

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLACA
DİRENÇLİ *Mycobacterium tuberculosis* İZOLATLARININ BİRİNCİ
ve İKİNCİ KUŞAK ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI
DİRENÇ MUTASYONLARININ IN HOUSE PCR YÖNTEMİ ile
KARAKTERİZASYONU ve DİRENÇ PROFİLLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYA ÇAPUK
TİBBİ MİKROBİYOLOJİ

ADYAMAN

2021

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ÇOKLU İLACA
DİRENÇLİ *Mycobacterium tuberculosis* İZOLATLARININ BİRİNCİ
ve İKİNCİ KUŞAK ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI
DİRENÇ MUTASYONLARININ IN HOUSE PCR YÖNTEMİ ile
KARAKTERİZASYONU ve DİRENÇ PROFİLLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Danışman Öğretim Üyesi:
Prof. Dr. Gülnur TARHAN

**Bu tez Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TIPFYL/2018-0002 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ADİYAMAN

2021

TEŞEKKÜR

Bu tezin seçiminde, yürütülmesinde ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardımını ve katkısını esirgemeyen, her zaman bilgisi, tecrübesi ve önerileriyle bana yol gösteren, bilim insanı kişiliğinden etkilendiğim değerli Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız danışman hocam Prof. Dr. Gülnur Tarhan'a,

Mikrobiyoloji eğitimimin sırasında bana katkı sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, birçok konuda desteklerini gördüğüm Adıyaman Eğitim Araştırma Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarı çalışanları Sami Akbulak ve Mehmet Bilgin'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olup benden yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Arzu Tanrıverdi ve Şerihan Kübra Emikoğlu'na,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Çoklu İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Birinci ve İkinci Kuşak Antitüberküloz İlaçlara Karşı Direnç Mutasyonlarının In House PCR Yöntemi ile Karakterizasyonu ve Direnç Profillerinin Karşılaştırılması

Amaç: Çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) önemli bir halk sorunu olarak güncelliğini korumaktadır. Etkenin hızlı tanısı ve direnç durumunun belirlenmesi doğru tedavi protokolünün oluşturulmasında kritik önem taşımaktadır. Bu çalışma solunum yolu örneklerinden izole edilen ve konvansiyonel yöntemler ile ÇİD-MTB saptanan kökenlerde birinci ve ikinci kuşak ilaçlara karşı direnç mutasyonlarının belirlenmesi amacı ile yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamıza Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve gönüllülük esasına göre Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi'nden Dr. İsmail Ceyhan'dan temin edilen 33 adet ÇİD-MTB izolatı dahil edildi. Bu suşların Löwenstein – Jensen besiyerine ekilerek, subkültürü yapıldıktan sonra, DNA izolasyonu kaynatma yöntemine göre yapıldı. DNA izolatları çalışma gününe kadar -40 °C' de bekletildi. İzonyazid, rifampisin, kinolon ve aminoglikozid direncini belirlemek için rpoB, InhA, katG, gyrA, eis ve rrs bölgelerine özgün primer dizileri kullanıldı.

Bulgular: İncelenen 33 ÇİD-TB izolatında in-house PCR yöntemi ile rpoB, InhA, katG, gyrA, eis ve rrs pozitiflik oranı 27 (% 81.8), 31 (% 93.9), 25 (% 75.7), 25 (%75.7), 20 (% 60.6) ve 14 (% 42.4) olarak tespit edildi. Duyarlı izolatlarda direnç mutasyonları tespit edilmedi.

Sonuç: Çalışmadan elde edilen verilere göre konvansiyonel ve moleküler yöntemler ile ÇİD-TB olarak tanımlanan izolatlarda florokinolon direnç mutasyonlarının daha yüksek olduğu, in-house PCR yönteminin hızlı direnç tespitinde yararlı bir yöntem olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: ÇİD-TB, Mutasyon, *Mycobacterium tuberculosis*, ilaç direnci, PCR.

ABSTRACT

The Comparison of Resistance Profiles and Characterization of Resistance Mutations by Molecular Methods of Resistance Mutations Against First-Line and Second-Line Antituberculosis Drugs Of Multiple Drug Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Strains Isolated From Clinical Specimens

Aim: Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) is still an important public problem. Rapid diagnosis of the agent and determination of resistance status are critical in establishing the correct treatment protocol. This study was conducted with the aim of determining resistance mutations against first and second generation drugs in strains isolated from respiratory tract specimens and detected by conventional methods.

Material and method: Adıyaman University Medical Faculty Training and Research Hospital and obtained from Dr. İsmail Ceyhan from Atatürk Chest Diseases and Thoracic Surgery Training and Research Hospital on a voluntary basis 33 MDR-MTB isolates were included in this study. After the subculture of these strains in Löwenstein - Jensen medium, DNA isolation was performed according to the boiling method. DNA isolates were kept at -40 °C until the working day. Primer sequences specific to rpoB, InhA, katG, gyrA, eis and rrs regions were used to determine isoniazid, rifampicin, quinolone and aminoglycoside resistance.

Results: The positivity rate of rpoB, InhA, katG, gyrA, eis and rrs in 33 MDR-TB isolates by in-house PCR method was 27 (81.8 %), 31 (93.9 %), 25 (75.7 %), 25 (75.7 %), 20 (60.6 %) and 14 (42.4 %). Resistance mutations were not detected in susceptible isolates.

Conclusion: According to the data obtained from the study, it was found that fluoroquinolone resistance mutations were higher in isolates defined as MDR-TB by conventional and molecular methods, and in-house PCR method was a useful method for rapid resistance detection.

Key words: MDR-TB, Mutation, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, PCR.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	2
ÖZET	3
ABSTRACT	4
İÇİNDEKİLER.....	5
ŞEKİLLER DİZİNİ	10
TABLolar DİZİNİ.....	11
1 GİRİŞ	12
2 GENEL BİLGİLER	14
2.1 Tarihçe	14
2.2 Epidemiyoloji	16
2.2.1 Dünyada Tüberkülozun Güncel Durumu.....	16
2.2.2 Türkiye’de Tüberküloz	17
2.3 Mikobakterilerin Yapısı ve Bakteriyolojik Özellikleri.....	18
2.4 Mikobakterilerin Sınıflandırılması	20
2.5 Tüberkülozda Bulaş	20
2.6 Tüberküloz Tanı Yöntemleri	22
2.6.1 Örneklerin Alınması ve İşlenmesi	22
2.6.2 Aside Dirençli Boyama (Mikroskopi)	23
2.6.3 Besiyeri ve Kültür	24
2.6.4 Fenotipik Yöntemler	27
2.6.5 Moleküler Yöntemler.....	28
2.7 İlaç Duyarlılık Test Yöntemleri.....	28
2.7.1 Fenotipik Yöntemler	29
2.7.1.1 Klasik Kültür Yöntemleri	29
2.7.1.2 Hızlı Kültür Yöntemleri.....	30
2.7.1.3 Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler	31
2.7.2 Moleküler Yöntemler.....	32

2.7.2.1	DNA Dizi Analizi	33
2.7.2.2	PCR-Line Probe Assay (LİPA).....	34
2.7.2.3	Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism SSCP) Analizi	34
2.7.2.4	GeneXpert MTB/RIF	34
2.7.2.5	Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)	35
2.7.2.6	DNA Microarray	35
2.8	Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	35
2.8.1	Birinci Kuşak Anti-Tüberküloz İlaçlar	36
2.8.2	İkinci kuşak Anti-Tüberküloz İlaçlar.....	39
2.9	Tüberkülozda Direnç	42
2.9.1	Dünya’da Direnç	43
2.9.2	Türkiye’de Direnç	44
2.10	Korunma ve Kontrol	45
3	MATERYAL VE METOT	46
3.1	Kullanılan Cihaz, Gereç ve Solüsyonlar.....	46
3.2	Çalışma Grubu ve Örnekler	47
3.3	İzolatların Canlandırılması	47
3.4	DNA İzolasyonu	48
3.5	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	48
3.6	Agaroz Jel Elektforezi	49
4	BULGULAR.....	51
5	TARTIŞMA	56
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	60
7	KAYNAKLAR	61
8	EKLER.....	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A: Adenin

AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome): Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu

AMS: Açlık Mide Suyu

ARB: Aside Dirençli (Rezistan) Basil

Arg: Arjinin

ATP: Adenozin trifosfat

BAL: Bronkoalveolar Lavaj

BCG: Bacillus Calmette-Guerin

Bç: Baz çifti

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

C:Sitozin

CDC (Central Diseases Control): Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezi

Cfu (colony forming units): Koloni Oluşturan Birim

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute):Klinik ve Laboratuvar Standart Enstitüsü

°C: Santigrat Derece

ÇİD-TB: Çoklu İlaç Dirençli Tüberküloz

DHK: Dekontaminasyon-Homojenizasyon-Konsantrasyon

ddNTP: di-deosinükleotit tri-fosfat

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotit tri-fosfat

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EMB: Etambutol

EMA(European Medicines Agency): Avrupa İlaç Dairesi

EZN: Ehrlich-Ziehl-Neelsen

FDA: Floresein diasetat

G:Guanin

g: Dönme Hızı

GI: Üreme İndeksi (Growth İndeksi)

HIV: Human Immunodeficiency Virus

INH: İzoniazid

İDT: İlaç Duyarlılık Testi

KDBB: Kinolon Direncini Belirleyen Bölge

LAM: lipoarabinomannan (LAM)
LCR: Ligaz Zincir Reaksiyonu
Leu: Lösin
LJ: Löwenstein – Jensen
Lys: Lizin
MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube
MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mM: Milimolar
µg: Mikrogram
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
MTBK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks
NAD: Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NBD: Negatif belirleyicilik değeri
NTM: *Nontuberculous mycobacteria*
OADC: Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz
PANTA: polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B
PAS: Para-aminosalisilik asit
PBD: Pozitif belirleyicilik değeri
PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PCR-SSCP (PCR-single strand confirmation polymorphism analysis): Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi
POA: Pirazinoik asit
PPD (Purified Protein Derivative): Saflaştırılmış Protein Türevi
PVNA: Polimiksin B, Vankomisin, Nalidiksik asit ve Amfoterisin B
PZA: Pirazinamid
RD/ÇİD-TB: Rifampisine Dirençli/Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
RIF: Rifampisin
RNA: Ribonükleik Asit
RRDR: Rifampin Resistance Determining Region
RRTB: Rifampisine Dirençli (Rezistan) Tüberküloz
SDA (Strand Displacement Amplification): İplikcik Yer Değiştirme Amplifikasyonu
SM: Streptomisin
Ser: Serin
TB: Tüberküloz

TBE: Tris Borik asit EDTA

TCH: Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid

TE: Tris-EDTA

Thr: Treonin

TMA: Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon

UV: Ultraviyole

V: Volt

YİD-TB: Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı	19
Şekil 2: Tüberkülozun Şematik Evrimi.....	21
Şekil 3: Otomatize DNA Dizi Analizi Yönteminin Aşamaları.....	33
Şekil 4: Löwenstein – Jensen Besiyerinde Üreme	48
Şekil 5: ÇİD-MTB İzolatlarında PCR Testi ile Direnç Gen Bölgelerinin Elektroforez Görüntüsü	50



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Yıllara Göre TB İnsidans Hızları, 2005-2017	18
Tablo 2: Mikobakterilerde Genel Üretim ve Selektif Besiyerleri	24
Tablo 3: Mycobacterium tuberculosis kompleks Türlerinin Koloni Morfolojileri ve Biyokimyasal Özellikleri.....	28
Tablo 4: Yeni, Önceden Tedavi Görmüş ve Tüm Olgularda ÇİD-TB Oranları, 2005-2017	44
Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Primerler	49
Tablo 6: ÇİD-MTB Suşlarının LJ Besiyerinde İndirek Proporsiyon Yöntemi ile İlaç Duyarlılık Test Sonuçları	51
Tablo 7: Çalışmaya Dâhil Edilen ÇİD-MTB In House PCR Test Sonuçları	52
Tablo 8: ÇİD-MTB Suşlarının LJ Besiyerinde İndirek Proporsiyon Yöntemi ile İlaç Duyarlılık Test Sonuçları	53
Tablo 9: PCR ve Konvansiyonel IDT Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	54
Tablo 10: PCR Yönteminin Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Belirleyicilik Değerleri.....	55

1 GİRİŞ

Tüberküloz (TB) diğer bir adı ile verem tek bir enfeksiyon ajanının yol açtığı ve dünya sağlığını ciddi bir biçimde tehdit eden en önemli ölümcül hastalıklardan biridir. Ülkemizde TB endemik olarak görülse de doğrudan gözetimli tedavi sisteminin (DGTS) tam olarak uygulanamaması, TB kontrol programlarına yeteri kadar bütçe ayrılmaması, hastalar tarafından tedavinin ihmal ve red edilmesi ülkemizde Çok İlaça Dirençli Tüberküloz (ÇİD-TB) oranını ve dolayısıyla da Yaygın İlaça Dirençli Tüberküloz (YİD-TB) görülme riskini arttırmaktadır. Ayrıca Doğu Avrupa ülkeleri, Güneydoğu Asya ülkeleri ve bazı Afrika ülkeleri gibi ÇİD-TB prevelansı yüksek olan ülkelere yapılan seyahat ve göçler nedeniyle artan anti-TB ilaç direnci önemli bir sorun haline gelmiştir (1,2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 yılı Küresel TB Raporu'na göre; 2018 yılında yaklaşık olarak 10 milyon kişinin TB ile enfekte olduğu bildirilmiştir (3).

Bu raporda, yaklaşık yarım milyon yeni rifampisin (RIF) dirençli TB olgusu bulunduğu ve bunların %78'inin ise ÇİD-TB olduğu bildirilmiştir. Türkiye Verem Savaş Derneği 2018 raporunda; izoniazid(INH) ve RIF için ilaç duyarlılık testi (İDT) yapılan 6.028 olgunun 200'ünün (% 3.3) ÇİD-TB olduğu bildirilmiştir (4).

TB tedavi rejiminde ilk olarak birinci kuşak ilaçlar olan INH, RIF, pirazinamid (PZA) ve etambutol (EMB) kullanılır. Ancak ülkemizde birinci kuşak ilaçlara karşı artan direnç oranları nedeniyle anti-TB tedavisinin temelini INH, RIF, PZA ve EMB içeren 2 aylık yoğun bir başlangıç tedavisi oluşturmaktadır. 4 aylık devam fazı için ise INH ve RIF ile tedaviye devam edilmektedir (5). Genellikle kaviter lezyonlar içinde bulunan ve bulaştırmalıktan sorumlu olan TB basili çok hızlı çoğalır ve yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Bu grup için başta INH olmakla birlikte RIF ve streptomisin (SM) de anti-TB ilaç olarak kullanılır. Makrofajlar ve inflamasyonlu bölgeler gibi genellikle asidik ortamlarda bulunan ve metabolik aktivitesi çok yavaş, yarı uyuyan TB basilleri için ise PZA kullanılmaktadır (6).

TB'de ilaç direnci 1990'lı yılların başından bu yana önemli bir sorun haline gelmiştir. Anti-TB ilaç direncinin oluşumundaki nedenler; tedavinin uyumsuzluğu, yetersiz tedavi rejimleri, anti-TB ilaç duyarlılık testlerinin yapılmaması, ilaç temininde sınırlılık veya piyasadan reçetesiz ilaç alımı vb. olarak sayılabilir (7). ÇİD-TB *M.tuberculosis* (MTB)'in günümüzde mevcut en güçlü anti-TB ilaçlardan olan INH ve RIF'a karşı dirençli olması durumudur ve klinik açıdan önemlidir (2). ÇİD-TB olan olgularda birinci kuşak ilaçlara ek olarak ikinci kuşak ilaçların eklenmesi tedavinin uzamasına yol açmaktadır (8).

Tedaviye eklenen ikinci kuşak anti-TB ilaçların gerek daha fazla toksik etkiye sahip olması gerekse daha az etkili olması hastalarda birçok yan etki oluşturmaktadır. Bununla birlikte hasta uyumunu da olumsuz etkilemektedir (9). Yine ikinci kuşak ilaçların maliyetli oluşu hastaların olumsuz etkilenmesine yol açan bir diğer nedendir (10).

MTB’de ilaç direnci, her antibiyotik için farklı sıklıkta olmakla birlikte, birçok mekanizma ile gelişmektedir. Bu mekanizmalar enzim inaktivasyonu, permabilitede azalma, antibiyotik hedefinde değişiklik, artan efluks mekanizmaları ve ön ilaçları aktive eden enzimlerin aktivitesinde azalma şeklinde sıralanabilir (11, 12).

Anti-TB ilaç direncinin önlenbilmesinde direncin hızlı ve doğru olarak saptanması son derece önemlidir (13). Bu nedenle yapılan çalışmalarda hastaya uygun anti-TB tedavi protokolünün belirlenmesi için direnci hızlı ve doğru olarak saptayan nükleik asit tanı testlerinin varlığı önemli bir ihtiyaçtır (14).

Bu çalışma ile konvansiyonel yöntemlerle ÇİD-TB saptanan MTB suşlarında INH, RIF, Kinolon ve Aminoglikozid gibi birinci ve ikinci kuşak anti-TB ilaçlara ait rpoB, InhA, katG, gyrA, eis ve rrs gen bölgelerinin moleküler bir yöntem olan in-house polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

M. tuberculosis kompleks (MTBK) DNA benzerlikleri ve diğer bakteriyolojik özelliklerine göre birbiri ile yakın ilişkili *Mycobacterium* türlerini içeren bir gruptur. Bu grupta *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis M. pinnipedii*, *M. canetti* ve *M. caprae* olup, insanda ve bazı memelilerde kronik nekrotizan bir enfeksiyon hastalığı olan ve geçmiş insanlık tarihi kadar eski olmasına karşın günümüzde hala önemli bir sorun olan TB'a neden olmaktadır (15, 16).

Yıllar boyunca semptomlarından yola çıkarak TB hastalığına tüketim hastalığı anlamında “*Consumption*”, beyaz ölüm, beyaz veba, ölümün kaptanı ve hırıltılı nefes anlamındaki *Phytisis* gibi birçok isim verilmiştir. Yapılan çalışmalar TB'un Doğu Afrika'da Afrika boynuzundan ilk insanların sığırları ehlileştirmeleri ile birlikte ortaya çıktığını ve buradan tüm dünyaya yayıldığını desteklemektedir. M.Ö. 17.000'li yıllara ait bizon kemikleri üzerinde yapılan çalışmalarda MTB varlığı saptanmıştır. Bu durum TB basilinin pleistocene (buzul) dönemde sığırları ve mastadonları da enfekte ettiğinin kanıtıdır (17, 18). Tarih öncesi çağlardan beri bilinen ve insanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan TB hakkında ilk bilgiler MÖ 3000 yılına ait Nil nehri kenarındaki Dra Abu-El Naga isimli kasabada yaşamış olan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kızıdan öğrenilmiştir (19). MÖ 1000 yıllarında yaşamış olan rahip Nesperehan'ın mumyasında Pott hastalığına bağlı vertebral değişiklikler tespit edilmiştir. Günümüzden 2,500 yıl önce Bodrum'un karşısındaki Kos adasında yaşamış olan Hippocrates'in kitabında TB'un daha çok 18-35 yaşlarındaki kişilerde görüldüğü yazılmıştır (17, 18). Ayrıca kısa bir süre önce mumya dokularında mikroskopik olarak tipik TB basilleri saptanmış ve MTB DNA'sı çoğaltılmıştır (19).

Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da zaman zaman çeşitli TB epidemilerine rastlanılmıştır. 18. ve 19. yüzyıllarda Avrupa'nın %70'i TB'a yakalanmış ve enfekte olanların 1/7 si ölmüştür (20). Bu zaman diliminde Avrupa bu dalgalanmaları; nüfus artışı, sosyoekonomik olaylar, çocuk işçi çalıştırma, bağışıklık sistemi, sanayi devrimi ve en önemlisi de yokluk gibi sebeplere dayandırmıştır (21).

Fraccasaro 1546 yılında yazmış olduğu “*De Morbus Contagiosus*” adlı kitabında bakteri hakkında bilimsel bilgi vermemiş olsa da TB'un bulaşıcı bir hastalık olduğunu açıkça belirtmiştir. Padua Üniversitesinden Giovanni B. Morgagni (1682-1771) TB'un bulaşıcı

olduğuna inandığı için hastaları otopsi yapmak istememiştir. Ayrıca Giovanni B. Morgagni TB'un kavite ve skar dokusuna neden olduğunu gösteren ilk hekimdir (22, 23).

1722 yılında TB'a neden olan etkenleri “muhteşem küçük canlılar ” olarak tanımlayan Marten B. bulaşmanın ise etkenlerin hastaların nefesleri ile yayılarak sağlam kişilerin vücuduna girdiğini belirtmiştir. Hastalığın anlaşılmasında 1827 yılında önemli bir adım atılmış olup hastalığın insandan sığırlara, sığırlardan tavşana bulaştırılarak TB'un bulaşıcı bir hastalık olduğu deneysel olarak da kanıtlanmıştır. Koch, TB basilini agar ve patates karışımından oluşan bir besiyerinde üretmiş ve daha sonra bu basilleri Paul Erlich' in geliştirdiği boyayı modifiye edip 24 saatte boyayarak göstermiş daha sonra TB etkeninin aside dirençli basil “ARB” olduğunu kanıtlamıştır. 1930'lu yıllardan sonra TB ile ilgili gelişmeler devam etmiş ve Florence Seibert old tüberkülini saflaştırmayı başararak elde edilen saflaştırılmış protein türevinin (PPD) ile enfeksiyonun olup olmadığı tespit etmiştir. Fransız asıllı Calmette ve Guerin adlı iki bilim insanının uzun süren çalışmalar sonucunda 1921 yılında Fransa'da ilk TB aşısını yani Bacillus Calmette-Guerin (BCG)'i geliştirmesi devrim niteliği taşımış ve bu aşı İkinci Dünya Savaşı sonrasında tüm dünyada yaygın olarak kullanılmıştır (24-27).

19. yüzyılın sonlarına doğru Osmanlı İmparatorluğunda da TB salgını büyük bir halk sağlığı sorunu olmuştur. Balkan Savaşları ve 1. Dünya Savaşı sonrası büyük yoksulluk çeken Anadolu halkı bu salgına dayanamamış ve 1940'lı yılların sonuna doğru en yüksek düzeyde seyreden hastalık yine bu yıllarda ölümlerin en başlıca sebebi olarak yerini almıştır (25).

1944 yılında ABD'de ilk anti-TB ilaç olan SM'nin keşfi ve daha sonra İsveç'te para amino salisik asit (PAS)'ın bulunması ile TB tarihinde yeni bir dönem başlamıştır. TB'un bu ilaçlarla tedavi edilmesinden kısa bir süre sonra direnç gelişmiş bu da bilim insanlarını yeni ilaçlar bulmaya zorlamıştır. 1951 yılında INH'ın keşfi ile sonraki yıllarda kombine tedavi protokolü uygulanmış ve TB 18-24 ayda tedavi edilebilir bir hastalık olmuştur. INH'ın keşfini PZA (1952), sikloserin (1952), etionamid (1956), RIF (1957), ve EMB'un (1962) keşfi izlemiştir (28).

Yaşanan bu gelişmelerden sonra TB ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve endüstrileşmiş ölkelerde başlatılan TB'la mücadele programları sayesinde hastalığın yayılması ve hastalığa bağlı ölümlerin büyük çoğunluğu azalmıştır. Aynı yıllarda ölkemizde de TB ile etkin mücadele başlatılmış ve 1960 yılında çıkarılan bir yasa ile Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur (25).

1970'li yıllarda gelişmiş ölkelerde yapılan çalışmalar sonucunda duyarlı suşların azalması ve direnç gelişiminin durmasıyla birlikte TB kontrol programlarında gevşemeler

yaşanmıştır. Yine bu ülkelerde, ilaçların hatalı reçete edilmesi ve reçetesiz ilaç kullanımı, kontrolsüz göçler, AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) hasta uyumsuzluğuna bağlı kromozomal mutasyonların birikimi ÇİD-TB suşlarının klonal yayılımı neden olmuştur (29, 30).

2.2 Epidemiyoloji

2.2.1 Dünyada Tüberkülozun Güncel Durumu

Dünyada TB tek bir enfeksiyon ajanının yol açtığı en önemli ölümcül hastalıklardan biridir ve her yıl milyonlarca insan TB hastalığına yakalanmaya devam etmektedir. DSÖ'nün yayımlanan son raporuna göre; 2018 yılında küresel olarak yaklaşık 10 milyon kişi TB hastalığına yakalanmıştır. Salgın hastalıkların şiddeti ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. 2018 yılında gelir seviyesi en yüksek olan ülkelerde her 100.000 nüfus için 5'ten az, yüksek TB yüküne sahip olan 30 ülkede 150-400, Mozambik, Filipinler ve Güney Afrika'nın da içinde bulunduğu bazı ülkelerde 500'ün üzerinde yeni olguya rastlanmıştır. Küresel olarak ortalama olgu sayısı ise 100.000 kişide 130 olarak tespit edilmiştir (3).

2000 yılında HIV (-) olup TB'dan ölenlerin sayısı 1,7 milyon iken, 2018 yılında bu sayı azalarak 1,2 milyon olmuştur. Yine aynı şekilde 2000 yılında HIV (+) olan ve TB'dan ölen kişi sayısı 610.000 iken 2018 yılında bu sayı 251.000 olarak tespit edilmiştir.

TB olguları cinsiyet ayırt etmeksizin bütün ülkelerde ve bütün yaş gruplarında görülmekle birlikte genel olarak yetişkin erkeklerde (>15) görülmüştür. 2018 yılındaki hastaların % 57'si erkektir. Bu oran kadınlarda % 32, 15 yaş altı çocuklarda ise % 11 olarak tespit edilmiştir. Tüm hastalarda HIV(+) oranı ise % 8,6'dır. Coğrafik olarak 2018'deki TB olgularının çoğu Güneydoğu Asya (% 44), Afrika (% 24), Batı Pasifik (% 18), Doğu Akdeniz (% 8), Amerika (% 3) ve Avrupa'da (% 3) görülmüştür (3).

Küresel toplamın 2/3'ünü Hindistan başta olmak üzere Çin, Endonezya Filipinler, Pakistan, Nijerya, Bangladeş ve Güney Afrika oluşturmaktadır. Bu ülkelerle birlikte 22 ülke daha DSÖ'nün listesinin ilk 30 sırasında görülmekte olup bu vakalar dünyadaki vakaların % 87'sini oluşturmaktadır (3).

Anti-TB ilaçların 1940'lı yıllarda kullanıma girmesi ile alınan olumlu sonuçlar sonucunda hastalığın eradike edilebileceği düşünülmüştür. Ancak birçok mikroorganizmada olduğu gibi MTB'nin de sonraki yıllarda ilaca karşı direnç geliştirdiği görülmüştür (31).

Tek ilaca dirençli TB’da anti-TB ilaçlardan yalnızca birine karşı direnç oluşması söz konusudur. Genellikle bu ilaç INH ya da SM’dir. ÇİD-TB’de ise birinci kuşak anti-TB ilaçlardan INH ve RIF’a karşı oluşan dirençtir (1).

İlaça dirençli TB halk sağlığı tehdidi olmaya devam etmektedir. 2018 yılında yaklaşık yarım milyon yeni RIF dirençli TB olgusu saptanmıştır. Bunların % 78’i ise ÇİD-TB’dir. ÇİD-TB’de küresel yükün en büyük payına sahip 3 ülke; Hindistan (% 27), Çin (% 14) ve Rusya Federasyonu (% 9) olmuştur. Küresel olarak yeni TB olgularının %3.4’ünde ve daha önce tedavi edilmiş olguların % 18’inde çok ilaca dirençli TB veya RIF dirençli TB (MDR/RRTB) vardır (3).

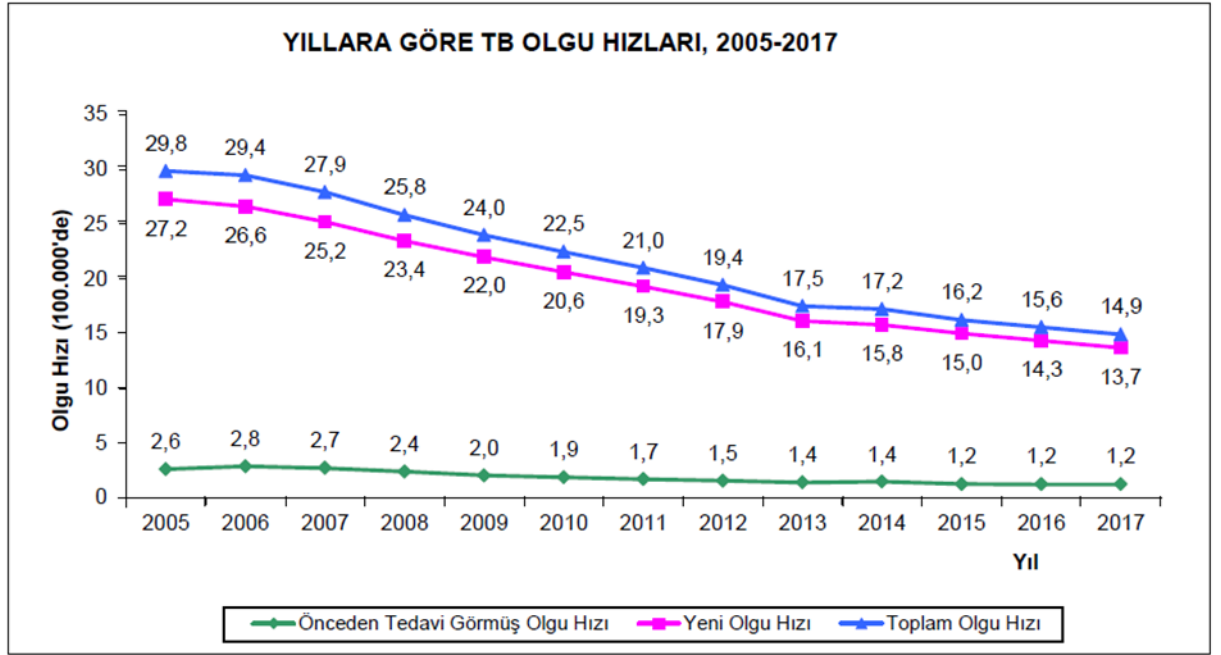
2.2.2 Türkiye’de Tüberküloz

Türkiyede veremle mücadele Osmanlı ve Cumhuriyet dönemlerinde devlet ve sivil toplum kuruluşları olan Verem Savaş Derneklerinin işbirliği ile yürütülmüştür. Türkiyede verem savaşından bahsedildiğinde ilk akla gelen kişi Dr. Besim Ömer Paşa’dır. 8 Haziran 1918’de İstanbul’da kurulan ve veremle savaşın ilk örgütlü kurumu olan Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti’nin kurucularından olup, ilk başkanıdır (16).

2017 yılında verem savaşı dispanserleri kayıtlarına toplam 12.046 TB hastası girmiştir. Toplam olgu hızı % 4.2 düşüş göstererek yüz binde 15.6’dan yüz binde 14.9’a gerilemiştir. Hastaların 6.953’ü (% 57.7) erkek, 5.093’ü (% 42.3) kadındır. Olgu hızı erkeklerde yüz binde 17.2 ve kadınlarda yüz binde 12,6’dır. Olgu hızının yaş gruplarına dağılımı incelendiğinde, 15-24 yaş grubundan başlayarak yükseldiği, 65 ve üzeri yaşlarda en yüksek düzeye (yüz binde 33.3) ulaştığı görülmektedir. Toplam 12.046 hastada yeni olguların oranı % 92.2 (11.101) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı % 7.8’dir (945). Önceden tedavi görmüş olguların toplam hasta içindeki oranları; % 6.0 (720) nüks, % 1.4 (168) tedaviyi terkten dönen, % 0.4 (53) tedavi başarısızlığından gelen ve % 0.03 (4) kronik olgudur. Hastaların % 60.9’u (7.332) akciğer tutulumu, % 33.9’u (4.078) akciğer dışı organ tutulumu, % 5.3’ü (636) hem akciğer hem de akciğer dışı tutulum göstermiştir. Akciğer dışı TB tespit edilen toplam 4.714 hastanın (4.078+636) % 42.7’si (2.013) erkek, % 57.3’ü (2.701) kadındır. Akciğer dışı organ TB’u olgularında en sık ekstratorasik lenf bezleri (% 28.5) ve plevra (%23.4) tutulumu olduğu tespit edilmiştir. 2017 yılında akciğer TB’u olan 7.968 hastada yapılan bakteriyolojik tetkikler incelendiğinde; mikroskopi yapılma oranı % 93.2 (7.428), mikroskopi yapılanlar içinde mikroskopi pozitiflik oranı % 57.3 (4.568); kültür yapılma oranı % 87.2 (6.948), kültür yapılanlar içinde kültür pozitiflik oranı % 81.0 (5.630); kültür pozitif olgularda ilaç duyarlılık testi yapılma oranı ise % 96.6 (5.438) bulunmuştur. İlaç duyarlılık testi yapılan toplam 5.891

hastanın sonuçları incelendiğinde; % 20.1’inde (1.187/5.891) en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranda direncin % 12.5 ile (734/5.891) izoniyazide karşı geliştiği görülmüştür. INH ve RIF için (her ikisine) ilaç duyarlılık testi yapılan 5.891 olgunun 191’inin (% 3.2) ÇİD- TB olduğu tespit edilmiştir. İDT yapılanlarda ÇİD-TB oranı yeni olgularda % 2.4 iken (128 olgu), önceden tedavi görmüş olgularda % 11.3 (63 olgu) olarak saptanmıştır. ÇİD-TB olgularından 2’si YİD-TB’dir (1 yeni olgu, 1 nüks olgu) (4).

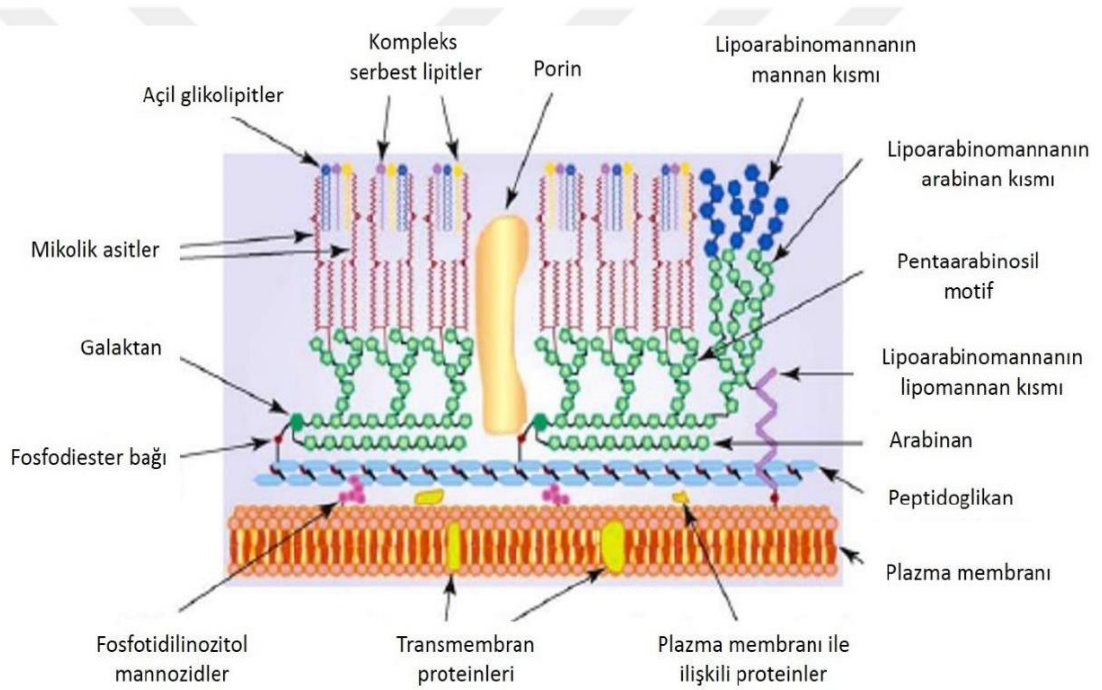
Tablo 1: Yıllara Göre TB İnsidans Hızları, 2005-2017(4)



2.3 Mikobakterilerin Yapısı ve Bakteriyolojik Özellikleri

Mikobakteriler 0,3-0,6 µm eninde 1-14 µm boyunda, aerop, kapsülsüz, sporsuz, bazen hafif kıvrık bazen de düz şekilde bulunan çomaklardır. Yavaş üreyen mikobakterilerin ikiye bölünme süresi 18-24 saattir. Kolonilerin katı besiyerinde gözle görülür hale gelmesi hızlı üreyenlerde 7 günden az, yavaş üreyenlerde 7 günden fazla olup klinik örneklerden primer kültürde üreme süresi 8 hafta kadar sürebilmektedir. Mikobakterilerin üremesi için gereken optimum pH 6,5- 6,8 ve CO₂ oranı % 5-10’dur. Üreme ortamı için uygun sıcaklık genellikle 37 °C olup türler arası 30 °C- 45 °C arasında değişmektedir. Mikobakteriler canlılıklarını +4°C’de haftalarca, -70°C’de aylarca koruyabilen son derece dayanıklı canlılardır. Mikobakterilerde koloni morfolojisi S (smooth) ya da R (rough) pigmentli veya pigmentsiz olarak değişiklik göstermektedir. Bazı türler hem ışıktaki hem karanlıkta pigment (skotokromojen) oluşturabilirken bazı türler sadece ışıktaki pigment (fotokromojen) oluştururlar (32-36).

Hücre duvarları lipid içeriği bakımından zengin olan mikobakteriler alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterirler. Mikobakteriler fenol içinde çözdürülen bazik fuksinin yoğun eriyikleri ile boyandıklarında, boya hücre duvarına nüfuz eder ve aldıkları boyayı % 3'lük asit alkolle renksizleştirme işlemine rağmen bırakmazlar. Çünkü boya lipid tabakanın altına geçmiştir ve lipid asit-alkole dirençli olduğundan içerideki boyaya ulaşamaz (35). Bu özelliklerinden dolayı bu bakteriler aside dirençli bakteriler (ARB) olarak da adlandırılırlar. EZN veya Kinyoun boyama yönteminde asit-alkol ile renksizleştirme işleminden sonra metilen mavisi zeminin boyanabilmesi için zıt boya olarak kullanılır. Sonuç olarak mikroskopik incelemede TB basilleri mavi zeminde kırmızı çomakçıklar şeklinde görülürler. Tek tek, küçük zincir veya birleşik demetler halinde görüntülere sahip olabildiği gibi bazı klinik örneklerde X, V, L harfleri oluşturacak biçimde de bulunabilirler (37).



Şekil 1: Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı (38)

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı, gram pozitif veya gram negatif bakterilerin hücre duvarlarından oldukça farklı kompleks bir yapı göstermektedir. Yapılan biyokimyasal çalışmalar mikobakteri hücre duvar iskeletinin 3 makromolekülden oluştuğunu ortaya koymuştur. Bu kompleks yapının sahip olduğu en iç tabaka plazma membranıdır. Peptidoglikan, arabinogalaktan, oligogosakkarit içeren lipidler, mikolik asitler orta tabakanın kor kısmını oluşturur. Bakteriye şeklini veren, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandıran peptidoglikan yapı ise hücre duvarının en dış kısmında bulunmaktadır. Mikobakteriler dışında benzer kor yapısına sahip canlılar Corynebacterium ve Nocardia'dır. Hücre duvarı mikolik

asitler dışında çok sayıda polar ya da apolar yapıda nonkovalent bağlı lipit ve glikolipitler içermektedir ve hücre duvar ağırlığının % 60'nı oluşturmaktadır. Ökaryotik hücrelerde bu lipidler ve glikolipitlerin sayıca fazlalığı ve asimetrik dizilişleri hücre duvar yapısına aşırı derecede hidrofobisite kazandırmaktadır (35, 36).

2.4 Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Mycobacterium cinsi (genus), Eubacteria üst aleminin (superregnum), Firmicutes bölümünün (divisio), Actinomycetes sınıfının (classis), Mycobacteria takımından (ordo), Mycobacteriaceae ailesine (familia) dahil olup bu ailedeki tek cinstir (35).

DNA'larındaki yüksek G+C içeriği (% 61-71) bakımından diğer mikolik asit üreten *Nocardia* (% 64-72), *Rhodococcus* (% 63-73) ve *Corynebacterium* (% 51-59) cinsleri ile benzerlik gösterirler. Doğada yaygın olarak bulunan mikobakterilerin ilk insanların sığırları evcilleştirmesiyle bulaştığı bildirilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium ulcerans* ve *Mycobacterium bovis BCG*'nin yüksek düzeyde DNA benzerlikleri yönüyle birbiriyle yakından ilişkili türler 'kompleks' başlığı altında gruplandırılır ve tanımlanırlar. MTB dışında kalan mikobakteriler, atipik mikobakteriler, veya NTM (nontuberculous mycobacteria) olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda AIDS'in ortaya çıkması MTBC dışı mikobakterilerin klinik öneminin anlaşılmasına ve bu türler üzerinde ilginin yoğunlaşmasına neden olmuştur (39, 40).

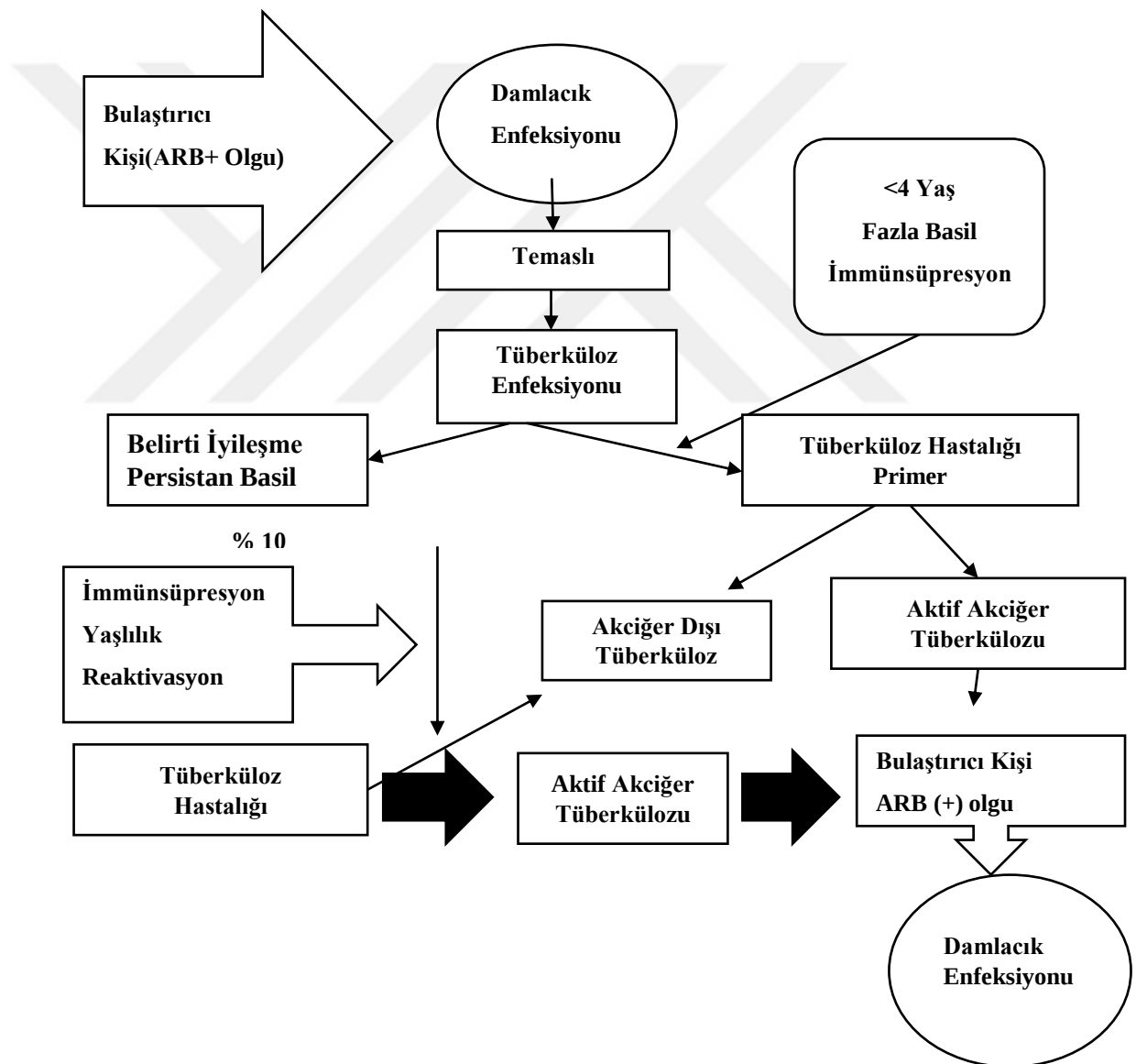
2.5 Tüberkülozda Bulaş

TB'un asıl bulaş şekli inhalasyon yolu olsa da nadiren deri yolu ile bulaş da söz konusudur. Hastaların öksürmesiyle, hapşırmasıyla ve konuşmasıyla havaya bol miktarda basil yüklü akciğer sekresyonları damlacık şeklinde yayılır. Parçalanan damlacıkların içindeki sıvının buharlaşması sonucu damlacık çekirdekleri adı verilen daha küçük parçacıklar oluşur. 1-3 arası basil içeren ve 1-5 µm büyüklüğünde olan bu parçacıklar havada saatlerce asılı kalabilmektedir. Hava yolu ile bulaş bu parçacıkların sağlıklı kişiler tarafından solunması ve parçacıkların alveollere ulaşarak enfeksiyon oluşturmalarıdır (41, 42).

Organizma içerisine yerleşen damlacık çekirdeklerinde bulunan basiller senelerce dormant (inaktif durumunda) kalabilir. Bu dönemde "latent" bir TB enfeksiyonu söz konusu olmakla birlikte hastalığa ait herhangi bir semptom bulunmamaktadır. Bu durum ise tüberkülin deri testi veya T hücre yanıtının in vitro olarak ölçülmesiyle saptanabilir. Kişide bulaştırıcılık olmazken basille enfekte kişilerin yaşamları boyunca aktif TB'a yakalanma olasılığı % 10'dur.

Bulaştan sonraki ilk iki yıl içerisinde hastalığa yakalanma olasılığı daha fazladır ve herhangi bir nedenden dolayı immünitenin baskılandığı durumlarda hastalık gelişebilir (43).

Sağlıklı kişilerde enfeksiyon oluşması ise kişinin akciğerlerine girmiş olan basilin virülans etkisine ve bu basili fagosite eden makrofajların mikrobisidal etkisine bağlıdır. Basil vücudun savunma sistemine karşı başarılı olduğu takdirde makrofajların içinde ortalama 25-32 saatte bir bölünerek çoğalır. Basil yavaş çoğaldığı ve bilinen bir ekzotoksin ve endotoksini olmadığından konakçı cevabı hemen oluşmaz. Bunun sonucu olarak basil yeterli hücrel immun cevap oluşana kadar çoğalır ve basiller kazeöz dokular içerisinde diğer odaklara ulaşır (44).



Şekil 2: Tüberkülozun Şematik Evrimi (45)

2.6 Tüberküloz Tanı Yöntemleri

TB tanısı balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi solunum yolu örneklerinde veya idrar, kan, steril vücut sıvıları (plevra, periton, perikard, eklem vb.), BOS gibi vücut sıvılarında ARB basıl tespit edilerek konur. Son yıllarda yeni moleküler tanı yöntemleri gelişmeye devam etse de mikobakterilerin tanısında, mikroskopi (ARB) ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kültür "altın standart" olarak önemini korumaktadır (46).

2.6.1 Örneklerin Alınması ve İşlenmesi

TB çeşitli organ ve sistemleri etkileyebilen sistemik bir enfeksiyon hastalığı olduğundan dolayı tanı koymak için laboratuvara gönderilecek örnek çeşidi, hastalığın etkilediği organ dikkate alınarak seçilmelidir (47). Bu hastalığın tanısının konmasında akciğer veya akciğer dışı olmak üzere ve floralı veya steril alanlardan farklı tipte örneklerden faydalanılmaktadır (48). Akciğer TB'ü şüphesinde balgam basıl saptama oranı yüksek olduğundan dolayı tercih edilen ilk ve en önemli örnektir. Hastalardan 3 gün arka arkaya sabah alınan örneklerde basıl aranır. Hastaların balgam çıkaramadığı durumlarda ise indüklenmiş balgam, BAL, endotrakeal aspirat, çocuklarda ve indüklenmiş balgam çıkaramayan hastalarda açlık mide suyu (AMS) gibi örnekler de tanı koymada kullanılabilir. Üriner sistem TB'unda en az üç gün üst üste orta akım idrarları kullanılır. Yine etkilenen organ ve sistemler göz önüne alınarak BOS, periton, plevra, eklem ve kemik iliği aspirasyonları, doku biyopsi örneği, kan ve dışkı gibi steril ve steril olmayan örnekler de işlenmek amacıyla alınabilir. Bu örnekler TB'a neden olan mikobakterilerin yanı sıra florada bulunan çok sayıda diğer mikroorganizmaları da içermektedir. Buna bağlı olarak alınan örneklerden kültüre ekim yapıldığı takdirde mikobakterilerin ortalama üreme süreleri 15-20 gün olduğundan daha hızlı üreyen flora bakterileri besiyerinin yüzeyini örterek mikobakterilerin üremesini ve görünmesini engellemektedir (49). Ayrıca mikroskopide diğer bakterilerin varlığı ve basıl azlığı nedeniyle tanı koymak zorlaşmaktadır. Bu nedenle, kültür yapılmadan önce kontamine olan örneklerin içerisindeki bakterileri ortadan kaldırmak ve örneklerde bulunan mukoz-epitel arasına gizlenmiş basilleri ortaya çıkarmak ve basillerin örnek içinde homojen dağılmasını sağlamak için dekontaminasyon-homojenizasyon-konsantrasyon (DHK) işlemleri yapılmaktadır (50-52).

Örneklerin işlenmesinde kullanılan başlıca DHK yöntemler aşağıda verilmiştir.

- NALC-NaOH yöntemi
- NaOH (Petroff) yöntemi
- Oksalik asit yöntemi
- Zefiran-trisodyum fosfat yöntemi
- Cetilpiridinyum klorid-sodyum klorid yöntemi
- Sülfürik asit yöntemi

Dekontaminasyon işlemi uzatıldığında mikobakteriler zarar göreceğinden ölü basil sayısı artacaktır. Bu nedenle dekontaminasyon-homojenizasyon için bu süre 15 dakikadan fazla olmamalıdır. İşlemler esnasında kullanılan kimyasal maddeler nedeni ile asidik ya da alkali hale gelen örnekler fosfat tamponu ile nötralize edilerek pH 6,8'e ayarlanır. Klinik örnekteki mikobakterilerin üremesini ve izolasyonunu arttırmak amacıyla 3000 g'de 15 dakika süreyle santrifüjleme işlemi yapılmaktadır (53, 54).

2.6.2 Aside Dirençli Boyama (Mikroskopi)

TB basilinin mikroskopi ile saptanması TB hastalığının tanısını koymada en ucuz, en hızlı ve çok pratik bir yöntemdir. MTB'un bölünme süresi ortalama 18 saattir. Kültürü yapıldıktan sonra izole edilerek tanı konması yaklaşık 6-8 hafta sürmektedir. Bu nedenle mikroskopi tanı günümüze kadar önemini korumuştur. Hastalardan alınan örneklerden hazırlanan prepatlarda farklı boyama yöntemleri kullanıldıktan sonra mikroskop ile değerlendirilip tanı konulmaktadır (47). Mikobakterilerin mikroskopik tanısında kullanılan boyama yöntemleri;

- Karbolfuksin yöntemleri
- Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)
- Kinyoun
- Florokrom (floresan) yöntemleri (Auramin O, auramin-rhodamin)

EZN en yaygın kullanılan boyama yöntemidir. EZN ve Kinyoun yöntemlerinde birinci boya olarak karbolfuksin, zıt boya olarak da metilen mavisi kullanılır. Asit-alkol dekolorizasyonuna rağmen karbolfuksin boyalarla boyanan basiller aldıkları karbolfuksini bırakmazlar. Bu nedenle aside dirençli hücreler mavi zeminde pembe-kırmızı renkte görünürler. Florokrom boyamada hazırlanan preparatlar floresan izotiyosiyanat filtreli mavi ışıktaki, koyu zemin üzerinde parlak sarı veya turuncu-kırmızı basiller şeklinde görülür.

Karbolfuksinle boyanmış preparatlara göre daha hızlı taranmasını sağlayan florokrom boyalar da tanıda kullanılmaktadır. Florokrom boyamada küçük objektiflerle büyük alanlar taranması avantajıyla hasta sayısı fazla olan laboratuvarlarda kullanılması önerilmektedir. Klinik örneklerden teksif işlemi ile preparatlar hazırlanırken personel ve çevre güvenliği açısından kesinlikle biyogüvenlik kabin içerisinde çalışılmalıdır. Preparatlar boyandıktan sonra korunaklı bir bölgede kurutulmalı basilin tespit işleminden sonra da canlı kalabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (48-50).

2.6.3 Besiyeri ve Kültür

Kültür yöntemleri basillerin üretilmesi, tanımlanması ve ilaç duyarlılık testleri gibi çeşitli özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır. TB'un kesin tanısının konulmasında kültür "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Mikobakterilerin üremesi için özel şartlar gerektiğinden genel üretim besiyerlerinde üremezler bu nedenle de özgün besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. TB'un tanısında kullanılacak kültür yöntemleri temel olarak katı besiyerleri ve sıvı besiyerleri olmak üzere iki tiptir. Katı özellikteki besiyerleri bütün yumurta veya yumurta sarısı içeren yumurta bazlı besiyerleri ve agar bazlı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılır. Basilin kolay üremesi ve koloni şeklinin korunması bakımından LJ besiyeri tanıda en sık kullanılan yumurta bazlı besiyeridir. Petraghani ve American Trudeau Society Medium gibi besiyerleri de tercih edilen diğer yumurta bazlı besiyerleridir. Middlebrook 7H10 ve Middlebrook H11 ise agar bazlı besiyerlerine örnektir (Tablo 2). Ayrıca MTBK'nın üretilmesi için serum ve sığır albümini ile zenginleştirilmiş sıvı besiyerleri kullanılır. Malaşit yeşili gibi inhibitörler veya çeşitli antibiyotikler kontamine mikroorganizmaların üremesine engellemek amacıyla besiyerlerine eklenebilir (55, 56).

Tablo 2: Mikobakterilerde Genel Üretim ve Selektif Besiyerleri (57)

Besiyeri	Bileşenleri	İnhibitör Ajanlar
Löwenstein-Jensen	Tam yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu	0,025gr/100ml Malaşit yeşili
Petragnani	Tam yumurta, yumurta sarısı, tam süt, patates, patates unu,	0,052gr/ 100ml gliserol Malaşit yeşili
Amerikan Toraks Derneği Besiyeri	Koagüle taze yumurta sarısı, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0,02 g /100 ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz	Malaşit yeşili, 0.0025g/ 100ml

Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, %0,1 kazein hidrolizat Malaşit yeşili,	Malaşit yeşili, 0.0025g/100ml
Modifiye Löwenstein-Jensen	Tam yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu, 5mg/100ml RNA	0,025gr/100ml Malaşit yeşili, 50U/ml penisilin, 35mg/ml nalidiksik asit
Löwenstein-Jensen	Tam yumurta, tuzlar, gliserol, patates unu	0,025gr/100ml Malaşit yeşili, 400µg/ml sikloheksimid, 2µg/ml linkomisin, 35µg/ml nalidiksik asit
Middlebrook 7H10	Tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, glikoz	0,0025gr/100ml Malaşit yeşili, 360µg/ml sikloheksimid, 2 µg/ml linkomisin, 20µg/ml nalidiksik asit
Selektif 7H11, (Mitchison's besiyeri)	Tuzlar, vitaminler, kofaktörler oleik asit, albümin, katalaz, glikoz, kazein hidrolizat gliserol,	50µg/ml karbenisilin 10µg/ml amfoterisin B 200U/ml polimiksin B, 20µg/ml trimethoprim laktat

Mikobakteri kültürü için ticari olarak sağlanabilen sıvı besiyerleri de mevcuttur.

- MGIT (Becton Dickinson, Biosciences): Cihazsız olarak mikobakterilerin üretilmesine dayalı olan bu yöntem Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içermektedir. MGIT, tüpün tabanında gömülü olan ve oksijen ile maskelenmiş bir sensör içerir. Mikroorganizmaların üremesine bağlı olarak azalan oksijen sonucu açığa çıkan floresan Wood lambası veya transilluminator yardımıyla tespit edilir. Manuel olarak kullanılan bu sistem düşük kapasiteli laboratuvarlarda tercih edilmektedir (58, 59).
- MB Redox (Heipha Diagnostica Biotest): Antibiyotik karışımı ve renksiz tetrazolium tuzu içeren modifiye Kirchner besiyeri (4 ml) içeren bu sistem sıvı bir ortam ile redoks göstergesini birleştiren bir sistemdir. Tetrazolium tuzu mikobakterilerin redoks sistemi sayesinde, hücre yüzeyinde granüler formda biriken pembe, kırmızı ve menekşe renginde formazona indirgenir ve üreme sonucu oluşan mikrokoloniler renkli partiküller

şeklinde makroskobik olarak görülebilir. Düşük kapasite ile çalışan laboratuvarlarda tercih edilen manuel sistemdir (51, 60)

- BACTEC 460TB (Becton Dickinson, Biosciences): Yarı otomatize radyometrik bir sistem olan BACTEC TB zenginleştirilmiş Middlebrook 7H12 sıvı besiyeri içerir. Bu sistemde içlerinde 4 ml besiyeri bulunan ve toplam 10 ml kapasiteli özel BACTEC şişeleri bulunur. İşlemden geçirilmiş örnekten 0,5 ml şişeye eklenerek 35°C’de inkübasyona bırakılır. Besiyerinde bulunan ve 14C ile işaretli palmitik asit mikobakteriler tarafından kullanılır ve BACTEC şişesi içerisine 14CO₂ salınır. Bu sistemin esası mikobakteri üremesi sonucu ortama salınan 14CO₂ miktarının ölçümüne dayanmaktadır. BACTEC 460 cihazı tarafından şişe içerisine salınan 14CO₂ miktarı ölçülerek radyoaktivite miktarı kantitatif olarak 0 ile 999 arasında bir değere çevrilir. Bu sayılara “Growth Index”(GI; büyüme endeksi) denir. Büyüme endeksinde oluşan günlük artış ile besiyerindeki üremenin miktarı ve hızı doğru orantılıdır. 10’un üzerindeki büyüme endeksi pozitif kabul edilirken negatif örneklerin büyüme endeksi genellikle 5-6 civarındadır. Şişeler her test edildiğinde BACTEC cihazı tarafından besiyerine verilen % 5’lik taze CO₂ üreme hızının artmasını sağlar. Bu yöntem sayesinde çok küçük miktarlardaki 14CO₂ bile saptanabildiğinden mikobakterilerin üremesi çok kısa bir zamanda belirlenmektedir. BACTEC 460 sistemiyle MTB’in saptanma süresi ortalama olarak 7-12 gün arasındadır. Bu sistemin dezavantajları; koloni morfolojisinin belirlenememesi, radyoaktif atık birikmesi ve pahalı olmasıdır. Günümüzde çok fazla tercih edilen bir yöntem değildir (51, 61, 62).
- MGIT 960 (Becton Dickinson, Biosciences): Tam otomatize ve non-radyometrik olan bu sistemde kullanılan tüplerde Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve dipte oksijene duyarlı floresan (rutenyum) madde gömülü silikonlar bulunur. Besiyerlerine örnek ekimi yapılmadan önce OADC (Oleik asit, sığır Albumin, Dekstroz, Katalaz) ve PANTA(polimiksin B, azlosilin, nalidiksik asit, trimetoprim ve amfoterisin B) ilave edilir. Daha sonra 7 ml kapasiteye sahip kültür tüplerine 0,5 ml örnek ekimi yapılır ve 37°C’de inkübe edilir. Ekim yapıldıktan sonraki günden itibaren sistem her gün üreme açısından değerlendirilir. Besiyerinde herhangi bir üreme olmadığında ortamda bulunan oksijenden dolayı floresan madde maskelenmektedir. Mikobakteri ve başka mikroorganizmalar ürettiğinde oksijenin azalması sonucu floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı üreme endeksi olarak değerlendirilmektedir. Herhangi bir iğne veya enjektöre ihtiyaç duyulmaması, tam otomatize olması, radyoaktif madde içermemesi bu

sistemin avantajları arasında yer alırken, yüksek kontaminasyon oranı ve kan ile floresansın maskelenmesi sistemin dezavantajlarıdır (51, 61, 63).

- BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson, Biosciences): Tam otomatize olan bu sistemde modifiye bir Middlebrook 7H9 besiyeri olan MYCO/F kullanılır. Besiyeri ortamındaki floresan artışı üreyen mikroorganizmaların tükettiği oksijen ile orantılıdır. Ekim yapmadan önce besiyerine PANTA ilave edilir. Bu sistemde floresan seviyesi ve üreme bilgisayar desteği ile takip edilir (51, 64).
- ESP II Kültür Sistemi (Trek Diagnostics): Bu sistem; besiyeri şişesi içerisinde modifiye Middlebrook 7H9, selüloz sünger, gliserol ve kaziton içeren tam otomatize bir sistemdir. Örneklerin ekimi yapılmadan önce besiyerine Polimiksin B, Vankomisin, Nalidiksik asit ve Amfoterisin B (PVNA) karışımı ilave edilir. ESP II kültür sisteminde her şişede mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu oluşan gaz basıncındaki değişikliklerin ölçülmesiyle değerlendirme yapılır. Bilgisayar destekli olan bu sistemde basınçtaki değişiklik sürekli olarak görüntülenebilir (65-67).
- MB/BacT Sistemi (Organon Teknika, İrlanda): Middlebrook 7H9 besiyeri MB/Bac T şişeleri, vakumlu, nitrojen, oksijen, CO₂ içerir. PANTA ve özel büyüme faktörleri içeren karışımın eklenmesiyle mikobakteriler için uygun şartların oluşması sağlanır. Besiyerinin dip kısmında bulunan ve CO₂ varlığında koyu yeşilden sarıya dönen kolorimetrik bir sensör yardımıyla üremeyi değerlendiren tam otomatize bir sistemdir. Bilgisayar desteği ile de besiyerleri sürekli kontrol altında tutulmaktadır (68).

2.6.4 Fenotipik Yöntemler

Kültürü yapılan mikobakterilerin tür düzeyine kadar tanımlanabilmesi doğru tedavi ve halk sağlığı bakımından büyük önem taşımaktadır. 1950'lerden itibaren fenotipik özelliklerine göre tanımlanan mikobakteriler için geleneksel biyokimyasal testler kullanılmıştır. Bu amaçla üreme hızı, oksijen kullanımı, koloni morfolojisi niasin birikimi, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) direnci, nitrat redüktaz aktivitesi ve pirazinamidaz üretim özellikleri incelenmektedir (Tablo 3). Ancak mikobakterilerin yavaş üremesi ve koloni morfolojisindeki belirsizlikler göz önüne alındığında sonuçların güvenilirliği tartışmaya yol açmaktadır (33).

Tablo 3: Mycobacterium tuberculosis kompleks Türlerinin Koloni Morfolojileri ve Biyokimyasal Özellikleri (69)

Testler	M. tuberculosis	M.bovis	M.bovis BCG	M.africanum	M.microti	M.canneti
Morfoloji	R	R	R	R	R	S
Pirizamidaz	+	-	-	+	+	+
Niasin	+	-	-	+/-	+	-
Nitrat kullanımı	+	-	-	+/-	-	+
Üreaz	+/-	-	+	+/-	+/-	+
TCH	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
duyarlılığı						
Oksijen	Aeorobik	Mikroaerofilik	Aerobik	Mikroaerofilik	Mikroaerofilik	Bilinmiyor
Piruvat kullanması	-	+	+	-	-	-

2.6.5 Moleküler Yöntemler

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanıma girmesi MTB suşlarının daha kesin olarak birbirinden ayırt edilmesini sağlamıştır. 1983 yılına kadar 53 olarak bilinen mikobakteri tür sayısı bu yöntemler sayesinde bugün 170'in üzerine çıkmıştır. Tür tespitinin yanı sıra, hastalığın toplum içinde küresel ve yerel bulaş ve yayılma dinamiklerinin daha ayrıntılı anlaşılmasını sağlamıştır. Genotipik yöntemlerle yapılan çalışmalar sonucunda laboratuvardaki çapraz kontaminasyon ile reinfeksiyon ve reaktivasyon arasındaki farkın tespiti gibi epidemiyolojik önemi olan bilgilere ulaşılmıştır (69).

İdeal bir moleküler genotiplendirme yönteminin, ayırım gücü yüksek, ucuz, hızlı, basit, güvenilir, değerlendirilmesi ve yorumlanması kolay, tekrarlanabilir, üretilen verilerin saklanması, laboratuvarlar arası paylaşımı kolay olmalıdır. Yöntem suşa özel, parmak izi “fingerprint” olarak adlandırılan, genetik profili ortaya koyabilmelidir (70).

Ticari direkt amplifikasyon kitleri başta PCR ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) olmak üzere “strand displacement amplification” (SDA) ve ligaz zincir reaksiyonu (LCR) gibi çeşitli amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (71).

2.7 İlaç Duyarlılık Test Yöntemleri

Hem tedavinin yönlendirilmesi hem de ilaç direncinin tanımlanmasında MTBK için İDT son derece önemlidir. İDT sonuçları olmaksızın yapılan tedaviler, tedavide başarısızlık oranını ve anti-TB ilaçlara karşı direnç gelişimini arttırmaktadır (72, 73).

Amerika Birleşik Devletlerindeki Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezi (Center of Diseases Control-CDC) anti-TB ilaçlara karşı dirençli mikobakterilerin oluşmasını engellemek amacıyla MTBK'in izole edildiği tüm hastalarda ilk izolata antimikrobiyal duyarlılık testlerinin

yapılmasını ve sonuçlarının sağlık kuruluşlarına bildirilmesi gerektiğini önermektedir (2). Özellikle bu testlerin, tedavinin üçüncü ayında hala yayma pozitif olan hastalarda ya da tedaviye yanıt yetersizliği olan hastalardan alınan sonraki klinik izolatlara da yapılması önerilmektedir (74,75).

2.7.1 Fenotipik Yöntemler

2.7.1.1 Klasik Kültür Yöntemleri

Orantı (Proporsiyon) Yöntemi:

MTBK izolatlarında antimikrobiyal ilaç duyarlılığını saptamak için kullanılan bu yöntem Klinik ve Laboratuvar Standart Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) tarafınca kabul edilmekle birlikte dünya genelinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Yapılan çalışmalar sonunda anti-TB ilaçlara dirençli basil oranı % 1 olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde belirli bir ilaç konsantrasyonunda (Kritik Konsantrasyon) dirençli olan mikroorganizmaların oranı tespit edilir. Koagülasyonundan önce ilaç eklenmiş LJ ve Middlebrook 7H10 besiyeri bu amaçla kullanılmaktadır. Basiller ilaçlı ve ilaç içermeyen (kontrol) besiyerlerine ekilerek 3 hafta kadar inkübasyona bırakılmaktadır. Direnç oranını % 1 olarak hesap etmek için ilaçlı besiyerinde kullanılan bakteri miktarı kontrol besiyerindekinden 100 kat fazladır. İlaçlı besiyerinde üreyen koloni sayısının ilaçsız besiyerinde üreyen koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını göstermektedir. Hesaplanan direnç yüzdesi 1'den büyük veya eşitse o suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu 1'den küçük ise antibiyotiğe duyarlı olarak kabul edilmektedir (76).

Mutlak Konsantrasyon Yöntemi:

Bu yöntem; test edilen mikroorganizmaya karşı her ilacın Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerinin tespitine dayanmaktadır. Belirli miktarda antibiyotik eklenen ve antibiyotiksiz besiyerlerine 2×10^3 veya 1×10^4 koloni oluşturan birim/ml (cfu/ml) içeren mikobakteri solüsyonu ekilir. İnokülüm miktarı 100.000 basili geçmemelidir. 4 haftalık bir inkübasyon süresinden sonra test değerlendirilebilir. İlaçlı besiyerinde 20'den fazla koloninin gözlenmesi bakterinin o ilaca karşı dirençli olduğu anlamını taşır. Ekim örneğinin hassas bir biçimde hazırlanması ve hata oranının yüksek olması yöntemin dezavantajıdır (76).

Direnç Oranı Yöntemi:

Direnç oranı yöntemi; direnci bilinmeyen bir suşun standart suş ile değerlendirilmesi prensibine dayanır. Mikobakteriler farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilir. Anti-TB ilaçların tümüne duyarlı olduğu bilinen standart suş H37Rv'de ilaçlı ve ilaçsız besiyeri içeren tüplere ekilir. 37°C'de 4 hafta inkübe edildikten sonra direnci bilinmeyen suşun MİK

değeri standart suşun MİK değerine bölünerek direnç oranı hesaplanır. Bu oran ≥ 8 ise suş denenen ilaca dirençli, ≤ 2 ise duyarlı olarak kabul edilir (76).

2.7.1.2 Hızlı Kültür Yöntemleri

Radyometrik Kültür Sistemi(BACTEC 460-Becton Dickinson):

DSÖ ve CLSI'nin önerdiği bu sistemde Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelere ekilen mikobakteri örnekleri düzenli olarak 14CO_2 varlığı yönünden kontrol edilir. Açığa çıkan 14CO_2 üreme indeksi olarak cihaz tarafından hesaplanır. GI değeri 500-800 arası bir değere geldiğinde duyarlılık testi yapılmalıdır. Antibiyotik duyarlılığı test edilecek olan ilaçları içeren Middlebrook 7H9 besiyerlerine 0,1 ml üreyen suşun bulunduğu şişeden ekim yapılır. Kontrol bir besiyerinde ilaçlı besiyerindekinden yüzde biri oranında ekim yapılır ve her iki besiyerinin günlük üreme indeksi ölçülerek raporlanır. Bu yöntemle birinci ve ikinci kuşak anti-TB ilaçlara duyarlılık testleri yapılabilir ve 5-7 günde sonuçlar alınır. Ancak iş yükü fazlalığı, dirençli basillerin oranının belirlenememesi ve radyoaktif atık içermesi yöntemin dezavantajlarıdır (77).

Floresan Kültür Sistemi (BACTECMGIT 960–Becton Dickinson):

Duyarlılık testi için ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine aynı oranda bakteri ekimi yapılarak besiyerlerindeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme gözlenmesinden sonraki 48 saat içinde ilaçlı tüplerde üreme olursa bakterinin testi yapılan ilaca karşı dirençli olduğu kabul edilir. Bilgisayar destekli olması nedeniyle besiyerlerinin aynı anda gözlenmesi sağlanır. Non-radyometrik olması avantajı iken kontaminasyon oranının yüksek olması dezavantajıdır (77).

Kolorimetrik Kültür Sistemi:

A. MB /BacT /ALERT MB (Organon, Teknika)

Bu sistemde mikobakteri üremesi ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi besiyerindeki CO_2 düzeyinin kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. BacT/ALERT MP şişelerindeki renk değişiklikleri saptanarak veriler bilgisayarlı sistemler tarafından değerlendirilir. INH, RIF, SM ve EMB için ilaç duyarlılık testleri yapılabilir (78).

B. Alamar Blue Oxidation-Reduction Indicator

Mikobakteriler ilaçlı ve kontrol besiyerlerine ekilerek tüm tüpler 35°C 'de 2 hafta kadar inkübe edilir. İlaçlı tüplerde üremenin olup olmadığını saptamak amacıyla kontrol tüpleri yedi 10. ve 14. günlerde test edilmelidir. Test için kontrol tüpüne 0.02 ml alamar blue solüsyonu ve bir miktar tween 80 eklenerek 50°C 'de 2 saat süreyle inkübe edilir. Bakteri üremesi sonucunda rengi pembeye dönüşen alamar blue boyası bir indikatör olarak bu sistemde kullanılır. Renk değişimini önleyecek ilacın konsantrasyonu ilacın MİK değeri olarak kabul edilir. Rengin maviden pembeye döndüğü tüplerde üreme olduğu ve o tüplerdeki ilaçlara karşı bakterinin dirençli olduğu saptanır (79).

Karbondiyoksit Oluşumunu Tespit Eden Sistem: ESP Kültür Sistemi II:

Duyarlılık testi için ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine aynı oranda mikobakteri ekimi yapılır. Periyodik aralıklarla üreme açısından değerlendirilip kontrol besiyerinde üreme zamanı tespit edilir. Kontrol besiyerinde pozitiflik görüldüğünden itibaren ilaçlı besiyerleri üç gün daha takip edilir. İlaçlı besiyerindeki tespit zamanı ile kontrol şişesindeki tespit zamanı arasında üç günden az fark varsa suş dirençli, üç günden daha uzunsa veya hiç üreme yoksa suş duyarlı olarak kabul edilir (77).

E-Test:

E-test (Epsilometer test) yöntemi primer anti-TB ilaçlara karşı MİK değerlerini belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Yüksek konstantasyonda hazırlanan bakteri süspansiyonu (MacFarland:3) OADC ile desteklenmiş Middlebrook 7H11 agara ekilerek 37°C'de % 5-10 CO₂'li ortamda 24 saat boyunca inkübe edilir. Bu inkübasyonu süresinden sonra -20°C'de saklanan E-test şeritlerinin oda ısısına gelmesi beklenir ve bir aplikatör yardımı ile besiyeri yüzeyine (ölçekli kısım üstte olacak şekilde) yerleştirilir. Pahalı olması ve inokülüm miktarının fazla olması dezavantajları arasında yer alırken MİK değerini vermesi avantajıdır (76, 80).

2.7.1.3 Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi:

Bu yöntemde ateş böceğinde bulunan ve ışık üretiminden sorumlu olan lusiferaz genini taşıyan bakteri fajı kullanılmaktadır. Mikobakteri varlığında bu fajlar kendilerine özgü mikobakterileri enfekte ederler. Fajlarla enfekte olan mikobakterilerde faj çoğalması ve lusiferaz geninin transkripsiyonuna bağlı olarak fazla miktarda lusiferaz enzimi üretilir. Lusiferaz enziminin substratı olan lusiferinin ortama eklenmesiyle adenosin trifosfat (ATP) varlığında kimyasal reaksiyon sonucu enzim lusiferini oksilüsiferine dönüştürür ve ışık oluşur. Bu yöntemle yapılan duyarlılık testinde lusiferaz geni içeren mikobakteriler ilaçlı ve kontrol besiyerlerine ekilerek bir gün boyunca inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda ortama lusiferin eklenerek ışık üretiminin olması beklenir. İlaçsız ortamda mikobakterilerin üremesi sonucu lusiferaz geni ve ATP varlığında ışık oluşur. Anti-TB ilaçlara duyarlı suşlar ilaçlı besiyerinde ışık oluşturmazken dirençli suşlar ışık oluşturmaya devam eder (81).

Biyoluminesans Yöntemi:

Bu yöntem yaşayan tüm canlılarda ATP'nin varlığı ve ölü hücrelerde ise ATP'nin yokluğu ile yapılan deneyler sonucu ATP'nin kültürlerden ekstrakte edilmesi ve ölçülmesi prensibine dayanır. Biyoluminesans testi ile duyarlılık tayinin yapılabilmesi için anti-TB ilaçlar uygun konsantrasyonlarda besiyerine eklenir. Daha sonra mikobakteri kolonileri süspansiyon (McFarland No:0.5) haline getirilerek ilaçlı tüplere ekimi yapılır. İlaçsız kontrol tüpleri ile

birlikte 35°C’de 10 gün inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda mikobakteri kültüründen 100 µl alınarak 0,1 µl Tris tamponu ve EDTA ile karıştırılır. Bu karışım beş dakika kadar kaynatılarak oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. Daha sonra üzerine ATP monitörize edici madde eklenerek oluşan ışığın şiddeti luminometre ile ölçülür. Ölçülen ışığın miktarı üretilen hücrel ATP miktarı ile doğru orantılıdır. Anti-TB ilaçlara karşı duyarlı olan suşlar ışık üretimi yapamaz. Kontrol suşa göre ATP aktivitesinin % 40 veya daha altına inmesi testi yapılan ilaca karşı suşun duyarlı olduğunu gösterir. Sonuçlar ortalama yedi günde alınır (82).

Flow Sitometri Yöntemi:

Yöntem, canlı MTB mikroorganizmalarının, floresein diasetat (FDA) hidrolize etme kabiliyetine ve böylece oluşan floresan mikobakterilerin flow sitometrik analiziyle saptanmasına dayanır. Anti-TB ilaçlara duyarlı mikobakteriler FDA’yı önemli ölçüde daha az hidrolize ederler. İlaç duyarlılık testi için çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan anti-TB ilaçlar mikobakteri içeren Middlebrook 7H9 besiyerlerine eklenir. 24 saat sonra ilaçlı ve kontrol besiyerlerine FDA eklenir ve oluşan floresan ölçülerek değerlendirilir (83, 84).

2.7.2 Moleküler Yöntemler

Dünyada ilaca dirençli MTB suşlarının artması ve ilaç direncinin moleküler mekanizmasının anlaşılmasıyla birlikte ilaç direncini hızlı saptayan moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Moleküler yöntemlerle direnç saptamak için minimum üremenin yeterli olması konvansiyonel yöntemlerle duyarlılık testlerini süresini birkaç haftadan yalnızca birkaç saate indirmiştir (85). Moleküler yöntemlerle ilaç direncinin hızlı tespiti; uygun anti-TB ilaçlarla tedaviye erken başlanması, tedavide başarı elde edilmesi, yeni dirençli suşların ortaya çıkmasının engellenmesi ve TB’un kontrol altına alınması bakımından büyük önem taşımaktadır(85, 86). Anti-TB ilaç direncinde sık rastlanan mutasyonlar artık bilinmektedir. Örneğin; mutasyonla ilişkili RIF direncinin % 95’i, RIF direncini saptayan gen bölgesi, rpoB geninin 81 bp’lik bir bölgesinde bulunduğu için genotipik olarak RIF direncini saptamaya uygundur. TB basilinin rpoB genindeki mutasyonlar, RIF direncinin % 95’inden fazlasından sorumludur (87). Yüksek maliyetli olması ve saptanan sessiz mutasyonların ilaç direnciyle ilişkisinin bulunmaması moleküler yöntemlerin dezavantajlarından (88). İlaç direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemlerin birçoğu DNA eldesi, hedef DNA’nın amplifikasyonu ve mutasyonların saptanması basamaklarından oluşmaktadır (86).

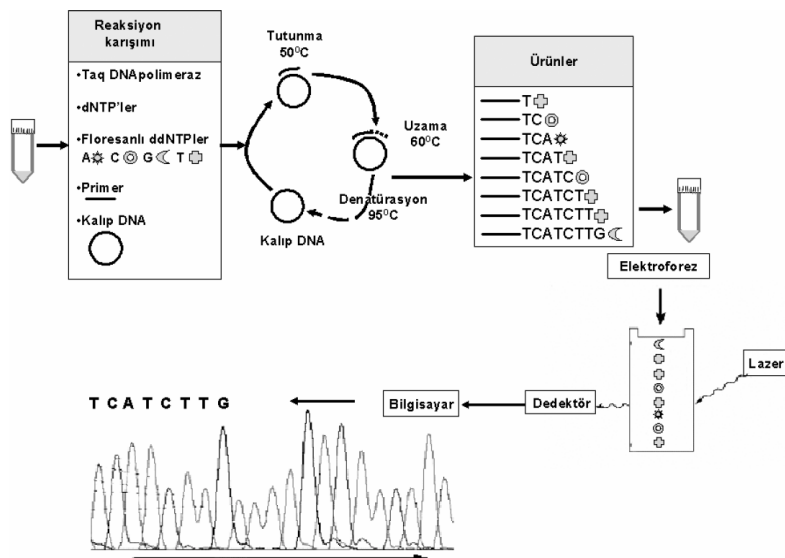
Katı faz hibridizasyon testleri (INNOLiPA RIF TB, GenoType MTBDR, microarray), DNA dizi analizi, PCR tek zincir konformasyon polimorfizmi (PCR single strand confirmation polymorphism analysis PCR-SSCP), heterodupleks analizi, “pyrosequencing”, mutasyona özgü

primer ile amplifikasyon, “gerçek zamanlı PCR” ve amplifikasyon ürününün mutasyona özgü restriksiyon enzimi ile analizi gibi işlemler ile hedef gendeki değişimler saptanabilmektedir (69).

2.7.2.1 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analiz yöntemi mikobakterilerde tüm genom analizinin yanı sıra ilaç direncine neden olan mutasyonların (delesyon, insersiyon) saptanmasına olanak sağladığından CLSI tarafından altın standart olarak kabul edilmektedir (89). Günümüzde DNA dizi analizi amacıyla dideoksi ya da zincir sonlanma tekniği olarak da bilinen ‘Sanger-dideoksi’ yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde dizilemesi yapılacak olan DNA dizileri, primerler, deoksinükleotid trifosfat (dNTP)’ler ve DNA polimeraz I enzimin ek olarak deoksiribozun 3’ pozisyonunda OH grubuna sahip olmayan dideoksi nükleotid trifosfatları (ddNTP) kullanılır. DNA’nın sentezlenmesi dört deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) molekülünün birbirine bağlanmasıyla gerçekleşir. Her nükleotid kendisinden bir önceki nükleotidin 3’ OH ucuna bağlanır. Dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) ise 3’ OH ucu içermediğinden DNA sentez zinciri durur ve zincirin son nükleotidini oluşturur (90).

DNA dizi analiz yöntemleri manuel ve otomatize sistemlere uyarlanarak yapılabilmektedir. Otomatik olarak yapılan DNA dizi analizlerinde reaksiyonda floresan veren madde ile işaretli primer veya nükleotid kullanılarak baz diziliminin görünür hale gelmesi sağlanır. Manuel olarak yapılan DNA dizi analizinde tüpte oluşan farklı uzunluktaki DNA parçaları poliakrilamid jelde görüntülenebilir (92).



Şekil 3: Otomatize DNA Dizi Analizi Yönteminin Aşamaları (91)

2.7.2.2 PCR-Line Probe Assay (LIPA)

Hızlı RIF direncinin saptanması amacıyla geliştiren bu kitin temeli ters hibridizasyona dayanmaktadır. LIPA yönteminde RIF direncinden sorumlu rpoB geninin biyotinle işaretlenmiş PCR ürünleri denatüre edilerek nitroselülöz şerit üzerine yerleştirilmiş 10 farklı özgül proba hibridize edilmektedir. Oluşan hibridler alkalen fosfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat eklenerek saptanmaktadır. Genotype MTBDR (Hain Lifesience, Almanya), aynı teknoloji ve test prensibine bağlı olarak geliştirilen, RIF ve INH ilaçlarına karşı oluşan mutasyonları tespit edebilen bir üründür (93, 94).

2.7.2.3 Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism SSCP) Analizi

Tek zincir konformasyon polimorfizmi tekniğinde; ilaç direncinden sorumlu olan gen bölgesi PCR ile amplifiye edildikten sonra ısı yardımıyla denatüre edilir ve çift iplikli DNA tek iplikçikli hale getirilir. Denatüre olmuş tek iplikçikler içerdikleri nükleotitlere göre farklı şekillerde kıvrılarak özgün yapılar meydana getirirler. Elde edilen denatüre ürünler ilaca duyarlı kontrol ürünlerle birlikte poliakrilamid jel elektroforezi yapılır. Elektroforez sırasında zincirin özgül yapısı jel gözeneklerinden geçiş hızını etkilemesi nedeniyle, hastadan elde edilen izolatin ilaca duyarlı kontrol kökenden farklı sonuç vermesi o gende mutasyon olduğunu göstermektedir. Bu yöntemde görüntüleme amacıyla radyoaktif madde kullanımı, deneyimli personel gerektirmesi ve uygulamadaki zorluklar nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır (86, 95).

2.7.2.4 GeneXpert MTB/RIF

GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD) test sistemi; bakteriyel lizis, DNA ekstraksiyonu, yarı kantitatif nested gerçek zamanlı PCR temeline dayanan tek kullanımlık plastik bir kartuş içinde iki saatten az bir süre içerisinde saptayan bir sistemdir (96). Klinik örneklerden TB tanısı ve RIF direncinin birlikte saptandığı bu sistem 2010 yılında yetişkinlerde akciğer TB'unun tanısında kullanılmak üzere DSÖ tarafından önerilmiştir. 2013 yılından itibaren ise çocuklarda ve akciğer dışı TB'un tanısında önerilmektedir. RIF direnci büyük oranda rpoB geninin 81 bp'lik bölgesindeki 5 gen mutasyonu ile oluşur. Bu sistemde RIF direncini belirlemede yüksek özgüllük için beş özgül prob ve üç özel primer kullanılmaktadır (97). MTBK'de RIF dirençli olguların neredeyse tamamında INH direnci de gözlemlendiğinden bu yöntem çok ilaca dirençli suşların saptanmasında önemlidir (96).

2.7.2.5 Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)

Gerçek zamanlı PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak ölçülmesine olanak sağlayan bir PCR yöntemidir (98). Özgül proplar veya çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği gösteren boyaların (SYBERGREEN, etidyum bromür v.b.) PCR sırasında oluşan ürünlere bağlanmasıyla artan floresan miktarının saptanması prensibine dayanır. Kontaminasyonun düşük olması, kısa bir sürede işlemlerin tamamlanması ve kantitatif sonuç vermesi, multipleks amplifikasyona ve mutasyon saptanmasına izin vermesi, test duyarlılığının yüksek olması, çok daha az miktarlardaki ürünün saptanabilmesi, elektroforez işlemine bağımlı olmaması gerçek zamanlı PCR'nın avantajlarından (99).

Gerçek zamanlı PCR yönteminde; TaqMan, Floresans rezonans enerji transferi (FRET) ve moleküler boncuk olmak üzere üç farklı formatta hazırlanmış saptama problemleri kullanılabilmektedir (91).

2.7.2.6 DNA Microarray

Son yıllarda, küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunduğu microarray'ler mikobakterilerin tanımlanmasına ve çok sayıda farklı mutasyonların saptanmasına olanak sağlamaktadır (100). Bu yöntem, PCR sonucu elde edilen floresanla işaretli amplikonların birçok farklı oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır (91). Hibridize amplikonların yaydığı floresan sinyaller daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. DNA microarray ile yapılan çalışmalarda RIF dirençli izolatların % 95'i, INH dirençli izolatların ise % 80'den fazlası kültürlerde ve klinik örneklerden yaklaşık 12 saat içinde saptanmıştır. Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda katG, inhA, rpoB ve gyrA genlerindeki mutasyonların tespitinde DNA dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır ancak pahalı bir yöntem olması ve ilaç direnç mekanizmalarının tam olarak anlaşılamaması nedeniyle sınırlı sayıda laboratuvarlarda uygulanmaktadır (85).

2.8 Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

TB tedavisinde kullanılan ilaçlar; kabul edilebilir toksisite içeren ve en etkili olan primer ilaçlar (birinci kuşak) ile genellikle primer ilaçlara direnç gelişimi veya hastaların bu ilaçları tolere edemedikleri durumlarda kullanılan sekonder ilaçlar (ikinci kuşak) olmak üzere iki grupta sınıflandırılırlar. İkinci kuşak ilaçlar genel olarak daha maliyetli daha az etkili ve daha fazla toksik etkiye sahiptir. Birinci kuşak ilaçlar arasında başta INH olmak üzere RIF, SM, EMB ve PZA yer alır ve TB'lu olan hastaların büyük çoğunluğu bu ilaçlar tedavi edilebilir. İkinci kuşak ilaçlar ise etionamid, PAS, viomisin, kapreomisin, kanamisin, amikasin, tiasetazon

(amitiazon), siprofloksasin, Levofloksasin ve sikloserin'dir. TB etkeni bakteriler bu ilaçlara karşı hızla direnç geliştirdikleri için ilaçlar arasında kombinasyon oluşturularak kullanılır (101, 102).

Anti-TB ilaçlarının etki mekanizmaları; hücre duvarı inhibitörleri (INH-EMB-etionamid, sikloserin), nükleik asit sentez inhibitörleri (RIF-kinolonlar), protein sentez inhibitörleri (SM, kanamisin) ve membran enerji metabolizma inhibitörleri (PZA) olarak sınıflandırılmaktadır (103).

Anti-TB ilaçların etki mekanizmalarına bakıldığında günümüzde kullanılan ilaçların esas olarak aktif şekilde çoğalan basiller üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Hâlbuki bir basil topluluğunda bulunan basiller farklı metabolik özelliklere sahip olabilmektedir. Mitchison, TB basillerini farklı metabolik aktivitelere göre 4 gruba ayırmıştır.

A grubu basiller (Aktif olarak büyüyen organizmalar) çoğunlukla INH tarafından öldürülen, kavite içinde bulunan ve hızla büyüyen bu grup genel olarak bulaştırıcılık ve ilaç direncinden sorumludur.

B grubu basiller (Asit ortam basilleri) Genellikle asitli ortamlarda bulunan (makrofaj içi ve inflamasyon bölgeleri) çoğunlukla PZA tarafından öldürülen yarı uyuyan organizmalardır.

C grubu basiller ikinci büyük basil grubu olup genellikle kazeöz odaklarda bulunurlar. RIF tarafından etkisiz hale getirilen bu grup nükslerden sorumludur.

D grubu basiller metabolik aktivitesi olmayan, ilaçlar tarafından öldürülemeyen ve bir gün metabolik aktivite kazanabilme potansiyeline sahip tamamen hareketsiz olan organizmalardır (79, 104).

2.8.1 Birinci Kuşak Anti-Tüberküloz İlaçlar

İsoniazid:

1951 yılında iki Çek bilim adamı tarafından üretilen ve hem aktif TB tedavisinde hem de latent TB tedavisinde kullanılan en önemli birinci kuşak ilaçlardan biridir. Dormant basiller üzerinde bakteriyostatik, hızlı çoğalan basiller üzerinde ise bakterisid etki yapar. MTB için MİK aralığı 0.002-0.2 µg/ml arasında olup yüksek oranda aktif bir ilaçtır. Kazeöz lezyonlar ve makrofajlara girebilmesi, kolay alınması, iyi absorbe olması ve maliyetinin ucuz olması nedeniyle anti-TB ilaçlar arasında önemli bir yere sahiptir. INH MTBK dışındaki bakterilere karşı etkisizdir. Çok dar spektrumlu olduğundan anti-TB ilaçlar arasında en ideal olanıdır. INH'a maruz kalan mikobakterilerde ileri derecede morfolojik değişiklikler görülmektedir.

Mikobakterilerde aside dayanıklılık ortadan kalkar ve EZN boyası ile boyanma özellikleri kaybolur (101, 103, 105).

INH dar spektrumlu bir ilaç olmasından dolayı TB profilaksisinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Uzun yıllardan bu yana kullanılmasına karşın ilacın bakteriyel hedefleri ve aktivasyonu tam olarak açıklanamamaktadır. MTB kökenlerinde oluşan INH direnci ile katalaz-peroksidaz aktivitesindeki kayıp arasında oluşan ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Buna göre INH hücre içine girdikten sonra bir peroksidazın etkisiyle izonikotinik asit ve hidrazine dönüşür. Sonucu madde bakteride nikotinik asidin antimetaboliti olarak görev yapar ve bir koenzim A türünün sentezini inhibe eder. Sonuç olarak hücrede hidrojen peroksit yıkımı olamadığından fazla miktarda biriken hidrojen peroksit letal etki yapar. INH direnci yüksek olan klinik izolatlarda (MİK >50µg/ml) katalaz-peroksidaz aktivitesinde görevli katG geninde kayıp (missense mutasyonlar), insersiyonlar (nükleotid ilavesi) ve küçük delesyonlar (nükleotid kaybı) olduğu saptanmıştır. Bu izolatlarda katG geninin tümünün delesyona uğraması çok nadir görülen bir olaydır. INH'a dirençli suşlarda katG geninde en sık rastlanan değişiklik 315.kodonda Ser315Thr mutasyonudur. Dirençli kökenlerin bazılarında katG geninin 463. kodonunda bulunan Arg463Leu mutasyonu saptanır ancak bu mutasyon tek başına katalaz-peroksidaz mutasyonunu değiştirmez (91, 107).

Etki mekanizması ile ilgili düşünülen bir diğer durum INH'a maruz kalan MTB kökenlerinde NAD miktarının düşmesi ve işaretli prekürsör metabolitlerin mikolik asit yapısına katılımının azalmasıdır. Bunu sebebi ise mikolik asit sentezinde önemli bir yeri olan C-24 asid delta-5 desaturaz enziminin INH tarafından inhibasyonudur. Mikobakterilerin hücre duvarında önemli bir yapıtaşı olan mikolik asid sentezinin bozulması ile birlikte hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının durduğu düşünülmektedir (91).

Rifampisin:

Streptomyces mediterranei'den izole edilen ve 1970'li yıllarda kullanıma giren bir rifampisin türüdür. INH ile birlikte kısa süreli tedavi rejimlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Hızla çoğalan ve dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde etkili olup hücre içindeki ve hücre dışındaki mikobakteriler üzerinde bakterisid etkisi yapar (102). RIF bakterinin RNA polimeraz enziminin β -alt ünitesine bağlanır ve transkripsiyonun başlamasının engeller. RIF dirençli mikobakteri suşlarının neredeyse tamamında (% 95) RNA polimeraz enziminin alt ünitesini kodlayan rpoB geni üzerindeki 507-533 kodonları arasındaki 81 baz çifti (bç) uzunluğunda olan rifampin resistance determining region (RRDR) veya hot spot denilen bölgede kayıp (missense mutasyonlar), insersiyonlar (nükleotit ilavesi) ve küçük delesyonlar (nükleotit kaybı) olduğu

belirlenmiştir. Ancak RIF dirençli suşların küçük bir bölümünde (% 4) RRDR bölgesinde hiçbir mutasyona rastlanılmamıştır. Bu suşların bir kısmında rpoB geni üzerinde bulunan RRDR bölgesi dışında kalan 7 farklı kodonda (146, 490, 505, 535, 541, 553, 572) mutasyon varlığı gösterilmiş olup çok az bir bölümünde ise oluşan direncin mekanizması henüz açıklanamamıştır. RIF dirençli kökenlerdeki mutasyonlar proteinlerin şifresi olan kodonlardaki nükleotidlerinin birinde değişim olabileceği gibi bir kodonda birden çok nükleotid değişimi şeklinde veya birden çok kodonu içine alan ikili, üçlü hatta dördü kodon mutasyonları şeklinde de olabilmektedir. RIF direnci sıklıkla INH direnci ile birlikte görülmektedir. Antibiyotikle karşılaşmamış suşların kültürlerinde direnç oranı yaklaşık olarak 10^{-8} olarak tespit edilmiştir. Ancak INH + RIF için bu oran 10^{-14} kadardır. Bu mutasyonların büyük bir kısmının 526. ve 531. amino asitleri arasında olduğu varsayılmaktadır. Yapılan çalışmalarda çeşitli coğrafik bölgelerde izole edilen suşlarda mutasyonlar saptanmış ancak direncin derecesi ile ilişkisi bulunamamıştır (101, 106, 108).

Pirazinamid:

İlk kez 1936 yılında Dalmer ve Walter tarafından sentezlenmesine rağmen kullanıma girmesi 1980 yılında olmuştur. Nikotinanamid'in sentetik pirazin analogudur. Tedavide kullanıma giresinden bu yana RIF, INH ve EMB ile birlikte TB tedavisin de vazgeçilmez birinci kuşak ilaçlardan biridir (5, 109). Diğer anti-TB ilaçlar tarafından öldürülemeyen asidik ortamdaki semi-dormant basil popülasyonu üzerinde etkili olduğundan tedavi süresini 12 aydan 6 aya kadar kısaltmakta eşsiz bir rol oynamaktadır (110). PZA bir ön ilaç olup MTB'deki pncA geni tarafından kodlanan pyrazinamidase (PZase)/nikotinamidase enzimi ile aktif formu olan pirazinoik aside (POA) dönüşür (5). Etki mekanizması pirazinamidin aktif kısmı olan pirazinoik asidin, membran enerjisini bozduğu ve MTB'de membran taşıma fonksiyonunu inhibe ettiği varsayılmaktadır (111).

Etambutol:

Etambutol (EMB) [dekstro-2,2 (etilendiimino) -di-1-bütanol] 1962 yılında poliaminlerin ve diaminlerin tüberkül basillerine karşı aktivite gösterdiği gözlemine dayanılarak keşfedilen ve D-arabinoza yapısal olarak benzeyen sentetik bir bileşiktir. MTB ve yavaş üreyen NTM'ler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (112). EMB mikobakterilerin hücre duvarında bulunan ve duvarın ana polisakariti olan arabinogalakthanın sentezini inhibe ederek etki eder. EMB arabinozun arabinogalakthan ve lipoarabinomannana (LAM) polimerize olmasını sağlayan arabinozil transferaz enzimine müdahale ederek bu yapıların hücre duvarına taşınmasını engellemektedir. Arabinozil transferaz enzimini kodlayan ve embCAB operonunda yer alan embC embA ve embB genleridir. Yaklaşık olarak % 65 oranında benzerlik gösteren

emb proteinlerinin 12 adet integral membran proteini olduğu düşünülmektedir. Yapılan biyokimyasal ve genetik çalışmalar embC'nin LAM sentezinde, embA ve embB'nin ise arabinogalakattan sentezinde terminal heksoarabinofuranosid motifini oluşturmada rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, EMB'nin EmbB'yi inhibe etme mekanizması hala belirsizdir (113, 114). EMB direnci büyük oranda embCAB operonundaki mutasyonlardan kaynaklandığı belirtilmektedir. Özellikle embB'nin 306, 406 ve 497 kodonlarındaki “kanonik” mutasyonlar emb direncinden sorumludur. embCAB ile ilgili yapılan çalışmalar en sık görülen mutasyonların 306. kodondaki (ATG) aminoasit değişikliği sonucunda olduğu ve 5 farklı mutasyonun 3 farklı aminoasidin kodlanmasına yol açtığını ortaya koymuştur. (ATG)→(GTG) mutasyonu sonucu valin, (ATG)→(CTG) mutasyonu sonucu lösin ve (ATG)→(ATA), (ATG)→(ATA), (ATG)→(ATT) mutasyonları sonucu izolösin sentezlenir. Bu değişiklikler sonucunda ise ilaç-protein etkileşiminin değiştiği ve sonuç olarak da EMB direncinin olduğu düşünülmektedir (113).

Streptomisin:

SM 1944 yılında Selman Waksman tarafından *Streptomyces griseus* kültürlerinden elde edilmiştir (102). Aminoglikozid grubundan bir anti-TB ilaç olan SM, ribozomların ribozomal S12 proteini ve 16SrRNA alt grubuna bağlanarak ribozom fonksiyonlarını ve dolayısıyla da protein sentezini bozarak etkisini göstermektedir (79). MTB'de SM direnci ile ilişkili mutasyonlar, 16S rRNA geninde (rrs) ve ribozomal protein S12'yi kodlayan rpsL geninde tanımlanmıştır. Birden fazla rRNA gen kopyasına sahip diğer bakterilerin aksine, MTBK üyelerinin yalnızca bir kopyası vardır. Bu nedenle, tek nükleotid değişiklikleri potansiyel olarak antibiyotik direnci üretebilir. rrs'deki nokta mutasyonları, 530 ve 915 nükleotidleri etrafında iki bölgede kümelenmiştir. SM direnci üreten nokta mutasyonlarının çoğu rpsL'de meydana gelir. En yaygın mutasyon, kodon 43'te bir Lys-Arg değişimi ile sonuçlanan bir AAG-AGG değişikliğidir; daha az sıklıkla, bir AAG-ACG (Lys-Thr) değişikliğide gözlenebilir (115).

2.8.2 İkinci kuşak Anti-Tüberküloz İlaçlar

Para-aminosalisilik asit:

PAS yalnızca MTB'e etkili çok dar spektrumlu ikinci kuşak anti-TB ilaçlardan biridir (101). PAS'ın folik asit biyosentezini ve demir alımını inhibe ettiği düşünülmektedir. Folat biyosentez yolunun enzim titanyum sentezini kodlayan tiA genindeki mutasyonlar, PAS-dirençli MTB klinik izolatlarında tanımlanmıştır, bu da PAS'ın bir folat antagonisti olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir (116). PAS'a karşı direnç gelişimi STR ve RIF'a karşı olana göre daha yavaş ve zordur. Birlikte kullanıldığında bu ilaçlara ve INH'a direnç gelişmesini geciktirir. Bakteriyostatik etkili olan bu ilaç STR ve INH göre çok daha zayıf

etkilidir. Thr202Ala'nın, PAS direnciyle ilişkili en yaygın mutasyon olduğu bildirilmiştir, ancak bu mutasyon aynı zamanda birkaç PAS duyarlı izolatta da tanımlanmıştır (117).

Etionamid:

ETH mikobakteriler üzerinde bakterisidal etki yapan ve INH gibi izonikotinik asitten üretilmiş ikinci kuşak anti-TB ilaçlardandır. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ancak mikobakteriyel hücre duvarında mikolik asit sentezini inhibe ederek etki ettiği düşünülmektedir (101). *InhA* mutasyonlarının ilaca dirençli MTB klinik izolatlarında hem INH hem de ETH'ye direnç sağladığı gösterilmiştir (118). Ayrıca ETH, INH'a yüksek dirençli MTB suşlarına karşı etkili olmasına rağmen, sadece INH'a az dirençli suşlara karşı daha az etkilidir (119).

Kapreomisin:

Streptococcus capreolus 'tan elde edilen ikinci kuşak anti-TB ilaçlardan biridir. Aminoglikozidlerle benzer etki mekanizmasına sahip olmasına rağmen kapreomisinin aminoglikozidleri tolere edemeyen ÇİD-TB'li olgularda da kullanılabileceği belirtilmektedir. TB tedavisinde tek başına kullanıldığında direnç gelişimi gösterir ve dirençli olgularda diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılır. Kapreomisin, 70s ribozoma bağlanarak protein translasyonunu inhibe eder (108, 118).

Kanamisin:

Kanamisin *Streptomyces kanamycetus*'tan elde edilen ve bakteriyostatik etkisi olan aminoglikozid grubu ilaçlardandır. Amikasin ve kapreomisinle aynı grupta bulunan bu ilaç dirençli suşların ve NTM'lerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır. Parenteral olarak kullanılması gereken bu ilaçların farmakokinetikleri ve toksisiteleri benzerdir. Ototoksik ve nefrotoksiktirler ve bu yüzden aynı gruptan ilaçlarla kombine edilmemelidirler (102, 108).

Amikasin:

Amikasin 'de aminoglikozid grubu ilaçlardan biridir. Amikasin, benzer farmakokinetik özelliklere ve dozajlara sahip yarı sentetik bir kanamisin türevidir. Mikobakteri türlerine karşı oldukça etkilidir ve genellikle NTM'lerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır. Yapılan çalışmalar yüksek amikasin ve kanamisin direncinin rrs geninin 1400. kodonunda oluşan mutasyonların sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır (91).

Sikloserin:

Sikloserin *Streptococcus orchidaceus* 'tan elde edilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bakteri hücre duvarı sentezinde kullanılan D-alanil, D-alanin sentetaz ve alanin rasemaz'ı kompetatif olarak inhibe eder ve hücre duvarının önemli bir bileşeninin oluşumunu engeller (102). Sikloserin, MTB'e karşı sadece marjinal olarak aktiftir ve öncelikle MDR-TB

tedavisinde kullanılır. Sikloserin kullanımı, zayıf aktivitesi ve sık görülen advers reaksiyonları nedeniyle sınırlıdır (120). Siklosporin ve diğer anti-TB ilaçlar arasında çapraz-direnç yoktur (101).

Tiasetazon:

Tiyosemikarbazon türevi olan tiasetazon çok ucuz olduğundan dolayı 1960'lı yıllardan sonra gelişmekte olan ülkelerde INH ile birlikte kullanılmıştır. Zayıf etkili bir anti-TB ilaç olup bakteriyostatik etkilidir. ETH ile benzer yapıdadır ancak farmakokinetiği ve invitro etkinliği konusundaki bilgiler sınırlıdır. Belirgin ve ciddi yan etkiler nedeniyle kullanımı azalmıştır. Özellikle HIV pozitif hastalarda ciddi cilt reaksiyonlarına yol açması kullanımını sınırlandırmıştır. Tiyonamidlerle arasında çapraz direnç vardır (109).

Florokinolonlar:

DNA giraz enzimi üzerine etkili olan florokinolonlar TB tedavisinde kullanılan en etkili anti-TB ilaçlardır (121, 122). DNA replikasyonu sırasında görev alan ve temel bir enzim olan DNA giraz üzerinde etkili olan florokinolonlar TB basili üzerinde bakterisidal etki gösterirler (123). DNA giraz enzimi; gyrA ve gyrB genleri tarafından kodlanan, 2A ve 2B alt ünitelerinden oluşan tetramer yapısında bir enzimdir (101). Levofloksasin, moksifloksasin ve gatifloksasin TB basili üzerinde oldukça etkili olan florokinolonlardır (124). Kinolon direncini belirleyen bölge (KDDR), MTB dahil olmak üzere çoğu bakteri türünde florokinolon direnci veren mutasyonların bildirildiği gyrA ve gyrB içindeki korunmuş alanlardan oluşur (125). GyrA ve gyrB genlerinde mutasyon oluşumu florokinolon grubu ilaçlara direnç oluşmasına neden olmaktadır. Siprofloksasin direncinin yüksek olması gyrA genindeki 90. kodon etrafındaki anlamsız mutasyonlarla ilişkili olduğu saptanmıştır(108). Bakterilerde birkaç florokinolon direnç mekanizması vardır. Her ne kadar MTB'deki birincil florokinolon direnç mekanizması, DNA giraz genlerinin QRDR'sindeki mutasyonlarla ilişkili olsa da, florokinolon direnci, artan florokinolon çıkışı veya DNA taklidiyle de sağlanabilir (125, 126).

Bedaquiline

Bedaquiline (TMC207), 31 Aralık 2012'de FDA tarafından TB tedavisinde kullanımı onaylanan ilaçtır. Bedaquiline ÇİD-TB'yi tedavi etmek için ikinci aşama etkililik ve güvenlik verileri temelinde onaylanmıştır (127).

Bedaquiline'in benzersiz ve spesifik anti-mikobakteriyel aktivitesi, mikobakteriyel ATP sentazın proton pompasının inhibisyonundan kaynaklanır. ATP sentaz, M. tuberculosis'in ATP sentezinde kritik bir enzimdir. Bedaquiline, mikobakteriyel ATP sentezinin oligomerik ve proteolipik alt birimine bağlanması, ATP sentezinin inhibisyonuna yol açar ve bu, daha sonra

bakteriyel ölümle sonuçlanır. ATP sentaz alt birimini kodlayan gen, atpE olarak belirtilir ve amino asit dizisi, ilişkili olmayan M. tuberculosis izolatlarında yüksek oranda korunur (128).

Bedaquiline, özellikle ÇİD-TB tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş olan bir anti-TB ilaçtır. Çünkü ilaca duyarlı TB tedavisinde kullanılan birinci kuşak ilaçlardan olan rifamisin türevi ilaçlar, etkili birer sitokrom P-450 indükleyicisidirler. Bedaquiline ise sitokrom P-450 tarafından metabolize edilmektedir. Bu nedenle rifamisin türevi ilaçlar bedaquiline ile beraber kullanıldığında ilacın inaktive olmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla bedaquiline etkisi inhibe olacağından RIF tedavisi uygulanan hastalarda kullanılmamaktadır (129, 130).

Delamanid

OPC-67683 olarak da bilinen, delamanid yeni bir anti-TB ilaçtır ve 2014'te Avrupa İlaç Dairesi (EMA)'nden ÇİD-TB tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (129). 2018 yılı itibarıyla faz 3 aşamasında olan ilaç anti tüberküloz etkinliği saptanmış bisiklik nitroimidazo oksazol yapısındaki CG1 17341 kodlu bileşikten hareketle toksisiteyi düşürmek ve de anti-TB etkiyi artırmak amacıyla sentezlenmiştir (131).

Etki mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte mikobakteriyel hücrede duvar sentezi için gerekli olan mikolik asit biyosentezini inhibe etmektedir (132)

Delamanid direnci başlıca mikobakteriyel F420 genlerinde ortaya çıkan mutasyondan kaynaklanmaktadır. Delamanid; ÇİD-TB tedavisinde, AIDS'li hastalarda ve de latent tüberküloz enfeksiyonunun tedavisinde kullanılabilmektedir (133)

Linezolid

Linezolid, 2000 yılında FDA'dan onay almış ve özellikle cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, pnömöni ve bakteriemi tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (131). Oksazolidinon antibiyotik sınıfının bir üyesi olan linezolid, bakteriyel 50S ribozomal alt biriminin 23S ribozomal RNA (rRNA) bölümünü bağlayarak protein sentezini inhibe eder. Linezolid, çoklu ilaca dirençli (MDR) ve geniş ölçüde ilaca dirençli (XDR) suşlar dahil olmak üzere Mycobacterium tuberculosis'e karşı in vitro bakteriyostatik aktivite sergiler ve minimum inhibitör konsantrasyon mililitre başına 1 µg'den azdır (134).

2.9 Tüberkülozda Direnç

Anti-TB ilaçlara direnç, küresel sağlık ve güvenlik için bir tehdit oluşturmakta ve son yirmi yılda TB mücadelede kaydedilen ilerlemeye meydan okumaktadır (135). 2018 yılında yaklaşık yarım milyon yeni RIF dirençli TB olgusu saptanmıştır ve bunların % 78'i ise ÇİD-TB'dir. Küresel olarak daha önce tedavi edilmiş olguların % 18'inde ÇİD-TB veya RIF dirençli TB (MDR/RRTB) olduğu açıklanmıştır (3). Antimikobakteriyel ilaç direnci, primer direnç ya

da sekonder direnç olarak ortaya çıkabilir. Daha önce antimikobakteriyel tedavi almayan hastalarda ortaya çıkan tedavi primer direnç olarak adlandırılır. Primer direnç için risk faktörleri; ÇİD-TB hastayla temas, dirençli olguların yüksek olduğu yerlerde bulunmak sayılabilir. Hatalı tedavi veya tedaviye uyumsuzluk nedeniyle TB tedavisi gören hastalarda ortaya çıkan dirence ise sekonder direnç ya da kazanılmış direnç denir (108).

MTB’de ilaç direnci, rastgele, SNP’ler sonucu ve spontan kromozomal mutasyonları sonucu her antibiyotik için farklı sıklıkta oluşmaktadır. Plazmid veya transpozon aracılığıyla oluşan horizontal gen transferine bağlı direnç birçok bakteride görülse de MTB’de bu tür transpozonlar görülmez (91).

Spontan direnç oranları INH 10^{-6} , RIF 10^{-8} , EM 10^{-6} ve SM 10^{-5} olarak gerçekleşmektedir. Kromozomlardaki direnç bölgeleri birbirleriyle bağlantılı olmadıklarından, bakterinin iki ilaca birden spontan direnç geliştirmesi, her bir ilaç için mevcut olan olasılıkların çarpımına eşittir. Dirençli suşların yayılması ancak dirençli izolatlarla enfekte hastaların bulaştırıcılığı ile mümkündür çünkü mikobakterilerde oluşan direnç aktarılabilir değildir (108).

2.9.1 Dünya’da Direnç

Dünyadaki ÇİD-TB ve YİD-TB ile ilgili en önemli veri kaynağı DSÖ tarafından yapılan ilaç direnci süveyansı çalışmalarıdır. Dünyadaki birçok ülkede yürütülen ilaç direnç süveyansı çalışmalarında ilaç direncinin durumu, yıllar içindeki değişimi ile ilaç direncine etki eden çeşitli nedenler araştırılmaktadır. Yürütülen çalışmalar sonucunda dünyadaki birçok ülkede sürekli bir ilaç direnci süveyansı sistemi kurulmuştur. İlaç direnci ile mücadelede en önemli nokta bütün örneklerin düzenli olarak İDT’nin yapılmasıdır. Bazı durumlarda sadece önceden tedavi görmüş hastalarda İDT yapılması istense de olanakları olan ülkeler için İDT’nin kültürde üreme saptanan her hasta için rutinde çalışılması önerilmektedir. DSÖ’ye üye 194 ülkeden 144’ü ilaç direnci verilerini toplayarak analiz etmektedir. Bu ülkelerden 72’si rutin İDT ile sürekli süveyansı yaparken, 72 ülke hasta örneklerinde İDT yapmaktadır (136).

DSÖ’nün son raporunda 2018’de küresel olarak, yeni olguların % 3.4’ü ve daha önce tedavi edilen olguların % 18’i MDR / RR-TB idi. Genel olarak, 2018’de tahmini 484.000 MDR / RR-TB olgusu olmuştur. Bu olguların yarısını Hindistan (% 27) Çin, (% 14) ve Rusya Federasyonu (% 9) oluşturmaktadır. 2018’de MDR/RR-TB’den yaklaşık 214.000 (133.000-295.000) ölüm meydana geldi. Eşzamanlı RIF direnci olmaksızın INH’a direnç seviyelerine ilişkin veriler 2002–2018 döneminde 156 ülkede mevcuttur. Eşzamanlı RIF direnci olmaksızın INH direncinin global ortalamaları yeni TB olgularında % 7.2 ve daha önce tedavi edilmiş TB

olgularında % 11.6 idi. Son 15 yılda, 128 ülke ve beş bölge, XDR-TB'ye sahip MDR-TB olgularının oranına ilişkin sürekli gözetim veya anketlerden temsili veriler rapor etmiştir. Verileri birleştirildiğinde, XDR-TB'li MDR-TB olgularının ortalama oranı % 6.2'dir. Ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin dahil olmak üzere testin yapıldığı herhangi bir florokinolona dirençli MDR / RR-TB olgularının oranı %2 0.8'dir (3).

2.9.2 Türkiye’de Direnç

Türkiye her yıl düzenli olarak DSÖ’ye ülke verilerini raporlamakta ayrıca ülkemizde yıllık Türkiye Tüberküloz Raporu yayımlanmaktadır. Bu iki bilgi kaynağı ülkemizdeki TB epidemiyolojisi hakkında temel bilgileri sağlamaktadır. Türkiye’de 2011 yılına kadar ülke veya herhangi bir şehir örneklemini üzerinde hazırlanmış ilaç direnç sürveyans çalışması yoktu. 2011 yılında ilk İlaç Direnç Sürveyans çalışması Ankara’da yapılmıştır. Bir sonraki yıl Ankara ve İstanbul, 2013 yılında ise Ankara ve İstanbul dâhil olmak üzere 27 şehir İlaç Direnç Sürveyans çalışmasına dâhil olmuştur (136).

Tablo 4: Yeni, Önceden Tedavi Görmüş ve Tüm Olgularda ÇİD-TB Oranları, 2005-2017 (4)

Yıl	Yeni Olgular		Önceden Tedavi Görmüş Olgular		Tüm Olgular	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
2005	101	3,1	90	17,7	191	5,1
2006	131	3,2	118	16,6	249	5,1
2007	120	2,9	120	15,5	240	4,9
2008	125	3,0	138	18,6	263	5,3
2009	99	2,7	123	20,5	222	5,1
2010	110	2,5	140	22,8	250	5,0
2011	116	2,7	146	24,3	262	5,4
2012	151	3,2	140	21,8	291	5,4
2013	123	2,5	105	17,8	228	4,1
2014	121	2,5	132	21,1	253	4,6
2015	127	2,5	103	17,8	230	4,1
2016	115	2,1	85	14,2	200	3,3
2017	128	2,4	63	11,3	191	3,2

2017 yılında; İDT yapılan 5.891 hastanın % 20.1’inde (1.187/5.891) en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranda direncin % 12.5 ile (734/5.891) INH’a karşı geliştiği görülmüştür. INH ve RIF için (her ikisine) İDT yapılan 5.891 olgunun 191’inin (% 3.2) ÇİD-TB olduğu görülmüştür. İDT yapılanlarda ÇİD-TB oranı yeni olgularda % 2.4 iken (128 olgu), önceden tedavi görmüş olgularda % 11.3 (63 olgu) olarak tespit edilmiştir. ÇİD-TB olgularından 2’si YİD-TB’dir (4).

2.10 Korunma ve Kontrol

TB’da bulaş kaynağı aktif TB hastaları olduğundan dolayı bulaşın önlenmesindeki en önemli husus hastalara erken tanı koymak ve en etkili tedavi rejimini uygulamaktır (137). TB şüphesi olan her kişide balgam mümkün olunan en kısa zamanda ARB yönünden incelenmelidir (138).

TB’da korunmada üç yöntem esas alınır. İlk korunma yöntemi aktif TB hastalarının etkin bir şekilde tedavi edilmesi ve bulaş kaynağının ortadan kaldırılmasıdır. Tedavinin 14. gününden itibaren balgamdaki basil sayısının logaritmik azalışı ile birlikte öksürük seyrekleşir ve ortadan kalkar bu durum bulaştırıcılık açısından oldukça önemlidir. İkinci korunma yöntemi henüz TB’la enfekte olmamış özellikle çocukluk yaş gruplarındaki bireylerin BCG aşısı ile korunmasıdır. Son olarak da TB basili ile karşılaşmış fakat hastalanmamış kişilerde hastalığın aktif hale gelmesinin engellenmesi amacıyla kişilere ilaç tedavisinin başlanmasıdır. Bu durum latent enfeksiyonun tedavisi veya kemoprofilaksi olarak adlandırılmaktadır (139).

TB insidansı, prevelansı, morbitide ve mortalitesinde azalma sağlanması ve bu azalmanın sürekli hale getirilerek hastalığın eradike edilmesi TB kontrolü olarak ifade edilmektedir (140).

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Cihaz, Gereç ve Solüsyonlar

- Otomatik Pipetler(isolab)
- Thermal Cyclers(labnet)
- Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı(Majör Science)
- Hassas Terazî (Bel)
- Vorteks (VSM)
- Santrifüj (İsolab)
- İnkübatör(termal)
- Otoklav (termal)
- Steril laminar akımlı güvenlik kabini(Bilser Class II)
- Benmari (termal)
- Hotplate Stirrer(Benchmark)
- Mikroskop: (olympus)
- Derin Dondurucu(nüve)
- İnsineratör(zenon)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Santrifüj (İsolab)
- UV görüntüleyici
- Cryovial Tüp 2 ml
- Cam boncuk
- PCR tüp 0,5 mL -1,5 ml
- Pipet ucu 1-20-1000 µL
- % 95'lik etil alkol(sigma)
- Asetik asit(sigma)
- Agaroz (sigma)
- Tris-base (sigma)
- Borik asit (sigma)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA sigma)
- Etidyum bromide
- Sodyum Hipoklorit
- **TE Tamponu Stok Solüsyonu(1 M)**

121,1 g Trisma-base 800 ml distile suda eritilerek pH 8 ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edildi.

- **TBE Tamponu Stok Solüsyonu(10X)**

108 g Trisma base, 55 gr Borik asit ve 7,5 gr EDTA içerisinde bir miktar su olan behere konulur ve üzeri 1000 ml'ye tamamlanır. İçerisine manyetik bir balık atılarak hotplate stirrer yardımıyla homojen hale gelinceye kadar karıştırılır ve otoklavlanır.

- **Etidyum bromür:**

100 ml distile su içinde 0,5 g etidyum bromür çözülerek ışığı geçirmeyen koyu renk bir şişede saklandı.

- **Agaroz Jel**

1,5 gr agaroz (Sigma) 100 ml 1xTBE buffer ile karıştırılarak mikrodalga içinde eritilerek jel hazırlanmıştır. Stok solüsyondan 20 µl (0,5 µg/ml) etidyum bromür ilave edilmiştir. Ürünler 10x yükleme tamponu 1x'e dilue edilerek jelle yüklenmiştir.

- **DNA belirtecinin hazırlanması:**

Üretici firmanın (MBI Fermentas) önerdiği şekilde 1 µl φ174 DNA marker, 1 µl loading buffer, 4 µl distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

- **Orange G:** 3 ml gliserol 25mg Orange G ve 7 ml distile su karıştırılarak elde edilir.

3.2 Çalışma Grubu ve Örnekler

Çalışmamıza 2017-2018 yılları arasında Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve gönüllülük esasına göre Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi'nden Dr. İsmail Ceyhan'dan temin edilen 33 adet ÇİD-MTB ve 10 adet duyarlı izolat dahil edildi. Konvansiyonel yöntemlerle ilaç duyarlılık testleri birinci kuşak ilaçlardan izoniazid için 0,2 µg/ml, rifampisin için 40 µg/ml, streptomisin için 4 µg/ml ve etambutol için 2 µg/ml ve ikinci kuşak ilaçlardan ofloxacin için 0,2 µg/ml, moxifloxacin için 0,5 µg/ml, amikasin ve kanamisin için ise 40 µg/ml olacak şekilde çalışılmıştır. Her ilaç duyarlılık testi için pozitif kontrol olarak H37RV kullanılmıştır.

3.3 İzolatların Canlandırılması

Çalışmada değerlendirilecek örneklerin kültür süspansiyonlarından 200 µl alınarak LJ besiyerine ekilerek subkültürü yapıldı. 37 °C'de 6-8 hafta boyunca inkubasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince hafta iki kez üreme kontrolleri yapıldı. Üreyen kültürlerden bakteri süspansiyonu hazırlandı. DNA izolasyonu için ayrılan süspansiyonlar çalışma gününe kadar -40 °C'de saklandı.



Şekil 4: Löwenstein – Jensen Besiyerinde Üreme

3.4 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu kaynatma yöntemine göre yapıldı (141). Bu amaçla 750 µl TE tamponu (10mM Tris [pH:8,0] 1mM EDTA) içeren mikrosantrifüj tüpü içerisine LJ besiyerinden üremiş bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınarak süspansiyon haline getirildi. Vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldıktan sonra bu işlem üç kez tekrarlanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bakteri çözeltisi üzerine son kez 250 µl TE tamponu eklenerek süspansiyon haline getirildi ve kaynar su banyosunda 20 dakika bekletilerek bakterilerin parçalanıp, DNA'sının açığa çıkması sağlandı. Tüpler 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bakteri artıklarının çökmesi sağlandı. Kalıp DNA'yı içeren üst sıvı alınarak steril mikrosantrifüj tüpü içerisine konuldu. Ekstrakte edilen DNA PCR ile amplifiye edilmek üzere -40 °C'de saklandı.

3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

RIF direnci için rpoB, INH direnci için katG ve inhA, forokinolon grubu ilaç direnci için gyrA aminoglikozid grubu direnci için ise eis ve rrs gen bölgelerinin varlığı in-house PCR testi ile araştırıldı. Her bir direnç genin tanımlamasında kullanılan ileri ve geri primer dizileri aşağıda belirtilmiştir (tablo 5).

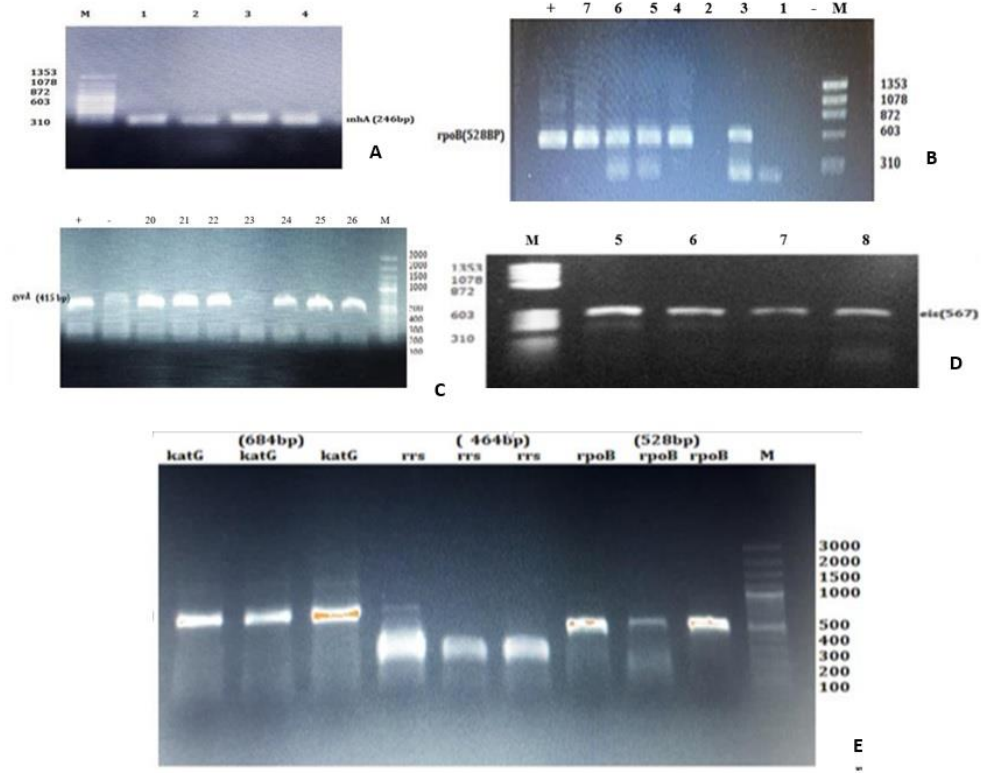
Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Primerler

Hedef	Gen	Sekans	Anneling derecesi	Uzunluk
RIF (Rifampisin)	rpoB	İ: ACCGACGACATCGACCACTT G: GGCGGTCAGGTACACGATCT	58	528
INH (İzoniazid)	katG	İ: GAGCCCGATGAGGTCTATTG G :GTCTCGGTGGATCAGCTTGT	60	684
	inhA	İ: CGCAGCCAGGGCCTCGCTG G: CTCCGGTAACCAGGACTGA	60	246
FQs(Florokinolonlar)	gyrA	İ:TCGACTATGCGATGAGCGTG G:GGTAGCACCGTCGGCTCTTG	60	415
Aminoglycosides/cyclic peptides (Aminoglikozidler/siklik peptidler)	rrs	İ:GAGTTGGTGCGGCGTAAGAGC G:GGGGCGTTTTCGTGGTGCTCC	60	464
	eis	İ:GCGTAACGTCACGGCGAAATTC G:GTCAGCTCATGCAAGGTG	60	567

Testler 50 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 28,8 µL distile su, 5 µL 10xPCR tamponu, 4 µL (2 mM) MgCl₂, 1 µL dNTP karışımı, 0,5 µL primer (İ ve G) , 0,2 µL Taq DNA polymerase ve 10 µL template DNA içermektedir. Bu karışım sırasıyla tüm primerler için yapıldı. 94°C’de 1 dk. 60 °C 1 dk.(sadece rpoB primeri için 58 °C), 72 °C 1 dk. olacak şekilde 35 döngü halinde tekrarlandı. 72 °C 10 dk. bekletildikten sonra amplifikasyon sonlandırıldı.

3.6 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri % 2’lik agarose jel elektroforezde ethidium bromide varlığında 90 V’da bir saat yürütüldü. Elde edilen DNA bantları UV transillüminatörlü jel dökümantasyon sisteminde molekül ağırlık belirteçleri (100 bp DNA marker, HaeIII QX174 DNA Marker ve X174 DNA/HinfI Marker) ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi. Her çalışmada pozitif kontrol (HCTP H37 Ra) ve negatif kontrol kullanıldı. KatG 684 bp, rpoB 528 bp, inhA 246 bp, gyrA 415 bp rrs 464 bp ve eis için ise 567 bp büyüklüğündeki bantlar pozitif kabul edildi (Şekil 5).



Şekil 5: ÇİD-MTB İzolatlarında PCR Testi ile Direnç Gen Bölgelerinin Elektroforez Görüntüsü

A) *InhA* B) *rpoB*: C) *gyrA* D) *eis* E) *katG*, *rrs*, *rpoB*

(M: Marker GeneRuler 100 bp PlusDNA marker ve X174 DNA/HinfI Marker, +:pozitif kontrol, -: negatif kontrol)

4 BULGULAR

Çalışmamızda, 2017-2018 yılları arasında Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi 400 Yataklı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarına TB şüphesi ile rutin olarak gönderilen klinik örneklerden (balgam, idrar, SVS, BAL, apse ve AMS vb) soyutlanan 10 adet MTB izolatı ile gönüllülük usulüne göre Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Dr. İsmail Ceyhan'dan temin edilen 33 adet ÇİD-TB suşu değerlendirildi (Tablo:6).

Tablo 6: ÇİD-MTB Suşlarının LJ Besiyerinde İndirek Proporsiyon Yöntemi ile İlaç Duyarlılık Test Sonuçları

İzolat No	Birinci Kuşak İlaçlar			İkinci Kuşak İlaçlar		
	ÇİD-MTB		Ofloxacin	Florokinolanlar		Aminoglikozidler
	İsoniazid	Rifampisin		Moxifloxacin	Amikasin	
1	R	R	S	S	S	S
2	R	R	S	S	S	S
3	R	R	S	S	S	S
4	R	R	S	S	S	S
5	R	R	S	S	S	S
6	R	R	S	S	S	S
7	R	R	S	S	S	S
8	R	R	R	S	R	R
9	R	R	S	S	S	S
10	R	R	S	S	S	S
11	R	R	S	S	S	S
12	R	R	S	S	S	S
13	R	R	R	S	S	S
14	R	R	S	S	S	S
15	R	R	S	S	S	S
16	R	R	S	S	S	S
17	R	R	S	S	S	S
18	R	R	S	S	S	S
19	R	R	S	S	S	S
20	R	R	S	S	S	S
21	R	R	S	S	S	S
22	R	R	S	S	S	S
23	R	R	S	S	S	S
24	R	R	S	S	S	S
25	R	R	S	S	S	S
26	R	R	S	S	S	S
27	R	R	S	S	S	S
28	R	R	S	S	S	S
29	R	R	S	S	S	S
30	R	R	S	S	S	S
31	R	R	R	S	S	S
33	R	R	S	S	S	S
33	R	R	S	S	S	S

R:Dirençli S: Duyarlı

LJ besiyerinde indirekt proporsiyon yöntemi ile birinci kuşak ve ikinci kuşak anti-TB ilaçlara karşı 33 adet MTB suşunun direnç profilleri çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm suşların birinci kuşak ilaçlardan INH ve RIF'a karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatların ikinci kuşak ilaçlardan florokinolon grubunda ofloxacin direnç oranı 3/33 (% 9.09) olarak saptanırken tüm izolatlar moxifloxacin duyarlı bulunmuştur. Aminoglikozid grubunda yer alan ve enjekte edilebilen ilaçlardan olan amikasin ve kanamisinine karşı direnç oranı ise 1/33 (% 3.03) olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemlerle ÇİD-MTB olduğu saptanan ve alt kültürü yapılan 33 izolatın in-house PCR ile tanımlanan rpoB, inhA, katG, gyrA, eis ve rrs mutasyonel gen bölgelerine ait sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7: Çalışmaya Dâhil Edilen ÇİD-MTB In House PCR Test Sonuçları

İZOLAT NO	RPOB	INH A	KATG	GYRA	EİS	RRS
1	S	R	R	R	R	R
2	S	R	R	S	S	S
3	R	R	R	R	R	S
4	R	R	S	S	S	R
5	R	S	S	R	R	R
6	R	R	S	R	R	R
7	R	R	R	R	R	R
8	R	R	S	R	R	R
9	R	R	R	S	S	R
10	S	R	R	S	S	S
11	R	R	R	R	S	R
12	R	R	R	R	R	R
13	R	R	S	R	S	R
14	R	S	R	R	S	R
15	R	R	R	S	S	S
16	R	R	R	S	R	S
17	S	R	R	S	S	R
18	R	R	R	R	R	R
19	S	R	R	R	S	S
20	R	R	R	R	R	R
21	R	R	R	R	R	S
22	S	R	R	R	S	S
23	R	R	R	S	S	S
24	R	R	R	R	R	S
25	R	R	S	R	R	S
26	R	R	R	R	R	S
27	R	R	R	R	R	S
28	R	R	S	R	R	S
29	R	R	R	R	R	S
30	R	R	R	R	R	S
31	R	R	R	S	S	S
32	R	R	R	R	R	S
33	R	R	S	R	R	S

R: Dirençli S:Duyarlı

Bu sonuçlara göre incelenen 33 izolatın 27 (% 81.8)'sinde rpoB geni saptanmış olup, 31 (% 93.9) izolatta inhA geni ve 25 (% 75.7) izolatta katG geni pozitif. rpoB geni negatif olan 6 izolatın inhA ve katG geni pozitif. inhA negatif saptanan 2 izolat ile katG negatif saptanan 8 izolatın rpoB geni pozitif bulundu. Çalışmamızda rpoB, inhA ve katG duyarlı saptanan izolatların hiç birinde rpoB'nin inhA ve/veya katG kombinasyonunda biri veya ikisi ile birlikte dirençli izolat saptanmadı. InhA ve katG negatif olan bir izolatta, rpoB pozitif. İzolatların 18 (% 54.5) ise rpoB, katG ve inhA direnç genlerinin her üçüne birden pozitif bulundu.

Çalışmada kullandığımız in-house PCR ve konvansiyonel ilaç duyarlılık testine ait karşılaştırılmalı sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: ÇİD-MTB Suşlarının LJ Besiyerinde İndirek Proporsiyon Yöntemi ile İlaç Duyarlılık Test Sonuçları

İlaç Grupları		Test Sonuçları	
		in-house PCR	Konvansiyonel İDT
Rifampisin	(rpoB)	27/33 (% 81.8)	33/33 (% 100)
İzoniazid	(inhA)	31/33 (% 93.9)	33/33 (% 100)
	(katG)	25/33 (% 75.7)	
FQ(gyrA) (Ofloxacin Moxifloxacin)		25/33 (% 75.7)	3/33 (% 9.09)
Aminoglikozidler Amikasin Kanamisin	(eis)	20/33 (% 60.6)	1/33 (% 3.03)
	(rrs)	14/33 (%42.4)	

***İDT:** İlaç Duyarlılık Testi

Florokinolon grubu ilaçlarda mutasyonel bölgeyi ifade eden gyrA gen bölgesi pozitiflik oranı % 75.7 (25/33) idi. Aminoglikozid grubunda mutasyonel direnç bölgelerini temsil eden eis gen bölgesi 33 izolatın 22 (% 60.6)'sinde ve rrs gen bölgesinin ise 14 (% 42.4)'ünde pozitiflik saptandı. Çalışmamızda kontrol amaçlı kullanılan 10 birinci ve ikinci kuşak ilaçlara duyarlı MTB izolatında tüm gen bölgeleri duyarlı olarak saptandı.

İzolatların 21'inin rpoB gen bölgesi ile katG veya inhA bölgelerinden birinde pozitiflik saptandı. Bu izolatların gyrA gen bölgesi ile eis ve/veya rrs gen bölgelerinden birinde dirençli olduğu belirlendi.

İndirekt proporsiyon yöntemine göre oflaksasin dirençli 1 izolatta PCR yöntemi ile gyrA mutasyonel gen bölgesi saptanmadı.

Birinci ve ikinci kuşak ilaçlarda Löwenstein-Jensen besiyerinde indirekt proporsiyon yöntemi ile İDT altın standart olarak kabul edildiğinde, PCR sonuçlarımız Tablo: 9'da verilmiştir. Her bir ilaç için in-house PCR testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif belirleyicilik değeri (PBD), negatif belirleyicilik değeri (NBD), ve iki test arasındaki uyum değerleri Tablo 10'da gösterilmiştir. Bu parametreler hesaplanırken 33 ÇİD-MTB ve kontrol olarak kullanılan 10 MTB izolatu birlikte değerlendirilmiştir

Tablo 9: PCR ve Konvansiyonel IDT Sonuçlarının Karşılaştırılması

TEST EDİLEN GEN BÖLGESİ	KÜLTÜR (+)		KÜLTÜR (-)		TOPLAM
	PCR(+)	PCR(-)	PCR(+)	PCR(-)	
rpoB	27	6	-	10	43
inhA	31	2	-	10	43
katG	25	8	-	10	43
gyrA	1	2	23	17	43
eis	1	-	19	23	43
rrs	1	-	13	29	43

Tablo 10: PCR Yönteminin Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Belirleyicilik Değerleri

LEN GEN BÖLGESİ	GERÇEK(+)	GERÇEK(-)	YALANCI(+)	YALANCI(-)	DUYARLILIK	ÖZGÜLLÜK	PBD	NBD	TEST UYUMU
rpoB	27	10	-	6	81	100	100	62	86
inhA	31	10	-	2	93	100	100	83	95
katG	25	10	-	8	75	100	100	55	81
gyrA	1	17	23	2	33	42	4	89	41
eis	1	23	19	-	100	54	5	100	55
rrs	1	29	13	-	100	69	7	100	69
Duyarlılık=Gerçek Pozitif Değer / Gerçek Pozitif Değer+ Yalancı Negatif Değer Özgüllük=Gerçek Negatif Değer/ Gerçek Negatif Değer + Yalancı Pozitif Değer Pozitif Belirleyicilik Değeri=Gerçek Pozitif Değer/ Gerçek Pozitif Değer + Yalancı Pozitif Değer Negatif Belirleyicilik Değeri=Gerçek Negatif Değer / Gerçek Negatif Değer +Yalancı Negatif Değer Testlerin Uyumu= Her İki Yöntemde Pozitiflerin Toplamı + Her İki Yöntemde Negatiflerin Toplamı / Toplam Örnek Sayısı									

Bu sonuçlara göre rifampisin direnci için rpoB geni saptamada duyarlılık ve özgüllük oranı sırası ile % 81 ve % 100 idi. İzoniazid direnci için inhA ve katG geni saptamada duyarlılık oranı % 93 ve % 75 olarak bulundu. Her iki test arasındaki uyum oranı rpoB, inhA ve katG için sırası ile % 86, % 95 ve % 81 olarak bulundu. İkinci kuşak ilaçlardan florokinolon grubu direnci saptama genleri gyrA için duyarlılık % 33 ve test uyumu % 41 idi. Aminoglikozid grubunda eis ve rrs genleri için ise duyarlılık oranları sırası ile % 100 ve %100 olarak saptandı. Bu gruptaki test uyumu oranları ise % 55 ve % 69 idi.

5 TARTIŞMA

Çoklu ilaca dirençli tüberküloz dünyada ve ülkemizde gittikçe artan önemli bir halk sağlığı sorunudur. ÇİD-TB; pahalı, karmaşık, müdahalesi zor olmasına rağmen tedavi edilebilir bir hastalıktır. Tedavisinde birinci kuşak ilaçlar ile birlikte florokinolon ve aminoglikozid grubu ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak ÇİD-TB'nin ortaya çıkmasından itibaren bu ilaçlara karşı da direnç geliştiği bildirilmiştir (142-145). DSÖ'nün 2018 de yayımladığı Küresel Tüberküloz Raporu'na göre ÇİD-TB olgularının % 8.5'inin YİD-TB olduğu tahmin edilmektedir (3). Yeni ÇİD-TB olgularının önüne geçilebilmesi için bu olguların erken ve doğru tanısı ile ÇİD-TB tedavisinde birinci ve ikinci kuşak ilaç duyarlılık testlerinin yapılması kritik önem taşımaktadır. Günümüzde bu amaçla kullanılan kültüre dayalı yöntemler ve moleküler testler bulunmaktadır. Ancak geleneksel ilaç duyarlılık yöntemlerinde (indirekt proporsiyon, mutlak konsantrasyon yöntemi) kullanılan katı veya sıvı besiyerlerinde bakterinin üretilmesine gerek duyulduğundan ve mikobakterinin yavaş üremesinden dolayı bu yöntem ciddi gecikmelere neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada özellikle ikinci basamak ilaçlar için in vitro testlerin uygulanmasının zahmetli, yorumlanmasının zor ve sınırlı sayıda merkezlerde çalışıldığı bildirilmiştir. Bu nedenlerden dolayı direncin tanımlanmasında hızlı moleküler saptama yöntemleri önemli bir ihtiyaç olmuştur (146). Bu amaçla kullanılan ticari moleküler testlerin (Xpert MTB/RIF, GenoType MTBDR/ MTB DRplus, dizi analizi) pahalı olması ve alt yapı gerektirmesi sebebi ile direnci tanımlayacak hızlı, pratik ve ucuz testler üzerinde çalışmalar devam etmektedir (147, 148). Çalışmamız konvansiyonel yöntemler ile ÇİD-MTB saptanan izolatlarda florokinolon ve aminoglikozid grubu ilaçlara karşı direnç genlerinin varlığının in-house PCR yöntemi ile saptanması ve etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile planlanmıştır.

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemlerle ÇİD-TB olduğu saptanan 33 izolatın 27 (% 81.8)'sinde rpoB, 31 (%93.9)'inde inhA ve 25 (% 75.7)'inde katG gen bölgesi pozitif olarak saptandı. Yapılan çalışmalarda INH direncinde en sık nedenin katG mutasyonları olmasına rağmen çalışmamızda InhA mutasyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi (105, 149).

Oudghiri ve ark. 2018 yılında Morocco'da yaptıkları çalışmada 703 MTB suşunda ilaç direncini değerlendirilmişlerdir. Birinci kuşak ilaçlara karşı yapılan ilaç duyarlılık testi sonucunda 703 suşun % 68.6'sı (482/703) RIF ve / veya INH dirençli olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatların % 28.2'si (198/703) RIF mono-dirençli, %

27.6'sı (194/703) INH mono-dirençli ve % 12.8'i (90/703) ÇİD-TB olarak belirlenmiştir. ÇİD-TB olarak belirlenen suşların ikinci kuşak ilaçlara karşı duyarlılık testleri yapılmış ve 20/90 (% 22.2)'si florokinolon grubu ilaçlara dirençli, 2/90 (% 2.22)'si kanamisin dirençli, 3/90 (% 3.33) amikasin dirençli olarak tespit edilmiştir (150).

Gupta ve ark. 2020 yılında Pekin'de yaptıkları çalışmada 76 MTB izolatı Multiplex-PCR ile değerlendirilmiştir. İzolatların 47 (% 61.8)'si RIF, 50 (% 65.7)'si INH'ye dirençli ve % 59.2 (45/76)'sinin ise ÇİD-TB olduğu belirlenmiştir (151).

Florokinolon direncinin global olarak araştırıldığı çalışmalarda mutasyonların %60 ile %90 arasında 88. kodon ile 90. kodonda olduğu tespit edilmiştir (152). Florokinolonlara karşı direnç mekanizması, gyrA ve gyrB genlerindeki nokta mutasyonlarıdır ve DNA girazın iki alt birimini kodlar. Florokinolonlara direnç sağlayan çoğu mutasyon, gyrA geninde Kinolon Direnci Belirleme Bölgesi (KDBB) olarak adlandırılan kısa bir segmentte meydana gelirken yapılan çalışmalar florokinolon direncinde gyrB mutasyonlarının daha az sıklıkla meydana geldiğini göstermiştir (152, 153). Çalışmamızda PCR testi ile 33 ÇİD-TB izolatında yapılan değerlendirmede gyrA gen bölgesi % 75.7 (25/33) olarak saptandı. Florokinolon grubu ilaçlar ÇİD-TB ve YİD-TB hastaların tedavisinde temel dayanak noktasıdır bununla birlikte florokinolon direnci gittikçe artma eğiliminde olup Ulusal Tüberküloz Kontrol Programlarının başarısını engellemektedir (154). Florokinolon direnç oranı belirtilen ülkelerde mutasyonların sıklığı Şangay'a (% 76.0) benzer, ancak Rusya (% 83.0), Hindistan (% 81.0) ve Tayland'dan (% 92.3) daha düşük ve Fas (% 30.0) ve New York (% 67.0)'tan daha yüksektir(155-160).

Li ve ark. tarafından 2019 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada 257 izolat spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemi ile değerlendirilmiş olup 170 (% 66.1)'inde INH ve 152 (% 59.1)'sinde RIF direnci saptanmıştır. Florokinolon grubu ilaçlara dirençli izolat sayısı 97 (% 37.7) olarak bildirilmiştir. Aynı zamanda 257 izolatın ofloxacin, levofloxacin, kanamisin ve amikasin direnci sırasıyla 84 (% 32.7), 56 (% 21.7), 52(% 20.2) ve 18 (% 7.0) şeklinde belirlenmiştir (161).

Ramarkarishma ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada 13 ÇİD-TB izolatı değerlendirilmiş ve bu izolatların eis bölgesindeki mutasyon 7/13 (% 53.9) olarak yüksek frekansta olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki rrs mutasyonu 2/13 (% 15.4)

olarak bildirilmiştir (162). Çalışmamızda eis gen bölgesinde %60.6 olarak daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Kateete ve ark. 2019 yılında eSwatini, Somali ve Uganda da yaptıkları çalışmada 38 ÇİD-TB izolatının %72.2'sinde gyrA ve gyrB mutasyonu saptamışlardır. Ayrıca, rrs'de ilaç direnci mutasyonları ikinci kuşak anti-TB enjekte edilebilir ilaca dirençli MDR izolatlarının % 64.3'ünde meydana geldiği bildirilmiştir (163). Çalışmamızda kullanılan izolatların 20/33 (% 60.6) eis gen bölgesine 14/33 (% 42.4) rrs gen bölgesine dirençli olduğu tespit edildi. Bu çalışma sonuçları çalışmamız sonuçları ile uyum içerisinde.

ÇİD-TB tedavisinde aminoglikozid grubu ilaçlardan olan kanamisin, amikasin ve kapreomisin, anahtar ilaçlar olarak kabul edilmektedir. Bu ilaçlara karşı artan direnç oranları ve bunlar arasındaki olası çapraz direnç ÇİD-TB tedavisinde önemli sorunlara neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ÇİD-TB olgularında aminoglikozid grubu ilaçlarda gittikçe artan bir direnç olduğu bildirilmektedir (164, 165). Eis promoter bölgesindeki mutasyonların büyük ölçüde KAN direnci ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. 16S rRNA bakteriyel alt birimini kodlayan rrs genindeki mutasyonların KAN'a yüksek düzeyde direnç, AMK ve bazen CAP'e karşı çapraz direnç oluşturduğu gösterilmiştir(166).

Çalışmamızda değerlendirilen izolatlardan 21 (% 63.6)'i rpoB'ye pozitif olup, bu izolatların inhA veya katG bölgelerinden birine ve ek olarak gyrA'ya da dirençli oldukları saptandı. İzolatların 18 (%54.5)'i ise rpoB, katG ve inhA direnç genlerinin her üçüne birden pozitif bulundu. İzolatların 21'i rpoB ve gyrA dirençli olup; katG-inhA bölgelerinden birine mutasyonel pozitif saptandı, aynı zamanda eis-rrs gen bölgelerinden birinde dirençli bulunarak YİD-TB olduğu belirlendi

Konvansiyonel yöntemlerle in-house PCR arasındaki bu farklılıkların konvansiyonel (fenotipik) yöntemlerle tespit edilemeyecek kadar düşük seviyeli olan direncin moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve LJ besiyerinde duyarlılık testlerinin yapılmasını olumsuz şekilde etkileyen (örneğin; antibiyotikleri bağlayan yüksek protein içeriği gibi) nedenler olabileceği düşünülmektedir.

Birinci ve ikinci kuşak ilaçlar için Löwenstein-Jensen besiyerinde konvansiyonel IDT altın standart olarak kabul edildiğinde PCR testinin birinci kuşak ilaçlardan rifampisin için rpoB genini saptamadaki duyarlılığı % 81 izoniazid için inhA ve katG saptamadaki duyarlılığı % 93 ve % 75 olarak bulundu. PCR testinin ikinci kuşak ilaçlar

grubunda bulunan florokinolon ve aminoglikozid direnç genleri gyrA, eis ve rrs genlerini belirlemedeki duyarlılık oranı sırası ile % 33, % 100, % 100 d . İki test arasındaki uyum oranı ise birinci kuşak ilaçlar için % 81- 95 arasında ve ikinci kuşak ilaçlar için % 41-69 olarak bulundu.

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre in-house PCR testinin direnç saptamada tek başına kullanılması doğru değildir. Direncin tanımlanmasında konvansiyonel ilaç duyarlılık testlerine destekleyici veya ön tarama testi olarak kullanılabilir. Ancak testin iyi standardize edilmesi oldukça önemlidir. Rutin kullanımda değerlendirme için daha fazla sayıda örnekle değerlendirilmesi gerekmektedir.



6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Adıyaman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi ile gönüllülük esasına göre Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi'nden Dr. İsmail Ceyhan'dan temin edilen 33 adet ÇİD-MTB ve 10 adet duyarlı izolat birinci ve ikinci kuşak anti-TB ilaçlara karşı duyarlılıkları yönünden In-house PCR yöntemi ile değerlendirilmesi sonucunda;

1. Değerlendirilen 33 adet ÇİD-TB izolatın florokinolon direnci ve aminoglikozid direncinin yüksek olması ÇİD-TB'ye karşı daha sıkı önlemlerin alınması ve antibiyotik kullanımının daha düzenli bir şekilde yapılması
2. Özellikle ikinci kuşak ilaçlar karşı direnç oranlarının yeteri kadar saptanmaması gerçek direnç oranlarının saklı kalmasına sebep olabilir. Bu bağlamda ülkemizin her bölgesinde her hasta için standart bir yöntemle ikinci kuşak ilaçlara karşı direncin belirlenmesi ve ilaç direnci ile ilgili geniş dataların oluşturulması
3. Çalışmamızda sınırlı sayıda ÇİD-TB kullanıldığından dolayı daha geniş çalışmaların yapılması gerektiği
4. Çalışmamızla ilgili sonuçların DNA sekans analizi ile desteklenmesi gerektiği
5. GyrA gen bölgesi ile birlikte gyrB gen bölgesindeki direnç mutasyonlarının belirlenmesi florokinolon bölgesine direncin daha doğru tanımlanmasında yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

7 KAYNAKLAR

1. Tomioka H, Namba K. Development of antituberculous drugs. current status and future prospects. *Kekkaku Tuberculosis*, 2006, 81(12), 753-774.
2. Baylan O. tensively drug resistant and extremely drug resistant tuberculosis forms after multi-drug resistant tuberculosis: new faces of the old disease. *Mikrobiyol Bul* 2011, 45(1):181-95.
3. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. [https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/]. (Erişim Tarihi: 25/10/2019).
4. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye’de Verem Savaşı 2019 Raporu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüberküloz Daire Başkanlığı, Sağlık Bakanlığı Yayını No: 1109, 2018, s: 65. Artı6 Medya Matbaacılık, Ankara.
5. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Molecular Genetics of Mycobacteria*, 2014, 2 479-491.
6. Unissa AN, Hanna LE, Swaminathan S. A note on derivatives of isoniazid, Rifampicin, and pyrazinamide showing activity against resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical biology & drug design*. 2016, 87(4), 537-550.
7. Bektöre B, Haznedaroğlu T, Baylan O, Özyurt M, Özkütük N, Şatana D, Seber E. Investigation of extensive drug resistance in multidrug resistance tuberculosis *Mikrobiyol Bul* 2013, 47 (1): 59-70.
8. Aksu M, Şaşmaz T, Bayrak H. Akciğer tüberkülozlu olgulardan izole edilen *Mycobacterium Tuberculosis* izolatlarında primer tüberküloz ilaç direncinin araştırılması. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi*.2019, 4(2):122-30
9. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev*1995, 8(4): 496-514.
10. Orhan KF, Aktaş AS, Yiğit N. Klinik örneklerden izole edilen *mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının birinci ve ikinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığın sensititre mycotb plate yöntemi ile araştırılması. *Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi* 2018, 23(1):31-38.

11. Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2004, 9 975-994.
12. Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrugresistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2010, Sep;10(9):621-629.
13. Çilli A. Antitüberküloz ilaçlar ve etki mekanizmaları. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. 2003, 163-170.
14. Durmaz R. Tüberkülozda hızlı moleküler tanı testleri. *ANKEM Derg* 2012, 26(Ek 2):72-81.
15. Viegas SO. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates in Mozambique. Karolinska Institutet, tumor-and cell biology/Dept of Microbiology. Sweden,2011.
16. Şimşek H, Gülhan M, Özkan AT. *Her Yönüyle Tüberküloz* Ankara Sözkese Matbaacılık 2019, 1-13.
17. Barış Yİ. Dünyada tüberküloz'un tarihi. *Konuralp Tıp Dergisi*. 2010, 3(2), 1-4.
18. Peterson R. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. Karolinska Institutet, Dept of Microbiology tumor-and cell biology/Dept of Microbiology. Sweden, 2009.
19. Daniel TM. Captain of the Death.The story of tuberculosis.Univesity of Rochester. Center for Global Health and Diseases, Case Western Reserve University School of Medicine, New York, USA 2006.
20. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW.DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(5), 1143-1147.
21. Haggard A. Doctor In History. Dorset Press. New York 1989.
22. Özgür D. Primer anti-tüberküloz ilaçlara dirençli ve duyarlı Mycobacterium izolatlarında pirazinamid direnci ile ilişkili PNCA, PRSA ve PAND gen mutasyonlarının araştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2019.

23. Moliva JJ, Turner J, Torrelles JB. Prospects in Mycobacterium bovis Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis?. *Vaccine*, 2015, 33(39), 5035-5041
24. Barış İY. Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Dergisi*, 2002, 3(3): 338-340.
25. Barış İY. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. 2003, 1-7.
26. Sanıç A, Çoban A. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı Kitabı. Samsun. 1999.
27. Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *The Medical clinics of North America*. 1993, 77(6), 1205-1217.
28. Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis drug resistance and the history of modern medicine. *New England Journal of Medicine* 2012, 367(10), 931-936.
29. 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.
30. Köksal F. Mycobacterium tuberculosis'te direnç problemi. I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 2011, s92-94, Antalya.
31. Furin, J. The clinical management of drug-resistant tuberculosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 2007, 13(3), 212-217.
32. Köksal F. Tüberküloz basilinin kaynak ve evrimi. Tüberküloz Sempozyum kitapçığı, Malatya: 2003, 34-47.
33. S Sürücüoğlu. Tüberküloz basilinin identifikasyonu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun
34. Bozkurt H. Çok ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis kökenlerinde artmış ilaç direncinin tespiti. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.Uzmanlık Tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2009.
35. Liu Z, Shilkret KL, Finelli L. Epidemiology of drug-resistant tuberculosis in New Jersey from 1991 to 1995. *Int J Epidemiol* 1998, 27:121-126

36. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. 2003, 34-47.
37. Özışık N. Çok ilaca dirençli tüberküloz hastalarında BACTEC ve Agar Proporsiyon yöntemi ile saptanan etionamid direncinin klinik önemi. Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul. 2006.
38. Medjahed H, Gaillar, JL, Reyat J. M. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. *Trends in microbiology* 2010, 18(3), 117-123.
39. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis From basic science to patient care 2007, Cheapter 1 25-49.
40. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğancı L. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen mycobacterium tuberculosis kompleks (mtc) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Klimik dergisi*, 2007, 20(1), 20-22.
41. Avkan V. Tüberküloz basilinin bulaş yolları ve konaktaki seyri 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
42. Çetin M. Tüberküloz basilleri kompleksi'nin izoniazid ve rifampisin duyarlılıklarının Real-Time PCR (Floresans Rezonans Enerji Transferi) yöntemi ile araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Samsun:Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2002.
43. Öğretensoy M. Tüberkülozda bulaşma *Tüberküloz Sempozyum kitapçığı*, Malatya: 2003.
44. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, Bloom BR. Transmission of tuberculosis in New York City--an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *New England Journal of Medicine*, 1994, 330(24), 1710-1716.
45. Cantepe EC. Tüberküloz hastalarında mannoz bağlayıcı lektin ve tümör nekrosis faktör-alfa gen polimorfizmlerinin araştırılması Uludağ üniversitesi tıp fakültesi göğüs hastalıkları anabilim dalı. Uzmanlık tezi, Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2009.

46. Ceyhan İ, Şimşek H, Tarhan G. Tüberkülozun tanısında % 2 ogawa besiyerinin löwenstein-jensen besiyeri ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2012, 46(1), 33-8
47. Özakin C, Gedikoğlu S. Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü: tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun
48. Ceyhan İ. Tüberkülozda örnek alma, mikroskopi ve mikroskopinin kalite kontrolü. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun
49. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, 2014
50. Kantor IS, Kım SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Rieder H. Laboratory services in tuberculosis control. For the Global Tuberculosis Programme, World Health Organization, Geneva, Switzerland 1998.
51. Uzun M. Örneklerin işlenmesi ve kültür yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
52. Kocagöz T. Etkin Tüberküloz tanısı için nerede, ne zaman, hangi inceleme. *ANKEM Derg* 2007, 21(Ek 2):261-265
53. Özden M. Mycobacterium tuberculosis izolasyonu öncesinde uygulanan iki farklı dekontaminasyon, homojenizasyon işleminin karşılaştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, yüksek lisans tezi, Ankara: Hacettepe üniversitesi, 2019.
54. Sarıgüzel N. Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun
55. Yetkin G. Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısı. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2011, 4(2)
56. Başkesen T, Sürücüoğlu S, Özkütük N, Ecem T. Comparison of Löwenstein Jensen medium and BACTEC 460TB culture system for diagnosis of tuberculosis. *Türkiye Klinikleri tıp Bilimleri Dergisi*, 2010, 30(5), 1469-1475

57. Winn WC. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 2006.
58. Ådjers-Koskela K, Katila ML. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 2003, 41(3), 1235-1239.
59. Morcillo N, Scipioni S, Vignoles M, Trovero A. Rapid diagnosis and susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to antibiotics using MGIT system. *Revista Argentina de microbiologia*, 1998, 30(4), 155-162.
60. Cambau E, Wichlacz C, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Evaluation of the new MB Redox system for detection of growth of mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, 1999, 37(6), 2013-2015.
61. Silva PA, Ainsa J. Drugs and drug interactions. In: Palamino JC, Leao SC, Rittacco V (eds). Tuberculosis 2007, From basic science to patient care. 1st edition. 2007. 593-634.
62. Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. Bactec MGIT 960 TB system. Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects Borstel, Germany 2006.
63. Çetin Sesli E, Aynalı A, Öztürk T, Özseven A, Kaya S. Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonunda Löwenstein-Jensen besiyeri kültürü, ve Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube 960 sisteminin değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2012, 19(1), 12-16.
64. Van Griethuysen AJ, Jansz AR, Buiting AG. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB system, Septi-Chek AFB system, and Lowenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(10), 2391-2394.
65. Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T. Clinical evaluation of difco ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, 1997, 35(1), 121-124.
66. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismond MR, Bono L, Marone P. Multicenter comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460TB and with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *Journal of clinical microbiology*, 1998, 36(5), 1378-1381.

67. Ruiz P, Zerolo FJ, Casal MJ. Comparison of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using the ESP culture system II with that using the BACTEC method. *Journal of clinical microbiology*, 2000, 38(12), 4663-4664.
68. Rohner P, Ninet B, Metral C, Emler S, Auckenthaler R. Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(12), 3127-3131.
69. Sağlam S. Mycobacterium tuberculosis suşlarında anti-tüberküloz ilaçlara direncin moleküler yöntemlerle araştırılması Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2016.
70. Zeytinli Oral Ü. Çukurova Bölgesinde Akciğer Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen Mycobacterium Tuberculosis Suşlarının Spoligotyping Ve Miru-Vntr (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unitvariable Number Of Tandem Repeat) Yöntemiyle Tiplendirilmesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi Adana: Çukurova Üniversitesi, 2010.
71. Özyurt M. Tüberkülozun laboratuvar tanısında kullanılan moleküler ticari tanı sistemleri. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(2): 319-331.
72. Van Klingeren B, Dessens-Kroon M, van der Laan, T, Kremer K, van Soolingen D. Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex by use of a high-throughput, reproducible, absolute concentration method. *Journal of clinical microbiology*, 2007, 45(8), 2662-2668.
73. Varaldo PE. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2002, 50(1), 1-4.
74. Simone PM. Essential components of a tuberculosis prevention and control program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *Morbidity and mortality weekly report: recommendations and reports*, 1995, 16.
75. Köksalan OK. Günümüzde tüberküloz tanısı / güçlükleri *ANKEM Derg* 2010, 24(Ek 2):61-63.
76. Tansel Ö. Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. 2003, 347-351.

77. Güney T. Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarında izoniazid ve rifampin direncinin belirlenmesinde GenoType mtbdr yönteminin kullanımı tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı uzmanlık tezi Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2011.
78. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Piersimoni C. Direct identification of mycobacteria from MB/BacT alert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *Journal of clinical microbiology*, 2001, 39(9), 3222-3227.
79. Çalık S. Çukurova üniversitesi tropikal hastalıklar araştırma ve uygulama merkezi ve bölge tüberküloz laboratuvarına gönderilen balgam örneklerinden izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının major ve minör antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi Adana: Çukurova Üniversitesi, 2012.
80. Wanger A, Mills K. Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(7), 1672-1676.
81. Cowan HE, Falkinham JO. A luciferase-based method for assessing chlorine-susceptibility of Mycobacterium avium. *Journal of microbiological methods*. 2001, 46(3), 209-215.
82. Alp A. Mycobacterium tuberculosis' in antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık testinde yeni yöntemler. *Mikrobiyoloji bülteni* 1996 30: 409-417
83. Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2007, 5(2), 75-82.
84. Norden MA, Kurzynski TA, Bownds SE, Callister SM, Schell RF. Rapid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) by flow cytometry. *Journal of clinical microbiology*, 1995, 33(5), 1231-1237.
85. Durmaz R. Mycobacterium tuberculosis suşlarında direncin belirlenmesinde moleküler yöntemler *ANKEM Derg* 2010, 24(Ek 2):64-70
86. Horne DJ, Kohli M, Zifodya JS, Schiller I, Dendukuri N, Tollefson D, Steingart KR. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019, (6).

87. Cesur S, Şimşek H. Çoklu ilaca ve yaygın ilaca dirençli tüberküloz için hızlı tanı yöntemleri. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 2015, 7(2).
88. Cho SN. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei medical journal*, 2007, 48(3), 347-359.
89. Esen N. Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde moleküler yöntemlerin değeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11-12 Haziran 2003, Samsun. Sempozyum Kitabı, s: 402-8.
90. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni nesil DNA dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2011, 1(1), 11-18
91. Çavuşoğlu C. Mycobacterium tuberculosis’de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun
92. Durmaz R. DNA baz dizi analizi. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001, 169-71.
93. Juréen P, Werngren J, Hoffner SE. Evaluation of the line probe assay (LiPA) for rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 2004, 84(5), 311-316.
94. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk, P, Portaels, F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1997, 41(10), 2093-2098.
95. Çiftçi A. Antimikrobiyel direncin genetik metotlar ile saptanması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2003, 1(1), 22-28.
96. Albay A, Güney M, Tekin K, Kısa Ö, Sığ AK. Pulmoner ve ekstrapulmoner örneklerde tüberkülozun erken tanısı ve rifampisin direncinin tespiti için geneXpert MTB/RIF testinin değerlendirilmesi. *Cukurova Medical Journal*, 2016, 41(3), 548-553.
97. Genç GE, Yılmazlı Ö, Şatana D, Erturan Z, Uzun M. Mycobacterium tuberculosis kompleksinin varlığının saptanmasında ve rifampisine direncinin belirlenmesinde Xpert Mtb/Rif testinin değerlendirilmesi. *Ankem Derg*, 2017, 31(2), 67-74.
98. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-

- associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 2000, 38(9), 3194-3199.
99. Brown TA. Gene Cloning & DNA Analysis. Çeviri: Bardakçı F, Yenidünya AF, Yılmaz N. Gen Klonlama ve DNA Analizi 5. Baskı. Ankara: Nobel Yayıncılık; 2013, 9-12.
100. 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). *Clinical microbiology and infection*. 2007, 13(12), 1144-1156.
101. Çilli A. Antitüberküloz ilaçlar ve etki mekanizmaları. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11-12 Haziran 2003, Samsun.
102. Dural Özalp EA. Farmakoloji 4. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2008, s.466-468
103. Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005, 45: 529-564.
104. Mitchison DA. Mechanisms of the action of drugs in the short-course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc* 1985, 60: 36-40.
105. Gönlügür T, Gönlügür U. INH direnç mekanizmaları. *Dicle Tıp Dergisi*, 2017, 44(3), 287.
106. Sanıç A. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemlerin yeri. *ANKEM Derg* 2007, 21:81-5.
107. Yang Z, Durmaz R, Yang D, Gunal S, Zhang L, Foxman, B. ve diğerleri. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005, 53 (3), 201-208.77
108. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11-12 Haziran 2003, Samsun.
109. Unissa AN, Hanna LE. Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: rifampicin and

- pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. *Tuberculosis*, 2017, 105, 96-107.
110. Hu Y, Coates AR, Mitchison DA. Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2006, 10(3), 317-322.
 111. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(5), 790-795.
 112. Musser MJ. Antimicrobial Agent Resistance in *Mycobacteria*: *Molecular Genetic Insights*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995, 8 (4): 496-514.
 113. Xu Y, Jia H, Huang H, Sun, Z, Zhang Z. Mutations found in *embCAB*, *embR*, and *ubiA* genes of ethambutol-sensitive and-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *BioMed research international*, 2015.
 114. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B. Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting *embB306* mutations. *J Clin Microbiol* 2002, 40 (5), 1617-1620.
 115. Ramaswamy S, Musser JM. (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung disease*, 1998, 79(1), 3-29.
 116. Kolyva AS, Karakousis PC. Old and new TB drugs: mechanisms of action and resistance. *Understanding Tuberculosis–New Approaches to Fighting Against Drug Resistance. Europe: InTech*, 2012, 209-32.
 117. Bacchi A, Pelizzi G, Nebuloni M, Ferrari P. Comprehensive Study on Structure– Activity Relationships of Rifamycins: Discussion of Molecular and Crystal Structure and Spectroscopic and Thermochemical Properties of Rifamycin O. *Journal of medicinal chemistry*. 1998, 41(13), 2319-2332.
 118. Vale N, Gomes P, A Santos H. Metabolism of the antituberculosis drug ethionamide. *Current drug metabolism*. 2013, 14(1), 151-158
 119. Peloquin CA. Antituberculosis drugs: pharmacokinetics. *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*, 1991, 59-88.

120. Antituberculosis drugs Peter R Donald and Helen McIlleron chapter 59
S.J. Enna, David B. Bylund, in xPharm: The Comprehensive Pharmacology
Reference. 2007.
121. Xu C, Kreiswirth BN, Sreevatsan S, Musser JM, Drlica K.
Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in
clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal
of Infectious Diseases*, 1996, 174(5), 1127-1130.
122. Young LS, Berlin OG, Inderlied, CB. Activity of ciprofloxacin and other
fluorinated quinolones against mycobacteria. *The American journal of
medicine*. 1987, 82(4A), 23-26.
123. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Current opinion in
microbiology*. 1999, 2(5), 504-508.
124. Rubinstein E, Keynan, Y. Quinolones for mycobacterial infections.
International journal of antimicrobial agents. 2013, 42(1), 1-4.
125. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF,
Mayer C, Aubry A. A systematic review of gyrase mutations associated with
fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed
gyrase numbering system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012,
67(4), 819-831.
126. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on
fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 32 2001, S9-S15.
127. Mirsaeidi, M. After 40 years, new medicine for combating TB.
International journal of mycobacteriology. 2013, 2(1), 1.
128. Mahajan R. Bedaquiline: first FDA-approved tuberculosis drug in 40
years. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* 2013,
3(1), 1.
129. Kıtıta F. *Mycobacterium tuberculosis* klinik izolatlarında yeni
antitüberküloz ilaçlar olan bedaquiline ve delamanid'in mik değerlerinin ve
dirence neden olan mutasyonların saptanması Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
Doktora Tezi, Ankara Hacettepe Üniversitesi: 2020.
130. Andries K, Vıllellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, Koul, A.
Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PloS
one*, 2014, 9(7)

131. Evranos-Aksöz B. Tüberküloz tedavisinde yeni ilaç adayları. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology* 2014, 71(4).
132. Xavier AS, Lakshmanan M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2014, 5(3), 222.
133. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, Farhat M. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(8), 2031-2043
134. Lee M, Lee J, Carroll MW, Choi H, Min S, Song T, Barry CE. Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 2012, 367(16), 1508-1518.
135. Zignol M, Cabibbe AM, Dean AS, Glaziou P, Alikhanova N, Ama C, Cirillo DM. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018, 18(6), 675-683.
136. Özkara Ş. Çok ilaca dirençli /yaygın ilaca dirençli tüberküloz tanımı dünyada ve türkiyede sorunun boyutu. *Türkiye klinikleri dergisi* 2015, 8(3) s 80-86.
137. Özkara Ş. Sağlık kurumlarında tüberküloz bulaşması ve korunma21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 11-12 Haziran 2003, Samsun.
138. Bilgiç H. Türkiye de Tüberkülozun durumu ve eradikasyon programı 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
139. Kıter G, Uçan ES. Tüberkülozdan Korunma. *Toraks dergisi*,2(1) 2001, s,85-90.
140. Çevirme A. Dünyada ve Türkiye’de Tüberkülozun Önlenmesi ve Kontrolü ile İlgili Yasalar. *Turkiye Klinikleri J Intern Med Nurs-Special Topics* 2017, 3(1):1-6.
141. Ergin A, Kocagöz T, Us D. Evaluation of 120 Mycobacterial Strains Isolated from Clinical Specimens to the Species Level by Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis. *Scand J Infect Dis* 2000, 32:657-62).

142. Terzi HA, Aydemir Ö, Karakeçi E, Köroğlu M, Altındış M. M. *tuberculosis* kompleks izolatlarının antitüberküloz ilaçlara direnç oranlarında yıllara göre değişim *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi* 2019, 4(1) s:47-56.
143. Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, Murray M, Theron G, Udwadia Z, Warren R. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *The lancet Respiratory medicine*, 2014, 2(4), 321-338.
144. Lin, H. C., Perng, C. L., Lai, Y. W., Lin, F. G., Chiang, C. J., Lin, H. A., & Chiueh, T. S. Molecular screening of multidrug-resistance tuberculosis by a designated public health laboratory in Taiwan. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2017, 36(12), 2431-2439.
145. Becerra M, Appleton C, Franke SC, Chalco MF, Arteaga, F, BayonaJ, Mitnick CD. Tuberculosis burden in households of patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 2011, 377(9760), 147-152.
146. Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Journal of clinical microbiology*, 2010, 48(5), 1683-1689.
147. Xie YL, Chakravorty S, Armstrong DT, Hall SL, Via LE, Song T, Gao Q. Evaluation of a rapid molecular drug-susceptibility test for tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(11), 1043-1054.
148. Kim S, Kim Y, Chang Y, Hirgo, WK, Chang CL, Shim TS, Lee, H. Comparison of quantamatrix multiplexed assay platform and GenoType MTBDR assay Using smear-positive sputum specimens from patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10, 1075.
149. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: update 2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2015, 19(11), 1276-1289.
150. Oudghiri A, Karimi H, Chetioui F, Zakham F, Bourkadi JE, Elmessaoudi, MD, El Mzibri M. Molecular characterization of mutations associated with

- resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco. *BMC infectious diseases*, 2018, 18(1), 98.
151. Gupta A, Sinha P, Nema V, Gupta PK, Chakraborty P, Kulkarni S, Anupurba S. Detection of Beijing strains of MDR M. tuberculosis and their association with drug resistance mutations in kat G, rpo B, and emb B genes. *BMC infectious diseases*, 2020, 20(1), 1-7.
 152. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J, & Rodwell, T. Frequency and geographic distribution of gyrA and gyrB mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates: a systematic review. 2015, 10(3).
 153. Nosova EY, Bukatina AA, Isaeva YD, Makarova MV, Galkina KY, Moroz AM. Analysis of mutations in the gyrA and gyrB genes and their association with the resistance of Mycobacterium tuberculosis to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin. *Journal of medical microbiology*, 2013, 62(1), 108-113.
 154. Pantel A, Petrella S, Veziris N, Brossier F, Bastian S, Jarlier V, Aubry A. Extending the definition of the GyrB quinolone resistance-determining region in Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in M. tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56(4), 1990-1996.
 155. Sullivan EA, Palumbo L, Ebrahimzadeh A, Frieden TR, Kreiswirth BN, Kapur V, Musser JM. Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City. *The Lancet*, 1995, 345(8958), 1148-1150.
 156. Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, Potapova Y, Vishnevsky B, Narvskaya O, Rastogi N. Molecular characterization of ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Russia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008, 52(8), 2937-2939.
 157. Zhu C, Zhang Y, Shen Y, Siu GK, Wu W, Qian X, Zhang W. Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Shanghai, China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2012, 73(3), 260-263.
 158. Disratthakit A, Prammananan T, Tribuddharat C, Thaepisuttikul I, Doi N, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. Role of gyrB mutations in pre-

- extensively and extensively drug-resistant tuberculosis in Thai clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(9), 5189-5197.
159. Singhal R, Reynolds PR, Marola JL, Epperson LE, Arora J, Sarin R, Salfinger M. Sequence analysis of fluoroquinolone resistance-associated genes *gyrA* and *gyrB* in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients suspected of having multidrug-resistant tuberculosis in New Delhi, India. *Journal of clinical microbiology*, 2016, 54(9), 2298-2305.
 160. Chaoui I, Oudghiri A, El Mzibri M. Characterization of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2018, 12, 171-174.
 161. Li Q, Gao H, Zhang Z, Tian Y, Liu T, Wang Y, Dai, E. Mutation and transmission profiles of second-line drug resistance in clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Hebei Province, China. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10, 1838.
 162. Ramakrishna V, Singh PK, Prakash S, Jain A. Second Line Injectable Drug Resistance and Associated Genetic Mutations in Newly Diagnosed Cases of Multidrug-Resistant Tuberculosis. 2020, Microbial Drug Resistance
 163. Kateete DP, Kamulegeya R, Kigozi E, Katabazi FA, Lukoye D, Sebit SI, Dlamini MG. Frequency and patterns of second-line resistance conferring mutations among MDR-TB isolates resistant to a second-line drug from eSwatini, Somalia and Uganda (2014–2016). *BMC pulmonary medicine*, 2019, 19(1), 124.
 164. Jugheli L, Bzekalava N, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, 53(12), 5064-5068.
 165. Evans J, Segal H. Novel multiplex allele-specific PCR assays for the detection of resistance to second-line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2010, 65(5), 897-900.
 166. Yuan X, Zhang T, Kawakami K, Zhu J, Li H, Lei J, Tu S. Molecular characterization of multidrug-and extensively drug-resistant *Mycobacterium*

tuberculosis strains in Jiangxi, China. *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50(7), 2404-2413.



8 EKLER

