK değerlendirilmesi ve gruplara dağılımı	68
Çizelge 4.5. Aynı hastada farklı tarihlerde alınan üç örneğin fenotipik ve genotipik inceleme sonuçları	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ADT	Antibiyotik Duyarlılık Testi
AMK	Amikacin
Anti-TB	Anti-Tüberküloz
APD	Agar Proporsiyon Duyarlılık
ARB/AARB	Acid-Resistant Bacilli/ Acid-Alcohol Resistant Bacilli
BCG	Bacille Calmette-Guerin
C	Sitozin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFP-10	Culture Filtrat Protein
CIP	Ciprofloxacin
ÇİD	Çoklu İlaç Dirençli
DGTS-Artı	Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri-Artı
DOTS-Plus	Directly Observed Therapy Strategies-Plus
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü – World Health Organisation
EMB	Etambutol
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target
Expand-TB	Expanding Access to New Diagnostics for TB
G	Guanin
GAD	Geç Tip Aşırı Duyarlılık
Hİ	Hücrel İmmünite
HIV	Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome-Kazanılmış Bağışık Yetmezlik Sendromu))
IU-ATLD	Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıklarına Karşı Birlik
İDT	İlaç Duyarlılık Testi
İNH	İsoniazid
LAM	Lipoarabinomannan
LAP	Lenfadenopati
LJ	Lowenstein Jensen

MDR-TB	Multidrug-Resistant-TB
MGIT	Mycobacterium Growth İndikatör Tube
MHC	Major Histo-Compatibility Complex
MIRU-VNTR	Mycobacterial interspersed repetitive unitvariable number of tandem repeat
µl	Mikro Litre
MOTT	Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MTBK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleks- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
NALC	N-Asetil L-Sistein
NAP	p-Nitro- α -Asetilamino- β -hidroksi-Propiofen
NTM	Non-Tüberküloz
OT	Old Tüberkulin
PANTA	Polimiksin B Amfoterisin B Nalidiksik, Trimethoprim, Azlosilin asit
PAS	Para-amino salisilik asit
PIM	Fosfatidil İnoзит Mannoзid
PPD	Purified Protein Derivative-Saflaştırlılmış protein derivesi
Pzase	Pirazinaminidaz
PZA	Pirazinamid
RİF	Rifampicin
RPT	Rifapentin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizm
Spoligotyping	Spacer oligonucleotide typing
STR	Streptomycin
T	Timin
TB	Tüberküloz
Tm	Temperature Melting-Erime Eğrisi
UÖRL	Ulus-Üstü Tüberküloz Laboratuvarları
YİD-TB	Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz
XDR	Extensively Drug Resistant

ÖZET

Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarının, ikinci seçenek anti-tüberküloz (anti-TB) ilaçlara da direnç geliştirmesiyle yaygın ilaç dirençli (YİD) suşların ortaya çıkışı en önemli insan sağlığı tehditlerinden birini oluşturmaktadır. Bu sebeple, araştırmamızda bölgemizde izole edilen MTBK suşlarının birinci ve ikinci seçenek ilaç duyarlılık paterninin değerlendirilmesi, ÇİD ve YİD suşların hızlı tanısında mutasyonları tespit etmeye yönelik multipleks Real-Time PCR yönteminin kullanılması, böylece elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

ÇÜ THAUM ve Bölge Tüberküloz laboratuvarına gönderilen klinik örnekler ÇİD MTBK suşunun izole edildiği 44 kültür örneği ve ARB pozitif 50 balgam örneğinden oluşan iki grup halinde incelendi. Fenotipik olarak, MTBK identifikasyonunu takiben suşların birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç paternleri BACTEC MGIT 960 sistemi ve Lowenstein Jensen agar proporsiyon duyarlılık (APD) yöntemleri ile belirlendi. Genotipik olarak ise, multipleks Real-Time PCR yöntemi ile yeni bir Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection kit (Seegene) kullanarak bütün örneklerde aynı anda hem MTBK varlığı, hem de ÇİD ve YİD yönünden direnç durumu ortaya çıkarıldı.

Çalışma sonucunda, fenotipik ve genotipik inceleme sonuçlarının çok uyumlu olduğu, ÇİD tespitinde fenotipik yöntemlere göre kullandığımız moleküler yöntemin duyarlılığının %80, özgüllüğünün de % 100 olduğu görüldü. Ayrıca, MTBK suşlarımız içerisinde YİD bulunamazken, her iki yöntemle de, ikisi florokinolonlara, biri de injektabl ilaçlara dirençli olmak üzere toplam üç ön-YİD MTBK tespit edildi.

Sonuç olarak, yeni multipleks Real-Time PCR yönteminin MTBK, ÇİD ve YİD tespitinde kullanılabilir ve güvenilir bir yöntem olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Agar proporsiyon duyarlılık yöntemi, Çoklu İlaç Direnci (ÇİD), *M.tuberculosis* kompleks (MTBK), Real-Time PCR, Yaygın İlaç Direnci (YİD)

ABSTRACT

Occurrence of the Extensively Drug-Resistant (XDR) strains by improving resistance also to second-line anti-tuberculosis (anti-TB) drugs of multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains brings about one the of most important human health threats. For this reason, our research aimed to determine the first- and second-line anti-TB drug resistance status of MTBC strains isolated from our region, to use the Multiplex-Real Time PCR assay which determines the mutations for rapid diagnosis of MDR and XDR strains, thus to compare the phenotypic and genotypic results obtained.

Clinical samples sent to the CU THAUM and the Regional Laboratory for Tuberculosis were investigated in two different groups consisting of the 44 MDR-MTBC-positive culture specimens and 50 ARB-positive sputum samples. Phenotypically, subsequent to identification of MTBC the first- and second-line anti-TB drug resistance patterns of the isolates were determined by BACTEC MGIT 960 system and Löwenstein Jensen agar proportion susceptibility methods. Whereas genotypically, both existence of MTBC and resistance patterns in terms of MDR and XDR status were simultaneously revealed by multiplex Real-Time PCR assay using the novel Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection kit (Seegene).

As a result of the study, it was observed that results of the phenotypic and genotypic investigations were very consistent, and sensitivity and specificity of the Real-Time PCR assay in MDR detection was 80 % and 100 %, respectively comparing with phenotypic methods. In addition, while XDR cannot detected among MTBC strains, three pre-XDR MTBC strains, two fluoroquinolone-resistant and one injectable drug-resistant, were detected by using both these methods.

In conclusion, it was suggested that the new multiplex Real-Time PCR assay is usable and reliable method for detection of MTBK, MDR and XDR.

Key Words: Agar proportion susceptibility method, Extensively Drug Resistance (XDR), Multidrug Resistance (MDR), *M.tuberculosis* complex (MTBC), Real-Time PCR

1. GİRİŞ ve AMAÇ

En eski hastalıklardan biri olarak kabul edilen ve şimdiye kadar dokuz bakteri türü belirlenen *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK)'nin yol açtığı Tüberküloz (TB), etkin tedavi seçeneklerinin bulunmasına, üstelik korunulabilir bir hastalık olmasına karşın; morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek, insanlarda ve hayvanlarda infeksiyon yapan, hâlâ dünyada en yaygın, bulaşıcı, nekrotizan, ölümcül hastalıklardan biri olmaya devam etmekte ve yılda üç milyonu aşkın kişi bu hastalıktan ötürü hayatını kaybetmektedir¹⁻³.

Dünya nüfusunun üçte biri MTBK ile infektidir. Her yıl, % 85'i gelişmekte olan 22 ülkeden olmak üzere; Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2013 verilerine göre 2012 yılında yaklaşık olarak 12 milyon prevelans 8,6 milyon insidans (yeni vaka) ve 1,3 milyon tüberkülozdan ölüm olduğu hesaplanmıştır. Ölümünün 320.000'ü HIV pozitif tüberküloz hastalarıdır. 510.000 çoklu ilaç dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) ve yine çoğu bu ülkelere mensup, üretkenlik dönemindeki genç yetişkinler arasından olmak üzere yaklaşık olarak 2-3 milyon hasta bu global pandemide kaybedilmektedir^{4,5}.

MTBK infeksiyonları dünyadaki bütün hastalıkların yüzde 2,5'ünü ve önlenebilir ölümlerin ise yüzde 26'sını oluşturmaktadır. Tüberküloz HIV (Human Immunodeficiency Virus-İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) /AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome-Kazanılmış Bağışık Yetmezlik Sendromu)'ten sonra erişkinlerde en çok ölüme neden olan infeksiyon hastalığı olarak önemini korumaktadır. Dünyadaki HIV/AIDS salgını, kötü ekonomik şartlar, sınır ötesi göçler ve tüberküloz kontrol programlarının ihmal edilmesi, az gelişmiş ülkelerin yanında birçok gelişmiş ülkede de tüberkülozun önemli bir sağlık problemi olarak varlığını sürdürmesine sebep olmuştur. Ölüm oranının ve bulaşın azaltılması için ise erken tanı şarttır, fakat duyarlı yöntemlerin gelişmiş laboratuvar altyapısına gereksinim duyulması uygulamayı sınırlamaktadır.

Birçok ülkede Acid-Resistant Bacilli (ARB) yada son dönemde Acid-Alcohol Resistant Bacilli (AARB) terimi olarak karşımıza çıkmakta olan boyama; MTBK'yi teşhis etmede ilk aşama olarak kullanılmaya devam etmektedir. MTBK tanısı için kültür ortamında izolasyon yöntemleri altın standart kabul edilmektedir⁶.

ARB/kültür pozitif olarak belirlenen hastaların tedavilerinde ise Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) önerdiği standart protokole göre ilk 6 ay süren kombine ilaç

kullanımını birinci seçenek/primer (majör) anti-tüberküloz (anti-TB) ilaçlar; rifampisin (RIF), izoniazid (INH), pirazinamid (PZA), streptomisin (STR) ve etambutol (EMB) oluşturmakta ancak RIF ve INH'in herikisine birden gelişen direnç Çoklu İlaç Direnci (ÇİD) /Multidrug-Resistant (MDR-TB) olarak değerlendirilmekte ve bu durum sıklıkla klinik ve bakteriyolojik kür sağlanamaması olarak sonuçlanmaktadır. Diğer taraftan bu suşlarda ikinci seçenek/sekonder (minör) ilaçlara karşı da direnç gelişimi provoke edilmekte ve bunun sonucunda bir florokinolon (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin ve b.) ile bir enjekteable (parenteral) (amikacin, kanamycin, kapreomycin) ilaca birden dirençli Yaygın İlaç Dirençliliği (YİD) /Extensively Drug-Resistant (XDR-TB) olarak tanımlanan 'tüm anti-TB ilaçlara dirençli' suşların ortaya çıkışı ve bu suşlar ile oluşan infeksiyonların klasik tüberküloza göre çok daha malign ve mortal seyretmesi, bu hastalığı "yeniden önem kazanan" global bir tehdit haline getirmiştir^{7,8}.

Yapılan araştırmalarda ÇİD-TB %8.32 ve YİD-TB prevalansı ise %0.68 dir. Bu sebeple tedavi öncesi etken *M.tuberculosis* suşlarında ilaç direnç profillerinin tespiti, çoklu ilaç dirençli tanımına uyan suşlarda primer veya sekonder direncin bilinmesi gerek bu olgularda kürün sağlanması gerekse ÇİD suşların yayılımları ile YİD suşlara dönüşümlerinin engellenmesinde son derece önemlidir. Bu tedavi protokolleri MTBK suşlarının sebep olduğu tüberküloz vakalarının tedavisi için yeterlidir. Ancak hastaların ilaç uyumsuzlukları, ilacın tedariki ile tanı ve tedavi merkezlerine ulaşımındaki güçlükler, yanlış reçeteleme, HIV'li hastalarda tüberküloz dışı immün yetmezlik sendromuna bağlı diğer sebeplerle hastanelere sık başvuru ve immün yetmezlik sebebi ile savunma mekanizmalarının kullanılan ilaçlara, bakteri eradikasyonunda yardımcı olmaması ve laboratuvar tanıdaki gecikme ve hatalar MTBK suşları arasında birinci seçenek ilaçlara karşı direnç gelişimine sebep olmuş ve klasik tedavi protokollerinin başarısını olumsuz yönde etkilemiştir. DSÖ bu gerekçeleri de dikkate alarak tüberküloz kontrol programlarının gözden geçirilmesi, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi/ Directly observed therapy strategies (DGTS-Artı veya DOTS-Plus) uygulamaları ile doğru hastaya doğru ilaç uygulamasının ve hızlı tanı yöntemlerinin yaygınlaştırılarak her hastaya ve şüpheli temaslıya ulaşılması ve izole edilen suşlarda direnç tayinide yapılarak tedavi protokollerinin modifiye edilmesi şartı ile 2025 yılında tüm dünyada tüberkülozun kontrol altına alınabilmesini ön görmüştür⁸⁻¹⁰.

Bu bağlamda CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), ÇİD-TB ve YİD-TB suşlarının yayılmasının önlenmesi için, dirençli suşlara karşı daha etkili yeni anti-TB ajanların geliştirilmesinin yanısıra yüksek insidansa sahip yoksul ülkelerde ucuz, hızlı ve yüksek duyarlılıkta yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ve birinci ve ikinci seçenek ilaçların duyarlılık testleri yapılarak kullanılmasının önemine dikkat çekmiştir. CDC;

- Kültüründe MTBK izole edilen hastaların tamamından,
- Üç aylık tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden,
- Tedaviye klinik cevap vermeyen bütün hastalardan izole edilen suşlara duyarlılık testi yapılmasını önermektedir⁷.

Böylece duyarlılığın zamanında ve sistematik ortaya konması ile;

- İlaça dirençli suşların hızlı yakalanması,
- Hastaların etkin tedavisi ve
- ÇİD-TB ve buna bağlı olarakta YİD-TB yayılımının azaltılması, uygun halk sağlığı ölçülerinin belirlenmesi gerçekleştirilecektir.

Ülkemizde rutinde MTBK tanısı, birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı gelişen direnç durumunun tespiti için hızlı ve güvenilir moleküler yöntemler kullanılmamakla beraber bunların uygulanabilirliğini araştıran bir çalışma da bulunmaması sebebiyle çalışmamızın amacı; bölgemizde izole edilen MTBK suşlarının birinci ve ikinci anti-TB ilaç duyarlılık paterninin değerlendirilmesi, ÇİD ve YİD suşların hızlı tanısında mutasyonları tespit etmeye yönelik amplifikasyon ve spesifik erime eğrisi analizleri (Melting Curve) ile ayırım gücüne sahip multiplex Real-Time PCR kullanılması, ayrıca elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılması şeklinde belirlendi.

Bunun için Bölgemizde bulunan 19 merkezden tüberküloz şüpheli kişilerden alınan ve rutin olarak değerlendirmek amacıyla, ÇÜ THAUM ve Bölge Tüberküloz laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen *M.tuberculosis* suşlarının birinci ve ikinci anti-TB ilaçlara direnç paterni BACTEC MGIT 7ml tüp ve Lowenstein Jensen agar proporsiyon duyarlılık (APD) yöntemleri kullanılarak belirlenecek ve özellikle ÇİD ve YİD olarak tespit edilen suşların CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad California, USA) cihazı kullanılarak genetik yönden direnç paterni ortaya çıkarıldı.

Bu çalışma ile rutin kullanıma oturtulması planlanan Real-Time PCR ile agar proporsiyon yöntemi karşılaştırılarak yöntemlerin spesifikite ve sensitivite oranları

değerlendirilip laboratuvarımızda rutin kullanıma uygunluğu araştırıldı. Bu yöntemler kıyaslandığında geleneksel yöntemlerin gerek zaman gerekse iş gücü bakımından ne gibi problemlere yol açabileceği ve Multiplex-PCR'ı da kullanarak bu problemlerin nasıl bertaraf edilebileceği hususu üzerinde duruldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz Hastalığının Tarihçesi

2.1.1. Dünya’da Tüberküloz

Tüberkülozun belli başlı 10 tarihi sürece ayrıldığı görülebilir.

2.1.1.1. Tüberküloz Basilinin Keşfi (1882)

Tarih öncesi çağlardan beri bilinen ve insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan tüberküloz, Nikiforuk’un “*Mahşerin Dört Atlısı. Salgın ve Bulaşıcı Hastalıkların Tarihi*” isimli kitabına giren ve zengin-fakir, köylü-kentli ayırımı yapmaksızın toplumun her kesimini kıran bir hastalıktır. Çok bulaşıcı ve kısa inkubasyon dönemli viral hastalıkların aksine uzun inkubasyon devri olan ve minimal enfeksiyöz bir hastalıktır¹¹.

Üç yüz milyon yıldan beri soyunu sürdüren verem basili, doğanın her yerinde, örneğin sularda, otlaklarda, toprakta, çamurda havada bulunur. Arkeolojik çalışmalar Avrupa’da sığırların ehlileştirilmesinin 9000 yıl önce başladığını, insanların soğuk iklim şartları sebebiyle ısınabilme ve korunma amacıyla ehlileştirdikleri hayvanları ev ve ahırlarda barındırdıkları biliniyor. Aynı ortamı paylaşan insanlar ve hayvanlar yüzünden aslında sığırların basili insanlarda patojenite yapabilmek için mutasyon geçirerek *Mycobacterium humanus* dönüşmüş olduğu hipotezi ortaya atılmıştı¹².

TB basilinin genomu açığa çıktıktan sonra anlaşıldı ki, *M. tuberculosis*, *M. bovis*’ten mutasyon sonucu gelişen bir bakteri değil, ancak, her iki bakteri de ortak bir atadan mutasyonlarla farklılaşmış iki türdür¹³.

Sığır tipi mikobakteri önceleri insanlarda lenf bezi ve kemik veremine yol açarken, sonradan akciğerde tahribat yapan ve öksürükle bulaşan bir hastalık yapar hale gelmiştir¹².

Arkeolojik araştırmalarda insan iskeletlerinde, veremin izleri gösterilmiştir. Milattan bin yıl önce yaşamış olan rahip Nesperhan’ın mumyasında Pott hastalığına bağlı vertebral değişiklikler tespit edilmiştir¹⁴.

Hipokrat tüberkülozun daha çok 18-35 yaşları arasındaki insanlarda görüldüğünü yazmıştır¹⁵. M.S. II. yüzyılda yaşamış olan Eski Roma'nın ünlü hekimi Kapadokyalı Areteus, "*Veremin en önemli belirtileri kanlı balgam ve kronik öksürüktür, sesleri kısık, boyunları hafif bükük ve sert; parmakları silindirik fakat eklemleri şiş, vücutları iyice eridiği için kemikleri belirginleşmiştir. Tırnakları eğri, yassılaşmış ve kırılmalıdır. Burun keskin ve silindirik, yanakları belirgin bir şekilde pembeleşmiş, gözler iyice çukura çekilmiş olmasına rağmen parlaklığını kaybetmemiştir. Yüzleri kadavra gülüşü halini almış. Kol ve bacak kasları erimiştir. Kadınların sadece meme başları kalmış. Kaburgaların başladığı ve sonlandığı yerler ve eklemler net bir şekilde seçiliyor. Skapulalar kuş kanadı halini almış*" şeklinde aktarmıştır^{15,16}.

Verem tarihi hakkında araştırma yapanlar, M.Ö. ve M.S.'ki asırlarda hastalığın Nil vadisinde, Yunanistan'da, Amerika'da, Kuzey Amerika'nın Yeni İngiltere yöresinde ve Avrupa'da beş epidemik yükselme ve azalma şeklinde dalgalanmalar yaptığını ortaya çıkarmışlardır. Bu epidemilerde birkaç on yıl hastalık en yüksek seviyeye ulaşmış ve sonradan ani olarak düşmüştür. Bu tür dalgalanmaların oluşmasında, bağışıklık sisteminin, sosyo-ekonomik olayların ve hastalığın doğal seyrinin etkisi olmuştur¹⁵. Nüfus artışı, yoksulluk, göçler ve sanayi devriminin veremin artışında etkisi biliniyordu. Tüberkülozun sosyal yönünü ve sanayi ekolojisinin önemini ilk kez ortaya çıkaran Rene Dubos isimli çevre bilimcisidir¹⁶.

Kırsal alanda yaşayan Kızılderililer Buffalo denilen yabani sığırlardaki atipik mikobakterilerin sağladığı bağışıklık yüzünden tüberküloza yakalanmadıkları halde Avrupa'dan gelen beyazların taşıdıkları hakiki verem mikrobu ile karşılaşınca kısa sürede hastalanarak ağır kayıplar vermişlerdir^{12,15,16}.

Tüberküloz basilinin bulunma şerefi Robert Koch'a nasip olmuştur. Koch bakteriyolojik çalışmalarını insanları eriterek öldürdüğü için "*Tüketim hastalığı*" anlamındaki "Consumption", ölenlerin çoğu soluk yüzlü olduğu için "*Beyaz Ölüm*" veya "*Beyaz Veba*" (*White Death; White Plaque*) ve en önemli ölüm sebebi olduğu için de "*Ölümün Kaptanı*" (*Captain of the death*) gibi isimlerinden dolayı tüberküloza yöneltmiştir^{15,17,18}. Önce tüberküloz basilini balgamda bulan Koch, daha sonra Laennec'in tüberkül diye tarif ettiği dokuda basili tespit etti ve son olarak tüberküloz basilini sağlıklı hayvanlara enjekte ederek onlarda tüberküloz hastalığını geliştirdi. Robert Koch'un önerilerini dikkate alan Sir Robert Philip Edinburg'ta ilk verem

dispanserini kurdu. Bu görüş Almanya, Belçika ve Fransa’da da benimsenerek oralarda da dispanserler ve tüberkülozlu hastalara bakım yerleri açıldı. Koch’a Nobel Tıp ödülü ise ölümünden 5 yıl önce 1905 yılında gelmiştir¹⁵⁻¹⁸.

Wurzburg Üniversitesinin Fizik Profesörü Konrad Roentgen’in x ışınlarını bulmasının ardından geliştirilen radyolojik görüntüleme teknikleriyle de akciğer tüberkülozunun erken teşhisinde önemli rol oynamıştır^{19,20}.

2.1.1.2. Aşı (1921)

Koch’un tüberküloz basilini bulması birçok araştırmacıyı hastalığa karşı aşı geliştirmek için çalışmaya yönlendirdi. Bunlardan en önemlileri Bacille Calmette-Guerin (BCG) aşısını bulan bakteriyolog Leon Charles Albert Calmette ve veteriner Jean Marie Camille Guerin isimli iki Fransız bilim adamıdır. 24 yıl süresince birlikte çalışan Calmette ve Guerin birlikte verem aşısı üzerinde çalıştı. Bu süre zarfında Calmette’nin dikkatini çeken bir olay vardı. Lenf bezi tüberkülozu geçirenlerde progressif akciğer tüberkülozunun ender görülmesi (*Marfan kanunu*). Bu olaydan esinlenerek tüberküloz basiline karşı spesifik immunitenin stimule edilebileceğini düşündü. 13 yıl boyunca tam 230 kültür yaptılar. Elde edilen basiller kobaylara, sığırlara, tavşanlara, ve atlara zerk edildi fakat onlarda verem gelişmedi. Bu aşıya kısa adı BCG olan “*Bacille Calmette-Guerin*” adı uygun görüldü. Verem aşısı ilk kez 18 Temmuz 1921 günü Paris’teki Charite hastanesinde sağlıklı çocuk doğurup veremden ölen kadının bebeğine oral yolla bir doz BCG verilmesiyle gerçekleşmiştir. Çocukta hiçbir yan etki görülmeyip verem de gelişmemiştir. Sonradan BCG aşısı deri altına ve içine zerk şeklinde de kullanılmış olup netice olumlu olunca Lille şehrindeki Pasteur Enstitüsünde BCG üretimine başlanılmıştır²¹.

2.1.1.3. Kemoterapi (1940)

Tüberküloz tarihinde 1940’ların ortasında ABD’de Streptomycin (STR) ve İsveç’te Para-amino salisilik asitin (PAS) bulunması ile yeni bir dönem başladı. İlaçların tek başına kullanılmasından dolayı bir ayda oluşan direnç gelişimi önce büyük hayal kırıklığı yaratmış ancak bu durum yeni ilaç bulma çabalarına ivme kazandırmıştır. İzoniazid (INH)’in 1952 yılında Robizek ve Selikof (ABD’de) tarafından bulunmasından sonra üç ilaçla 18-24 ay süren kombine tedavinin uygulanarak

tüberküloz altı ayda tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir. Daha sonra 1954 yılında Pirazinamid (PZA), 1962 yılında Etambutol (EMB) ve 1966 yılında da Rifampicin (RIF) bulunmuştur. Yetmişli yıllara gelindiğinde batı ülkelerinde tüberküloz sorununun artık bittiği düşünülüyordu. Ancak 1985 yılından itibaren bu ülkelerde tüberküloz insidansının ilk kez artmaya başlamasıyla hastalığın yeniden ortaya çıkması şaşkınlık yaratmıştır²¹.

2.1.1.4. HIV ve Tüberküloz (1980)

Tüberküloz ve HIV enfeksiyonu hücresel bağışıklık ile ilişkilidir. HIV enfeksiyonu seyri sırasında CD₄ + T lenfosit sayısında azalma görülür. Bu sebepten dolayı *M. tuberculosis*'e karşı bağışıklık azalmış olacaktır. HIV enfeksiyonu aktif tüberküloz gelişme riskini artırmaktadır. HIV negatif olgularda tüm yaşam boyunca tüberküloz gelişme riski %10'ken HIV pozitif olgularda yıllık tüberküloz gelişme riski %10'dur. HIV verem hastalığını yeniden önem kazanan hastalıklar arasına taşımıştır²².

2.1.1.5. ÇİD (1990)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıklarına Karşı Birlik'in (IU-ATLD) 1994 yılında başlattıkları ilaç direnç paterni izleme programının 72 ülkeyi kapsayan sonuçları yayınlanmıştır. Buna göre dirençli tüberküloz her kıtada ve hemen her ülkede bulunmaktadır. ÇİD TB oranının %3ten daha fazla olduğu bölgeler "sıcak bölgeler (Hotspots)" olarak tanımlanmaktadır. Estonya, Çin'in Henan Bölgesi, Latvia, Ivanova ve Tomsk sıcak bölgelerdir. DSÖ'ne göre yeni ÇİD TB olgularının %70'i yalnızca 10 ülkede bulunmaktadır ve ÇİD TB halen küresel bir sorun olmaktan çok yerel bir sorundur²².

2.1.1.6. DSÖ'nün Acil Durum İlanı ve Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri (DGTS) (1993)

Kayıtların yetersizliği nedeniyle 1950'li yıllar öncesindeki durum hakkında yeterince veri yoktur. DSÖ tarafından önerilen ve erken tanı, tedavi ve aşılamaı öneren tüberküloz kontrol programları 1960'lardan sonra uygulanmaya başlanmıştır. 1960 yılında çıkan bir yasa ile verem savaş dispanserleri kurulmuştur²². Bu mücadele ülkemizde de hastalığın kontrol altına alınmasını sağlamıştır. Ancak bu çalışmaların

sonuçlarına karşı duyulan aşırı güven, toplumlarda yoksulluk ve sefaletin artması, kontrolsüz göçler verem hastalığını yeniden önem kazanan hastalıklar arasına taşımıştır.

2.1.1.7. YİD (2005)

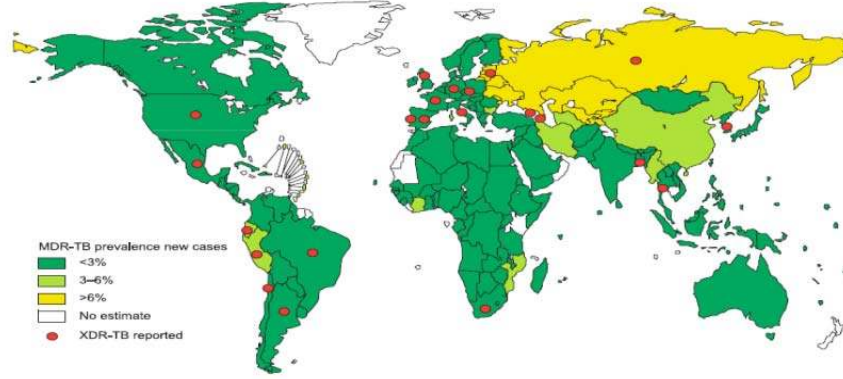
Tedavi seçeneklerinin sınırlı oluşu ve hasta ilaç uyumsuzluğu, ÇİD ve YİD suşların ortaya çıkışına sebep olarak pandeminin boyutları daha da büyümüştür²³. YİD tanımı ilk olarak Kasım 2005 tarihinde kullanılmıştır. 24 Mart 2006 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki Hastalık Kontrol Merkezleri [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] tarafından yapılan tanım, ÇİD-TB'ye ek olarak ikinci grup TB ilaçlarından üçüne daha direnç olmasıydı²³. Bu tanım bırakılmıştır. 9-10 Ekim 2006 tarihinde DSÖ bir Görev Grubu oluşturarak bugün kabul edilen tanımı, ÇİD'ye ek olarak bir kinolon ve bir enjeksiyonla verilen ilaca (kanamisin, kapreomisin, amikasin) direnç olması tanımını kabul etmiştir²⁴.

YİD-TB, ikinci grup ilaç tedavilerinin kötü uygulanmasının bir ürünüdür. Özellikle ÇİD-TB tedavisinde, etkili tedavi rejimi oluşturmamak, tedaviyi düzenli kullanmamak, ilaçların bir kısmını kullanmak, tedaviyi erken kesmek gibi nedenlerle, kinolon ve enjeksiyonla verilen ilaçlara da direnç gelişmektedir. Bunun sonucunda “tedavisi olanaksız” hastalık ortaya çıkmaktadır²⁴.

Tüberküloz (TB)'un ilaç tedavisi 1940'lı yılların sonunda başlamıştır. Tedavi ile birlikte, tedavide kullanılan ilaçlara da direnç gelişmeye başlamıştır. İlaç direnci, *Mycobacterium tuberculosis*'in genlerindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlar, çok düşük oranlarda ortaya çıkmaktadır. Bir bakteri için bir hücre bölünmesindeki mutasyonların rifampicin için 3.32×10^{-9} ve isoniazid için 2.56×10^{-8} olduğu gösterilmiştir. Tedavinin yeterli sayıda ilaç içermemesi ve düzensiz olması gibi nedenlerle bu düşük orandaki dirençli suşlar seçilerek hakim suş haline gelmekte ve hastanın o ilaçlara dirençli olmasına yol açmaktadır. Dirençli basillerin belirgin oranlara çıkmasından sonra, bu hastanın bulaştırdığı kişiler de aynı ilaçlara dirençli hale gelmektedir²⁵.

Dünya genelinde ulus-üstü TB laboratuvarları (UÖRL) ağı ile yapılan ilaç duyarlılık testi (İDT) çalışmaları üç ayrı rapor ile yayımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü 2013 raporuna göre; 2012 yılında Dünya çapında 450.000 yeni ÇİD-TB vakası

görülmüş 92 ülke tarafından rapor edilen ÇİD-TB vakalarının ortalama % 9.6'sı YİD-TB vakalarını oluşturmaktadır^{26,27} (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. YİD-TB vakaları²⁷.

Kırmızıyla işaretlenmiş ülkelerde en az bir YİD vakası bulunmaktadır. Bu ülkeler; Arjantin, Ermenistan, Bangladeş, Brezilya, Şili, Çek Cumhuriyeti, Ekvador, Fransa (1 vakası ithal), Amerika'nın Georgia eyaleti, Almanya, İtalya, Güney Kore, Letonya, Meksika, Peru, Portekiz, Rusya, Güney Afrika, İspanya, Tayland, Birleşik Krallık ve Amerika.

2.1.1.8. Stop-TB Stratejisi (2006)

Başarılı bir tüberküloz kontrol programıyla birlikte bulaşların önlenmesi ve mortalitenin azaltılabilmesi için tedavi başarısı ve direnç gelişimi önemlidir. Bunları etkileyen iki önemli faktör; hasta uyumu ve ilaç direncidir. Tüberküloz kontrolünde istenen başarıyı sağlamak için DSÖ; Dünya nüfusunun %55'ini ve dünyadaki tüberküloz vakalarını %27'sini içeren 148 ülkede Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejileri-Artı (DGTS-Artı) veya Directly Observed Therapy Strategies- Plus (DOTS-Plus) uygulamasını başlatmıştır²⁸.

2.1.1.9 Expand-TB Projesi (2009)

DSÖ tarafından hayata geçirilen Expand-TB (Expanding Access to New Diagnostics for TB) projesi 2009 yılında düşük ve orta gelirli 27 ülkede ÇİD-TB riski altında bulunan hastaların teşhisine hızlı bir şekilde ulaşmak için başlatılmıştır. Projenin; anti-TB ilaçların maliyetini azaltmak, ÇİD-TB'nin kontrolünü geliştirmek, 27 ülkede TB kontrol programıyla 100 TB laboratuvarını destekleyerek bütünlük bir kontrol programı oluşturmak şeklinde 3 hedefi vardır²⁹.

2.1.1.10. TB'nin Kontrol Altına Alınmasının Hedefi (2025)

Tüberküloz kontrol programları ışığında TB kontrol çalışmaları da hız kazanmıştır. 1900'lü yılların başlarında endüstrileşmiş ülkelerde başlatılan tüberkülozla mücadele programları sayesinde 2025 yılına kadar hastalığın yayılması ve hastalığa bağlı ölümlerin önemli ölçüde azaltılması ve salgınların kontrol altına alınması hedeflenmiştir⁸⁻¹⁰.

2.1.2. Türkiye'de Tüberküloz

Türkiye'de yılda yaklaşık 13-14 bin yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmaktadır. Yeni tespit edilen tüberküloz hasta sayısı her yıl yaklaşık %6 oranında azalmaktadır. 2005-2006 yıllarında Türkiye genelinde yaklaşık 21.000 tüberküloz vakası varken 2012 yılında kayıtlı toplam tüberküloz vaka sayısı 14.691'e düşmüştür. Hastaların %59'u erkek, %41'i kadındır. Hastaların %64'ünde akciğer tüberkülozu varken, %36'sında akciğer dışındaki organlar (lenf bezleri, plevra, kemik, böbrek, beyin vb.) tutulmuştur. Hastaların %1,8'i ise yabancı ülke doğumlu hastadır^{29,30} (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 DSÖ'ye göre tüberküloz vaka sayısı³⁰.

Tüberküloz	Vaka/Yıl	2002	2008	2009	2010	2011	2012
	Yerli Vaka	18.043	17.425	16.594	15.700	14.852	14.430
	Yabancı Vaka	0	175	163	179	202	261
	Toplam	18.043	17.600	16.757	15.879	15.054	14.691

Dünya ve doğal olarak Türkiye genelinde tüberkülozla ilgili en önemli tehlike hastaların ilaçlarını düzenli kullanmamaları veya tedavilerini yarım bırakmaları sonucunda gelişen ilaç direncidir. Bu vakalar birinci seçenek verem ilaçlarına dirençlidir ve tedavileri ancak ikinci seçenek tüberküloz ilaçları ile mümkündür. Bu da tedavi başarısını azaltmakta ve tedavi maliyetini arttırmaktadır.

DSÖ, ülkelerdeki tüberkülozlu hasta sayısını tahmin ederken teknik bir terimi olan "olgu bulma oranı"nı kullanmaktadır ve Türkiye için bu oran %85 olarak belirlenmiştir. Başka bir ifadeyle DSÖ, 2011 yılında Türkiye'de var olan hastaların yüzde 15'inin kayıtlarda yer almadığını tahmin etmektedir^{29,30}.

Türkiye'de 2012 yılında tespit edilen vakaların %2'si çok ilaca dirençli tüberküloz hastasıdır. Tüberküloz vakalarının özellikle de bulaştırıcılığı en fazla olan yayma pozitif vakaların başarı ile tedavi edilmesi tüberküloz kontrolünde en önemli

hususlardan birisidir. Türkiye'nin, 2011 yılı yeni yayma pozitif vakalarda tedavi başarısı %90'dır. Bu oran Dünya Sağlık Örgütü Avrupa Bölgesi'nde ise %66'dır³⁰.

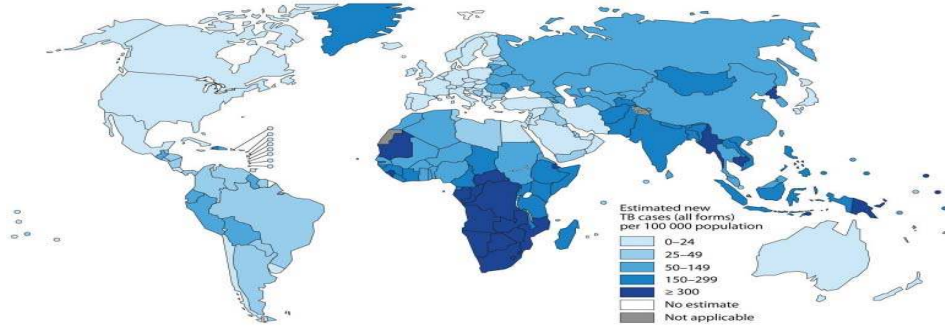
DSÖ "Küresel Tüberküloz 2013 Raporu'na göre dünya genelinde tüberküloz insidans, prevalans ve mortalite hızları düşmektedir. Buna rağmen küresel tüberküloz yükü halen çok yüksektir. Bu rapora göre, 2012 yılında 12 milyon prevelans 8,6 milyon insidans (yeni vaka) ve 1,3 milyon tüberkülozdan ölüm olduğu bildirilmiştir. Ölümünün 320.000'ü HIV pozitif tüberküloz hastalarıdır. Ayrıca Dünya'daki tüberküloz vakalarının yaklaşık %40'ı Hindistan ve Çin'de bulunmaktadır⁵.

2.2. Epidemiyoloji

Yirminci yüzyılın ilk yarısında kontrol altına alınmaya başlanan TB hastalığı, tedavi alanında sağlanan önemli başarılarla rağmen, son 10 yılda ölümün en önemli sebeplerinden birisi olarak tekrar ortaya çıkmıştır. DSÖ tahminlerine göre 13-14 milyon yıllık yeni TB vakası görülmekte, yani haftada 79.000, günde 11.000 den fazla her saat başı 2000 yeni vaka tüberkülozlular arasına katılmaktadır. Vakaların % 80'inden fazlasını 15-49 arasında, üretkenlik yağındaki hastalar oluşturmaktadır. Küresel bir salgın olmasına rağmen, TB'den yoksul ülkeler daha fazla etkilenmektedir ve bu ülkelerde TB % 98 oranında ölümle sonuçlanmaktadır³².

Dünya nüfusunun büyük çoğunluğunu (% 86) düşük ekonomi kaynaklı ülkeler oluşturmakta ve tüm tüberküloz olgularının %95'ini oluşturmaktadır. TB dünyada özellikle Batı Afrika ülkelerinde yaygın görülmektedir. Bu yüksek insidansın bölgede görülen HIV epidemisine bağlı olduğuna inanılmaktadır. Endüstrileşmiş ülkelerde de HIV'li genç yetişkinler problemin kaynağını oluşturmaktadır^{32,33} (Şekil 2.2). Diğer taraftan, hiç anti-TB ajanla karşılaşmamış sokak tipi bir basile göre ilaçlardan bir veya bir kaçına karşı standart ilaç konsantrasyonlarında nispi olarak duyarlılık kaybı gösteren dirençli suşların oransal artışı, morbiditenin yanı sıra mortalite yönünden de TB epidemisinin bir diğer ürkütücü yönüdür. ÇİD-TB de mortalite %50-80'e kadar çıkmaktadır. Diğer taraftan bu tür suşların sebep olduğu infeksiyonlarda ayrıca tanı ile ölüm arasındaki süre de kısalmış, 4 ila 16 hafta arasına kadar düşmüştür. Bu hızlı ölüm süreci tanı için ne kadar çabuk davranılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Gecikmiş tanı ve tedavi, özellikle yatan hastalar arasında veya cezaevleri gibi kapalı toplumlarda ÇİD-TB insidansını ve TB'ye bağlı mortalite riskini artırıcı faktördür. Sonuç olarak

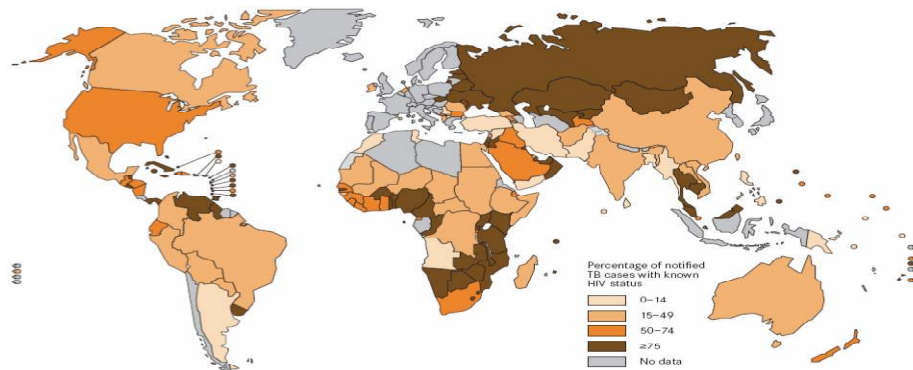
ÇİD-TB suşlardaki oransal artış, özellikle gelişmekte olan ülkelerde genel olarak TB insidansını da artırmış ve kontrol programlarını zaafa uğratmıştır. Bu ülkelerde ÇİD-TB oranları % 48'lere kadar çıkmıştır^{8,34}.



Şekil 2.2. 2011 yılında tahmin edilen TB insidansı²⁷.

TB'nin tekrar dünyanın gündemine girmesinde etkili olan en önemli faktör ÇİD suşların oranındaki artıştır. Çin'in Beijing bölgesinden orjin aldığı ve daha sonra tüm dünyaya yayıldığı tahmin edilen W genotipinin çoklu ilaç direncine sahip olduğunun belirlenmesi epidemiyolojik çalışmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur^{32,35-37}.

HIV enfeksiyonu ABD gibi gelişmiş ülkelerde tüberkülozun daha genç hastalarda rastlanması, reaktivasyona göre primer tüberküloz olgularının artması ve çoklu ilaca dirençli tüberküloz sayısında artış gibi tüberküloz epidemiyolojisinde önemli değişimlere neden olmuştur. Amerika ve Afrika'dan sonra Güney Doğu Asya ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde de bu iki hastalığın birlikteliği artış göstermiştir^{27,38-40} (Şekil 2.2 ve 2.3).



Şekil 2.3. Ülkelere göre TB olgularında HIV testi uygulaması (HIV durumu bilinen TB hastalarının yüzdesi)²⁷.

2.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

Tüberküloza neden olan mikroorganizma prokaryot (bakteri) kingdomu, *firmicutes* phylumu *actinobacteria* classının *Actinomycetales* ordosu içinde yer alan *Mycobacteriaceae* familyasının *Mycobacterium* cinsine ait *Mycobacterium tuberculosis* türüdür⁴¹. Genellikle hücre içi yerleşim gösterip, hücresel immün cevap ve geç tipte hipersensitivite reaksiyonu sonucu granülomatöz tipte infeksiyonlara neden olurlar⁴².

Mikobakteriler katalaz aktifliği gösteren (bazı türleri), aerop, sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, aside dirençli, silindirik, hafif kıvrık veya düzgün şekilde kord oluşturabilen, 0.3-0.6 µm eninde, 1.0-10 µm boyunda ince basillerdir. Bölünme süreleri 12-18 saat olup yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Optimum üreme şartları 5-6 pH ve %5-10 CO₂'dir. 37°C üreme için uygun bir sıcaklık olmasına karşın bu sıcaklık türden türe değişmektedir. Uygun şartlar altında 10-15 günde koloniler gözle görülmeye başlar⁴³. *M. tuberculosis* ve *M. bovis* 2 haftadan çok, *M. avium* ve *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans* 1 haftadan çok, *M. fortuitum*, *M. chelonae* türleri ise 1 haftadan daha az bir sürede üreme gösterebilirler⁴⁴ (Çizelge 2.2).

Ailenin tek genusu *Mycobacterium*'lardır. Bu genus içerisinde yer alan mikroorganizmalar çok farklı özelliklere sahiptir. Bazı mikobakteriler toprak ve suda vinilylklorid ve phenanthrene gibi recalsitran organik bileşikleri degrade ederek, steroidler ve düşük alkallenlerin optikal aktif oksidlerini üretirlerken, bazıları da yüksek vertabralı hayvanlarda ölümle sonlanabilen hastalıklara neden olan intrasellüler patojenlerdir. İnsanlarda infeksiyon oluşturan türleri ile mikobakteriler tüm dünyada önlenebilir ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer alan tüberküloza neden olurlar⁴¹.

Guanin ve sitozin (G+C) (%62-70) oranının yüksek olması ile mikolik asit içeren diğer bakterilere; *Nocardia* (%60-69), *Rhodococcus* (%59-69), ve *Corynebacterium*'lara (%51-59) benzerler. Mikobakterilerle ilgili yapılan çalışmalar *M. tuberculosis*, *B. bovis* ve *M. lepra* türlerinin gen analizlerinin yapılmasından sonra hız kazanmış, bakterinin fizyolojik biyokimyasal antijenik ve genetik özellikleri hakkındaki bilgilerimiz daha da berraklaşmış, bu bilgilerin ışığında yeni profilaksi ve tedavi çalışmaları hız kazanmıştır. Yapılan gen analizleri Mikobakterilerin genomunun *B. subtilis* ve *E. coli* gibi kolay ve hızlı üreyen bakterilere göre daha küçük olduğunu göstermiştir. *M. tuberculosis* H37Rv suşunun gen büyüklüğü 4.411.529 bp olup yaklaşık olarak 3.986 proteini kodlamaktadır⁴¹.

Çizelge 2.2. Mikobakterilerin genel özellikleri⁴⁴.

Türler	Mikobakterilerin Genel Özellikleri																		
	Üreme Dereceleri ^a °C				Koloni		Niacin	T ₂ H ₂ 'ya Duyarlılık	Nitrat Redüksiyonu	Yarı Kantitatif Katalaz	68°C Katalaz	Tween Hidrolizi	Tellürit Redüksiyonu	%5 NaCL'ye direnç	Demir Alımı	Aryl Sulfataz	McConkey Agarda üreme	Üreaz	Pyrazinamidase
	45	37	31	24	Tipi ^b	Pigment ^c													
M. tuberculosis	-	Y ¹	Y	-	R ¹	-	+	-	-	-	-	-	- +	-	-	-	-	+	+
M. bovis	-	Y		-	R	-	-	+	-	-	-	-	- +	-	-	-	-	+	-
M. kansasii		Y	Y	Y	S/R ²	F ¹	-	-	+	+	+	+	- +	-	-	-	-	+	-
M. marinum		 +	O ²	O	S/R	F	 +	-	-	-	-	+	- +	-	-	- +	-	+	-
M. ulcerans	-	-	Y	-	R	-	-	-	-	-	+	-		-		-		-	-
M. simiae		Y			S	F	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-		+	+
M. scrofulaceum		Y	Y	Y	S	Sk ²	-	-	-	+	+	-	- +	-	-	D	-	+	 +
M. szulgai		Y	Y	Y	S/R	Sk/F	-	-	+	+	+	- +	 +	-	-	D	-	+	+
M. gordonae		Y	Y	Y	S	Sk	-	-	-	+	+	+	-	-	-	D	-	-	 +
M. xenopi	Y	Y			S	Sk	-	-	-	-	+	-	- +	-	-	+	-	-	D
M. avium-intracellulare	 +	Y		 +	S/R	-	-	-	-	-	 +	-	+	-	-	-	 +	-	+
M. gastri		Y		Y	S/R	-	-	-	-	-	-	+	- +	-	-	-	-	+	-
M. malmoense		Y	Y	Y	S	-	-	-	-	-	 +	+	+	-	-	-		D	+
M. haemophylum			Y	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M. nonchromogenicum		Y		Y	S/R	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
M. terrae		Y		Y	S/R	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	D	-	D
M. triviale		O		Y	R	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	- +	-	-	D
M. fortuitum	-	Ç ³		Ç	S/R	-	-	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+
M. chelonae		Ç		Ç	S/R	-	D	-	-	+	D	D	+	D	-	+	+	+	+
M. phlei	Ç	Ç		Ç	R	Sk			+	+	+	+	+	+	+	-	-		
M. smegmatis	Ç	Ç		Ç	S/R	-			+	+	+	+	+	+	+	-	-		
M. vaccae		Ç		Ç	S	Sk			+	+	+	+	+	D	+	-	-		

Açıklamalar: a- 1 Y: bulunduğu sıcaklık derecesinde yavaş üreyenler, 2 O: bulunduğu sıcaklık derecesinde orta hızda üreyenler, 3 Ç: bulunduğu sıcaklık derecesinde çabuk üreyenler. b- 1 S: smooth-düz koloni, 2 S/R: smooth-düz rough-düzensiz oluşturanlar. c- 1 f: fotokromojenler, 2 Sk: skotokromojenler. + olumlu, - olumsuz, +- genellikle olumlu, -+ genellikle olumsuz, D; değişken.

2.3.1. Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı ve Bileşenleri

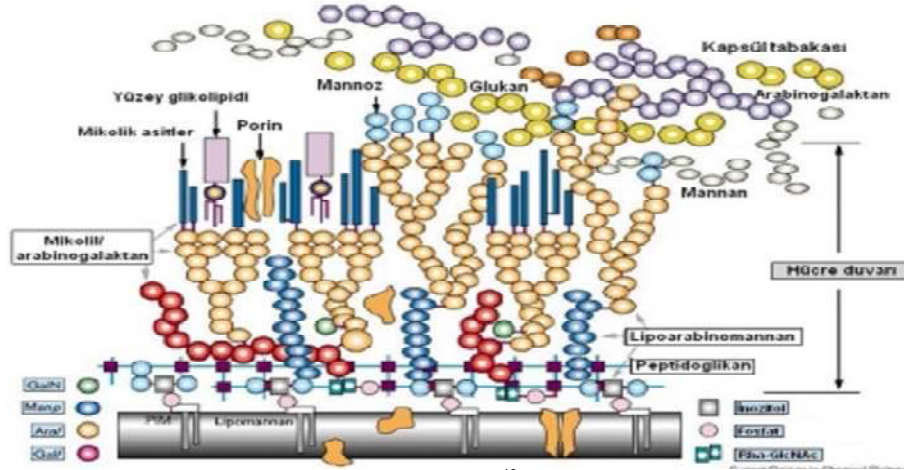
Mikobakterilerin duvar yapısı da temelde diğer bakteriler gibidir. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitin polimeri olan peptidoglikan (mürein) iskeleti oluşturur. Mikobakterilerde daha spesifik olan, lipopolisakkarit yan zincirlerdir. Lipopolisakkaritler, arabinose ve galaktozdan oluşan dallı bir polisakkarit olan arabinogalakattan'dan yapılmıştır. Arabinogalakattan, mikobakteri'lerin yanı sıra *Corynebacterium*'de ve *Nocardialar*'da da bulunur. Arabinogalakattan, peptidoglikan'a fosfodiester köprüleri ile bağlıdır. Arabinogalakattanların yan zincirlerindeki üç arabinose birimlerine mikolik asit diye adlandırılan bir grup uzun zincirli yağ asitleri kovalent bağlarla bağlanırlar. Yaklaşık 70 karbon atomu içeren bu yağ asitleri hücre duvarının kalınlığından ve bir ölçüde de hücrenin aside dirençli olmasından sorumludurlar^{45,46}.

Mikobakterilerin dış tabakasında ise polisakkarit ve proteinlerden az miktarda da lipidlerden oluşan yapı yer almaktadır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukoz, bir arabinomannan ve mannan içeren içeren lipomannan ve lipoarabinomannan gibi kapsüler polisakkaritler son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde olan porin proteinleri de bulunur^{46,47} (Şekil 2.4).

Hücre duvarının dış tabakasında yukarıda söz edilenlerin dışında daha bir çok kompleks moleküller bulunmaktadır. Bunların arasında *M. tuberculosis* ile infekte edilmiş makrofaj kültürlerinde fagolizozom füzyonunu engellediği için virulansta rol oynadığı düşünülen sülfatidler ve sulfated acyl trehalose'lar vardır⁴⁸. Eskiden sadece virulan suşlara özgü olduğu düşünülen, bir trehalose dimyecolate olan "cord faktörü'nün bütün mikobakteri türlerinde olduğu gösterilmiştir. En dış tabaka, peptidoglikolipidlerden ya da phenol-phthiocerol glycoside'lerden oluşan ve "mycosides'ler olarak adlandırılan bir yapıdır⁴⁵.

Hücre duvarı, kuvvetli tüberkülin benzeri reaksiyon veren proteinler ve peptidler de içerir. Hücre duvarının kalınlığından ve çok miktarda lipid içermesinden (hücre duvarının %70'ini lipidler oluşturur) dolayı hidrofilik moleküllere karşı impermeabilitesi *E.coli*'den hatta *P.aeruginosa*'dan çok daha fazladır⁴⁹.

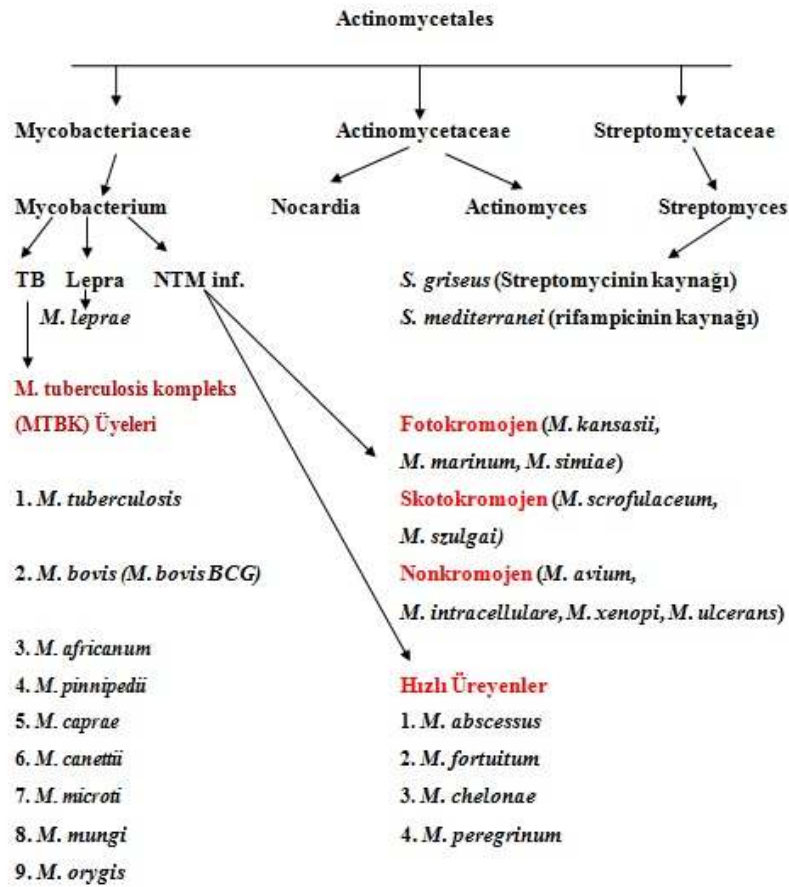
Gliserol ya da isoniazid gibi küçük hidrofilik moleküller, Gram-negatif bakterilerdeki porlar gibi görev yapan duvar proteinlerine bağlanarak penetre olurlar. Buna karşın makrolidler ve Rifampin gibi hidrofobik moleküller ise hücre duvarı lipidlerinde çözünerek hücre içine girerler⁴⁸.



Şekil 2.4. Mikobakterilerde hücre duvar yapısı⁴².

2.4. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mikobakterilerin yaklaşık 150'ye yakın türü bulunmaktadır. Bu türler içerisinde aktif TB'ye neden olan türler MTBK olarak adlandırılırken, TB'ye neden olmayan türler ise tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) olarak adlandırılırlar^{44,50,51} (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Mikobakterilerin şematik sınıflandırılması.

2.4.1. *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks (MTBK) Üyeleri

MTBK *M. tuberculosis*, *M. bovis* (*M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. mungi*, *M. orygis* olmak üzere 9 türden oluşmaktadır^{44,46,50-52}.

2.4.1.1. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)

İnsanda tüberküloz hastalığının etkeni olarak en sık izole edilen mikobakteri türü olan *M. Tuberculosis* aerobik, hareketsiz, spor oluşturmeyen, 0,2-0,6 x 1-10 µm boyutlarında, hafif kıvrımlı veya düz bir basildir. Tüberküloz basilinin kendine has özellikleri olan yavaş üreme hızı ve bilinen birçok ilaca dirençli olmasının temelinde, hücre duvarı geçirgenliğinin az olması yatmaktadır. Geçirgenliğin az olmasında zengin lipid içeriğinin yanı sıra, hücre duvarında bulunan geçiş kanallarının diğer bakterilere göre daha az olması da rol oynamaktadır⁵⁰⁻⁵⁴.

Tüberküloz basilini diğer bakterilerden ayıran diğer bir özelliği de, özel çevre şartlarına adaptasyon yeteneğinin daha fazla olmasıdır. Bu adaptasyon yeteneği bakterinin aerobik şartlarda ağırlıklı olarak karbohidrat kullanmasını sağlarken, mikroaerofilik şartlarda lipid kullanımı ön plana çıkar. Ortamda bulunan magnezyum ve demir miktarının fazla olması, bu moleküllerin artmış kullanımı sonucunda tüberküloz basilinin virulansının artmasını sağlar. Tüberküloz basili tarafından ortama salınan hidrofilik peptidler çevredeki demir moleküllerini toplar. Toplanan demir molekülleri, hücre duvarında bulunan ve mikobaktin adı verilen hidrofobik yapılar tarafından sitoplazmaya taşınır. Tüberküloz basili aerobik solunumda son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır. Bu nedenle akciğerler, özellikle de üst loplar, tüberküloz basilinin en iyi üreyebildiği vücut bölgeleridir. üreme için karbondioksit de gereklidir ve özellikle kültür ortamında %5-10 karbondioksit bulunması daha iyi üreme sağlar⁵⁵.

2.4.1.2. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis* (*M. bovis* BCG))

M.bovis 'in insanlar için en önemli bulaş kaynağı kontamine, pastörize edilmemiş süt tüketimi olmakla birlikte infekte hayvanlar ile direkt temas veya hasta çiftlik hayvanlarının çıkarttığı infeksiyöz aerosollerin inhalasyonu ile de bulaş gözlenmektedir. İnsandan insana bulaş çok nadir olmakla birlikte, özellikle immün

süprese kimseler arasında bu yolla bulaş doğrulanmıştır^{56,57}. Birçok olguda *M.bovis*'in klinik ve patolojik özellikleri *M.tuberculosis* infeksiyonundan ayırt edilememektedir. Bu nedenle bu hastalarda *M.bovis*'in insidansı bilinmemekte, koruma ve tedavi stratejileri de şekillenememektedir^{56,58,59}.

2.4.1.3. *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*)

İnsan TB etkeni bu heterojen grup ilk olarak 1968 yılında Afrika'da Senegalli bir hastadan izole edilmiştir. *M. africanum* fenotipik özellikleri dikkate alınarak *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasına yerleştirilmiştir. *M. africanum* subtip I (Batı Afrika) ve subtip II (Doğu Afrika) olmak üzere ikiye bölünmüştür. *M. africanum* insan konaklı patojendir, *M. Tuberculosis* 'den daha düşük oranda izole edilir. Mikroaerofilik ortamda iyi ürerler. Nitratı indirgeyemezler. T2H varlığında üreyemezler. Pirazinamidaz aktiviteleri pozitifdir^{32,60}.

2.4.1.4. *Mycobacterium pinnipedii* (*M. pinnipedii*)

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTBK) üyelerinden biri de adına anlamını veren özellikle yüzgeçayaklılar da bulunan *Mycobacterium pinnipedii*'dir. Bu mikroorganizma ilk olarak Avustralya denizaslanları ve fok balıklarında gözlenen tüberküloz vakalarından izole edilmiştir. Daha sonra Güney Amerika'da aynı hayvanlardan ele geçmiştir. Fok balıklarından izole edilen suşlar sodyum piruvat içeren besiyerinde üreme göstermiştir. Ziehl-Neelsen boyamada gevşek kord formasyonu ve pirazinamid duyarlılığı ile *M. bovis* den farklılık göstermektedir⁶¹.

2.4.1.5. *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*)

M. caprae ilk olarak İspanya'da keçilerden izole edilmiştir. MTBK'nin diğer üyelerinden farklılıklar gösterir. Pirazinamid duyarlılığı gibi biyokimyasal ve epidemiyolojik özellikleri dışında gen (*pncA*, *oxyR*, *katG* ve *gyrA*) polimorfizm kombinasyonları ile MTBK nin sıradışı bir üyesidir^{32,61}.

2.4.1.6. *Mycobacterium canettii* (*M. canettii*)

M. canettii ilk olarak 1969 yılında Fransız bir çiftçiden izole edilmiştir. *M. canettii* neden olduğu bilinen tüm TB olguların Afrika boynuzu ile bağlantılı olduğu

görülmüştür. *M. tuberculosis*'in oldukça nadir görülen varyantıdır. *M.canettii* izolatları düzgün, yuvarlak ve parlak görünümlü kolonileri bulunur. Diğer mikobakteriler ile aynı 16S rRNA dizilerine sahiptir. *M. canettii* suşları arasında house-keeping gen polimorfizmi, koloni morfolojisi, hücre duvarının lipid içeriği gibi birçok açıdan farklılıklar tespit edilmiştir. Düzgün koloni fenotipi stabil değildir, düzensiz koloni morfolojisine dönüşebilir^{32,61}.

2.4.1.7. *Mycobacterium microti* (*M. microti*)

M.microti Wells tarafından 1937 yılında tarla farelerinde keşfedilmiştir. Özellikle küçük kemirgenlerde bulunur, ancak kedilerde, domuzlar ve lamalarda infeksiyon oluşturduğu gözlenmiştir. *M. microti* çiftlik ve ev hayvanlarında infeksiyon oluşturmaktadır. İnsanlarda patojen olmadığı bilinen *M. microti*' nin son zamanlarda çok nadir de olsa insanlarda infeksiyonu bildirilmiştir. İnsandan insana bulaş ihtimali de oldukça düşüktür. Geleneksel yumurtalı katı besiyerinde zayıf üreme gösterirler. Sıvı kültür tekniklerinde daha hızlı ve bol miktarda ürerler^{32,61}.

2.4.1.8. *Mycobacterium mungi* (*M. mungi*)

MTBK üyelerine 2010 yılında dahil olan *M. mungi* genellikle Afrika'nın orta ve doğu bölgelerinde bulunan ve firavun faresi olarak bilinen adını *Mungos mungo*'dan alan bir türdür. Önceki 7 tür kadar patojen olmadığı düşünülmektedir⁶².

2.4.1.9. *Mycobacterium orygis* (*M. orygis*)

Son olarak MTBK üyeleri içerisinde 2012 yılında yerini alan *M. orygis* hayvanlarda ve insanlarda izole edildiği gösterilmiştir⁶³.

2.5. *M.tuberculosis*'de Antijenik Yapı ve Virulans Faktörleri

M.tuberculosis'in sahip olduğu granülom oluşturma, makrofaj aktivasyonu, immünosüpresyon, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi değişik özellik ve etkileri bulunan proteinler, lipidler ve polisakkaritler immünojenik özellik göstermektedir⁶⁴.

2.5.1. Old Tuberkülin (OT)

Önceleri interdermal cilt testlerinde kullanılan, ilk kez Koch tarafından elde edilmiş tüberküloz basillerinin kültür ekstraktı olarak bilinen OT, sadece mikobakteriyel proteinler içermemesi nedeniyle saflaştırılmasına gerek duyulmuş ve PPD'nin gelişimine olanak sağlamıştır^{64,65}.

2.5.2 Saflaştırılmış Protein Derivesi (Purified Protein Derivative-PPD)

İlk kez Seibert ve Glenn tarafından tanımlanan, OT'ye kollodyon membranlardan süzdürme ve amonyum sülfatla çöktürülme gibi işlemler uygulandıktan sonra elde edilmiş daha saf bir üründür. Diğer mikobakterilerle çapraz reaksiyon vermesi ve tamamen saflaştırılamaması gibi dezavantajlarına rağmen immünoagnostik önemi hala mevcuttur. DSÖ tarafından kullanımı kabul edilen deri test maddesidir ancak PPD testi kişinin aktif tüberkülozlu olup olmadığından çok tüberküloz bakterileri ile karşılaşp karşılaşmadığını gösterir⁶⁴⁻⁶⁶.

2.5.3. Isı Şok Proteinleri-HspX (65Kda, 38 Kda, 12 Kda)

Şaperon benzeri proteinler olup konağın Th1 cevap oluşturmaları ve koruyucu immünite geliştirmesini sağlar. Farklı çeşitleri olup tüberküloz basilinin dormant fazda hayatta kalması, apoptozdan korunmasını sağlar^{64,67}.

2.5.4. 65 kDa Protein

Saflaştırılmış proteinler arasında en ilgi çeken antijendir. Isı şok proteinlerine çok benzer özellik gösterip yüksek derecede immunojeniktir. Konak hücrede salındığı zaman kazeifikasyon nekrozu ve otoimmün reaksiyonlara yol açtığı ve ayrıca bu antijene karşı oluşan antikorlar ve duyarlı T hücrelerinin varolduğu gösterilmiştir⁶⁷.

2.5.5. 19 kDa Lipoprotein

Hücre duvarı proteinidir. MHC-I'in antijen bağlantısını ve nitrojen ara ürünlerinin üretimini inhibe etme gibi işlevlerinin yanı sıra tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve IL-12 sentezini azaltmaktadır. IL-12 sentezinin azalması T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder. Buna ek olarak interferon gama (INF γ) sentezini kodlayan genleri ve makrofajların INF γ reseptörünü inhibe eder⁶⁸.

2.5.6. ESAT-6 (Early secretory antigenic target) ve CFP-10 (Culture filtrat protein)

ESAT-6 RD1 bölgesinden kodlanmaktadır. T hücreleri üretimi ve INF γ salınımını indükler. Bu proteinlere karşı oluşan INF cevabını, T hücre sayısını göstererek in vitro ölçebilen kitler yapılmıştır⁶⁸.

2.6. Mikobakteriyel Lipidler

2.6.1. Lipoarabinomannan

M. tuberculosis'in hücre duvar yapısında bulunan lipoarabinomannan (LAM) konağın tirozin fosfatını etkinleştirir. Eğer ölü *M. tuberculosis*'in fagositozu sırasında TK aracılığı ile sfingozin kinaz etkinleşirse, LAM aracılığı ile tirozin fosfat uyarılarak sfingozin kinazın durdurulmasına neden olmaktadır⁶⁹.

2.6.2. WaxD

Freud's adjuvanının etkisini arttıran, peptidoglikolipid yapısındadır⁶⁹.

2.6.3. Trehaloz-6,6 Dimikolat (Kord Faktör)

Tüberküloz basillerinin küme oluşturmalarını sağladığı için aynı zamanda kord faktörü olarak bilinen önemli bir virulans faktörüdür. Alternatif kompleman yolunu aktive etme, polimorfnükleer lökosit göçünü engelleme gibi özelliklerinin yanı sıra granülom oluşumunda da rol oynar. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar^{69,70}.

2.6.4. Sülfolipidler (Sülfatidler)

İçeriğinde sülfür bulunan glikolipidlerdir. Makrofajlarda meydana gelen fagozom-lizozom füzyonunu engeller, bakteriyi lizozom enzimlerinden korur ve kord faktörünün toksik etkisini artırır^{69,70}.

2.6.5. Fosfatidil İnozitol Mannoizid (PIM)

Çapraz koruyucu immünitede rolü olduğu düşünülen, lipid yapıda olup esasen hapten özelliğe sahiptir^{69,70}.

2.7. Tüberküloz Basillerinin Metabolik Aktiviteleri

Mitchison tüberküloz basillerini metabolik aktivitelerine göre 4 gruba ayırmıştır⁷¹.

2.7.1. A Grubu Basiller (Sürekli Çoğalan Basiller)

Kavite içinde bulunan, hızla çoğalan en büyük basil grubudur. Bulaştırıcılıktan, direnç gelişiminden sorumludurlar. Bu grup üzerine en etkili ilaç isoniaziddir. Ayrıca rifampicin ve streptomycinin de zayıf etkisi vardır^{71,72}.

2.7.2. B Grubu Basiller (Asit Ortam Basilleri)

Makrofaj içinde ve inflamasyon alanları gibi asit ortamlarda bulunan metabolik aktivitesi zayıflamış basillerdir. Bu grup üzerine en etkili ilaç pirazinamiddir^{71,72}.

2.7.3. C Grubu Basiller (Aralıklı Çoğalan Basiller)

Kazeöz odaklarda bulunan ikinci büyük basil grubudur. Metabolik aktiviteleri zayıftır, zaman zaman çoğalırlar. Nükslerden sorumludurlar. Bu grup üzerine en etkili ilaç rifampicindir^{71,72}.

2.7.4. D Grubu Basiller (Dormant Basiller, Persistan Basiller)

Metabolik aktivitesi olmayan ancak bir gün metabolik aktivite kazanabilme potansiyeli olan basillerdir. Bu grup üzerine etkili ilaç yoktur^{71,72}.

2.8. Tüberkülozda Klinik Tablo, İmmunoloji ve Patogenez

2.8.1. Klinik Tablolar

Tüberkülozda semptomlar sinsi bir başlangıç gösterir. Primer tüberkülozda gelişen primer lezyon ve hiler adenopati genellikle semptom ve bulgu oluşturmaz. En sık görülen semptomlar ateş, öksürük, kilo kaybı ve gece terlemesidir. Ancak bu semptomlar daha çok büyük çocuk erişkinlerde görülür. Küçük çocuklarda ise 2-4 haftadan daha uzun süren kilo alamama, 2-3 ay ve daha uzun süren kuvvet kaybı, terleme, öksürük, wheezing, bir haftadan daha uzun süren açıklanamayan ateş ve effüzyon bulguları görülebilir. Aşırı duyarlılık reaksiyonu nedeni ile enfeksiyonunun 3-8. haftalarında eritema nodozum görülebilir. Sekonder tüberkülozda ise en sık görülen

semptomlar; iştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı, öğleden sonraları çıkan ateş, gece terlemeleridir. Bu semptomlar yavaş gelişir, hasta tarafından iyi tolere edilir ve genellikle önemsizdir. Solunum sistemi ile ilgili semptomlar hastalığın ilerlediğini gösterir⁷³.

2.8.1.1. Primer Tüberküloz

Bulaştırıcı özellikte balgam yayması pozitif tüberkülozlu hasta ile karşılaşan *M.tuberculosis* ile daha önce karşılaşmamış PPD negatif bireylerin %30'unda klinik ve radyolojik bulgu olmamasına rağmen PPD pozitifleşir. Alveollere ulaşan damlacıklar ile taşınan *M. tuberculosis*, konağın ilk savunma mekanizmasını yenerek hayatta kalır ise; akciğer parankiminde pnömoni odağı (Ghon odağı), komşu hiler lenf bezinde granülomatöz inflamasyon ve bu iki oluşum arasındaki lenfanjit ile karakterize primer kompleksin (Ranke kompleksi) meydana gelmesine neden olur. Primer infeksiyon da denilen bu süreç hücresel immün yanıt gelişimiyle durdurulur ise, hastalık oluşmadan olay sonlanır. Eğer konağın immün yanıtı yetersiz kalırsa primer odak ve ilgili lenf bezindeki inflamasyon ilerler, primer tüberküloz meydana gelir. Bakteriler immün sistem hücreleri tarafından tamamen yok edilemeyip yıllarca canlılığını koruyarak sessiz (dormant) kalırlar⁶⁵.

2.8.1.2. Miliyer Tüberküloz

Primer infeksiyon sırasında kazeöz bir odağın damara açılması veya erken hematojen yayılımı sırasında damarlara yerleşen basillerin kana karışması miliyer tüberkülozun gelişmesine neden olur. Dört yaş altındaki çocuklarda immün sistem zayıflığı nedeni ile primer infeksiyonun erken komplikasyonu olarak görülebilir⁶⁵.

2.8.1.3. Sekonder Tüberküloz

Primer infeksiyon sonrası latent halde kalan basillerin çoğalmaya başlaması ile ve/veya basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan virülen bir basil almasıyla sekonder tüberküloz gelişebilir⁶⁵.

2.8.1.3.1 Endojen Reaktivasyon

Primer infeksiyon sırasında akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen (Simon odağı) ve latent halde kalan basillerin hayatın herhangi bir döneminde hücrel immün yanıtta meydana gelen süpresyon nedeniyle aktif hale geçmesi ile meydana gelir^{65,74}.

2.8.1.3.2. Ekzojen Reinfeksiyon

Önceden primer infeksiyon geçirmiş bireyin, basil yayan aktif tüberkülozlu bir hastadan çok sayıda virülen basil alması ile meydana gelir^{65,74,75}.

2.8.1.4. Ekstrapulmoner Tüberküloz

Tüberkülozun akciğer dışında ki odaklarda (plevra, perikard, kemik, böbrek, genital, gastrointestinal, merkezi sinir sistemi) meydana gelmesi durumudur⁷⁵.

2.8.2 Konağın Savunma Mekanizması ve İmmun Cevap

Tüberküloz, çok sayıda antijene ve farklı virülans faktörü içeren *M.tuberculosis* basili ile birlikte konağın mononükleer fagositleri ve T lenfositlerine bağlı olarak gelişen kronik granümatöz bir infeksiyon hastalığı olarak tanımlanmaktadır. İnfeksiyon veya hastalığın oluşup oluşmaması, konağın direnci ile basilin virulansı arasındaki dengeye bağlıdır. Tüberküloza karşı yanıtta doğal ve kazanılmış immunité rol oynamaktadır^{76,77}.

2.8.2.1. Doğal İmmun Cevap

M.tuberculosis basilleri alveollere ulaştığında doğal savunma yollarıyla yok edilebilir ya da çoğalıp klinik görünüm oluştururlar. Konağın doğal savunmasında ÜSY fiziksel engeli, fagositoz, inflamatuvar hücreler ve sitokinleri, mast hücreleri dentritik hücreler rol oynamaktadır.

2.8.2.2. Tüberkülozda İmmünoloji

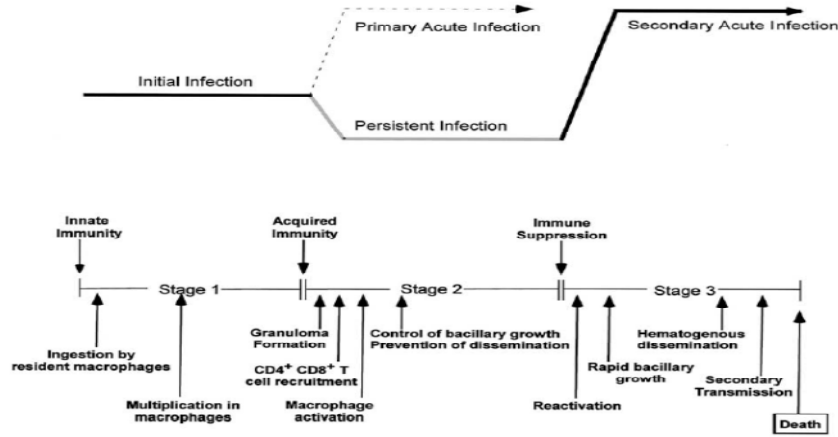
Tüberkülozda immün yanıt, başlıca iki hücreye bağlı olarak zincirleme seyreden bir seri etkileşimler sonucu gelişir. Bu immün yanıt T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salınan sitokinlerle oluşur. İnhalasyon yoluyla alınan ve alveollere ulaşan

mikobakteri alveoler makrofajlarca fagosite edilir⁷⁸. Fakat çok sayıda basil ile infeksiyon veya basilin virulans özelliği makrofajların basili tahrip etme özelliğini sınırlamaktadır. Aktive olmamış makrofaj içinde basil kolayca çoğalarak hücrenin erimesine yol açabilmektedir. Açığa çıkmış olan mikobakteriler, inflamatuvar cevap nedeniyle lezyon bölgesine gelmiş olan diğer monositer serideki hücreleri de infekte ederler. İnfekte makrofajların bazıları bölgesel lenf bezlerine giderek immun yanıtı başlatırlar. Konağın tüberküloz infeksiyonunu kontrol etme yeteneği, etkin bir hücreyel immun cevap oluşturmaya bağlıdır⁷⁹.

Hücreyel immunitede antijeni spesifik olarak tanıyan hücreler T lenfositlerdir. Bu sistemin efektör hücreleri ise makrofajlardır⁸⁰. İnfeksiyon zengin bir antikor yanıtı oluşturmakla birlikte, hümmoral immunitenin konakçı savunmasında anlamlı bir katkısı yoktur Makrofajların sindirme ve yok etme etkisinden kurtulabilen basiller (virulan basiller) fagozomlarda çoğalmaya başlarlar⁷⁸ Alveoler makrofajlar, TNF- α serbestleştirir, bu makrofajın kendisini uyarır, otokrin bir aktifleşme olayıdır. Sonrasında CD4+, CD8+ ve gama/delta T hücrelerini olay yerine çeken ve uyaran IL-1 ve IL-12 salgılarlar⁸¹. Alveol makrofajı aynı zamanda, kanda bulunan çeşitli hücrelerin yerel endotele tutunmasına neden olan çeşitli kemokinler serbestleştirir. Alveol içindeki basil antijenik yapılarından bazıları, makrofajların sitoplazmasında bulunan major doku uygunluk kompleksine (MHC/ Major Histo-Compatibility Complex) bağlanırlar. Bu bileşik yapı makrofaj yüzeyine taşınır^{73,78,79,82}.

Oluşan immunolojik cevapta basilin çeşitli antijenlerine karşı spesifik reseptörler taşıyan T lenfositler vardır. Hücreyel immunité (Hİ) ve geç tip aşırı duyarlılık (GAD), tüberküloz patogeneğinde konağa ait temel immunolojik olaylardır. Tüberküloz basilleri, bu immun yanıtlar gelişene dek konak dokularına hasar vermezler. Hücreyel immunité, mikrobik antijen varlığında lokal olarak sitokin oluşturabilen geniş bir spesifik Th1 lenfosit popülasyonu ile karakterize olan yararlı bir konakçı yanıtı biçiminde tanımlanabilir. Sitokinler, kan akımından lezyona monosit/makrofajları çekerler ve onları aktive ederler. IFN- γ ve TNF- α en önemli makrofaj aktive edici sitokinlerdir. Aktive makrofajlar reaktif oksijen ürünleri, lizozomal enzimler ve diğer faktörleri üreten fagosite edici hücreler oldukları için tüberküldenki basilleri yok edebilirler. IFN- γ 'nın makrofajlardaki IL-2 reseptörlerini uyarmasından sonra T lenfositlerden salınan IL-2 makrofajların mikrobisidal etkilerini artırır. GAD

konakçının doku hasarı yapan bir yanıtı olup, içinde tüberküloz basili çoğalan inaktif makrofajları ve komşu dokuları harap eden bir süreç olarak değerlendirilebilir. GAD'dan sorumlu hücreler Th1 ve Th2 sitokin kalıplarına göre sınıflandırılmışlardır. Hİ ve GAD'ın her ikisi de aynı immunolojik mekanizmada rol oynamasına karşın, GAD konakçı için zararlı olabilmekte, Hİ ise yararlı olmaktadır⁸¹⁻⁸⁸ (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *Mycobacterium tuberculosis* infeksiyonunun seyri (3 aşaması)⁸⁵⁻⁸⁸.

2.9. Tüberküloz İlaçlarının Etki Mekanizmaları ve Anti-TB ilaçlar

Tüberküloz ilaçlarının etki mekanizmalarını 4 grupta incelemek mümkündür:

- 1) Hücre duvarı inhibitörleri (isoniazid, etambutol, etionamid, sikloserin),
- 2) Nükleik asit sentez inhibitörleri (rifampicin, kinolonlar),
- 3) Protein sentez inhibitörleri (streptomycin, kanamisin),
- 4) Membran enerji metabolizma inhibitörleri (pirazinamid).

Etki mekanizmalarından da anlaşıldığı gibi günümüzde kullanmakta olduğumuz ilaçlar esas olarak aktif olarak çoğalmakta olan basiller üzerine etkilidir. Oysa bir tüberküloz basil topluluğunda bulunan basiller farklı metabolik özellikler gösterebilir⁸⁹.

2.9.1. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan Anti-TB İlaçlar

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar birinci ve ikinci seçenek olmak üzere iki gruba ayrılır (Çizelge 2.3).

2.9.1.1. Birinci Seçenek Anti-TB İlaçlar

Türkiye'de tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlar streptomycin (STR), isoniazid (INH), rifampicin (RIF) ve etambutol (EMB)'dür. DSÖ

bu majör 4 ilaca ek olarak pirazinamid (PZA) ile tedavi seçeneklerini de öngörmektedir⁹⁰⁻⁹³.

Çizelge 2.3. Tüberküloz tedavisinde kullanılan anti-TB ilaçlar⁹⁰⁻⁹³.

Birinci seçenek (Primer, Majör) ilaçlar	İkinci seçenek (Sekonder, Minör) ilaçlar
<i>Streptomycin (STR)</i> <i>Isoniazid (INH)</i> <i>Rifampin (RIF)</i> <i>Rifabutin</i> <i>Rifapentin (RPT)</i> <i>Etambutol (EMB)</i> <i>Pirazinamid (PZA)</i>	<i>Sikloserin</i> <i>p-Aminosalisilik asid</i> <i>Etionamid, Protionamid,</i> <i>Tiasetazon</i> <i>Amikasin, Kanamisin,</i> <i>Kapreomisin</i> <i>Levofloksasin</i> <i>Gatifloksasin</i> <i>Moksifloksasin</i>

2.9.1.1.1 Streptomycin (STR)

Streptomycin, *S. griseus* bakterisinden elde edilen bakterisidal (bakterisit) etkili bir aminoglikozittir⁹⁰. Streptomycin bakteri ribozomuna bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Ribozomal protein S12'yi kodlayan *rpsL* genindeki mutasyonlar (% 60) ve 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlar (< %10) Streptomycin direncinden sorumludur. En sık görülen *rpsL* genindeki Lys 43 Arg mutasyonu olup daha nadiren Lys 43 Thr mutasyonu da görülmektedir. Bu gende ayrıca Lys 88 Arg veya Lys 88 Gln mutasyonları da belirlenmiştir. Bu gendeki mutasyonlar yüksek MİK değerli Streptomycin direncinden sorumlu bulunmuştur. Streptomycin direncinden sorumlu diğer mutasyonlar *rrs* geninin 530 halkası ve 915 bölgesinde bulunmaktadır. 530 halkasında C 491 T, C 512 T, C 516 T, A 513 C, A 513 T nükleotid değişiklikleri görülmüştür. 915 bölgesinde ise C 903 A, C 903 G, A 904 G nükleotid değişiklikleri sıktır. Streptomycine karşı düşük değerli MİK direncinin, hücre zarında oluşan değişiklikler sonucu ilacın hücre içine girişinin azalmasıyla olabileceği düşünülmektedir^{91,92} (Çizelge 2.3 ve 2.4).

2.9.1.1.2 İsoniazid (INH)

Sentetik yapıda ve çoğalan basiller üzerine bakterisit etkili bir ilaç olan izoniazid bir ön ilaçtır ve katalaz-peroksidaz enzimiyle aktive olur. Katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan *katG* genindeki mutasyonlar % 60-70 oranında izoniazide karşı yüksek MİK değerli dirençten sorumludur^{90,91}. En sık görülen Ser 315 Thr mutasyonudur (% 40). *KatG* geninde sıklıkla tespit edilen Arg 463 Leu mutasyonunun polimorfizm olduğu,

Çin, Rusya ve bazı Asya ülkelerinde isoniazide duyarlı izolatlarda da bulunduğu gösterilmiştir. Mikolik asit biyosentezinde rol alan iki genden enoyl-ACP (acyl carrier protein) reduktaz enzimini kodlayan *inhA* geni (< %10) ve yağ asidi uzamasında önemli olan beta ketoaçıl ACP sentaz enzimini kodlayan *kasA* genindeki mutasyonlar da isoniazid direncinden sorumlu tutulmuştur. Ancak *kasA* geninde mutasyon bulunan izolatlarda aynı zamanda *katG* veya *inhA* genlerinde de mutasyon bulunduğundan bu genin isoniazid direnciyle ilişkisi şüphelidir⁹³. Oksidatif strese karşı hücresel cevaptan sorumlu alkil-hidroperoksid reduktaz enzimini kodlayan *ahpC* genindeki mutasyonların da (~ %10) dirençten sorumlu olduğu düşünülmüş, ancak bu mutasyona da *katG* genindeki mutasyonların eşlik edebildiği görülmüştür⁹¹⁻⁹³(Çizelge 2.3 ve 2.4).

2.9.1.1.3. Rifampicin (RIF)

Rifampicin R. Mediterranei bakterisinden üretilen yarısentetik, (semisentetik) bakterisidal etkili bir ilaçtır⁹⁰. Bu ilaç DNA'ya bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesine bağlanıp RNA sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Yaklaşık 500 mg rifampicine dirençli MTBK kökenlerinin % 96'sında rifampicin direncinden, RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 81 bp'lik bölgesindeki (27 kodon, 507- 533) mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir. En sık görülen ve yüksek MİK değerli dirençten sorumlu mutasyonlar 526 ve 531. kodonlarındadır (% 65- 86). Düşük MİK değerli rifampicin direnci 511, 516, 518 ve 522. kodonlardaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur. En sık Ser 531 Leu (% 42) ve His 526 Tyr (% 23) mutasyonları belirlenmiştir^{92,93}(Çizelge 2.3 ve 2.4).

2.9.1.1.4.Etambutol (EMB)

Etambutol, sentetik yapıda, bakteriostatik etkili bir ilaçtır. Etambutol arabinogalaktan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinozil transferaz enzimiyle etkileşerek MTBK' in hücre duvarı sentezini bozar. Arabinozil transferaz enzimini kodlayan *embABC* geninde meydana gelen mutasyonlar % 70 oranında etambutol direncinden sorumludur. Özellikle en sık görülen mutasyonlar % 60 oranında *embB* geninin 306. kodonundaki Met aminoasidindeki değişikliğe bağlıdır. Yüksek MİK değerli etambutol direnciyle Met 306 Ile mutasyonundan ziyade Met 306 Leu, Met 306 Val mutasyonları ilişkili bulunmuştur^{91,92} (Çizelge 2.3 ve 2.4).

Çizelge 2.4. Birinci seçenek anti-TB ilaç mutasyonları⁹⁵.

İlaçlar	Birinci Seçenek Anti-TB İlaç Mutasyonları	
	Gen Bölgeleri	Kodonları
Streptomycin (STR)	1- Ribozomal protein subunit 12 <i>rpsL</i>	Lys 43 Arg, Lys 43 Thr, Lys 88 Arg, Lys 88 Gln, 43 AAG→AGG, 88 AAG→AGG, AAG→CAG.
	2- 16 s ribozomal RNA (<i>rrs</i>)	491C→T, 512C→T, 516C→T, 513 A→C, 513A→T, 903C→A, 903C→G, 904A→G, 189 G→A, 426 G→T, 483 A→T, 485 A→G, 491 C→T, 496 G→T, 795 C→T, 870 C→T, 907 A→C, 1238 T→C.
	3- Aminoglycoside phosphotransferase geni (<i>strA</i>)	
İsoniazid (INH)	1- Enoyl-ACP (acyl carrier protein) reduktaz enzimini kodlayan <i>inhA</i>	-15 C→T
	2- Katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan <i>katG</i>	Ser315Thr, Arg463Leu, 249 CGC→TGC, 275 ACC→TCC, 307 GGA→GAA, 311 GAC→GAG, 315 AGC→ACC, AGC→ACA, 318 GAG→GTA, 328 TGG→TGC, 331 AGT→TGT, 727 GCC→GAC.
	3- Beta ketoaçil ACP sentaz enzimini kodlayan <i>kasA</i>	
	4- Alkil-hidroperoksid redüktaz enzimini kodlayan <i>ahpC</i>	-39 C→T -32G→A, -10C→T.
Rifampicin (RIF)	1- RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan <i>rpoB</i> geninin 81 bp'lik bölgesindeki 27 kodon (507- 533)	Ser 531 Leu (% 42), His 526 Tyr (% 23) 469 GAG→TCG, 509 AGC→CAG, 510 CAG→AAG, 511 CTG→CCG, 513 CAA→AAA, CAA→CCA, 516 GAC→GTC, GAC→TAC, GAC→GAG, 522 TCG→TTG, TCG→CAG, 524 TTG→TCG, 526 CAC→TAC, CAC→GAC, CAC→CGC, CAC→TGC, CAC→AAC, 528 CGC→CCT, 530 CTG→GCT, 531 TCG→TTG, TCG→TGG, TCG→CCG, TCG→GCG, TCG→TTC, 533 CTG→CCC, CTG→GCG, CTG→CCG, 561 ATC→GTC, 572 ATC→TTC.
Etambutol (EMB)	1- Arabinozil transferaz enzimini kodlayan <i>embABC</i> geni	Met 306 Leu, Met 306 Val, 306 ATG→ATA, ATG→CTG, ATG→ATC, ATG→GTG, ATG→ATT, 406 GGC→GAC, GGC→GCC.
Pirazinamid (PZA)	1- Pirazinamidaz enzimini kodlayan <i>pncA</i> geni	<i>pncA</i> geninin 3-17, 61-85 ve 132-142 kodonlar arasında üç bölgesinde

2.9.1.1.5. Pirazinamid (PZA)

PZA nikotinamidin yapısal analogudur. Antitüberküloz ajan olarak önemi 1952 yılında fark edilen ve 1980'li yıllarda kısa süreli tedavi protokollerinin yaratılmasında etkili olan PZA, asidik şartlarda makrofaj içindeki düşük metabolik aktivite gösteren semi-dorman durumdaki tüberküloz basillerine etkilidir. PZA ve INH nikotinamid türevi olmakla birlikte, etki mekanizmaları farklıdır. Ancak INH ve RIF ile güçlü sinerji yaratır. PZA bir ön ilaç olup, mikobakterilerin PZA'ya duyarlılığı spesifik

Pirazinamidaz (Pzaze)'in varlığına bağlıdır. PZA fagolizozomların asidik ortamında tüberküloz basilinin ürettiği Pzaze ile aktif şekli olan pirazinoik aside dönüşerek etkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim bu enzim aktivitesine sahip olmayan diğer mikobakteriler mesela *M. bovis*, PZA'ya karşı intrinsik direnç gösterir. Makrofaj fagolizozomlarında pH 5.5'de aktif hale geçer. pH 5.5'de MİK 1650 µg/ml iken, pH 6.0'da 100 µg/ml olup, nötr pH'da etkili değildir. Pirazinamidin etkinliğini pH dışında bakteri sayısı, demir, efluks, enerji inhibitörleri ve oksijen miktarındaki azalma belirler. PZA'ya karşı direnç kolay gelişir, ancak diğer ilaçlarla çapraz direnç gelişimi söz konusu değildir. Direnç gelişiminde nikotinamidaz aktivitesindeki azalma sorumlu tutulmaktadır. PZA'ya dirençli kökenlerin % 72-94'ünde pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir. Mutasyonların çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması *pncA* dışındaki direnç genlerinde görülmeyen bir durumdur. Buna karşın mutasyonlar (3-17, 61-85 ve 132-142 kodonlar arasında *pncA* geninin üç bölgesinde) belli bir kümeleşme göstermektedir⁹⁴(Çizelge 2.3 ve 2.4).

2.9.1.2. İkinci Seçenek Anti-TB İlaçlar

MTBK tedavisinde birinci seçenek ilaçlara özellikle de rifampicin ve isoniazid dirençliliğinin birlikte olduğu durumlarda ikinci seçenek ilaçlar kullanılır. Ayrıca ikinci seçenek ilaçlar MOTT (Mycobacterium Other Than Tuberculosis) (NTM)) tedavisinde de kullanılır⁹⁷.

2.9.1.2.1. Para-amino Salisilik Asit (PAS)

Sadece *M. tuberculosis*'e etkili, çok dar spektrumlu bir ilaçtır. PAS, paraaminobenzoik asidin yapısal analogudur ve para-aminobenzoik asidin folik aside konversiyonunu kompetitif olarak bloke ederek *M. tuberculosis* üzerinde bakteriyostatik etki yapabilir. STR ve INH'e göre çok daha zayıf etkilidir. Bu ilaca karşı mikobakteride direnç gelişmesi, STR ve RIF'e karşı olana göre daha geç ve güç olur. Birlikte kullanıldığında bu ilaçlara ve isoniazide direnç gelişmesini geciktirir. Günümüzde, 2 yaşın altındaki çocuklarda tüberkülozun kombine tedavisinde kullanılır. Bunlarda EMB'nin görme ile ilgili toksik etkisinin başladığını tespit etmek zor veya olanaksız olduğundan onun yerine PAS kullanmak gerekir⁹⁷ (Çizelge 2.5).

2.9.1.2.2. Etionamid

Sadece oral olarak kullanılan etionamid ikinci sıra bir ajandır, primer ilaçlar etkili olmadığında veya kontrendike olduğunda diğer ilaçlarla birlikte kullanılır. Etionamid isoniazid gibi izonikotinik asitten üretilmiştir ve bakterisidal etkilidir. Gerçek etki mekanizması bilinmemekle birlikte, INH'deki gibi mikobakteriyel hücre duvarında mikolik asid sentezini inhibe ederek etki ettiği düşünülmektedir⁹⁷.

2.9.1.2.3. Protionamid

Etionamid gibi bir INH türevi olup farmakolojik özellikleri etionamide benzer. Etki ve yan etki etionamidle aynıdır ve her iki ilaç da INH'ye dirençli mikobakteriler üzerine etkili olabilir. Etionamid ve protionamid arasında çapraz direnç görülür⁹⁷.

2.9.1.2.4. Sikloserin

Sikloserin *Streptococcus orchidaceus* tarafından üretilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. D-alanin'in analogudur, ve alanin rakemaz ve D-alanil-D-alanin sentaz'ın hareketini kompetitif olarak inhibe eder. Bu enzimler hücre duvarının prekürsörlerini inhibe ederler ve bunların inhibisyonu hücre büyümesinde gerilemeye ve büyük olasılıkla lizis yolu ile hücre ölümüne neden olmaktadır. Tüberküloz tedavisi için kullanıldığında diğer efektif ilaçlarla birlikte verilmelidir⁹⁷.

2.9.1.2.5. Tiasetazon

Çok ucuz olduğundan gelişmekte olan ülkelerde isoniazid ile birlikte çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İn vitro etkinliği ve farmakokinetiği konusundaki bilgiler sınırlıdır. İlaç adrenal glandlarda konsantre olur ve akciğer içinde bakteriyostatik konsantrasyonlara ulaşır. Tiasetazonun belirgin yan etkileri ve önemli toksisitesi vardır. Bu ilaç etionamid ile benzer yapıdadır ve bulantı, kusma, abdominal rahatsızlık ve iştahsızlık dahil benzer bir yan etki profili vardır. En önemli yan etkileri öldürücü eritema multiforme ve toksik epidermal nekrozisdir⁹⁷.

2.9.1.2.6. Kanamisin

Kanamisin kendisi gibi aminoglikozit olan amikasin ve kapreomisinle pek çok açıdan benzer özellikler göstermektedir. Sadece dirençli mikroorganizmaların ya da

tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) sebep olduğu hastalığın tedavisinde kullanılan ve parenteral olarak verilmesi gereken bu ilaçlar benzer farmakokinetiklere ve toksisiteye sahiptirler. Potansiyel olarak ototoksik ve nefrotoksik olduklarından, bu gruptan iki ilaç bir arada kullanılmamalıdır ve Streptomycin ile kombine edilmemesi gereklidir. Tüberkülozlu hastaların küçük grupları günlük 1 gr kanamisin ile tedavi edilmişlerdir. Sık görülen toksik etkileri nöromusküler paralizi, solunum depresyonu, agranülositozis, anafilaksi ve nefrotoksisitedir⁹⁷.

2.9.1.2.7. Amikasin

Bir aminoglikozit olan amikasin birçok mikobakteri türüne karşı oldukça aktiftir. TDM infeksiyonlarının tedavisinde de önemli bir ilaç olabilir⁹⁷.

2.9.1.2.8. Kapreomisin

Streptococcus capreolus tarafından oluşturulan antimikobakteriyel bir siklik peptid olan kapreomisin hem in vitro hem de deneysel tüberkülozda etkilidir. Tek başına verildiğinde kapreomisine karşı bakteriyel direnç gelişir; bu mikroorganizmalar 50 kanamisin ve neomisin ile çapraz direnç gösterirler. Kapreomisin bakterisidal ajanlar tolere edilemediğinde veya dirençli mikroorganizma varlığında diğer antitüberküloz ilaçlarla kombine edilerek kullanılır⁹⁷.

2.9.1.2.9. Viomisin

Birçok dirençli tüberküloz suşlarına karşı etkilidir. Kapreomisin ve viomisine karşı çapraz direnç sıklıkla oluşmaktadır⁹⁷.

2.9.1.2.10. Florokinolonlar

DNA giraz inhibisyonu yapan florokinolonlar bakterisidal etki gösterirler. DNA giraz inhibisyonu DNA replikasyonunda ve protein sentezinde yetersizliğe yol açar. Diğer antitüberküloz ilaçlarla etkileşimi önemlidir. RIF gibi RNA ve protein sentez inhibitörleri kinolonların bakterisidal etkisini azaltabilirler. Geniş spektrumlu bir florokinolon olan moksifloksasinin rifampicine benzer in vitro aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ofloksasin ve siprofloksasin arasında tam çapraz direnç vardır, in vitro siprofloksasin ile moksifloksasin ve gatifloksasin arasında da çapraz direnç olduğu

gösterilmiştir. Levofloksasinin izomeri olan ofloksasine göre 2 kat daha etkili olduğu düşünülür. Nadiren alerjik reaksiyonlar, diare, fotosensitivite, yükselmiş karaciğer fonksiyon testleri ve periferik nöropati görülebilir. Böbrek yetmezliğinde siprofloksasin, ofloksasin ve levofloksasinin doz ayarlaması gerekir, bu gereklilik moksifloksasin için mevcut değildir⁹⁷ (Çizelge 2.5 ve 2.6).

Çizelge 2.5. İkinci Seçenek Anti-TB İlaç Mutasyonları⁹⁵

İlaçlar		İkinci Seçenek Anti-TB İlaç Mutasyonları
Injectable (parantral)	Amikasin Kanamisin	<i>eis</i> promoter, <i>rrs</i> geninde: A 1400 G, 1401 G & 1484 T
	Kapreomisin	Haemolysin <i>tlyA</i> geninde.
Florokinolon (kinolonlar)	Ciprofloksasin Ofloksasin Levofloksasin Gatifloksasin Moksifloksasin	DNA giraz enzimi <i>gyrA</i> geni tarafından kodlanan iki A alt ve <i>gyrB</i> geni tarafından kodlanan iki B alt birimden oluşur. <i>GyrA</i> genindeki Ser 95 Thr kodonları.

Çizelge 2.6. DSÖ'nün ÇİD TB için önerdiği tedavi rejimleri⁸⁰

Duyarlılık testleri sonucu	Başlangıç Fazı		İdame Fazı	
	İlaç	Süre	İlaç	Süre
Yok	Kanamisin ¹ +Etionamid+ Florokinolon+Pirazinamid± Etambutol	En az 6 ay	Etionamid+Florokinolon +Pirazinamid±Etambutol	12 – 18 ay
INH+RİF	Streptomisin ² +Etionamid + Florokinolon+Pirazinamid± Etambutol	En az 6 ay	Etionamid+Florokinolon +Pirazinamid±Etambutol	12 – 18 ay
Tüm birinci sıra ilaçlara dirençli	Parenteral ilaç* +Florokinolon+ Oral ilaç (PAS,Etionamid, Sikloserin)	En az 6 ay	Parenteral ilaç hariç aynı ilaçlar	18 ay
Rezerv ilaçlara ait test sonuçları var	Test sonuçlarına göre kişisel tedavi			

Açıklamalar:

Florokinolon(Ofloksasin,Ciprofloksasin)

*:Parenteral İlaç(Amikasin,Kanamisin,Kapreomisin)

1.Amikasin veya Kapreomisin seçilebilir.Kanamisin ile Amikasin arasında çapraz direnç vardır. Eğer bu ilaçlardan biri daha önce kullanıldıysa ya da dirençten şüphe ediliyorsa Kapreomisin seçilmelidir.

2.Streptomisin direnci saptanırsa, Kanamisin, Amikasin , Kapreomisin ile değiştirilir.

2.9.1.3. Tüberküloz'da İlaç Direnç Tanımları

2.9.1.3.1. Yeni Olguda İlaç Direnci

Bir aydan daha kısa süre tedavi görmüş ya da hiç tedavi görmemiş hastadaki ilaç direncidir. Bu tanım daha önce “primer ilaç direnci” olarak adlandırılıyordu.

2.9.1.3.2. Tedavi Görmüş Olguda İlaç Direnci

Bir aydan daha uzun süre tedavi görmüş hastadaki ilaç direncidir. Bu ilaç direnci, ilk tedaviden önce varsa “primer”, eğer başlangıçta yok ve tedavi sonrası gelişti ise “sekonder” ilaç direnci olabilir.

2.9.1.3.3. Çok İlaça Dirençli Tüberküloz (ÇİD-TB) [multi-drug resistant tuberculosis (ÇİD-TB)]

İsoniazid ve rifampicine dirençli TB’dir. Bu iki ilaca ek primer ilaçlardan başka ilaç direnci de olabilir.

2.9.1.3.4. Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz (YİD-TB) [extensive drug resistant tuberculosis (XDR-TB)]

İsoniazid ve rifampicinin her ikisine birden, bunlara ek olarak da bir kinolona ve parenteral kullanılan ilaçlardan (kanamisin, kapreomisin, amikasin) birisine direnç olması olarak tanımlanmaktadır.

2.10. Tüberküloz Tanı Yöntemleri

2.10.1. *Mycobacterium tuberculosis*’in Mikrobiyolojik Tanısı

Aktif tüberküloz solunum yolu örneklerinde veya diğer vücut sıvılarında *M. tuberculosis* tespit edilerek tanı konur. Her ne kadar yeni moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiş olsa da mikobakterium tanısında, mikroskopi (ARB) ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kültür ‘altın standart’ olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tedavinin etkinliğini izlemek ve aktif tüberkülozun çevreye bulaşını engellemek için kısa sürede sonuç veren yöntemlere ihtiyaç vardır^{98,99}.

2.10.1.1. Fenotipik Yöntemler

2.10.1.1.1. Mikroskopi

Aside dirençli organizmalar olan mikobakteriler için başıca iki boyama tekniği geliştirilmiştir. Basiller Karbolfuksin yönteminde (Ziehl-Neelsen, Kinyoun) kırmızı renkte, Florokrom yönteminde (auramin O, auramain-rhodamin) ise sarı-oranj renkte floresan verir şekilde görülür. Aside dirençli boyama, mikobakterilerin lipidden zengin hücre duvarlarının primer boya ile boyanması ve renk giderici ajan asid alkolle

muameleden sonra boyalı kalması esasına dayanmaktadır. Bu nedenle mikroorganizma aside dirençli basil olarak adlandırılmaktadır. Yayma duyarlılığı % 22-80 arasında değişmektedir. Direk mikroskopi ile görülebilmesi için, balgamın her ml' de 5000-10000 basil bulunması gereklidir.

Değerlendirme yapılırken 300 mikroskop sahası tarandıktan sonra hiç basil görülmezse negatif denmelidir. Alanlar taranırken 1-2 basil şüpheli, 100 alanda 1-9 basil görülmesi (+), 10 alanda 1-9 basil görülmesi (++), her alanda 1-9 basil görülmesi (+++), her alanda 10 ve üzeri basil görülmesi (++++), olarak yorumlanmaktadır⁴⁶.

2.10.1.1.2. Kültür Ortamında İzolasyon Yöntemleri

Kültür yöntemleri tüberküloz tanısında altın standart olarak devam etmektedir. Mikobakteriyel kültür yöntemleri katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Katı besiyerleri agar ver yumurta bazlı iki çeşiti bulunmaktadır. Petragani ve American Trudeau Society gibi katı besiyerleri dışında günümüzde en yaygın kullanılan katı besiyeri, Lowensterin-Jensen (LJ)'dir. İçeriğinde patates unu, gliserol, tuz, yumurta bulunmasıyla kontaminasyonu engellerken aynı zamanda tüberküloz bakterisi için uygun üreme şartlarını sağlar. En çok tercih edilen agar bazlı besiyerleri ise Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11'dir. Sıvı besiyerlerinin, MB Redox, BACTEC 460TB, BACTEC MGIT 960, BACTEC 900 MB, ESPII, MB/BacT ALERT 3D gibi çeşitleri bulunmaktadır. MB Redox genellikle düşük kapasiteli laboratuarlarda tercih edilen manuel bir sistemdir. Mikobakterilerin izolasyonu amacıyla modifiye Kirchner besiyeri kullanılır. İçerisinde tetrazolium tuzu bulunması mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde yüzeylerinde biriken pembekırmızı renklerinde formazona indirgenir. Üreme sonucu oluşan renkli mikrokoloniler makroskobik olarak görülür⁴⁶.

2.10.1.1.2.1. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi ve NAP Testi

Mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler; direkt mikroskopik olarak ARB inceleme, katı veya sıvı besiyerinde üreme ve biyokimyasal testleri içermektedir. Klasik tanı yöntemleri halen önemini korumakla birlikte, etkenin üretilmesi, tanımlanması ve ilaç duyarlılığının belirlenmesinin geç ve güç olması nedeniyle daha duyarlı ve hızlı yöntemlere gereksinim vardır. Bu amaçla geliştirilen immünokromatografik yöntemler de hızlı tanı seçenekleri arasında yer almaktadır.

İmmünokromatografik bir yöntem olan SD Bioline Ag MPT64 Rapid ticari kiti (Standard Diagnostics, Kore) *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) suşlarına özgül MPT64 proteininin, monoklonal MPT64 antikorları kullanılarak belirlenmesi esasına dayanır. MPT64, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* ve *Mycobacterium bovis*'i de içine alan MTC üyelerine ait 23 kDa ağırlığında bir membran proteini olup, kültür filtratları ve biyopsi materyallerinde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, TB Ag MPT64 testinin, MTK ve tüberküloz dışı mikobakteriler (NTM)'in ayırımında kullanılabilecek başarılı ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu yöntem, kültürde üretilen MTC suşlarının erken tanımlanmasına ve tedavinin gecikmemesine olanak sağlamaktadır^{101,102,103}.

Kültür ortamında izole edilen koloniler karşılaştırmalı bir metod olan p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi de immünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi ile MTBK ile TDM identifikasyonu yapılır.

2.10.1.1.3. Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri

Klasik mikobakteriyolojide genel olarak üç ilaç duyarlılık yöntemi vardır.

1. Absolute konsantrasyon yöntemi (Meissner 1961-MIC'da (minimum inhibitör konsantrasyonu) etkili)
2. Rasyo (ratio) yöntemi (Mitchison 1957)
3. Proporsiyon yöntemi (Canetti- Rist- Grosset 1963)

2.10.1.1.3.1. Mutlak (Absolute) Konsantrasyon Yöntemi

Mutlak konsantrasyon yöntemi katı yada sıvı besiyerlerinde minimum inhibitör konsantrasyonunu belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Katı besiyerlerinde bu yöntem oldukça kolay standartize edilebilir. Direnç 20 koloniden düşük konsantrasyonlarda bile tanımlanabilir. İlaç konsantrasyonları ve özellikle inokülüm miktarı ata suşlar referans alınarak dikkatlice standartize edilmelidir. İnokülüm miktarındaki çeşitlilik bu yöntemdeki hatanın başlıca kaynağıdır¹⁰⁴.

2.10.1.1.3.2. Rasyo (Ratio) Yöntemi

Bu yöntem absolute konsantrasyon yönteminin gelişmiş bir halidir. Kontrol edilen izolatlardan bir izolat için MIC değerindeki farklılıklar ilaç içeren besiyerinin

farklı serilerinde test edilebilir. Şayet bu yöntemle duyarlılık oranı 2 yada daha az ise yada 8 veya daha fazla ise sırasıyla tamamen duyarlı yada hayli yüksek dirençlilik durumundan söz edilebilir. Orta yada düşük dirençlilik oranını tam olarak ölçmek zordur. İnokülüm miktarının standartize edilmesi gereklidir fakat kritik konsantrasyon duyarlı izolatlarla direk mukayese edildiğinden dolayı belirlemeye ihtiyaç yoktur¹⁰⁴.

2.10.1.1.3.3. Proporsiyon Yöntemi

Proporsiyon yöntemi üremenin 100 kat inhibe edildiği durumun izlendiği bir yöntemdir. BACTEC MGIT 960 SIRE ve LJ agarda proporsiyon yöntemleri bu prensibe dayanmaktadır¹⁰⁴.

2.10.1.2. Moleküler Yöntemler

2.10.1.2.1. IS6110-PCR-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)

M. tuberculosis 0 ile 25 arasında kopya sayılarında tekrarlayan yerleşim dizilimi(IS) bölgeleri içerir. Bu yerleşim dizilimlerinin farklı çeşitleri bulunmaktadır; IS6110, IS8110, IS1547 ve IS-like'tır ve en yaygın kullanılanı IS6110'dur. RFLP altın standart olarak kabul edilmektedir. Burada DNA'da bulunan IS6110 bölgeleri *Pvu*II restriksiyon endonükleazı ile kesilmekte, daha sonra DNA fragmentleri jel elektroforezi ile ayrılır ve ardından jelde bulunan DNA'lar southern blotting tekniği ile naylon membrana taşınır. DNA membrana hibridize olduktan sonra IS6110 prob ve kemilüminesan kit aracılığı ile görülür hale getirilir. Meydana gelen ışıma film üzerine aktarılıp yorumlaması yapılır³¹.

Yüksek ayırım gücüne sahip olmasının yanı sıra, yoğun miktarda koloni ve DNA ihtiyacı, uzun zaman alması ve emek istemesi RFLP'nin dezavantajlarıdır. Kopya sayısı 5 ve altında olan suşlarda yetersiz ayırım gücü bu yöntemin spoligotiplendirme, MIRUVNTR ve SNPs yöntemleriyle kombine edilerek avantaja dönüştürülebilir⁴⁶.

2.10.1.2.2. Spoligotyping (Spacer oligonucleotide typing)

MTK DR lokusu CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-düzenli kümelenmiş spacer arası kısa palindromik tekrarlar) ailesi üyesidir⁴⁶. Kromozomal DR lokusunda bulunan polimorfizmi göstermeye dayalı bir yöntemdir. DR'leri hedef alan primerler kullanılarak bu lokusların arasındaki farklı spacerlar

(ayırıcı yerler) amplifiye edilmektedir. Aplikon, membranda bağılı bulunan ve DR'ler arasında yerleşmiş olan farklı spacer bölgelere karşılık gelen 43 çeşit oligonükleotit proba hibridize edilmektedir. Spacerların varlığı veya yokluğu dijital ortamda gösterilir. Meydana gelen görüntü membranın üst yüzeyinde kareler halindedir. Spacerlar suşlar arasında farklılık gösterir ve suşlar spoligotipleme patternleri sayesinde ayırılmaktadır. Basit, hızlı ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bu yöntem, IS6110'dan sonra en yaygın olarak kullanılan metottur. IS6110'a göre avantajı düşük kopya sayılı suşlarda ayırım gücünün yüksek olmasıdır⁴⁶.

2.10.1.2.3. MIRU-VNTR (Mycobacterial interspersed repetitive unitvariable number of tandem repeat)

MIRU-VNTR yöntemi değişik sayılarda sıralı tekrarlar(variable numbers of tandem repeats) içeren, *M. tuberculosis* tiplendirmesi için efektif, spesivitesi yüksek ve laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliğinden dolayı standardize edilmiş hızlı bir yöntemdir. *M. tuberculosis* genomunda 41 farklı değişebilen sıralı tekrarlar (variable tandem repeats) tanımlanmış ve bunlara mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) adı verilmiştir. Bu lokusları içine alan komşu bölgeleri tanıyan primerler kullanımıyla yapılan PCR sonucu sıralı tekrarların sayısı ve bu sıralı tekrarların her iki yanında yerleşmiş olan DNA segmentlerinin büyüklüklerini belirlemektedir. Bu metot ile suş tiplendirmede ilk 12 lokus MIRU-VNTR metodu kullanılmış ve daha sonra 15 ve 24 lokustan oluşan standart MIRU-VNTR formatları geliştirilmiştir.

MTK için duyarlı ve spesifik olan bu yöntem IS6110 RFLP ve spoligotipleme ile karşılaştırıldığında, daha yüksek miktarda ayırıcı profil oluşturmaktadır. European Union Concerted Action Meeting'e göre tüberküloz kontrolü ve epidemiyolojisi için yeni teknikler MIRU bazlı metotlardır⁴⁶.

2.10.1.2.4. Real-Time PCR

Konvansiyonel PCR'ın avantajları: oldukça duyarlı, ucuz, ve protokol standardize edildikten sonra uygulanması kolaydır. Duyarlık ve özgüllüğü artırmak için "nested PCR" ya da "hot-start PCR", RNA çoğaltmak için "RT-PCR", çok sayıda mikroorganizmayı aynı tüpte tespit etmek için "multipleks PCR", genel infeksiyon varlığını tespit etmek için "broad-range PCR" gibi modifikasyonlar yapmak

mümkündür¹⁰⁴. Konvansiyonel PCR'in dezavantajları ise zaman alıcı olması, yoğun emek istemesi, özgülüğünün düşük kontaminasyon riskinin ise yüksek olması, çok sayıda örnek çalışmak için uygun olmaması ve sağlıklı kantitasyon yapmanın mümkün olamaması şeklinde sıralanabilir.

Real-Time PCR'in avantajları: döngülerin hızlı uygulanması ve tespitin floresan ölçümü yardımıyla eş zamanlı yapılabilmesi nedeniyle toplam test süresi kısaltılması, bu vasıta ile harcanan emek azalmıştır. Ayrıca çoğaltma ve örneğin varlığını tespit etme aynı tüp içinde gerçekleştiğinden dolayı kontaminasyon riski de azaltılmıştır. Kapasitesi artırılmış cihazlarla çok sayıda örnek çalışmak mümkün hale gelmiştir. Kullanılan probler yardımıyla özgülük oldukça artırılmıştır. "Log faz analizi" ile kantitasyon daha sağlıklı ve daha geniş bir aralıkta yapılabilmektedir. Rekabet nedeniyle ucuzlamıştır. Real-Time PCR'in dezavantajları ise teknik donanım, alt yapı, beceri ve tecrübe gerektiriyor olması, yüksek ekipmana ihtiyaç duyulması, aynı ve farklı laboratuvarlar arasında sonuçlar arası farklılıklarda standardizasyon probleminin yaşanması şeklinde değerlendirilebilir.

Konvansiyonel PCR'in dezavantajlarının ortadan kaldırmak için 1990'ların ikinci yarısında çeşitli teknolojik ilerlemeler kaydedilmiştir. Elektroforez aşamasının ortadan kaldırılarak işlem süresinin kısaltılması ve PCR'in kapalı bir sistem içinde daha az kontaminasyon riskine maruz bırakılması amacıyla yarı otomatize "Cobas Amplicor" sistemi geliştirilmiş ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır¹⁰⁵. Bu sistemde cihaz içinde işaretli primerler ile gerçekleştirilen PCR sonrası çoğaltılan ürünler ELISA formatıyla saptanmaktadır. Konvansiyonel PCR ve PCR+ELISA formatlarında yapılan kantitasyon "end-point kantitasyon" şeklindedir. Bu yöntem ilk örnekteki mikroorganizma miktarını tespit etmekte çok sağlıklı bir yaklaşım değildir. Sağlıklı kantitasyon yapmak, kontaminasyonu en aza indirmek, hızla sonuca ulaşmak, özgülüğü yükseltmek ve çok sayıda klinik örneği çalışabilmek için real-time PCR formatı geliştirilmiştir¹⁰⁵.

Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, ürünleri tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur¹⁰⁶. DNA'nın çoğaltımını ve Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji

yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir¹⁰⁷. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde tespit edilebilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri tespit etme işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır. Real-time PCR’da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının tespit edilmesi çeşitli şekillerde yapılabilir:

Bunlardan biri özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I’dir. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA’nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA’ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile gerçekleştiği, yoksa non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılır. Çoğaltılan hedefin özgül olarak tespit edilmesi amacıyla işaretli problemler kullanılır. Prob formatları arasında en sıklıkla FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), Taqman ve “Molecular Beacons” yer almaktadır¹⁰⁵.

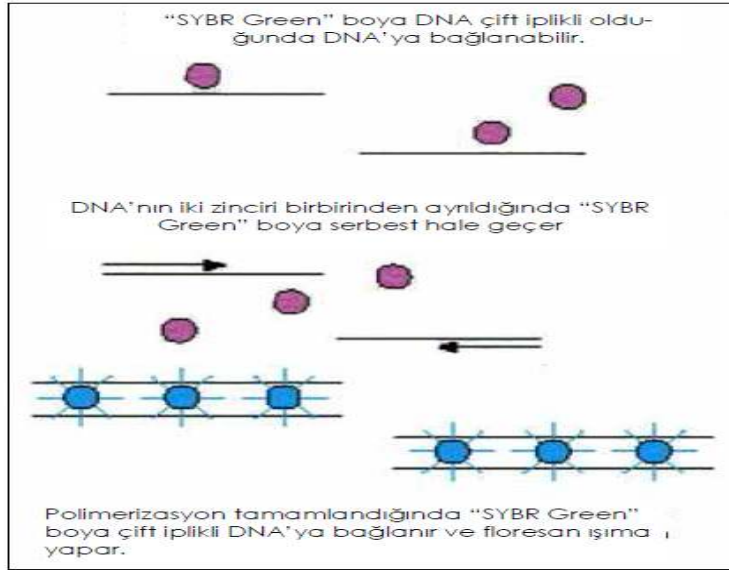
Biyolojik örneklerden elde edilen DNA’nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA’nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP (single nucleotide polymorphism/tek nükleotid polimorfizm) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur¹⁰⁸.

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar.

2.10.1.2.4.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi SYBR Green I

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak "real-time" PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluğuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder¹⁰⁸.

Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir¹⁰⁸ (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Sybr Green yöntemi.

Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problemlara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez yanlış pozitif sonuç almak

mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ısıma gözlemlenebilir. Çoğaltılan DNA’nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA’ların erime eğrisi analizleri (“melting curve”, “dissociation”) yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA’nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer’lerinde) aradığımız DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindendir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir¹⁰⁹ (Şekil 2.7).

2.10.1.2.4.2. Özgül Belirleme Sistemi

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin tespit edilmesinde floresan işaretli problar kullanılır. Bu tekniklerin başında “TaqMan” prob, “Molecular beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılan yöntemler gelmektedir.

2.10.1.2.4.2.1. “TaqMan Probe” Yöntemi

“TagMan probe” yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılmaktadır. “TagMan® probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6- karboksitetrametil-rodamin= TAMRA). 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA’ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından

yeni zincir oluşmaya başlar. Proben bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyali oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresan da ona bağlı olarak artmaya devam eder¹¹⁰.

“TagMan probe” yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü, kolay dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır.

2.10.1.2.4.2.2. Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi hem yapısı hem de çalışma prensibi ile “TagMan probe” ve “SYBR Green I” yönteminden çok farklıdır.

Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içermektedir. Bunlardan baskılayıcı florofoz diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest halde iken ışıma yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Bu teknikte oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır¹¹¹.

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları, farmakogenetik çalışmalardır. Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışıma elde edilemeyebilir¹¹¹.

2.10.1.2.4.2.3. Hibridizasyon Prob Yöntemi

Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir.

İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar¹¹².

2.10.2. *Mycobacterium tuberculosis*'in Radyolojik Tanısı

Reaktivasyon tüberkülozunun radyografik bulguları, enfeksiyonun başlangıcından itibaren iki yıl içerisinde ortaya çıkar. Primer tüberkülozun radyolojik özelliklerine benzer. Ayırt edici bulgular; üst lobları tercih etmesi, lenfadenopati (LAP)'ın olmaması ve kavitasyona meyil olmasıdır. Radyografik olarak;

1. Parankimal hastalık ve kavitasyon
2. Hava yolu hastalığı
3. Plevral hastalık
4. Komplikasyonlar şeklinde incelenir⁶⁸.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Bölgemizde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarının birinci ve ikinci seçenek anti-tüberküloz (anti-TB) ilaç duyarlılık paterninin değerlendirilmesi, Çoklu İlaç Dirençli (ÇİD) ve Yaygın İlaç Dirençli (YİD) suşların hızlı tanısında mutasyonları tespit etmeye yönelik amplifikasyon ve spesifik erime eğrisi analizleri (Melting Curve) ile ayırım gücüne sahip multipleks Real-Time PCR kullanılması, ayrıca elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılmasını hedef alan bu çalışmaya, 2012 Ocak - 2014 Mart tarihlerinde ÇÜ THAUM ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen toplam 94 balgam örneği dahil edildi.

3.1.1. Örnek Grupları

Adana ve çevre illerinde (Antakya, Adıyaman, Gaziantep, Mersin, Osmaniye ve Kahramanmaraş) bulunan 13'ü Verem Savaşı Dispanseri (Anamur, Ceyhan, Çifteminare, Elbistan, İskenderun, İslahiye, Karşıyaka, Kilis, Kozan, Nizip, Osmaniye, Silifke ve Tarsus), altısı da hastane (Adana Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Çukurova Devlet Hastanesi, Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ceyhan Devlet Hastanesi, Tarsus Devlet Hastanesi ve özel Adana Ortadoğu Hastanesi) olmak üzere toplam 19 merkezden gönderilen balgam örnekleri arasından titizlikle seçilen bu örnekler iki grupta incelenerek gruplar arasındaki farklılıkların fenotipik ve genotipik yansımaları da derinlemesine irdelenmiştir.

3.1.1.1. Birinci Grup

Laboratuvarımıza 2012 Ocak - 2013 Eylül tarihlerinde gönderilmiş olan örnekler arasından p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) ve immünokromatografik TB Ag MPT64 kart testleri sonucu MTBK tespit edilen suşlardan BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminde yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda ÇİD olarak bulunmuş olan 34 suşa ek olarak 2013 Eylülden örnek toplanmasının sonlandığı 2014 Mart tarihine kadar gelen ardışık örnekler arasından aynı sistemle ÇİD MTBK olarak tespit edilen 10 suş çalışmamızın ilk grubunu

oluşturmuştur. Bu 34 suşun MTBK identifikasyonunu teyit etmek için MGIT tüplerine aşağıdaki anlatıldığı şekilde tekrardan MPT64 ve NAP testi yapıldı. MGIT besiyerlerinden MTBK izole edilemediği durumlarda ise LJ besiyerine pasajlanarak yeniden MTBK izole edilmeye çalışıldı.

Bu grubun moleküler incelemesi için Mickle cihazı (The Mickle lab. Engeneering CO. LTD. Gomshall Surrey, UK) yardımıyla mekanik DNA ekstraksiyonu yapıldı ve bunun için kültür ortamında üretilen bakteriler kullanıldı.

3.1.1.2. İkinci Grup

Laboratuvarımıza 2013 Eylül–2014 Ocak tarihlerinde gönderilen ve mikroskopik inceleme sonucu ARB (acid-resistant-bacilli)-pozitif bulunan balgam örneklerinden BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine direnç tespit edilen örnekler toplandı. 2014 Ocak tarihinden sonra gelen ARB-pozitif ardışık örneklerle de bu sayı 50'ye tamamlanmıştır. Bu süreç tez döneminde 2014 Ocak–2014 Mart tarihleri arasında kapsamıştır. Bu örneklerle dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemleri akabinde kültür işlemi yapıp geriye kalan örnekler doğrudan 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine alınarak MTB Real-Time PCR ekstraksiyon protokolüne göre genetik araştırması yapılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi

Mikobakteri türlerinin geç ve güç üredikleri göz önüne alındığında hızlı üreyen diğer bakterilerin elemine edilmesinin aciliyeti dekontaminasyon–homojenizasyon konsantrasyon işleminde bir adım daha öne çıkmaktadır.

2013 Eylül sonrasında gelen örneklerin tamamı dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemine tabi tutularak işlenmiştir.

3.1.2.1. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemine Hazırlık

N-asetil-L-sistein-%4 NaOH- (NALC-NaOH) için gerekli malzemeler;

NaOH	40 gr
Trisodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	14,5 gr

Distile su 1 lt

İçerikler homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Karışım 120°C’de 30 dakika otoklavlandı. Şişelere bölünüp buzdolabında saklandı.

Fosfat tamponu (PBS) için gerekli malzemeler;

Disodyum fosfat (Na_2HPO_4) 23,11 gr

Monopotasyum fosfat (KH_2PO_4) 18,16 gr

Distile su 4 lt

İçerikler homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Karışımın PH’sı 6,8’e ayarlanıp 120°C’de 30 dakika otoklavlandı. Şişelere bölünüp buzdolabında saklandı.

3.1.2.2. Dekontaminasyon–Homojenizasyon ve Konsantrasyon İşlemi Uygulanışı

Birinci gruba ilave edilen örnekler ve ikinci grup örneklerin tamamına N-asetil-L-sistein-%4 NaOH- (NALC-NaOH) yöntemi kullanılarak dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemleri uygulandı. Bu işlemler için sırasıyla şu yöntemler baz alındı:

1- Falkon tüpünde gelmiş olan örneğe kendi miktarı kadar NALC-NaOH karışımı eklenip 30 saniyeyi geçmeyecek şekilde vortekslendi. Daha sonra oda ısısında 15 dakika bekletildi bu sürenin aşılmasına azami özen gösterildi. Bu işlemle diğer bakterilerin elemine edilmesi ve şayet varsa mikobakterilerin balgamın yoğun yapısı içerisinde açığa çıkması sağlandı. (dekontaminasyon işlemi) Dekontaminasyon işlemini takiben yapılacak her işlemde asepti-antisepti kurallarına uyulmaya özen gösterildi.

2- Sonra falkon tüpünün 45-50 ml çizgisine kadar 0,067 M fosfat tamponu (PBS) (pH 6.8) ilave edilip, karışım el yardımıyla alt üst edildi. Bu çözelti asit-baz dengesini sağladı. (homojenizasyon işlemi)

3- Daha sonra bu karışım 3000 g’de 15 dakika santrifüj (Eppendorf Soğutmalı Micro santrifüj cihazında, GERMANY) edildi (konsantrasyon işlemi).

4- Santrifüj akabinde süpernatant kısım dökülüp dipte kalan pellet üzerine kendi miktarı kadar tekrar PBS tampon çözeltisi eklendi ve pipetaj işleminden sonra 0,8 ml Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik, Trimethoprim, Azlosilin asit-(PANTA) Supplement

eklenmiş MGIT tüpüne 0,5 ml, Lowenstein-Jensen (LJ) ağara (Becton Dickinson, ABD) ise 0,3 ml oranında rutin olarak işlenen kültür ekimleri yapıldı.

3.2. Fenotipik İncelemeler

Çalışma sırasında (2013 Eylül–2014 Mart) gelen örnekler rutin uygulamalarda yapıldığı üzere doğrudan ve teksif sonrası mikroskopik olarak inceledikten sonra mikobakterilerin identifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen kültür ortamında izolasyon için LJ besiyeri ve MGIT 960 otomatize sistemi kullanıldı. Kültürde izole edildikten sonra, MTBK türleri ve tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) türlerinin ayrımı için ise NAP testi (Para Nitro Benzoik Asit reaktifi (p-NBA)) ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 kart testleri kullanıldı.

3.2.1. Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi

Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar karbol fuksin yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)) ile boyandıktan sonra mikroskopik olarak mikobakteriler incelendi. Bu inceleme gelen örneklerle hiçbir işlem yapılmaksızın doğrudan (direkt ARB boyama) ve dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işleminden sonra (teksif sonrası ARB boyama) olmak üzere iki aşamada yapıldı.

Ayrıca, kültür ortamında üretilen kolonilerin morfolojik incelemesi için de bu boyama yöntemi kullanıldı.

3.2.1.1. Karbol fuksin yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN))

Mikobakteriler hücre duvar yapılarında bulunan %70 yağ asitleri oranıyla boyanmaları diğer bakterilere nazaran daha güçtür. Bu sebeple EZN adı verilen en eski boyama yöntemiyle asit-alkol karışımına dirençli şekilde boyanırlar. Asit-alkole dirençli mikroorganizmalar ışık mikroskopunda mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı renkte basiller şeklinde görülürler.

Çalışmamızın ikinci grubunu oluşturmak için, gelen örneklerden yayma preparatlar hazırlanarak EZN yöntemiyle boyamaları yapıldı ve mikroskopta mavi zemin üzerinde pembe-kırmızı basillerin görülmesi sonucu ARB-pozitif olarak değerlendirildi.

EZN boyama yöntemi olarak;

- 1- Karbol Fuksin
- 2- Asit-Alkol
- 3- Metilen Mavisi kullanılır.

3.2.1.1.1. EZN Boyasının Hazırlanışı

Karbol Fuksin boyası içerikleri

Bazik fuksin (karbol fuksin)	1 gr
Fenol kristalize	5 gr
Saf etil alkol	10 ml
Saf su	100 ml

%3'lük Asit-Alkol içerikleri

Hidroklorik Asit (HCL)	3 ml
%95'lik Etil alkol	97 ml

Metilen Mavisi içerikleri

Metilen mavisi	2 gr
Borax (sodyum tetra borat kristalize)	5 gr
Saf su	100 ml

3.2.1.1.2. EZN Boyama İşlemi (ARB/AARB Boyama)

Yayma sonrası havada kurumaya bırakılan preparatlara ateşle fiksasyon işleminden sonra karbol fuksin damlatıldı ve 3-4 dakika bekletildi. Bu işlem esnasında preparatların altından ateşle kaynamayacak şekilde üzerinden buhar çıkana kadar fikse edildi. Bu şekilde bakteri porlarının açılıp karbol fuksinin hücre içine alınması sağlanmış oldu. Daha sonra preparatlar çeşme suyuyla yıkandı. Üzerine asit-alkol karışımı döküldü ve 2 dakika beklenildi. Hücre duvar yapısında %70 yağasiti bulunduran Mikobakteri türleri asit-alkole dirençli oldukları için bu esnada karbol fuksini hücre içerisine alıp geri bırakmazken diğer bakterilerin ise bu boyayı bırakmaları ve ardındaki yıkama işleminden sonra zıt boya olan metilen mavisi boyasıyla da kontaminasyon olarak nitelediğimiz bu bakterilerin boyanması sağlandı. Metilen mavisiyle boyama işlemi 30-45 saniye arasında tutuldu. Bu işlemden sonra da

her işlemten sonra olduğu gibi çeşme suyuyla yıkama işlemi uygulandı ve hava da kurumaya bırakılan preparatlar kuruduktan sonra 100'lük objektifte immersiyon yağı (sedir yağı) yardımıyla incelendi.

3.2.2. Kültür Ortamında İzolasyon

Çalışmamızın birinci grubunun ikinci kısmına ve ikinci grubun tamamına dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerinden sonra kültür işlemleri yapıldı. Bunun için mikobakteriyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan LJ agar besiyeri ve 7 mL'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth içeren BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi kullanıldı.

Kültür ortamında izole edilen koloniler karşılaştırmalı bir metod olan p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi ve immünokromatografik TB Ag MPT64 kart testleri uygulanarak MTBK ile TDM identifikasyonu yapıldı. Miks infeksiyon tespit edildiği durumlarda yeniden pasajlanarak MTBK suşları elde edildi.

3.2.2.1. Lowenstein-Jensen (LJ) Agarda Kültür

Dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerinden sonra rutinde ilk kültür yöntemi olan LJ agar içerisinde 0,3 ml oranında ekim yapılan örnekler daha sonra 6-8 hafta (ortalama 42 gün) boyunca 37°C de inkübe edildi. Üreme tespit edilen LJ'lerle MGIT'lar arasındaki en büyük fark ise agarlı besiyerlerinin hemen hepsinde ortak özellik olan bakterilerin kromatik özelliklerini yansıtmalarıdır sıvı besiyerlerinde ise çoğunlukla bu mümkün olamamaktadır.

3.2.2.2. BACTEC MGIT 960 Sisteminde Kültür

Dekontaminasyon–homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerinden sonra örnekler 0,5 ml oranında rutinde ikinci kültür yöntemi olan MGIT'a ekildikten 6-8 hafta (ortalama 42 gün) sonra üreme tespit edilene kadar 37 °C de inkübe edildi. 42 günün sonunda pozitif sonuç vermeyen örnekler negatif kabul edilip, MGIT EPİCENTER sisteminde pozitif sonuç veren örneklerle ise Tüberküloz kompleksi (MTB) ile tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) ayrımı için p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi ve immünokromatografik TB Ag MPT64 kart testi uygulandı.

3.2.2.2.1. BACTEC MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960 Sistemi

Sistem başlıca 3 ana başlıkta incelenebilir:

1- MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)

2-.BACTEC MGIT Growth Supplement (BACTEC MGIT Çoğalma Destekleyicisi)

3- MGIT PANTA antibiotic mixture (BBL MGIT PANTA antibiyotik karışımı destekli) (Becton Dickinson, ABD)

3.2.2.2.1.1. MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)

MGIT; Mikobakter Çoğalma İndikatör Tüpü, 7 mL'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth bazı içerir. Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz (OADC) ile zenginleştirilen ve Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik, Trimethoprim, Azlosilin asit (PANTA) antibiyotik karışımı içeren tam besiyeri, mikobakterlerin kültürasyonunda en sık kullanılan sıvı besiyerlerinden birisidir. (Becton Dickinson, ABD)

3.2.2.2.1.2. BACTEC MGIT Growth Supplement (BACTEC MGIT Çoğalma Destekleyicisi)

BACTEC MGIT Çoğalma Desteği 15 mL Middlebrook OADC ile zenginleştirilmiştir. (Becton Dickinson, ABD)

3.2.2.2.1.3. MGIT PANTA Antibiotic Mixture (BBL MGIT PANTA antibiyotik karışımı destekli)

BACTEC MGIT broth bazının klinik örneklerle inokülasyondan önce BACTEC MGIT Çoğalma Destekleyicisi/BBL MGIT Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik, Trimethoprim, Azlosilin asit (PANTA) antibiyotik karışımı ile desteklenmesiyle kontaminasyon azaltılmaktadır. (Becton Dickinson, ABD)

3.2.2.3. NAP Testi (Para Nitro Benzoik Asit Reaktif (p-NBA)) Yorumu ve Hazırlanışı

BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde 42 güne kadar inkübe edilmiş ve bu süre sonrasında pozitiflik vermiş örneklerin ARB işlemleri sonrasında pembe-kırmızı

basillerin görülmesi üzerine MTBK türleri ile TDM'lerin ayırt edilebilmesi için NAP testi uygulandı. Kolonilerin MGIT besiyerinden elde edilemediği durumlarda ise LJ agarda üremiş koloniler kullanılarak temin edildi. Bu sistemde Growth Control (GC) MGIT tüpünün Growth Unit'i (GU) 400'e ulaşınca (bu sonuç en fazla 12 gün içinde gerçekleşir) pozitiflik sinyali veren örnekler değerlendirilmeye alındı. Bu testin sonucuna göre yorumu ise; NAP test tüpünün $GU \leq 10$ ise hassas olması göz önüne alarak, bu miktardan küçük üreme konsantrasyonun MTBK olarak değerlendirilirken, bu değerden yüksek konsantrasyon değeri ise dirençli yani TDM şeklinde yapıldı (Çizelge 3.1.).

500 mcg/ml konsantrasyonunda p-NBA hazırlanışı;

Bir tüpte 1 ml HCL 5 ml distile su içinde çözündü.

Farklı bir tüpte de 0,5 gr NaOH 5 ml distile su içinde çözündü.

1- Öncelikle 80 ml distile su içine 4 gr p-NBA ve 1 gr NaOH parçacıkları eklendi. Solüsyon iyice çözüldükten sonra rengin sarı olması beklendi.

2- pH indikatörü olarak kullanılacak 1 damla Phenolphthalein damlatıldı. Rengin pembeye dönmesi beklendi.

3- Renk tekrar sarı oluncaya kadar (pH nötr) önceden hazırlanmış olan dilüe HCL'den 3-4 damla damlatıldı. HCL'yi damlattıktan sonra oluşan beyaz çökelti (tuz çözeltisi) yok oluncaya kadar karıştırıldı. Karıştırıldığı halde beyaz parçaların kaybolmaması ise ortamın fazla asidik olduğunu gösterdi. Bunun üzerine dilue NaOH'den birkaç damla daha damlatıldı ve tekrar karıştırıldı. Fazla NaOH eklendiği durumda da rengin tekrar pembeye döndüğü görüldü. Final solüsyon berrak sarı renge gelene kadar işleme devam edildi ve berrak sarı olunca işleme son verildi.

4- Son olarak son hacim 100 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

5- Hazırlanan solüsyon küçük şişelere bölünerek 120°C'de 10 dk otoklavlandı.

2 -8°C de 2 ay stabil bir şekilde kullanıldı.

3.2.2.3.1. NAP Testinin Uygulanışı

1- İki MGIT tüpünün birincisi Growth Control (GC) ikincisi NAP tüpü olarak barkotlandı ve hasta kaydı yapıldı.

2- GC ve NAP tüpleri içerisine Growth Supplement+MGIT PANTA Antibiyotiği (çözülmüş) karışımından 0,5'er ml eklendi.

- 3- NAP tüpü içerisine 0,1 ml p-NBA reaktifi eklendi.
- 4- ARB boyanmış basillerin bulunduğu MGIT Tüpünden 1/4 oranında steril distile su ile sulandırılıp hazırlanmış süspansiyonundan her iki tüpe 0,5 ml ekim yapıldı.
- 5- İkili barkod taşıyıcılarına GC tüpü sola, NAP şişesi sağa yerleştirildi.
- 6- Barkod okutularak cihaza yerleştirildi.
- 7- 12 günün sonunda yorumlamaya geçildi.

3.2.2.4. İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Kart Testi

MTBK türlerinin hücre yapısında bulunan 23 kDa ağırlığındaki proteinleri emdirilmiş olan MPT64 kart (Becton Dickinson, ABD) testine MGIT kültür ortamında üreyen mikobakteri kolonilerinden 0,1 ml alınıp teste eklendi ve 15 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda sadece kontrol çizgisinin çıkması tüberküloz dışı TDM türlerinin varlığını gösterirken, kontrol çizgisiyle beraber TB çizgisindeki ufak bir belirti ise MTBK türlerinin varlığının olabileceğini gösterdi (Şekil 3.1). Kolonilerin MGIT besiyerinden elde edilemediği durumlarda ise LJ agarda üremiş koloniler kullanılarak temin edildi (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1 Mpt64 kart testi: TB pozitif

Çizelge: 3.1. P-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) test sonucu ve immünokromatografik TB Ag Mpt64 kart test sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi.

P-Nitro- α -Asetilamino- β -Hidroksi-Propiofen (NAP) Test Sonucu	İmmünokromatografik TB Ag Mpt64 Kart Test Sonucu	
	Tek Çizgi (I)	İki Çizgi (II)
Tek Tüp (I)	Geçersiz	MTBK
İki Tüp (II)	TDM	Koinfeksiyon

3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri (ADT)

Rutinde MGIT besiyerinden elde edilen kolonilerle yapılan ADT'leri, örneklerin MGIT'tan elde edilemediği durumlarda LJ agardan sağlanarak uygulandı.

Bunun için her örneğe ayrı bir falkon tüpü alınıp 4 ml steril distile su eklendi ve LJ agarda üremiş kolonilerden 3-4 koloni alınarak iyice ezildi. Bunun ardından MGIT antibiyotik duyarlılık testinde uygulanan işlemler sırasıyla gerçekleştirilerek ADT yapılmış oldu.

Birinci grubun Eylül 2013 tarihinden önce gelen örneklerine BACTEC MGIT 960 otomazite sisteminde uygulanan ADT'leri birinci grubun ikinci kısmı ve ikinci grubun tamamı için de aynı şekilde uygulanmış olup birinci seçenek ilaçlara karşı direnç durumuna bakıldı.

Her iki gruptaki suşların ikinci seçenek ilaçlara karşı direnç durumu LJ agar proporsiyon yöntemi ile araştırıldı.

3.2.3.1. Birinci Seçenek İlaçlara Karşı Direnç Durumunun BACTEC MGIT 960 Otomatize Sistemi ile Tespiti

Birinci grubun 2013 Eylül ayına kadar olan kısmı ÇİD-MTBK suşlarından oluştuğu için bu tarihten sonra gelen ve ikinci grup örneklerin tamamına MGIT SIRE (Streptomycin, İsoniazid, Rifampicin, Etambutol) kiti (Becton Dickinson, ABD) antibiyotik duyarlılık testi uygulandı.

3.2.3.1.1. Antibiyotik Solüsyonlarının Hazırlanması

Antibiyotikler MGIT SIRE kiti içinde liyofilize halde üretici firma tarafından sağlandı. Liyofilize halde bulunan bu ilaç şişeleri sulandırılarak stok solüsyonlar hazırlandı (Çizelge 3.1). Her liyofilize antibiyotik şişesine 4 ml steril distile su eklendi ve tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Daha sonra sulandırılmış her bir ilaç şişesindeki antibiyotikler insülin iğnelerine çekilerek stoklandı.

3.2.3.1.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz MGIT Tüplerinin Hazırlanması

MGIT antibiyotik duyarlılık testi başlıca 4 aşamadan geçilerek hazırlandı;

1- Her hasta örneği için 5 adet MGIT tüpü alındı ve üzerleri yazıldı. (Hasta barkotlarıyla beraber Kontrol tüpüne K, ilaç eklenecek olan tüplere ise sırasıyla

Streptomycin (S), İsoniazid (I), Rifampicin (R) ve Etambutol (E) olacak şekilde). Kontrol tüpünün sulandırılması için örnek sayısı kadar falkon tüpüne 10 ml steril edilmiş distile su çekildi.

2- Her tüpe aseptik şartlarda 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement (Oleic acid, dextros, catalase, bovine albumin, polyoxethylene stearate) eklendi.

3- Dört SIRE tüpünün her birine aseptik koşullar altında, firma önerileri doğrultusunda sulandırılmış liyofilize ilaç solüsyonlarından bir mikropipet yardımıyla 100 µL eklendi (Çizelge 3.2). Kontrol tüpüne ise antibiyotik eklenmedi.

4- Daha sonra MGIT tüpünün preparat yayma sonucu ARB’de pozitif olarak yorumlanmış olan hasta örneği alt üst edilip 2,1 ml çekildi ve 0,1 ml’si 10 ml steril distile su eklenerek sulandırılmak üzere hazırlanan falkon tüpüne eklendi. Geriye kalan 2 ml ise 0,5’er ml olmak üzere antibiyotik eklenmiş MGIT tüplerine konuldu. 0,1 ml eklenerek sulandırılmış falkon tüpünden 0,5 ml alınarak kontrol tüpüne eklendi. BACTEC MGIT 960 sistemine yerleştirildi ve 12. günün sonunda grafik yorumuyla beraber ilaç dirençliliği tespit edildi.

Çizelge 3.2. MGIT tüplerine eklenen ilaç konsantrasyonları.

İlaç	Liyofilize Antibiyotik İçeren Flakon	Sulandırım Sonrasında Konsantrasyon	MGIT Tüplerine Eklenmesi Gereken Volüm	Son Konsantrasyon
MGIT SM	332 µg	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
MGIT INH	33.2 µg	8.3 µg/ml	100 µl	0.1 µg/ml
MGIT RIF	332 µg	83 µg/ml	100 µl	1.0 µg/ml
MGIT EMB	1660 µg	415 µg/ml	100 µl	5.0 µg/ml

3.2.3.2. İkinci Seçenek Anti-TB İlaçlara Karşı İlaç Direncinin LJ Agar Proporsiyon Yöntemi ile Tespiti

BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi ile ÇİD-MTBK çıkan birinci grup örneklerinin tamamı (38 örnek) ve aynı sistemle ÇİD-MTBK bulunan ikinci grup örneklerin (6 örnek) ikinci seçenek ilaçlara duyarlılıklarını incelenmek üzere LJ agar proporsiyon yöntemi yapıldı. İkinci seçenek ilaçlarda florokinolon (kinolon) grubundan siprofloksasine, enjekte (parantral) ilaçlardan da amikasine direnç oranlarına bakıldı.

3.2.3.2.1. LJ Besiyerinin Hazırlanması

1. LJ besiyerinin tuz içerikleri

Monopotasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	2.4 gr
Magnezyum sülfat	0.24 gr
Magnezyum sitrat	0.6 gr
Asparajin tuzları	3.6 gr

2. Tuzlar steril bir erlenmayer içerisinde alındı ve üzerine 600 ml distile su ilave edildi.

3. Tuzların çözülmesi için 121 °C'deki otoklavda 15 dk bekletilip daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

4. Taze, iri boy 25 adet yumurtanın dış kabuğu iyice fırçalanarak temizlendi.

5. Yumurtalar alkol veya UV lambası yardımıyla 1 gece boyunca steril edildi.

6. Yumurtalar steril bir balona tek tek tüm şekilde kırılıp homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.

7. Daha önceden hazırlanmış tuz karışımına önceden otoklavlanıp soğutulmuş 12 ml gliserol ilave edildi.

8. Hazırlanmış olan solüsyona % 2'lik malaşit yeşilinden 50 ml ilave edildi. (modifiye edilmiştir)

9. Önceden hazırlanmış olan yumurta karışımı steril bir bezden geçirilerek filtre edildi ve hazırlanmış olan solüsyona 1000 ml ilave edildi ve çalkalanarak karıştırıldı.

10. Hazırlanan karışımın yani besiyerinin pH değeri 6.8-7 civarında olmasına dikkat edildi.

11. Hazırlanan karışımın bir kısmı kontrol besiyeri olarak ilaçsız şekilde steril tüplere 6'şar ml döküldü.

12. Kalan besiyerine ilaçlar belirlenen miktarlarda ilave edildi ve üzeri etiketlenmiş tüplere 6'şar ml şeklinde döküldü.

13. Bu tüplerin hepsi yatık bir şekilde koagülatöre (pastör fırınına) konuldu. 80°C'de 1 saat koagüle edildi. Bu pişirme ve aynı zamanda sterilizasyon işlemi 3 gün üst üste tekrarlandı. (antibiyotiksiz besiyerleri için)

14. 18-24 saat 37 °C'de sterilit kontrolü yapıldıktan sonra ekim yapılincaya kadar 2 -8 °C'de buzdolabında saklanır.

3.2.3.2.2. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerinin Döküm İşlemi ve İlaç Konsantrasyonları

LJ içerikleri eklenmiş son karışım ikisi ilaçlı, ikisi ilaçsız 700'er ml olmak üzere 4 kısma ayrıldı. Öncelikle iki kısmı ilaçsız kontroller olarak kullanılmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlandı. Her burgu kapaklı tüpe 6'şar ml olmak üzere dökülüp 80°C'de 1 saat aralıklı kontroller şeklinde pastör fırınında pişirildi ve bu işlem 2 gün daha üst üste 1'er saat olmak koşuluyla tekrarlandı. Bu şekilde kısmen tindalizasyon yöntemi gibi sterilizasyon işlemi yapılmış oldu. Pişirmenin akabinde örneklerin ekilmesinden önce buzdolabına kaldırıldı.

Geri kalan iki kısımdan birine son konsantrasyon 4 µg/ml olacak şekilde amikacin sulfat (AMK) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) ve diğerine ise 2 µg/ml olacak şekilde ciprofloksacin (CIP) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) eklenerek ilaçlı besiyerleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

700 ml'lik karışım içerisine 50 mg/ml olarak hazırlanmış AMK solüsyonundan 56 µl eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı. Bu karışım da 6'şar ml olmak üzere dökülüp 80°C'de 1 saat aralıklı kontroller şeklinde pişirildi. Bu işlem ilaçsız besiyerindeki gibi üst üste pişirme şeklinde tekrarlandı. AMK'nin, *M. tuberculosis*'e karşı minimal inhibitör konsantrasyonu 2 µg/ml ve altında hassas, 4 µg/ml'de orta derecede hassas, 8 µg/ml'de orta derecede dirençli, 16 µg/ml ve üzerinde dirençli olarak belirtilmektedir⁸¹.

Dördüncü kısım olarak ayrılan 700 ml içerisine 50 mg/ml olarak hazırlanmış Ciprofloksacin (CIP) solüsyonundan 28 µl antibiyotik konsantrasyonu eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı. AMK eklenmiş besiyerinin pişirimi işleminde ki gibi pişirilip besiyerleri buzdolabına kaldırıldı.

3.2.3.2.3. Antibiyotikli ve Antibiyotiksiz LJ Besiyerlerine Ekim İşlemi

Antibiyotiksiz LJ besiyerine Mcfarland 1 bakteri süspansiyonu 10^{-2} ve 10^{-4} olacak şekilde sulandırılarak 0,3'er ml şeklinde tüm örneklerin ekimleri yapıldı. 37 °C'de kültürden ekim yapıldığı için 2-3 hafta inkübasyona bırakıldı.

Her iki antibiyotikli besiyerlerine Mcfarland 1 bakteri süspansiyonları 10^{-2} olacak şekilde sulandırılarak 0,3'er ml şeklinde tüm örneklerin ekimleri yapıldı. 37 °C'de kültürden ekim yapıldığı için 2-3 hafta inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda

üremeyi 100 kattan daha fazla engelleyenler duyarlı 100 kattan daha az engelleyenler dirençli olarak yorumlandı¹¹³ (üreme oranı %1; dirençli).

3.3. Genotipik İnceleme

Fenotipik incelemelerle MTBK olarak tespit edilmiş olan birinci grup örneklerinin ve direk gelen örnekten işleme tabi tutulan ikinci grup örneklerin ÇİD ve YİD'e karşı direnç durumlarını genetik yönden tespit etmek için multipleks Real-Time PCR (CFX96 Real-Time PCR Bio-Rad California, USA) yöntemi kullanıldı.

3.3.1. Real-Time PCR

Genotipik inceleme için spesifik erime eğrisi (melting curve) ile direnç analizi yapan Real Time PCR cihazında MTB/MDR/XDR (MTBK/ÇİD/YİD) detection kit (Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection Kit Seegene/SOUTH KOREA) kullanıldı. ÇİD'i araştırmak için rifampicin ve isoniazidin her ikisine birden olan direnç durumuna ek olarakta folorokinolon ve injektabl ilaçların kendi grupları içerisindeki öncelikli önem arzeden ortak nokta mutasyon (SNP) bölgelerine bakıldı. Böylelikle rifampicin ve isoniazid dirençliliğine ek olarak bir folorokinolon ve bir injektabl ilacın dirençliliği bulunan suşlar ise YİD olarak belirlendi.

Real-Time PCR cihazında MTB/MDR/XDR kiti ÇİD için 7 isoniazid, 18 rifampicin ilaç direnç bölgesi tespit ederken, YİD için ise florokinolon grubundaki ilaçların 7'sini injektabl ilaçlarında 6'sını tespit edebilmiştir (Çizelge 3.3.).

3.3.1.1. DNA Ekstrasyonu

Birinci grup örnekleri için DNA ekstraksiyonu kültür ortamında üretilen bakterilerle sağlanarak Mickle cihazında mekanik ekstraksiyon protokolü uygulandı. İkinci grup örneklerin ise (direk ARB-pozitif balgamdan) Real-Time PCR ekstraksiyon protokolü kullanılarak bakteriyel DNA'sı elde edildi.

3.3.1.1.1 Real-Time PCR İçin Mickle Ekstraksiyon

Birinci grup örneklerden katı ve sıvı kültür ortamında üretilen koloniler Real-Time PCR'da değerlendirilmek üzere Mickle cihazında aşağıdaki şekilde ekstrakte edildi (Şekil 3.2). Ekstraksiyon işleminde, MGIT besiyerinden elde edilen kolonilerle

yapılan ADT'leri, örneklerin MGIT'tan elde edilemediği durumlarda LJ agardan sağlanarak uygulandı.

LJ besiyerinde üretilip fenotipik olarak MTBK olduğu belirlenen koloniler 4 ml steril distile su içerisinde süspanse edilerek, LJ besiyerlerinin değerlendirilemediği hasta örneklerinde ise fenotipik olarak MTBK teşhisi alan MGIT kültür tüpleri doğrudan kullanıldı. İşlemler aşağıdaki gibi uygulandı:

- 1- Bakteri süspanسیونları 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2- 1,5'luk mikrosantrifüj tüplere hasta barkot kayıtları yapıldı.
- 3- Santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmının bir bölümü döküldü.
- 4- Daha sonra pastör pipetiyle pellet kısmından 0,5 ml alınıp ilgili hasta barkotun olduğu mikrosantrifüj tüpüne eklendi.
- 5- Önceden 80 °C'ye getirilmiş ısı bloğunda 30 dakika bekletildi.
- 6- Sonra örnekler 12700 rpm'de (15000 g (Eppendorf Soğutmalı Micro santrifüj cihazında, GERMANY)) 15 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı dikkatle döküldü.
- 7- Kalan pellet üzerine 500µl Tris-EDTA (TE) Buffer eklendi ve pipetaj işlemi yapıldı.
- 8- 12700 rpm (15000 g) 15 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı dikkatle döküldü.
- 9- Pellet üzerine 250µl TE Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 10- Pipetaj akabinde 100-150 hacimde cam boncuk eklenip 2 dakika Mickle cihazında mekanik işleme tabi tutuldu.
- 11- 12700 rpm'de (15000 g) 15 dakika santrifüj edildi.
- 12- Santrifüj işlemi akabinde üstte ki sıvı DNA olarak alındı.
- 13- -20 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Mickle cihazı.

3.3.1.1.2. MTB Real-Time PCR Ekstraksiyon Protokolü

İkinci grup örneklerinden ARB-pozitif örneklerle direk balgamdan ekstraksiyon işlemi çalışmada kullandığımız Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection Kit ambalajında bulunan ekstraksiyon solüsyonları yardımı ile kullanıcı talimatlarına göre uygulandı. Ekstraksiyon işlemi için sırasıyla şu yollar izlendi:

- 1- Örneğe 1 ml distile su eklenip ve 15000 g'de (13000 rpm) 5 dakika santrifüj edildi. Pipet yardımıyla süpernatant kısmı atıldı.
- 2- Geriye kalan pellet kısmına ekstraksiyon protokolü içerisinde yer alan DNA Extraction Solution'dan 100 µl eklenip ve 30 saniye vortekslendi.
- 3- Karışım ısı bloğunda 100°C'de 20 dakika bekletildi.
- 4- Daha sonra 15000 g'de (13000 rpm) 5 dakika santrifüj edildi.
- 5- Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım DNA olarak alındı ve her örnek çalışması için 5 µl kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

Hem Mikle cihazıyla ekstrasyon işlemi hemde Real-Time PCR ekstrasyon işlemleri sonrasında Real-Time PCR cihazında genotipik olarak ilaç duyarlılık testine geçildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. CFX96 Real Time PCR cihazı.

3.3.1.2. Real-Time PCR Amplifikasyon

Birinci ve ikinci grup örneklerin ekstrasyonları yapıldıktan sonra Real-Time PCR'ın MTB/MDR/XDR (MTBK/ÇİD/YİD) protokolüne göre her örnek için 2 tüp hazırlandı. Birinci tüpe örneği ÇİD açısından incelemek üzere MTB/MDR primerleri eklenirken, ikinci tüpe YİD açısından incelenmek üzere MTB/XDR primerleri Çizelge 3.3'deki gibi eklendi.

Amplifikasyon aşamaları ise aşağıdaki gibi uygulandı:

- | | | | |
|----|---|---------------------------------|------------|
| 1. | 95 °C’de | 15 dakika (ilk denaturasyon) | 1 döngü |
| 2. | 95 °C’de | 0,5 dakika (denaturasyon) | } 50 döngü |
| | 60 °C’de | 1 dakika (bağlanma (annealing)) | |
| | 72 °C’de | 0,5 dakika (uzama (extension)) | |
| 3. | 55 °C’de | 0,5 dakika | 1 döngü |
| 4. | 55-85 °C’de her 5 saniyede bir 0,5 °C artırılıyor (Melting Curve) (5 sn/0,5 °C) | | |

Çizelge 3.3. MTB/MDR/XDR amplifikasyon karışımı protokolü

İçerik	Hacim	
	MTB/MDR Protokolü	MTB/XDR Protokolü
4x MTB/MDR	5 µl	-
4x MTB/XDR	-	5 µl
4x PCR Master Mix(MM)	5 µl	5 µl
RNase- Free Water	5 µl	5 µl
Örnek DNA	5 µl	5 µl
TOTAL	20 µl	20 µl

3.4. Elde Edilen Sonuçların Yorumlanması ve İstatistiksel Analiz

Birinci ve ikinci gruptaki örneklerin tamamı Real-Time PCR cihazı analiz sisteminde (Seegene Viewer, South Korea) ÇİD ve YİD açısından irdelenmiş oldu (Çizelge 3.4). Fenotipik ve genotipik inceleme bulguları gruplar da dikkate alınarak karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için Fisher Exact Test Ki Kare kullanıldı ve karşılaştırmalarda istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı (SPSS 21.0 versiyonu, IBM).

Çizelge 3.4. Multipleks Real-Time PCR ile ÇİD ve YİD MTBK tespitinde kullanılan mutasyonlar.

Direnç Durumu	İlaç	İlgili Gen	Mutasyon
ÇİD	RIF (18 mutasyon)	<i>rpoB</i>	L511P (CTG→CCG), Q513K (CAA→AAA), Q513L (CAA→CTA), Q513P (CAA→CCA), 513-516 3 a.a eksikliği, D516V (GAC→GTC), D516Y (GAC→TAC), S522L (TCG→TTG), S522Q (TCG→CAG), H526C (CAC→TGC), H526D (CAC→GAC), H526L (CAC→CTC), H526N (CAC→AAC), H526R (CAC→CGC), H526Y (CAC→TAC), S531L, (TCG→TTG), S531W (TCG→TGG), L533P (CTG→CCG)
		<i>katG</i>	S315I (AGC→ATC), S315N (AGC→AAC), S315T (AGC→ACC), S315T (AGC→ACA)
	INH (7 mutasyon)	<i>InhA</i>	-15 (CT), -8 (TA), -8 (TC)
YİD	FQ (7 mutasyon)	<i>gyrA</i>	A90V (GCG→GTG), D94G (GAC→GGC), D94N (GAC→AAC), S91P(TCG→CCG), D94H (GAC→CAC), D94Y (GAC→TAC), D94A (GAC→GCC)
	Injectable (6 mutasyon)	<i>rrs</i>	1401 (AG), 1402 (CT), 1484 (GT)
		<i>eis</i>	-37 (GT), -14 (CT), -10 (GA)

4. BULGULAR

Bölgemizde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarının birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun rutin olarak uygulanan fenotipik testlerle ve Ülkemizde rutin tüberküloz tanı algoritmasında yeri olmayan multiplex Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmesini, ayrıca elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılmasını hedef alan bu çalışmada, birinci grupta fenotipik olarak ÇİD (MDR) bulunan 44 kültür örneği, ikinci grupta ise ARB pozitif 50 balgam örneği olmak üzere toplam 94 örnek değerlendirildi.

4.1. Fenotipik İnceleme Bulgularının Değerlendirilmesi

Birinci gruptaki 44 örnekten 26'sının (% 59.1) ARB pozitif olduğu görüldü. Birinci gruptaki örneklerin 21'inde (% 47.7) LJ agar besiyerinde üreme varken, BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi ile biri dışındaki hepsinde (% 97.7) üreme görüldü. İkinci grupta bu sayılar sırasıyla 16 (% 32.0) ve 47 (% 94.0) idi (Çizelge 4.1). LJ besiyerindeki üreme oranı ikinci grupta çok düşük görülsede, gerek LJ gerekse MGIT için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.142$ ve $p=0.620$, Fisher exact Ki kare testi).

Çizelge 4.1. Fenotipik inceleme sonuçlarının gruplara dağılımı.

Fenotipik İncelemeler			1. Grup Sayı (%)	2. Grup Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
ARB		Poz	26 (59.1)	50 (100)	76 (80.9)
		Neg	18 (40.9)	0	18 (19.1)
LJ		Poz	21 (47.7)	16 (32.0)	37 (39.4)
		Neg	23 (52.3)	34 (68.0)	57 (60.6)
MGIT		Poz	43 (97.7)	47 (94.0)	90 (95.7)
		Neg	1 (2.3)	3 (6.0)	4 (4.3)
MGIT SIRE	STR	R	27 (61.4)	11 (22.9)	38 (41.3)
		S	17 (38.6)	37 (77.1)	54 (58.7)
	INH	R	44 (100)	11 (22.9)	55 (59.8)
		S	0	37 (77.1)	37 (40.2)
	RIF	R	44 (100)	6 (12.5)	50 (54.3)
		S	0	42 (87.5)	42 (45.7)
	EMB	R	12 (27.3)	4 (8.3)	16 (17.4)
		S	32 (72.7)	44 (91.7)	76 (82.6)
LJ Agar Proporsiyon	CIP	R	2 (4.5)	0	2 (4.0)
		S	42 (95.5)	6 (100)	48 (96.0)
	AMK	R	1 (2.3)	0	1 (2.0)
		S	43 (97.7)	6 (100)	49 (98.0)

Birinci grupta ARB pozitif 26 örnekten 12'sinde (% 46.2), ARB negatif 18 örnekten ise 9'unda (% 50.0) LJ besiyerinde üreme tespit edilmişken, BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde ARB(-) bir örnek dışında tamamında üreme görüldü. Böylece, ARB pozitif ve negatif örnekler arasında da LJ ve MGIT pozitifliği açısından fark bulunmadı (sırasıyla $p=1.000$ ve $p=0.409$, Fisher exact Ki kare testi) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. ÇİD MTBK örneklerinin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.

Kültür		ARB(+) - 26 örnek Sayı (%)	ARB(-) - 18 örnek Sayı (%)	Ki Kare Testi
LJ	Poz	12 (46.2)	9 (50)	$p=1.000$
	Neg	14 (53.8)	9 (50)	
MGIT	Poz	26 (100)	17 (94.4)	$p=0.409$
	Neg	0	1	

Kültür sonrası MTBK identifikasyonu için yapılan NAP ve MPT64 testleri sonucunda yalnız ikinci gruptaki bir örnekte TDM izole edildi, yine aynı gruptaki bir başka örnekte ne LJ, ne de MGIT ile üreme görülmeydi. MTBK yönünden kültür negatif olan bu iki örnek fenotipik olarak ADT'de değerlendirilemezken, moleküler olarak multipleks Real-Time PCR ile araştırıldı.

Birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun fenotipik incelenmesi için mikobakteriyolojide rutin uygulanan BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde SIRE kiti yardımı ile streptomycin, isoniazid, rifampicin ve ethambutol için yapılan ADT sonucunda dirençli bulunan örnek sayıları birinci grupta sırasıyla 27 (% 61.4), 44 (% 100), 44 (% 100) ve 12 (% 27.3), ikinci grupta da 11 (% 22.9), 11 (% 22.9), 6 (% 12.5) ve 4 (% 8.3) olarak bulundu (Çizelge 4.1). Birinci grup ÇİD MTBK suşlardan oluşturulmuş iken, ikinci gruptaki rifampicine dirençli 6 suşun tamamının isoniazide de dirençli olduğu görüldü ve ÇİD olarak tanımlandı. Ayrıca, bu 6 ÇİD suştan 5'i aynı zamanda streptomycine, 2'si de streptomycin ve ethambutola dirençli idi.

Çalışmamızda ÇİD MTBK suşların ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç (minör direnç) durumunun fenotipik incelenmesi için kullandığımız ve rutin tanıda daha standardize edilmemiş olan LJ agarda proporsiyon yöntemi ile florokinolon grubunu temsilen ciprofloxacin, enjektabl ilaçları temsilen de amikacin için yapılan ADT sonucunda, birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinin (% 4.5) yalnız ciprofloxacine, birinin (% 2.3) de yalnız amikacine dirençli olduğu bulunmuş iken, ikinci gruptaki 6 ÇİD suşun hiçbirinde minör direnç tespit edilmedi (Çizelge 4.1). Böylece, fenotipik olarak YİD

(XDR) bulunamazken, üç ÇİD suşumuz ön-YİD (pre-XDR) olarak tanımlandı. Göze çarpan bir diğer bulgu da bu 3 ön-YİD suştan birinin ARB negatif olması, üstelik, bu örneğin Eylül 2013 tarihinden sonra gelmiş olması idi. Ayrıca, birinci gruptaki 34 ÇİD suşa çalışmanın başladığı Eylül 2013 tarihinden itibaren eklenen 10 ÇİD suştan 4'ünün ARB negatif, 6'sının da ARB pozitif olduğu görüldü.

4.2. Multipleks Real-Time PCR Bulgularının Değerlendirilmesi

Suşların direnç durumunun genetik yönden incelenmesi için yeni bir multipleks Real-Time PCR kiti yardımı ile örneklerde hem MTBK varlığı, hem de ÇİD için isoniazid ve rifampicin, YİD için de florokinolonlar ve injektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan muhtemel nokta mutasyonlarının varlığının araştırıldığı çalışmamızda, birinci grubu oluşturan 44 kültür örneğinden Mickle yöntemiyle elde edilen DNA ekstraktlarının tamamında MTBK bulunmuşken, ikinci gruptaki 50 ARB pozitif işlenmiş balgam örneğinden kitteki hazır ekstraksiyon protokolüne göre elde edilen DNA ekstraktlarından 48'inde (% 96.0) MTBK varlığı tespit edildi (Çizelge 4.3).

Aynı kit ile birinci gruptaki kültür örneklerinin 37'sinde (% 84.1) isoniazide, 40'ında (% 90.9) da rifampicin direncinden sorumlu nokta mutasyonu tespit edilmişken, ikinci grupta bu sonuçlar sırasıyla 8 (% 16.0) ve 6 (% 12.0) olarak bulundu. Yine birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinde (% 4.5) florokinolonlara, birinde (% 2.3) de injektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan nokta mutasyonu bulunmuşken, ikinci gruptaki balgam örneklerinin hiçbirinde ikinci seçenek anti-TB ilaç direnci tespit edilemedi. Böylece, Real-Time PCR yöntemi ile ÇİD olarak tanımladığımız örnek sayısı birinci grupta 35 (% 79.5), ikinci grupta da 5 (% 10) iken, YİD açısından değerlendirmenin ise fenotipik yöntemin sonucu ile tamamen uyumlu olduğu görüldü (Çizelge 4.3 ve 4.4).

4.3. Fenotipik İnceleme ve Real-Time PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

ÇİD MTBK pozitif kültür örneklerinden oluşturulan ve moleküler inceleme için kültürden ekstrakte edilen DNA örneklerinin değerlendirildiği birinci grupta multipleks Real-Time PCR ile bütün örneklerde MTBK varlığı tespit edildi. Kültür ortamında izolasyon altın standart kabul edildiğinden, seçtiğimiz moleküler yöntemin duyarlılığı bu grup için % 100 iken, her iki yöntemle de negatif sonuç çıkmadığı için özgüllüğü hesaplanamadı. DNA ekstraksiyonu için doğrudan işlenmiş balgam örneklerinin

kullanıldığı ikinci grupta ise, fenotipik identifikasyon sonucunda TDM tanısı alan tek örnekte moleküler olarakta MTBK varlığı gösterilemezken, kültür negatif olan yine tek örnek Real-Time PCR ile duyarlı MTBK tanısı aldı, kültür pozitif ve tamamen duyarlı örneklerden birinde moleküler olarak MTBK varlığı tespit edilemedi. Böylece, ikinci grup için Real-Time PCR'ın duyarlılığı % 97.9, özgüllüğü de % 50 olarak hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Fenotipik inceleme ve Real-Time PCR sonuçlarının karşılaştırılması ve gruplara dağılımı.

Real-Time PCR	Grup ^a		Fenotipik İncelemeler											
			ARB (Toplam 94 örnek: G1- 44, G2- 50)		MTBK (Toplam 94 örnek: G1- 44, G2- 50)		Antibiyotik Duyarlılık Test (ADT) Sonuçlarına Göre Direnç Durumu ^b							
			Poz Sayı (%)	Neg Sayı (%)	Poz Sayı (%)	Neg Sayı (%)	INH (Toplam 92 suş: G1- 44, G2- 48)		RIF (Toplam 92 suş: G1- 44, G2- 48)		CIP (Toplam 50 ÇİD suş: G1- 44, G2- 6)		AMK (Toplam 50 ÇİD suş: G1- 44, G2- 6)	
							R Sayı (%)	S Sayı (%)	R Sayı (%)	S Sayı (%)	R Sayı (%)	S Sayı (%)	R Sayı (%)	S Sayı (%)
MTBK	G1	Poz	26 (100)	18 (100)	44 (100)	0	44 (100)	0	44 (100)	0	2 (100)	42 (100)	1 (100)	43 (100)
		Neg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2	Poz	48 (96)	0	47 (97.9)	1 (50)	11 (100)	36 (97.3)	6 (100)	41 (97.6)	0	6 (100)	0	6 (100)
		Neg	2 (4)	0	1 (2.1)	1 (50)	0	1 (2.7)	0	1 (2.4)	0	0	0	0
INH	G1	Poz	74 (97.4)	18 (100)	91 (98.9)	1 (50)	55 (100)	36 (97.3)	50 (100)	41 (97.6)	2 (100)	48 (100)	1 (100)	49 (100)
		Neg	2 (2.6)	0	1 (1.1)	1 (50)	0	1 (2.7)	0	1 (2.4)	0	0	0	0
	G2	Poz	20 (76.9)	17 (94.4)	37 (84.1)	0	37 (84.1)	0	37 (84.1)	0	2 (100)	35 (83.3)	1 (100)	36 (83.7)
		S	6 (23.1)	1 (5.6)	7 (15.9)	0	7 (15.9)	0	7 (15.9)	0	0	7 (16.7)	0	7 (16.3)
RIF	G1	Poz	8 (16)	0	8 (16.7)	0	8 (72.7)	0	5 (83.3)	3 (7.1)	0	5 (83.3)	0	5 (83.3)
		S	42 (84)	0	40 (83.3)	2 (100)	3 (27.3)	37 (100)	1 (16.7)	39 (92.9)	0	1 (16.7)	0	1 (16.7)
	G2	Poz	28 (36.8)	17 (94.4)	45 (48.9)	0	45 (81.8)	0	42 (84)	3 (7.1)	2 (100)	40 (83.3)	1 (100)	41 (83.7)
		S	48 (63.2)	1 (5.6)	47 (51.1)	2 (100)	10 (18.2)	37 (100)	8 (16)	39 (92.9)	0	8 (16.7)	0	8 (16.3)
CIP	G1	Poz	22 (84.6)	18 (100)	40 (90.9)	0	40 (90.9)	0	40 (90.9)	0	2 (100)	38 (90.5)	1 (100)	39 (90.7)
		S	4 (15.4)	0	4 (9.1)	0	4 (9.1)	0	4 (9.1)	0	0	4 (9.5)	0	4 (9.3)
	G2	Poz	6 (12)	0	6 (12.5)	0	6 (54.5)	0	6 (100)	0	0	6 (100)	0	6 (100)
		S	44 (88)	0	42 (87.5)	2 (100)	5 (45.5)	37 (100)	0	42 (100)	0	0	0	0
AMK	G1	Poz	28 (36.8)	18 (100)	46 (50)	0	46 (83.6)	0	46 (92)	0	2 (100)	44 (91.7)	1 (100)	45 (91.8)
		S	48 (63.2)	0	46 (50)	2 (100)	9 (16.4)	37 (100)	4 (8)	42 (100)	0	4 (8.3)	0	4 (8.2)
	G2	Poz	1 (3.8)	1 (5.6)	2 (4.5)	0	2 (4.5)	0	2 (4.5)	0	2 (100)	0	0	2 (4.7)
		S	25 (96.2)	17 (94.4)	42 (95.5)	0	42 (95.5)	0	42 (95.5)	0	0	42 (100)	1 (100)	41 (95.3)
FQ	G1	Poz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S	50 (100)	0	48 (100)	2 (100)	11 (100)	37 (100)	6 (100)	42 (100)	0	6 (100)	0	6 (100)
	G2	Poz	1 (1.3)	1 (5.6)	2 (2.2)	0	2 (3.6)	0	2 (4)	0	2 (100)	0	0	2 (4.1)
		S	75 (98.7)	17 (94.4)	90 (97.8)	2 (100)	53 (96.4)	37 (100)	48 (96)	42 (100)	0	48 (100)	1 (100)	47 (95.9)
İnjekt. İlaçlar	G1	Poz	1 (3.8)	0	1 (2.3)	0	1 (2.3)	0	1 (2.3)	0	0	1 (2.4)	1 (100)	0
		S	25 (96.2)	18 (100)	43 (97.7)	0	43 (97.7)	0	43 (97.7)	0	2 (100)	41 (97.6)	0	43 (100)
	G2	Poz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		S	50 (100)	0	48 (100)	2 (100)	11 (100)	37 (100)	6 (100)	42 (100)	0	6 (100)	0	6 (100)
ÇİD	G1	Poz	1 (1.3)	0	1 (1.1)	0	1 (1.8)	0	1 (2)	0	0	1 (2.1)	1 (100)	0
		S	75 (98.7)	18 (100)	91 (98.9)	2 (100)	54 (98.2)	37 (100)	49 (98)	42 (100)	2 (100)	47 (97.9)	0	49 (100)
	G2	Poz	18 (69.2)	17 (94.4)	35 (79.5)	0	35 (79.5)	0	35 (79.5)	0	2 (100)	33 (78.6)	1 (100)	34 (79.1)
		Neg	8 (30.8)	1 (5.6)	9 (20.5)	0	9 (20.5)	0	9 (20.5)	0	0	9 (21.4)	0	9 (20.9)
ÇİD	G1	Poz	5 (10)	0	5 (10.4)	0	5 (45.5)	0	5 (83.3)	0	0	5 (83.3)	0	5 (83.3)
		Neg	45 (90)	0	43 (89.6)	2 (100)	6 (54.5)	37 (100)	1 (16.7)	42 (100)	0	1 (16.7)	0	1 (16.7)
	G2	Poz	23 (30.3)	17 (94.4)	40 (43.5)	0	40 (72.7)	0	40 (80)	0	2 (100)	38 (79.2)	1 (100)	39 (79.6)
		Neg	53 (69.7)	1 (5.6)	52 (56.5)	2 (100)	15 (27.3)	37 (100)	10 (20)	42 (100)	0	10 (20.8)	0	10 (20.4)

^a G1 – Birinci grup; G2 – İkinci grup.

^b R – Dirençli; S – Duyarlı; ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnci tespit etmek için fenotipik ADT'de florokinolonları temsilen ciprofloxacin, injektabl ilaçları temsilen de amikacin kullanıldı. INH - Isoniazid, RIF – Rifampicin, CIP – Ciprofloxacin, AMK – Amikacin, FQ – Florokinolonlar.

Çizelge 4.4. Fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen suşların Real-Time PCR ile ÇİD MTBK açısından değerlendirilmesi ve gruplara dağılımı.

Real-Time PCR Sonucu	Fenotipik İnceleme Sonucu tespit edilen ÇİD MTBK suşlar		
	Grup 1 Sayı (%)	Grup 2 Sayı (%)	Toplam
Pozitif	35 (79.5)	5 (83.3)	40 (80)
Negatif	9 (20.5)	1 (16.7)	10 (20)
Toplam	44	6	50

Gerek birinci gerekse de ikinci grupta moleküler olarak dirençli bulunan örneklerin tamamı fenotipik olarakta dirençli bulundular. Birinci gruptaki 44 ÇİD MTBK suştan 4'ünde rifampicine, 7'sinde de isoniazide karşı dirençten sorumlu tutulan nokta mutasyonları tespit edilemedi. Buna karşılık, ikinci grupta fenotipik olarak ÇİD MTBK tanısı alan 6 örneğin tamamı Real-Time PCR ile rifampicine, 5'i de isoniazide dirençli bulundu (Çizelge 4.3). Diğer taraftan isoniazid direnci ikinci grupta fenotipik olarak 11 örnekte bulunmuşken, moleküler olarak 8 örnekte tespit edildi. Böylece, ADT altın standart olarak kabul edildiğinden, multipleks Real-Time PCR yönteminin isoniazid direnci açısından duyarlılığının ikinci grupta % 72.7, kültür pozitif toplam 92 örnek için ise % 81.8, özgüllüğünün de hem ikinci grup, hem de toplamda % 100 olduğu görüldü. Birinci grupta ne isoniazid, ne de rifampicine duyarlı bir suş olmadığından her iki ilaç açısından özgüllük oranı hesaplanamadı. Kullandığımız moleküler yöntemin rifampicin direnci açısından ikinci gruptaki gerek duyarlılığı gerekse özgüllüğünün % 100, toplamda ise duyarlılığının % 83.6, özgüllüğünün de % 100 olduğu görüldü (Çizelge 4.3). Ayrıca, çalışmanın başladığı Eylül 2013 tarihinden itibaren gelen ve fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen 6 ARB pozitif örneğin birinci grupta kültür ekstraktlarının, ikinci grupta ise balgam ekstraktlarının değerlendirildiği multipleks Real-Time PCR yöntemi sonuçlarının her iki grupta da tamamen uyumlu çıktığı görüldü.

Bunlara ek olarak, birinci gruptaki örneklerden 3'ünün aynı hastaya ait olduğu ve Haziran 2012, Ekim 2012 ve Şubat 2014 olmak üzere farklı tarihlerde alındığı belirlendi. Bunlardan ilkinin ARB(-), ikincisinin ARB(+), üçüncüsünün ise ARB(++) olduğu, ancak kültür ve fenotipik ADT sonucunda her üçünün de isoniazid ve rifampicine dirençli MTBK olarak tespit edilmesine rağmen, kültür ekstraktları ile yapılan Multipleks Real-Time PCR sonucunda üçünde de rifampicine dirençli MTBK tespit edildiği, isoniazid direncinden sorumlu mutasyon ise tespit edilemediği görüldü. Hastanın üçüncü örneği, Eylül 2013 tarihinden sonra geldiği ve ARB pozitif olduğu için

aynı zamanda ikinci grupta da balgam ekstraktı değerlendirildi ve genotipik inceleme sonucunun birinci gruptaki ile aynı olduğu belirlendi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Aynı hastadan farklı tarihlerde alınan üç örneğin fenotipik ve genotipik inceleme sonuçları.

Örnek	Fenotipik İnceleme Sonuçları		Real-Time PCR Sonuçları	
	ARB	Kültür ve ADT	Grup 1	Grup 2
1	(-)	Isoniazid ve Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK	Yok
2	(+)	Isoniazid ve Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK	Yok
3	(++)	Isoniazid ve Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK

5. TARTIŞMA

Mikobakteriler fizyolojik ve metabolik özellikleri sebebi ile üretilmesi zor ve zaman alıcı mikroorganizmalardır. Bu özellikleri, diğer bakterilerden farklı olarak kültür bazlı yöntemlerle yapılan tanı ve bağlı olarak identifikasyon, ilaç duyarlılık ve fenotipe dayalı tiplendirilme yöntemlerinin geri dönüşünü geciktirir ve duyarlılığını düşürür. Son yıllarda artan HIV insidansı ile paralel olarak tüberküloz epidemisindeki en önemli sorunlardan biri ÇİD MTBK suşlarının popülasyondaki artışıdır. Bu global artışın gelecekteki ilaç dirençliliğinin yoğunluğu konusunda endişe yaratması yanında, özellikle immün sistemi zayıflamış kişilerde çevreden doğrudan bulaş yolu ile veya kolonizasyon sonucu ciddi enfeksiyonlara sebep olabilen TDM suşları da, MTBK'dan ayrımındaki zorluklar sebebi ile yanlış tanı ve tedavilere yol açmaktadırlar. Bu sebeplerle etken mikobakteri ve ilaç direncinin olabildiğince hızlı bir şekilde tanımlanması ve takiben etkili bir anti-TB tedaviye başlanması enfeksiyona bağlı mortalitenin önlenmesinde ve enfeksiyon yayılımının azaltılmasında büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde mikobakteriyel identifikasyonda olduğu gibi anti-TB ilaçlara direnç paterninin belirlenmesinde de rutin olarak kullanılan fenotipik yöntemler zor ve zaman alıcıdır^{8,115}. CDC tarafından 2009 yılında, moleküler tanı testlerinin tüberküloz şüphesi olan hastalarda en az bir klinik örnekte yayma sonucu beklenmeksizin kullanılması önerilmiş olsa da, bu kararın yerel ihtiyaçlar ve ilgili resmi finansör sağlık kuruluşlarının görüşleri alınarak verilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Bu sebeple, düşük insidanslı gelişmiş ülkelerde moleküler yöntemler mikobakteriyel identifikasyon ve direnç tespitinde rutin kullanılmakta iken, Ülkemiz de dahil yüksek insidansa sahip olan birçok ülkede rutin mikobakteriyel tanı algoritmasında yer alamamaktadır¹¹⁵.

Kontrol ve engelleme çalışmalarının başarısı için en kritik nokta dirençli suşların toplumdaki hareketlerinin izlenmesi iken, direnç yayılımının engellenmesinde en önemli tehditlerden birisi, çoğu TDM suşunun birinci seçenek anti-TB ilaçlara doğal dirençli olması ve ÇİD/YİD MTBK suşlarının beklenenden daha hızlı yayılmasıdır. Daha önce o ilaç ile hiç karşılaşmamış olan vahşi veya sokak tipi mikobakterilerin duyarlı olduğu standard ilaç konsantrasyonunda üreyebilen basiller o ilaca karşı dirençli basiller olarak kabul edilir. DSÖ'nün tanımlamasına göre, *M. tuberculosis* suşlarında ÇİD; birinci seçenek olarak kullanılan Rifampicin ve Isoniazid ilaçlarının her ikisine

birden dirençli olma durumu, YİD ise; ÇİD’e ek olarak, bir florokinolon grubu antibiyotik (ciprofloksacin, levofloksacin, moxifloksacin ve b.) ile ikinci seçenek anti-TB ilaç olarak kullanılan injektabl ilaçların (amikacin, kanamycin, kapreomycin) bir veya daha fazlasına direncin beraber görülmesi durumudur¹¹⁵.

Toplum içerisinde kontrolsüz yayılım gösteren bu mikroorganizmalara karşı yeni ilaç geliştirmenin zorluklarına karşılık anti-TB ilaçların kullanımına bağlı direnç gelişimindeki artış sebebi ile tedavide yaşanan problemler, ilaç dirençliliği altında yatan sebeplerin araştırılması, koruyucu hekimliği yani “Doğrudan Gözetimli Tedavi” (DGT) ile ilaç kullanımının kontrol altına alınması, yeni etkili aşı geliştirilmesi, mevcut kullanılan ilaçların direnç oranlarıyla birlikte ilerde ne gibi dirençler gelişeceğinin izlenmesi ve epidemiyolojik yöntemlerle mikroorganizmanın toplum içerisindeki yayılma hareketlerinin irdelenerek tedbir alınması gibi yeni stratejilerin geliştirilmesine zorlamıştır^{29,30,104,115}.

Bu bağlamda, bölgemizde izole edilen MTBK suşlarının birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun rutin olarak uygulanan fenotipik testlerle ve Ülkemizde rutin tüberküloz tanı algoritmasında yeri olmayan multiplex Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmesini, ayrıca elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılmasını hedef alan ve birinci grupta fenotipik olarak ÇİD MTBK bulunan 44 kültür örneği, ikinci grupta ise ARB pozitif 50 balgam örneği olmak üzere toplam 94 örneğin değerlendirildiği bu çalışma gerek yöntem gerekse de grup seçimi açısından orijinal bir çalışmadır.

Çalışmamızda, birinci gruptaki ÇİD MTBK bulunan örneklerde pozitiflik oranları ARB için % 59.1, LJ agar besiyeri için % 47.7, BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi için de % 97.7 idi. ARB pozitif işlenmiş balgam örneklerinden oluşturulan ikinci grupta ise pozitiflik oranları LJ için % 32.0, MGIT için de % 94.0 idi. LJ besiyerindeki üreme oranı ikinci grupta çok düşük görülse de, gerek LJ gerekse MGIT için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca, ARB pozitif ve negatif örnekler arasında da LJ pozitifliği açısından fark bulunmadı. Kültür sonrası MTBK identifikasyonu için yapılan NAP ve MPT64 testleri sonucunda yalnız ikinci gruptaki bir örnekte TDM izole edildi, yine aynı gruptaki bir başka örnekte ne LJ, ne de MGIT ile üreme görülmedi. MTBK yönünden kültür negatif olan bu iki örnek fenotipik

olarak ADT’de değ rlendirilemezken, genotipik olarak multipleks Real-Time PCR ile araştırıldı.

Ülkemizde  etin ES ve ark.’nın Isparta şehrinde klinik örneklerden 148’inden konvansiyonel yöntemlerle mikobakteri izole ettikleri bir çalışmada, bu izolatların % 92.6’sını (137/148) MGIT 960 sistemi ile, % 68.2’sini LJ besiyeri ile (101/148), % 31.8’ini (47/148) de yayma  rneğinde EZN boyama ile ARB aranması yöntemiyle pozitif bulmuşlardır. Sonuç olarak MGIT 960 sisteminin klinik örneklerden mikobakteri izolasyonunda LJ kültürüne göre daha başarılı olduğunu gösteren araştırmacılar, bununla birlikte, az sayıda da olsa LJ’de üreme gösteren ancak MGIT 960 ile tespit edilemeyen örneklerin de bulunması sebebiyle klinik örneklerde mikobakteri aranmasında en iyi sonuçların her iki yöntemin birlikte kullanılması ile alınacağını bildirmişlerdir¹¹⁶. Yine  lkemizde yapılan başka bir çalışmada, Börekçi G ve ark. MGIT pozitif 60 klinik örnekten 29 (%48.3)’unun ARB ile, 44 (%73.3)’ünün de LJ kültür yöntemi ile pozitif sonuç verdiğini; moleküler yöntemler olan Oligo- ve PNA-FISH analizleri ile bir  rneğin TDM olarak tiplendirildiğini ve bunun fenotipik olarak doğrulandığını, sonuç olarak da, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında MGIT pozitif kültür örneklerinden mikobakteri türlerinin pahalı yöntemlere gereksinim olmaksızın, hızlı ve doğru tanısı için moleküler Oligo- ve PNA-FISH yöntemlerinin kullanılabileceğini bildirmişlerdir¹¹⁷. Her iki çalışmanın bulgularının çalışmamızla uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun fenotipik incelenmesi için mikobakteriyolojide rutin uygulanan BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde SIRE kiti yardımı ile ikinci gruptaki rifampicine dirençli 6 suşun tamamı isoniazide de dirençli bulundu ve    D olarak tanımlandı. Çalışmamızda    D MTBK suşların ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun fenotipik olarak incelenmesi için, rutin tanıda daha standardize edilmemiş olan, yine de diğer ADT’lere göre daha güvenilir olduğu ülkemizde de yapılan çalışmalarda gösterilmiş olan LJ agarda proporsiyon yöntemi tercih edilmiştir¹¹⁸. Bu yöntemle florokinolon grubunu temsilen ciprofloxacine, i jektabl ilaçları temsilen de amikacin için yapılan ADT sonucunda, birinci gruptaki    D suşlardan ikisinin (% 4.5) yalnız ciprofloxacine, birinin (% 2.3) de yalnız amikacine dirençli olduğu bulunmuş iken, ikinci gruptaki 6    D suşun hiçbirinde direnç tespit edilmedi. Böylece, fenotipik olarak Y  D (XDR) bulunamazken,       D suşumuz

ön-YİD (pre-XDR) olarak tanımlandı. Göze çarpan bir diğer bulgu da bu 3 ön-YİD suştan birinin ARB negatif olması ve daha da önemlisi bu örneğin Eylül 2013 tarihinden sonra gelmiş olması idi. Ayrıca, birinci gruptaki 34 ÇİD suşa çalışmanın başladığı Eylül 2013 tarihinden itibaren eklenen 10 ÇİD suştan 4'ünün ARB negatif, 6'sının da ARB pozitif olduğu görüldü. Bu sonuçlar, ARB negatif balgam örneklerinin de genotipik olarak incelenmesinin, dolayısıyla, CDC'nin de önerdiği gibi, hiperendemik bölgelerde ve/veya şüpheli olgularda ARB sonucu beklenmeksizin en az bir klinik örnekte güvenilir bir moleküler yöntemle erken ve doğru tanı konulmasının ÇİD/YİD MTBK yayılımının önlenmesinde ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ülkemizde ilk YİD-TB vakalarını 2010 yılında bildiren Ceyhan I ve ark.'ları, Türkiye genelinden 5 yıl boyunca toplanan klinik örnekleri fenotipik yöntemlerle inceledikleri bir çalışma sonucunda, 297 ÇİD MTBK suşundan 37'sinde (% 12.5) ön-YİD, 8'inde (%2.7) ise YİD tespit etmişlerdir¹¹⁹.

Suşların direnç durumunun genetik yönden incelenmesi için yeni bir multipleks Real-Time PCR kiti yardımı ile örneklerde hem MTBK varlığı, hem de ÇİD için isoniazid ve rifampicin, YİD için de florokinolonlar ve injektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan muhtemel nokta mutasyonlarının varlığının araştırıldığı çalışmamızda, birinci grubu oluşturan 44 kültür örneğinden Mickle yöntemiyle elde edilen DNA ekstraktlarının tamamında MTBK bulunmuşken, ikinci gruptaki 50 ARB pozitif işlenmiş balgam örneğinden kitteki hazır ekstraksiyon protokolüne göre elde edilen DNA ekstraktlarından 48'inde (% 96.0) MTBK varlığı tespit edildi. Aynı kit ile ÇİD olarak tanımladığımız örnek sayısı birinci grupta 35 (% 79.5), ikinci grupta da 5 (% 10) iken, birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinde (% 4.5) florokinolonlara, birinde (% 2.3) de injektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan nokta mutasyonu bulunmuş, ikinci gruptaki balgam örneklerinin ise hiçbirinde ikinci seçenek anti-TB ilaç direnci tespit edilemedi. Multipleks Real-Time PCR yöntemi ile YİD açısından değerlendirmenin ise fenotipik yöntemin sonucu ile tamamen uyumlu olduğu görüldü. Gikalo MB ve ark., 70 ÇİD MTBK suşunda single-strand conformation polymorphism (SSCP) ve DNA dizi analizi ile *eis promoter* ve *rrs* gen bölgelerindeki nokta mutasyonlarını taradıkları bir çalışmada, genotipik ve fenotipik inceleme bulgularını karşılaştırarak, injektabl ilaç direncinin moleküler yöntemlerle hızlı tespitinde bu gen bölgelerinin uygun ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir¹²⁰. Bizim genotipik incelemede kullandığımız kit

de bu 2 gen bölgesindeki muhtemel mutasyonları tespit etmeye yönelik olsa da, Georghiou SB ve ark. bunların dışında *tlyA* ve *gidB* gen bölgelerindeki muhtemel mutasyonların da enjekte edilmiş ilaç direncinden sorumlu olabileceğinden bahsetmişlerdir¹²¹.

Kültür ortamında izolasyon altın standart kabul edildiğinden, seçtiğimiz moleküler yöntemin duyarlılığı bu grup için % 100 iken, her iki yöntemle de negatif sonuç çıkmadığı için özgüllüğü hesaplanamadı. DNA ekstraksiyonu için doğrudan işlenmiş balgam örneklerinin kullanıldığı ikinci grupta ise, fenotipik identifikasyon sonucunda TDM tanısı alan tek örnekte moleküler olarak da MTBK varlığı gösterilemezken, kültür negatif olan yine tek örnek Real-Time PCR ile duyarlı MTBK tanısı aldı, kültür pozitif ve tamamen duyarlı örneklerden birinde moleküler olarak MTBK varlığı tespit edilemedi. Böylece, ikinci grup için Real-Time PCR'ın duyarlılığı % 97,9, özgüllüğü de % 50 olarak hesaplandı. Fenotipik olarak TDM izole edilen, moleküler olarak da gerek MTBK gerekse aradığımız dirençten sorumlu bir mutasyon tespit edilemeyen bu balgam örneğinde Restriksiyon Enzim Analiz (REA) yöntemi ile tür düzeyinde genotipik identifikasyon için *hsp65* gen bölgesi spesifik TB11 ve TB12 primerleri yardımı ile amfliye edilerek, BstEII ve HaeIII enzimleriyle kesildi ve *M. abscessus* olarak tanımlandı (yayımlanmamış veri).

Her iki grupta genotipik olarak dirençli bulunan örneklerin tamamı fenotipik olarak da dirençli bulundular. Birinci gruptaki 44 ÇİD MTBK suştan 4'ünde rifampicin, 7'sinde de isoniazid direncinden sorumlu nokta mutasyonu tespit edilemedi. Buna karşılık, ikinci grupta fenotipik olarak ÇİD MTBK tanısı alan 6 örneğin tamamı Real-Time PCR ile rifampicine, 5'i de isoniazide dirençli bulundu. Diğer taraftan isoniazid direnci ikinci grupta fenotipik olarak 11 örnekte bulunmuşken, moleküler olarak 8 örnekte tespit edildi. Böylece, ADT altın standart olarak kabul edildiğinden, multipleks Real-Time PCR yönteminin isoniazid direnci açısından duyarlılığının ikinci grupta % 72.7, kültür pozitif toplam 92 örnek için ise % 81.8, özgüllüğünün de hem ikinci grup, hem de toplamda % 100 olduğu görüldü. Birinci grupta ne isoniazid, ne de rifampicine duyarlı bir suş olmadığından her iki ilaç açısından özgüllük oranı hesaplanamadı. Kullandığımız moleküler yöntemin rifampicin direnci açısından ikinci gruptaki duyarlılık ve özgüllüğün % 100, toplamda ise duyarlılığının % 83.6, özgüllüğünün de % 100 olduğu görüldü. Ayrıca, çalışmanın başladığı Eylül 2013 tarihinden itibaren gelen ve fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen 6 ARB pozitif örneğin birinci grupta kültür

ekstraktlarının, ikinci grupta ise balgam ekstraktlarının değerlendirildiği multipleks Real-Time PCR yöntemi sonuçlarının her iki grupta da tamamen uyumlu çıktığı görüldü. Çalışmada kullandığımız kit ile toplam 10 örnekte isoniazid direncinin tespit edilememesi, daha belirlenmemiş olan mutasyonlar, *mabA* ve *ahpC* gibi bilinen farklı gen bölgelerindeki nokta mutasyonları, veya genotipik olarak açıklanamayan direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilebilir. Eski kültür örneklerinde gerek isoniazid, gerekse rifampicin direncinden sorumlu tutulan mutasyonların balgam örneklerine nazaran daha çok gözden kaçırılmasına sebep olarak, eski örneklerin pasajlanmaları sırasında popülasyondaki bazı türlerin, özellikle de dirençli suşların canlandırılmamış olma veya çapraz kontaminasyon ihtimalleri düşünülebilir. CDC tarafından da önerildiği gibi, ÇİD MTBK şüpheli olgularda özellikle rifampicin ve isoniazid direncinin moleküler yöntemlerle tespiti için ilk örneklerin (balgam, BAL ve b.) incelenmesi, erken tanının bilinen yararları ile beraber, bahsedilen muhtemel dezavantajların ortadan kalkmasına da yardımcı olabilir^{104,115,122-125}.

Bunlara ek olarak, birinci gruptaki örneklerden 3'ünün aynı hastaya ait olduğu ve Haziran 2012, Ekim 2012 ve Şubat 2014 olmak üzere farklı tarihlerde alındığı belirlendi. Bunlardan ilkinin ARB(-), ikincisinin ARB(+), üçüncüsünün ise ARB(++) olduğu, ancak kültür ve fenotipik ADT sonucunda her üçünün de isoniazid ve rifampicine dirençli MTBK olarak tespit edilmesine rağmen, kültür ekstraktları ile yapılan Multipleks Real-Time PCR sonucunda üçünde de rifampicine dirençli MTBK tespit edildiği, isoniazid direncinden sorumlu mutasyon ise tespit edilemediği görüldü. Hastanın üçüncü örneği, Eylül 2013 tarihinden sonra geldiği ve ARB pozitif olduğu için aynı zamanda ikinci grupta da balgam ekstraktı değerlendirildi ve genotipik inceleme sonucunun birinci gruptaki ile aynı olduğu belirlendi. Bu bulgular da yine yukarıda bahsedildiği gibi, ARB sonucu beklenmeksizin doğrudan klinik örneğin genotipik yöntemlerle incelenmesinin ne kadar doğru olacağını desteklemektedir.

Birinci gruptaki eski 34 ÇİD MTBK kültür örneğinden birinde fenotipik identifikasyon sonucu MTBK-TDM koinfeksiyonu tespit edilmesi üzerine yeniden pasajlanarak MTBK izole edildi ve çalışmada bu suş kullanıldı. Dolayısıyla, bu suşun fenotipik ADT incelemesi yeniden yapıldı ve pasajı öncesindeki gibi yine streptomycin, isoniazid ve rifampicine dirençli bulundu. Eski örneğin kontamine olma ihtimali de göz önünde bulundurularak, farklı ilaç dirençlerine sahip birden fazla MTBK suşu

barındırabileceği ve pasajlama sırasında bu durumun değişebileceği düşünüldü. Bu sebeple, özellikle de YİD ihtimalini gözden kaçırmamak için, agar proporsiyon yöntemi ile ciprofloksacin ve amikacin duyarlılığı gerek eski örnekte gerekse izole edilen ÇİD MTBK suşunda araştırıldı ve örneklerin ikisinde de ikinci seçenek ilaç direnci tespit edilemedi. Kullandığımız multipleks Real-Time PCR kiti örnekte MTBK varlığını ve MTBK suşlarında ÇİD ve YİD'den sorumlu tutulan nokta mutasyonlarını tespit etmeye yönelik olduğundan, buna karşılık TDM ve mutasyonlarını tespit edemediğinden ötürü, her iki örnek de genotipik olarak incelendi ve ikisinde de ÇİD MTBK tespit edildi, ikinci seçenek ilaç direncinden sorumlu mutasyon ise bulunamadı (yayımlanmamış bulgu). Böylece, fenotipik ve genotipik inceleme sonuçlarının uyumlu olduğu görüldü.

Cox HS ve ark.'ları, tedavi sırasında ortaya çıkan direnç durumunu inceledikleri bir çalışmada, TB teşhisi alan 382 hastadan 62'sinin tedaviye iyi yanıt vermediği ve tekrar test edildiği zaman MTBK pozitif bulunduğunu, tedavi öncesinde ÇİD-TB olmayan hastalardan % 3.5'inde (11/314) tedavi sırasında ÇİD-TB geliştiğini, iyileşmeyen 62 hastadan 19'unda da yeni yada ek ilaç direnci geliştiğini bildirmişlerdir¹²⁶. Farmer P ve Kim JY ise, kar-zarar analizi yaptıkları bir çalışma sonucunda, tek bir ÇİD-TB vakasının önlenmesinin bile Amerika Birleşik Devletleri (ABD) sağlık sistemini 250000 dolarlık maliyetten kurtardığını öngörmüşlerdir¹²⁷. Bütün bunların yanında tanıdaki gecikmeye bağlı geç ve/veya yanlış TB tedavisi uygulamalarının yol açtığı direnç gelişimi, özellikle de YİD MTBK insidansındaki artış da dikkate alındığında, çalışmamızda kullandığımız, MTBK tanısı ve birinci/ikinci seçenek ilaç direnci tespitini tek bir kit ile, DNA ekstraksiyonu da dahil, 4-5 saatte sonuçlandıran multipleks Real-Time PCR yöntemi gibi hızlı, güvenilir, kolay uygulanabilen moleküler yöntemlerin Ülkemizde rutin TB tanı ve direnç tayini algoritmasında yer almasının ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, toplum sağlığı çıkarları ile birlikte değerlendirildiği zaman, bu yöntemlerin beraberinde getireceği ek maliyetin çok önemsiz kalacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bölgemizde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarının birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun rutin olarak uygulanan fenotipik testlerle ve Ülkemizde rutin tüberküloz tanı algoritmasında yeri olmayan multiplex Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmesi, ayrıca elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılması amacı ile planlanan bu çalışma sonunda;

1. Adana ve çevre illerden toplanan ve ÇİD MTBK izole edilen 44 örnekten 26'sının (% 59.1) ARB pozitif bulunduğu, 21'inde (% 47.7) LJ agar besiyerinde, 43'ünde (% 97.7) de BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde üreme olduğu,
2. ARB pozitif ve negatif örnekler arasında kültür ortamında (gerek LJ gerekse MGIT) izolasyon açısından fark bulunmadığı,
3. Multiplex Real-Time PCR kiti ile MTBK varlığı tespit edilemeyen iki ARB pozitif balgam örneğinden birinin fenotipik identifikasyon sonucunda TDM, diğerinin ise duyarlı MTBK tanısı aldığı, yine ARB pozitif balgam örneklerinden kültür ortamında mikobakteri üretilmeyen tek örneğin ise moleküler olarak duyarlı MTBK tanısı aldığı, bundan ötürü, altın standart kabul edilen fenotipik identifikasyon ile karşılaştırıldığında toplam 94 örnek açısından Multiplex Real-Time PCR yönteminin duyarlılığının % 98.9, özgüllüğünün ise % 50.0 olduğu,
4. ÇİD MTBK suşlarımız içerisinde fenotipik ve genotipik olarak YİD bulunmadığı, ancak her iki yöntemle de, ikisi florokinolonlara, biri de injekebl ilaçlara dirençli olmak üzere toplam 3 ön-YİD (pre-XDR) MTBK tespit edildiği,
5. Fenotipik ve genotipik inceleme sonuçlarının çok uyumlu olduğu, özellikle de ÇİD tespitinde fenotipik yöntemlere göre kullandığımız genotipik yöntemin duyarlılığının %80, özgüllüğünün de % 100 olduğu,
6. Kullandığımız multiplex Real-Time PCR yöntemi sonucunda gerek MTBK varlığı gerekse de direnç tespiti için örnek seçimi açısından ARB pozitif işlenmiş balgam örnekleri ile ÇİD MTBK olduğu tespit edilen pozitif kültür örnekleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, MTBK suşlarının bilinen direnç mutasyonlarını tespiti yönelik dizayn edilmiş, hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan, WHO ve CDC tarafından da rutin tanı algoritması içerisinde olması teklif edilen Multiplex Real-Time PCR testi ile, doğrudan işlenmiş balgam örneğinde İD, n-YİD ve YİD MTBK tespitinin ülkemiz için de rasyonel çözüm olabileceği görülmüştür. Mevcut rutin fenotipik incelemeler ile, identifikasyon ve ADT için geçecek süreleri de eklersek, ancak aylar sonra tanısı mümkün olabilen, böylece geç veya yanlış tedavi uygulamalarına yol açabilen, bütün dünyada ölüm oranlarında ciddi artıştan da sorumlu tutulan bu İD/YİD MTBK infeksiyonlarının gözetimi ve yönetiminde giderek artan güç kaybı düşünüldüğünde, birkaç saatte sonuçlanan bu erken ve doğru moleküler tanının beraberinde getireceği ek maliyetin önemsiz kalacağı kanaatindeyiz. Ayrıca, sadece ARB pozitif balgam örneklerinin incelenmesi, çalışmamız sonuçlarında da görüldüğü üzere, ARB negatif İD MTBK suşlarının gözden kaçması ile sonuçlanacağından, gerek bütün klinik örnekleri inceleyebilmek gerekse maliyeti daha da düşürebilmek amacı ile, yine moleküler bir yöntemle MTBK-TDM identifikasyonu yapıldıktan sonra, MTBK tespit edilen örneklerde bu Real-Time PCR kiti ile direnç tespiti uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Djelouadji Z, Raoult D, Drancourt M.** Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infect Dis*, **2011**; 11:641-650.
2. **Kurtoğlu MG, Özdemir M, Keşli R, Özkalp B, Baysal B.** Tüberküloz Şüpheli Hastalardan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolasyon Oranı ve Suşların BACTEC™ NAP ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 Rapid™ Testleri ile Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(2): 266-273.
3. <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/index.html> 19.03 2014 Erişim tarihi: 06.112014.
4. **Olkar A, Koç An, Gültekin A, Atalay Ma, Kılıç H.** Klinik Örneklerden Mikobakteri Türlerinin İzolasyonunda Klasik Tanı Yöntemlerin Karşılaştırılması ve Primer Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi. *Research Report*, **2012**.
5. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. <http://apps.who.int/iris/bitstream/eng.pdf> **2013**.
6. **Çalık S.** Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarına Gönderilen Balgam Örneklerinden İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarının Major ve Minör Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Adana, **2012**.
7. **MMWR:** Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis of the Centers for Diseases Control and Prevention. *MMWR* **1993**; 42: 1-8.
8. **Köksal F.** Mycobacterium tuberculosis'te direnç problemi. I.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya. 12-16 Kasım **2011**; 92-94.
9. **Yu CC, Chang CY, Liu CE, Shih LF.** Drug Resistance Pattern of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex at a Medical Center in Central Taiwan, 2003–2007. *J Microbiol Immunol Infect*. **2010**; 43(4):285–290.
10. **Zhao LL, Xia Q, Lin N, Liu B, Zhao X, Liu Z, Wan K.** Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in China, *Journal of Microbiological Methods* **91**. **2012** 212–214.
11. **Nikiforuk A.** Mahşerin Dört Atlısı. *İletişim Yayıncılık A.Ş.* İstanbul, **2000**; Sayfa: 49-66.
12. **Stead WW.** Epidemiology of the Global Distribution of Tuberculosis. In: Koprowski H, Oldstone MBA. Eds. Microbe Hunters. Then and Now. *Medi- Ed Press*, **1996**; 23: 311- 317
13. **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci, USA* **2002**; 19: 3684-9.
14. **Eren N.** Tüberküloz. *Actuel Medicine*, **1992**; 2:18-20.
15. **Daniel TM.** Captain of Death. The Story of Tuberculosis.. Rochester *University of Rochester Press*, New York, **1997**.
16. **Dormandy T.** A history of Tuberculosis. London and Rio Grande, *The Hambledon Press*, **1999**. Page 1-50.

17. **Zorluer E.** Yöremizde İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarında Direnç Profili. Yüksek lisans tezi, Adana, **2010**.
18. **Dubos R, Dubos, J.** The White Plaque: Tuberculosis, Man and Society. *Rutgers University Press*, London: **1987**.
19. T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara İl Sağlık Müdürlüğü: Tüberküloz El Kitabı. Ankara. **2011**.
20. **Sakula A.** BCG: Who were Calmette and Guérin? *Thorax* **1983**; 38: 806-12.
21. **Bloom BR, Murray CJL.** Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science*, **1992**; 257:1055-64.
22. **Özkara Ş, Kılıçaslan Z.** Türk Toraks Derneği Kitabı. 11. Baskı, İstanbul: AVES Yayıncılık, **2010**.
23. CDC. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide. 2000-2004. *MMWR* **2006**; 55:301-5.
24. Report of the meeting of the WHO Global Task Force on XDR-TB, Geneva, Switzerland. 9-10 October 2006 (WHO/HTM/TB/2007.375).
25. **David HL, Newman CM.** Some observations on the genetics of isoniazid resistance in the tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis* **1971**; 104:508-15.
26. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. <http://apps.who.int/iris/bitstream/eng.pdf> **2013**.
27. <http://thsk.saglik.gov.tr/tuberkuloz-verem-hastaligi> Erişim tarihi: 06.12.2014.
28. **Peterson R.** Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *Karolinska Institutet*, Sweden, **2009**.
29. http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/acsm/EXPAND_TB_advocacybrief.pdf **2014**.
30. Stop TB Partnership and World Health Organization. The Global Plan to Stop TB 2006–2015. Geneva, World Health Organization, **2006**.
31. **Santo AH.** Deaths attributed to multiple causes and involving tuberculosis in the state of Rio de Janeiro Brazil between 1999 and 2001. *J Bras Pneumol*. **2006**; 32(6):544-52.
32. <http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2012/pdf/fullreportcorrectedversion.pdf> 15.03 **2012** Erişim tarihi: 06.17.2014.
33. **Zeytinli Ü.** Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Spoligotyping ve MIRU-VNTR Yöntemiyle Tiplendirilmesi. Uzmanlık tezi, Adana, **2010**.
34. **Johnson R, Strecicher EM, Louw GE, Warren RM, et al.** Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* curr. *Issues Mol. Biol.* **2009**; 8: 97-112.
35. **Günel S.** Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. Doktora tezi. Malatya, **2006**.

36. **Kyung W, Eun J, Go Eun C, Kyung H, Chulhun L. Chang** Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Korea by Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats. *J Korean Med Sci.* **2010**.
37. **Jyoti A, Urvashi S, Tanu R, Jitendra NP.** Characterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of India. *Joun. Micr.* **2009**.
38. **Özkara S, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı, Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, **2003**.
39. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Dairesi Başkanlığı: Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara, **2009**.
40. **Oelemann M, Roland D, Sabine R, Camille L, Stefan N, and Philip S.** Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *Rio de Janeiro, RJ, Brasil.* **2007**.
41. **Köksal F, Yaman A.** Farklı Bir Bakteri Topluluğu: Tüberküloz Basilleri Topluluğu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11 - 12 Haziran **2003**, Samsun
42. **Çakır S.** Tüberküloz Plörezide Serum Ve Plevral Sıvı Örneklerinde Early Secreted Antigenic Target- 6 (Esat-6) ve Culture Filtrate Protein- 10 (Cfp-10) Antijenlerine Spesifik T- Lenfositleri Analizinin Tanısal Değeri. Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, **2009**.
43. **Bozkurt H.** Çok İlaç Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kökenlerinde Artmış İlaç Direncinin Tespiti. Uzmanlık tezi, İzmir, **2009**.
44. **Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Basım, Bornova İzmir: Meta Basım, **2009**.
45. **Kocabaş A.** Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik özellikleri. In: Kocabaş A, ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana: Emel Matbaası, **1991**:47-55.
46. **Yakıcı G.** Çoklu İlaç Dirençli(ÇİD) *Mycobacterium Tuberculosis* İzolatlarının Filogenetik İlişkilendirilmesinde Kullanılan IS6110, MIRUVNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Of Tandem Repeat), Spoligotyping Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, **2013**.
47. **Gençaslan FS.** Kliniğimizde Son Altı Yılda İzlenen Ekstrapulmoner Tüberküloz Olgularının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, **2007**.
48. **Grosset JH.** Bacteriology of Tuberculosis. In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. Tuberculosis. A Comprehensive International Approach. New York: Marcel Dekker Inc, **1989**: 49-73.
49. **Jarlier V, Nikaido H.** Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* **1990**; 172:1418-23.
50. **Jakko van I, Zeaur R, Arnout M, Martin JB, Roxane S, Roland B, and Dick van S.** Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. Centers For Disease Control and Prevention, *Volume 18, Number 4-April* **2012**.
51. **Aydın Fe. Ülger M, Emekdaş G, Aslan G, Günal S.** Mersin İlinde Çiğ Sütlerden *Mycobacterium bovis* ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* **2012**; 46(2): 283-289.
52. **Taylor GM, Stewart GR, Cooke M, et al.** Koch’s bacillus - a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology* **2003**; 149: 3213-20.

53. **Barrera L.** The basics of clinical bacteriology. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. www.TuberculosisTextbook.com. **2007**; 93-112.
54. **Niederweis M.** Mycobacterial porins: new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* **2003**; 49: 1167-77.
55. **Smith I.** Mycobacterium tuberculosis: pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **2003**; 16: 463-96.
56. **Lari N, Rindi L, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C:** Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy, *J Clin Microbiol* **2006**; 44(11):4218-21.
57. **Mignard S, Pichat C, Carret G:** *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France, *Emerg Infect Dis* **2006**; 12(9):1431-3.
58. **Baker MG, Lopez LD, Cannon MC, De Lisle GW, Collins DM:** Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand, *Epidemiol Infect* **2006**; 134(5):1068-73.
59. **Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA:** Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States, *Emerg Infect Dis* **2008**; 14(6):909-16.)
60. **Wayne LG, Kubica GP.** Mycobacteria In: P.H.A.Sneath, (ed), Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.**1986**; 1435-1457.
61. **Kiers A, Klarenbeek A, Mendelts B, Van Soolingen D, Koeter G.** Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2008** Dec;12(12):1469-73.
62. **Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC.** Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. **2010** Aug;16(8):1296-9.
63. **Nicolaas C. Gey van Pittius, Paul D. van Helden, Robin M. Warren.** Characterization of *Mycobacterium orygis* *Emerg Infect Dis*. Oct **2012**; 18(10): 1708–1709.
64. **Clifton E. Barry** Interpreting cell wall ‘virulence factors’ of *Mycobacterium tuberculosis*. **2001**; 237-241.
65. **Babacan F, Över U.** Mikobakterilerin Genel Özellikleri ve *Mycobacterium tuberculosis complex*. Rota S. Tüberküloz dışı mikobakteriler ve *Mycobacterium leprae*. İçindeWilke Topçu, Söyletir G, Doğanay M(ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. **2002**; 1675-1698.
66. **Cengiz AT.** Mycobacteriaceae. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temelve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi; Ankara. **1999**: 419-455.
67. **Dubaniewicz A.** *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis; *Autoimmunity Reviews* 9. **2010**; 419–424.
68. **Noss EH, Pai RK, Sellati TJ,** Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kDalipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, **2001**; 167: 910-918.
69. **Astarie-Dequeker C, J. Nigou, C. Passemar, C. Guilhot.** The role of mycobacterial lipids in host Pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, **2010**; 33-41.

70. **Neyrolles O, Guilhot C.** Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis*, **2011**; 187-195.
71. **Mitchison D.** Mechanisms of the action of drugs in the short-course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc* **1985**; 60: 36-40.
72. **Pablo B, Natalia K, Barun M, Xiao-Ming W, Barry K.** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Using IS *6110*-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *BMC*. **2009**.
73. **Kocabaş A.** Akciğer tüberkülozu. İçinde Willke TA, Söyletir G, Doğanay M, editör. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri **2002**; 538-591.
74. **Vapur M.** Tüberkülozlu Hastaların Çeşitli Parametreler Eşliğinde Değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, İstanbul, **2008**.
75. **Yaman M.** Tüberküloz Patogenezi, Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu, 30 Nisan **1999**, İstanbul, 15-20.
76. **Öztürk R.** Tüberkülozda Doğal Direnç ve Risk Faktörleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11 - 12 Haziran **2003**, Samsun.
77. **Bahar Y.** Sağlık Çalışanları ve Tüberküloz Hastalarında Serum Neopterin Düzeyleri İle Tüberkülin Cilt Testi Arasındaki İlişkinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul, **2007**.
78. **Topcu WA, Söyletir G, Doğanay G, Doğanay M.** İnfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitapevleri **1996**; 404-425.
79. Tüberküloz. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi, Ocak-Şubat-Mart **2001**; Cilt 4 Sayı 1.
80. **Danneberg A.** Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis immunobiology **1994**; 191:463-473.
81. **Iseman M. D.** Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu Çeviri: Nobel Tıp Kitapevleri **2002**; 63-96.
82. **Edwards D, Kirkpatrick C.H.** The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.* **1986**; 134: 1062-1071.
83. **Chan J. Kaufmann.** Immune mechanisms of protection. In: Bloom BR.ed. *Tuberculosis pathogenesis protection and control*. Washington: *ASM Pres*; **1994**; 389-416.
84. **Flesch IEA, Kaufmann SHE:** Activation of tuberculosis makrophage functions by gamma interferon, interleukin-4 on tumor necrosis factor. *Infect Immun* **1990**; 58:2675-2677.
85. **Wahl SM, Mc Cartney, Francis M, Hunt DA, Smith PD, Wahl LM, Kotana IM.** Monocyte interleukin-2 receptor gene expression and interleukin-2 augmentation of microbicidal activity *J immunol* **1987**; 139: 1342-1347.
86. **Hoter W, Goldman CK, Casabo T, Nelson DL, Grene WC Waldman TA.** Expression of functional IL-2 receptors by lipopolysaccharide and Interferon gamma stimulated human monocytes. *J Immunol* **1987**; 138: 2917-2922.
87. **Scott P, Kaufmann SHE.** The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol Today*. **1991**; 12: 346.
88. **Mısırlıgil Z.** Tüberküloz İmmunolojisi. In: Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Kocabaş A.(ed.) Emel Matbaası Adana **1991**; 73-78.

89. **Zhang Y.** The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2005**; 45: 529-564.
90. **Wallace RJ.** Antimycobacterial agents. In: Mandell G, Bennett JE, Dolin R, (Eds.). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* Philadelphia: Churchill Livingstone; **2000**; p. 436-48.
91. **Rattan A, Kalia A, Ahmad N.** Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis* **1998**; 42: 195-207. 1
92. **Ramaswamy S, Musser JM.** Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc Lung Dis* **1998**; 79:3-29.
93. **Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M.** The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* **2001**; 2: 164-8.
94. **Saniç A, Çoban A.** Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı Kitabı. Samsun. **1999**; 23-26.
95. **Flores-Treviño S, Mendoza-Olazarán S, Garza-González E.** Drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico: A systematic review. *Artículo de revisión* July 26, **2013**.
96. http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/acsm/EXPAND_TB_advocacybrief.pdf **2014**.
97. **Çilli A.** Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. **2003**; 163- 170.
98. **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** *Tuberculosis.* **2007**.
99. **Della-Latta P, Weitzman I.** Mycobacteriology. In: Isenberg HD (ed). *Essential Procedures for Clinical Microbiology.* Washington DC: *ASM Press.* **1998**; 169-183.)
100. **Choyke PL, Sostman HD, Curtis AM, et al:** Adult-onset tuberculosis. *Radiology* **1983**; 48:357
101. **Abe C, Hirano K, Tomiyama T.** Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **1999**; 37(11): 3693-7.
102. **Hasegawa N, Miura T, Ishii K, et al.** New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. *J Clin Microbiol* **2002**; 40(3): 908-12.
103. **Marzouk M, Kahla IB, Hannachi N, et al.** Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69(4): 396-9.
104. **Drobniewski F, Rüsch-Gerdes S, Hoffner S.** Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1) Report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol Infect* **2007**; 13: 1144–1156.
105. **Pınar A.** Pcr ve Real-Time Pcr Hakkında Genel Bilgi, Kurs Kitapçığı; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları; **2012**.

106. **Gibson UE, Heid CA, Williams PM.** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **1996**; 6:995- 1001.
107. **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **2000**; 25:169-93.
108. **Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al.** The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* **2006**; 27:95-125.
109. **Van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ.** Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **2003**; 17:1013-34.
110. **Cacherill FR, Uhl JR.** Applications and challenges of Real- Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg; **2001**. p.11.
111. **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **2000**; 25:169-93.)(Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* **1996**; 14:303-8.
112. **Chaplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT.** LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* **1999**; 1:5-8.
113. **Satana D, Çoban AY, Uzun M.** Testing Susceptibility of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* to Second-Line Drugs by Use of Blood Agar. *Journal Of Clinical Microbiology*, Nov. **2010**, p. 4291–4293.
114. **Erer F.O.** Çok İlaça Dirençli Tüberküloz Tedavisindeki Sorunlar. 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu .İzmir.**2004**: 43-51.
115. **Lange C, Abubakar I, Alffenaar JWC, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho ACC, et al.** Management of patients with multidrugresistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*, **2014**; 44:23–63.
116. **Çetin ES, Aynali A, Öztürk Tuba, Özseven AG, Kaya S.** Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonunda Löwenstein-Jensen besiyeri kültürü ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube 960 sisteminin değerlendirilmesi. *S.D.Ü. Tıp Fak Derg*, **2012**; 19(1):12-6.
117. **Börekçi G, Aslan G, Aydın E, Fiandaca MJ, Stender H, Lee NM et al.** BACTEC MGIT™ Pozitif Kültürlerden *Mycobacterium* Türlerinin Oligo-FISH ve PNA-FISH Yöntemleriyle Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*, **2014**; 48(3):385-401.
118. **Aslan G, Direkel Ş, Otağ F, Akdenizli E, Emekdaş G.** Mersin Bölgesinde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Amikasin ve Siprofloksasin Duyarlılığı. *ANKEM Derg*, **2006**; 20(3):164-168.
119. **Ceyhan I, Simsek H, Arslanturk A, Albayrak N, Sezen F and Tarhan G.** Extensively Drug-resistant Tuberculosis Strains in National Tuberculosis Reference Laboratory Between 2005 and 2010, Turkey. *Clin Microbial*, **2014**; 3:1.
120. **Gikalo MB, Nosova EY, Krylova LY and Moroz AM.** The role of eis mutations in the development of kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from the Moscow region. *J Antimicrob Chemother*, **2012**; 67:2107–9.

121. **Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC.** Evaluation of Genetic Mutations Associated with *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Amikacin, Kanamycin and Capreomycin: A Systematic Review. *PLoS ONE*, **2012**; 7(3).
122. **Laurenzo D, Mousa SA.** Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Tropica*, **2011**; 119:5–10.
123. **Rodrigues L, Villellas C, Bailo R, Viveiros M and Aínsa JA.** Role of the Mmr Efflux Pump in Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**; 57(2):751-7.
124. **Folkvardsen DB, Svensson E, Thomsen V, Rasmussen EM, Bang D, Werngren J, et al.** Can Molecular Methods Detect 1% Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*? *J. Clin. Microbiol*, **2013**; 51(5):1596-9.
125. **Migliori GB, Zellweger JP, Abubakar I, Ibraim E, Caminero JA, De Vries G, D'Ambrosio L et al.** European Union standards for tuberculosis care. *Eur Respir J*, **2012**; 39:807–819.
126. **Cox HS, Niemann S, Ismailov G, Doshetov D, Orozco JD, Blok L, Rüsch-Gerdes S, Kebede Y.** Risk of acquired drug resistance during short-course directly observed treatment of tuberculosis in an area with high levels of drug resistance. *Clin Infect Dis*, **2007**; 44(11):1421-7.
127. **Farmer P and Kim JY.** Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: Introducing DOTS-plus. *Brit Med J*, **1998**; 317:671–674.

ÖZGEÇMİŞ

16.02.1989 tarihinde Altındağ'da doğan Emel YARAR; ilk ve orta okulu Recep Birsin Özen ilköğretim okulunda 2004 yılında, liseyi ise Özel Perihan Üçgül Anadolu lisesinde 2007 yılında bitirdi. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2012 yılında mezun oldu.

2012 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.