

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Cemilenur ATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023-ANTALYA

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ  
PRİMER ANTİ-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI  
DUYARLILIĞININ HIZLI TESPİTİNDE DİSK TEMELLİ  
YENİ BİR YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ**

Cemilenur ATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023-ANTALYA

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARININ  
PRİMER ANTİ-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI  
DUYARLILIĞININ HIZLI TESPİTİNDE DİSK TEMELLİ  
YENİ BİR YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ**

Cemilenur ATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından ..... Anabilim Dalı  
.....Programında ..... tezi olarak kabul  
edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : .....  
(Ünvanı, Adı Soyadı)  
(Üniversite)

Üye : .....  
(Ünvanı, Adı Soyadı)  
(Üniversite)

Üye : .....  
(Ünvanı, Adı Soyadı)  
(Üniversite)

Üye : .....  
(Ünvanı, Adı Soyadı)  
(Üniversite)

Üye : .....  
(Ünvanı, Adı Soyadı)  
(Üniversite)

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun  
görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../.....  
sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Cemilenur ATAŞ

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

İmza

## TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden bu yana kadar birlikte çalıştığımız değerli danışman hocam aynı zamanda Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi (AKVUAM) müdürü Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a ve değerli hocam Dr. Kübra YILDIRIM'a, akademik bilgi birikimi ve deneyimlerinden faydalanma imkânı sundukları için, tez çalışmam boyunca gösterdikleri ilgi ve destekleri için, eğitimim süresince her konuda fikirlerimi sabırla dinleyip, destekledikleri ve farklı bakış açıları kazandırdıkları için teşekkür ederim. Laboratuvar çalışma disiplinlerini örnek aldığım değerli hocalarıma en çok da tüberküloz alanını sevmemde ve bu alanda yetişmemdeki büyük katkıları için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana her zaman destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan eğitim hayatımda örnek aldığım kıymetli hocam Doç. Dr. Ece Şimşek'e

AKVUAM bünyesinde birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, laboratuvar eğitimimde büyük katkıları olan ve her konuda desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Orhan KOÇAK, Serhat BOZKURT ve Esra TANYEL AKÇİT'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım AKVUAM'daki tüm ekip arkadaşlarıma destekleri için

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

## ÖZET

**Amaç:** Tüberküloz (TB) günümüzde küresel bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. TB kontrol programları için ilaca direncin hızlı tespiti kritik önem taşımaktadır. Bu çalışmada çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* (ÇİD-TB) izolatlarının primer anti-TB ilaç duyarlılığının belirlenmesi için disk temelli yeni bir yöntemin geliştirilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Toplamda 4 tanesi referans (*M. tuberculosis* H37Rv, ATCC-35838, ATCC-35820, ATCC-35837) 3 tanesi klinik (2 adet duyarlı, 1 adet ÇİD-TB) olmak üzere 7 *M. tuberculosis* suşu kullanıldı. Suşlar yeni geliştirilen disk temelli yöntemde nitrat redüktaz testi (NRT) ve rezasurin testi ile birlikte uygulandı. İlaç duyarlılık sonuçları referans yöntem olarak agar proporsiyon test sonuçları ile karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Her iki kolorimetrik test sonuçları ile agar proporsiyon sonuçları karşılaştırıldığında özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve uyum %100 saptandı. İlaç duyarlılık sonuçları agar proporsiyon yöntem ile tüm suşlar için inkübasyonun 21. gününde, rezasurin testi ile inkübasyonun 9. gününde ve NRT ile 5-7 günde sonuçlandı.

**Sonuç:** Disk temelli yeni geliştirilen ilaç duyarlılık yöntemi kolorimetrik testlerle birlikte uygulandığından mevcut yöntemlere kıyasla daha hızlı sonuç vermektedir. Antibiyotik stabilitesini korumada disk temelli olmasından ötürü diğer yöntemlerden daha avantajlıdır. Yöntem uygulanma açısından kolay ve pratiktir. Performansının değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, ilaç duyarlılık testi, antibiyotik diski, ÇİD-TB

## ABSTRACT

**Objective:** Tuberculosis (TB) continues to be a global public health problem today. Rapid detection of drug resistance is critical for TB control programs. In this study, it was aimed to develop a new disc-based method for the determination of primary anti-TB drug susceptibility of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) isolates.

**Method:** A total of 7 *M. tuberculosis* strains were used, of which 4 reference (*M. tuberculosis* H37Rv, ATCC-35838, ATCC-35820, ATCC-35837) and 3 clinical isolate (2 susceptible, 1 MDR-TB). Strains were applied in the newly developed disc-based method together with nitrate reductase assay (NRA) and resazurin assay. Drug susceptibility results were compared with the agar proportion test results as a reference method.

**Results:** Specificity, sensitivity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and agreement were found as 100% between both colorimetric test results and agar proportion results. Drug susceptibility results were obtained on the 21st day of incubation for all strains by the agar proportion method, on the 9th day of incubation with the resazurin test, and at 5-7 days with NRA.

**Conclusion:** The newly developed disc-based drug sensitivity method gives faster results compared to existing methods, since it is applied together with colorimetric tests. It is more advantageous than other methods because it is disc-based in maintaining antibiotic stability. The method is easy and practical in terms of implementation. More studies are needed to evaluate its performance.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, drug susceptibility test, antibiotic disc, MDR-TB,

## İÇİNDEKİLER

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ÖZET</b>                                                     | i   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                 | ii  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                              | iii |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                          | iv  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                          |     |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>                                  |     |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                 | 1   |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                        |     |
| 2.1. Tüberkülozun Tarihçesi                                     | 2   |
| 2.2. Dünyada ve Türkiyede Tüberkülozun Epidemiyolojisi          | 5   |
| 2.3. <i>M. tuberculosis</i> 'in Bakteriyolojik Özellikleri      | 6   |
| 2.4. Mikobakterilerin Taksonomisi                               | 7   |
| 2.5. <i>M. tuberculosis</i> 'in Genomik Özellikleri             | 9   |
| 2.6. <i>M. tuberculosis</i> 'in Patogenezi ve Bulaş Mekanizması | 10  |
| 2.7. TB Enfeksiyonu için Testler                                | 11  |
| 2.7.1. Tüberkülin Deri Testi (TDT)                              | 12  |
| 2.7.2. İnterferon Gama Salınım Testi (IGRA)                     | 12  |
| 2.8. TB Tedavisinde Kullanılan Primer Anti-TB İlaçlar           | 12  |
| 2.8.1. İzoniazid (İNH)                                          | 13  |
| 2.8.2. Rifampisin (RİF)                                         | 13  |
| 2.8.3. Etambutol (EMB)                                          | 14  |
| 2.8.4. Pirazinamid (PZA)                                        | 14  |
| 2.8.5. Streptomisin (STR)                                       | 14  |
| 2.9. İlaç Duyarlılık Testleri (İDT)                             | 15  |
| 2.9.1. Proporsiyon Yöntemi                                      | 15  |
| 2.9.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi                             | 16  |
| 2.9.3. Direnç-Oran Yöntemi                                      | 16  |



|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 2.9.4. Otomatize Sıvı Kùltür Sistemleri | 17 |
| 2.9.5. Hızlı Molekùler Testler          | 18 |
| 2.9.6. Kolorimetrik Yöntemler           | 19 |

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. <i>M. tuberculosis</i> Suşları                                                                       | 21 |
| 3.2. Bakteri İnokulumlarının Hazırlanması                                                                 | 21 |
| 3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması                                                                          | 22 |
| 3.3.1. Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyeri                                                                      | 22 |
| 3.3.2. Mueller-Hinton II (MH) Agar Besiyeri                                                               | 22 |
| 3.3.3. Middlebrook 7H10 Agar Besiyeri                                                                     | 23 |
| 3.4. Ayıracıların Hazırlanması                                                                            | 24 |
| 3.4.1. Rezasurin Solüsyonu                                                                                | 24 |
| 3.4.2. Griess Ayıracı                                                                                     | 24 |
| 3.5. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması                                                        | 25 |
| 3.6. Antibiyotik Diskleri                                                                                 | 26 |
| 3.6.1. Antibiyotik Disklerinin Hazırlanması                                                               | 26 |
| 3.6.2. Disklerin Hazırlık Aşaması ve Etkinliğinin<br>Güvenilirliğinin Test Edilmesi                       | 29 |
| 3.7. Disk Temelli Yeni Fenotipik İlaç Duyarlılık Yöntemi                                                  | 30 |
| 3.7.1. Disk Temelli Yeni Yöntemin NRT ile Birlikte<br>Uygulanması ve Testin Değerlendirilmesi             | 31 |
| 3.7.2. Disk Temelli Yeni Yöntemin Rezasurin Testi ile<br>Birlikte Uygulanması ve Testin Değerlendirilmesi | 32 |
| 3.8. 7H10 Agar Besiyerinde Proporsiyon Yöntemin<br>Uygulanması ve Testin Değerlendirilmesi                | 33 |
| 3.9. İlaç Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması ve İstatiksel Analizi                                 | 34 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                     |    |
| 4.1. Disk Difüzyon Test Sonuçları                                                      | 35 |
| 4.2. Disk Temelli Yeni Yöntemin NRT ile<br>Belirlenen Duyarlılık Sonuçları             | 36 |
| 4.3. Disk Temelli Yeni Yöntemin Rezasurin Testi<br>ile Belirlenen Duyarlılık Sonuçları | 36 |
| 4.4. Agar Proporsiyon Yöntem ile Belirlenen<br>İlaç Duyarlılık Sonuçları               | 37 |
| 4.5. İlaç Duyarlılık Testlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları                             | 38 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                     | 42 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                            | 49 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                       | 50 |
| <b>EKLER</b>                                                                           |    |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                        | 62 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> <i>M. tuberculosis</i> 'in taksonomik sınıfı                                                                                   | 8  |
| <b>Tablo 2.2.</b> <i>M. tuberculosis</i> 'in genlerinin sınıflandırması                                                                          | 9  |
| <b>Tablo 3.1.</b> Agar proporsiyon yönteminde kullanılan primer anti-TB ilaçların kritik konsantrasyonları ve besiyerlerine eklenecek miktarları | 24 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Stok antibiyotik solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan parametreler ve miktarları                                            | 26 |
| <b>Tablo 4.1.</b> CLSI tarafından RİF ve STR için belirlenen KK aralıkları ve ölçülen zon çapları                                                | 35 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Disk temelli yeni yöntemin NRT ile belirlenen ilaç duyarlılık sonuçları                                                        | 36 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Disk temelli yeni yöntemin rezasurin testi ile belirlenen ilaç duyarlılık sonuçları                                            | 37 |
| <b>Tablo 4.4.</b> Agar proporsiyon yöntem ile belirlenen ilaç duyarlılık sonuçları                                                               | 38 |
| <b>Tablo 4.5.</b> NRT ve agar proporsiyon test sonuçlarının karşılaştırması                                                                      | 38 |
| <b>Tablo 4.6.</b> Rezasurin testi ve agar proporsiyon test sonuçlarının karşılaştırması                                                          | 39 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Lowenstein-Jensen (LJ) (soldaki) ve AYC.2.2 Agar (sağdaki)                                                                                                                    | 6  |
| Besiyerindeki <i>M. tuberculosis</i> H37Rv kolonileri                                                                                                                                           |    |
| <b>Şekil 2.2.</b> <i>M. tuberculosis</i> 'in patogenezi ve bulaş mekanizması                                                                                                                    | 11 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Antibiyotik disklerinin kurutma için hazırlanması                                                                                                                             | 28 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Disk temelli yeni yöntemin NRT ile birlikte uygulanması                                                                                                                       | 32 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Disk temelli yeni yöntemin rezasurin testi ile birlikte uygulanması                                                                                                           | 33 |
| <b>Şekil 4.1.</b> Disk difüzyon test sonuçları, A) <i>S. aureus</i> plağında RİF diskini için ölçülen zon çapı, B) <i>E. coli</i> plağında STR diskini için ölçülen zon çapı                    | 35 |
| <b>Şekil 4.2.</b> <i>M. tuberculosis</i> H37Rv'nin ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları                         | 39 |
| <b>Şekil 4.3.</b> <i>M. tuberculosis</i> ATCC 35838 (RİF-Dirençli) suşunun ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları | 40 |
| <b>Şekil 4.4.</b> <i>M. tuberculosis</i> ATCC 35820 (STR-Dirençli) suşunun ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları | 40 |
| <b>Şekil 4.5.</b> <i>M. tuberculosis</i> ATCC 35837 (EMB-Dirençli) suşunun ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları | 40 |
| <b>Şekil 4.6.</b> <i>M. tuberculosis</i> ÇİD-1 izolatının ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları,                                                             | 41 |

C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları

**Şekil 4.7.** *M. tuberculosis* D-1 izolatının ilaç duyarlılık sonuçları, 41

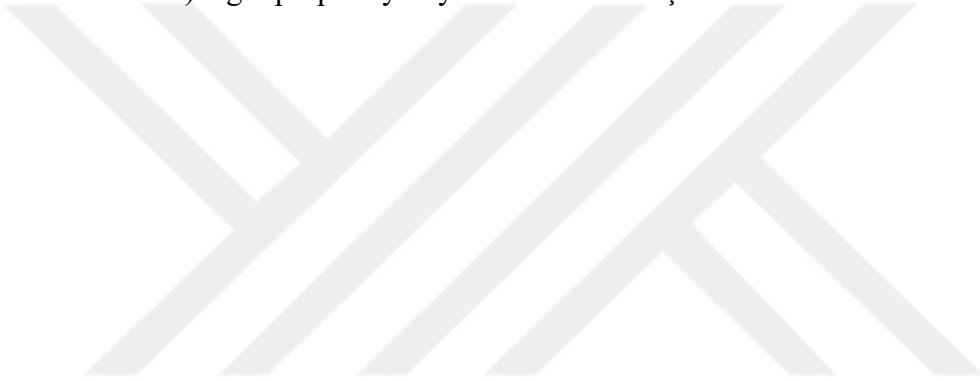
A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları,

C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları

**Şekil 4.8.** *M. tuberculosis* D-2 izolatının ilaç duyarlılık sonuçları, 41

A) NRT sonuçları, B) Rezasurin test sonuçları,

C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları



## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                       |                                                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACP</b>            | : Enoil açıl taşıyıcı protein                                             |
| <b>AKVUAM</b>         | : Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama<br>ve Araştırma Merkezi |
| <b>ATCC</b>           | : Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu                                        |
| <b>BCG</b>            | : Bacillus Calmette-Guerin                                                |
| <b>BM</b>             | : Birleşmiş milletler                                                     |
| <b>BSL-3</b>          | : Biyogüvenlik seviye 3                                                   |
| <b>C1</b>             | : Stok antibiyotik solüsyonunun konsantrasyonu                            |
| <b>C2</b>             | : Çalışmada kullanılacak antibiyotik konsantrasyonu                       |
| <b>CFP</b>            | : Kültür filtrat proteini                                                 |
| <b>CLSI</b>           | : Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü                            |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | : Karbon dioksit gazı                                                     |
| <b>COVID-19</b>       | : Koronavirüs hastalığı                                                   |
| <b>CS</b>             | : Sikloserin                                                              |
| <b>ÇİD-TB</b>         | : Çok ilaca dirençli tüberküloz                                           |
| <b>DNA</b>            | : Deoksiribonükleik asit                                                  |
| <b>DSÖ</b>            | : Dünya sağlık örgütü                                                     |

|                        |                                                    |
|------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>EMB</b>             | : Etambütöl                                        |
| <b>ESAT-6</b>          | : Erken salgı antijenik hedef 6kDa proteini        |
| <b>ETA</b>             | : Etiyonamid                                       |
| <b>EUCAST</b>          | : Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi  |
| <b>EZN</b>             | : Erlich Ziehl-Neelsen                             |
| <b>FDA</b>             | : Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi |
| <b>G +C</b>            | : Guanin + Sitozin                                 |
| <b>HCl</b>             | : Hidroklorik asit                                 |
| <b>IFN-γ</b>           | : İnterferon gama                                  |
| <b>IGRA</b>            | : İnterferon gama salınım testi                    |
| <b>İDT</b>             | : İlaç duyarlılık testi                            |
| <b>İNH</b>             | : İzoniazid                                        |
| <b>KK</b>              | : Kalite kontrol                                   |
| <b>KNO<sub>3</sub></b> | : Potasyum nitrat                                  |
| <b>KOB</b>             | : Koloni oluşturan birim                           |
| <b>KVDT</b>            | : Kristal viyole dekolarizasyon testi              |
| <b>LJ</b>              | : Lowenstein-Jensen                                |
| <b>MH</b>              | : Mueller-Hinton II                                |
| <b>MİK</b>             | : Minimum inhibisyon konsantrasyonu                |
| <b>ml</b>              | : Mililitre                                        |

|                       |                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>mm</b>             | : Milimetre                                                          |
| <b>MÖ</b>             | : Milattan önce                                                      |
| <b>MTBK</b>           | : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks                         |
| <b>MTT</b>            | : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür testi |
| <b>MYDT</b>           | : Malaşit yeşili dekolarizasyon testi                                |
| <b>NO<sub>2</sub></b> | : Nitrit                                                             |
| <b>NRT</b>            | : Nitrat redüktaz testi                                              |
| <b>NPD</b>            | : Negatif prediktif değer                                            |
| <b>O<sub>2</sub></b>  | : Oksijen gazı                                                       |
| <b>OADC</b>           | : Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz                             |
| <b>PAS</b>            | : Para amino salisilik asit                                          |
| <b>PCR</b>            | : Polimeraz zincir reaksiyonu                                        |
| <b>PE</b>             | : Pro-Glu (Prolin-Glutamat)                                          |
| <b>PPD</b>            | : Pürifiye edilmiş protein türevi                                    |
| <b>PPE</b>            | : Pro-Pro-Glu (Prolin-Prolin-Glutamat)                               |
| <b>PPD</b>            | : Pozitif prediktif değer                                            |
| <b>PZA</b>            | : Pirazinamid                                                        |
| <b>RİF</b>            | : Rifampisin                                                         |
| <b>RNA</b>            | : Ribonükleik asit                                                   |
| <b>STR</b>            | : Streptomisin                                                       |



|                     |                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>TB</b>           | : Tüberküloz                                                              |
| <b>TDM</b>          | : Tüberküloz dışı mikobakteri                                             |
| <b>TDT</b>          | : Tüberkülin deri testi                                                   |
| <b>UPLC</b>         | : Ultra performanslı sıvı kromatografisi                                  |
| <b>UV</b>           | : Ultra viyole                                                            |
| <b>V1</b>           | : Stok antibiyotik solüsyonunun hacmi                                     |
| <b>V2</b>           | : Çalışmada kullanılacak antibiyotik solüsyonunun hacmi                   |
| <b>XTT</b><br>testi | : 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid |
| <b>YİD-TB</b>       | : Yaygın ilaca dirençli tüberküloz                                        |
| <b>µg</b>           | : Mikrogram                                                               |
| <b>µl</b>           | : Mikrolitre                                                              |
| <b>µm</b>           | : Mikrometre                                                              |

## 1. GİRİŞ

*Mycobacterium tuberculosis* 'in neden olduğu, insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan tüberküloz (TB) çok ilaca dirençli (ÇİD-TB) ve yaygın ilaca dirençli (YİD-TB) suşların sayısındaki artış nedeniyle günümüzde hala ciddiyetini korumaktadır. TB kontrol ve önleme çalışmaları için dirençli suşlar önemli bir sorundur (Palomino ve ark., 2008). “TB’yi Bitirme Stratejisi (End TB)” stratejisi, herhangi bir TB türüne sahip her yaştan bireyin erken tanısını ve hızlı tedavisini savunmaktadır. Bu durum ancak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen hızlı tanıya ve ilaç duyarlılık testlerine evrensel erişim ile mümkün olacaktır. Şu anda DSÖ moleküler tekniklerdeki ilerlemelere rağmen kültür temelli yöntemleri “altın standart” olarak kabul etmektedir (WHO, 2018) Kültür temelli yöntemler, proporsiyon (orantı) yöntemi, mutlak konsantrasyon ve direnç-oran yöntemi olmak üzere temelde üç geleneksel yöntemi kapsamaktadır. Proporsiyon yöntemi bunlar içerisinde en yaygın kullanılanı olup, testin sonuçlanması için 3-4 hafta kadar uzun inkübasyon süresi gerektirmektedir. Bunlara alternatif olarak ortaya çıkan MGIT 960 (Becton-Dickinson, ABD) gibi otomatize sıvı kültür sistemleri ise daha kısa sürede sonuç vermelerine rağmen cihaz kullanımı gerektirdiğinden maliyeti yüksektir (Asmar ve Drancourt, 2015; Canetti ve ark., 1963).

Bu çalışmada bir dönem *M. tuberculosis*'in ve çoğunlukla hızlı büyüyen mikobakterilerin ilaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan “agar disk elüsyon” ve çoğunlukla gram negatif basillerin kolistin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)'nın belirlenmesinde kullanılan “sıvı disk elüsyon” yöntemlerinin birtakım modifikasyonlarını içeren disk temelli yeni bir ilaç duyarlılık yönteminin geliştirilmesi amaçlandı. Geliştirilen yeni yöntem, *M. tuberculosis* suşlarının, TB tedavisinin önemli bileşenleri olan izoniazid (İNH), rifampisin (RİF), streptomisin (STR) ve etambutol (EMB) antibiyotiklerinin DSÖ tarafından önerilen kritik konsantrasyonlarına göre hazırlanan antibiyotik diskleri ile 7H9 sıvı besiyerinde test edilmesini içermektedir. Bu çalışma, hızlı kolorimetrik testler olan nitrat redüktaz testi (NRT) ve rezasurin testi ile birlikte uygulanan disk temelli yeni yöntemin ilaç duyarlılık sonuçlarının agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırılması ve performans değerlendirmesinden oluşmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tüberkülozun Tarihçesi

Tarihsel yolculuğu epey uzun süren, yaklaşık 3 milyon yıl öncesinden günümüze kadar ulaşmayı başaran antik patojen *Mycobacterium tuberculosis*, tarihteki en ölümcül hastalıklardan biri olarak kayıtlara geçen TB etkenidir. TB hastalığından tek başına sorumlu olmayan bu basil *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) olarak isimlendirilen bir grup mikobakteriyel ajan içerisinde en başarılı insan patojenidir (Gutierrez ve ark., 2005). Mikobakterium cinsinin yaklaşık 150 milyondan daha uzun bir süre önce ortaya çıktığı düşünülürken (Hayman, 1984), düşük mutasyon oranının katkılarıyla modern moleküler teknikler sayesinde MT'nin ilk atasının 3 milyon yıl önce Doğu Afrika'daki ilk hominidleri enfekte ederek günümüze kadar ulaştığı tahmin edilmektedir (Daniel, 2006; Gutierrez ve ark., 2005). Paleopatoloji alanındaki ilerlemelerle birlikte, MT'nin Avrupa'da ve Kolomb öncesi Amerika'da insanlarla ilk olarak milattan önce (MÖ) 2500-1500'de, Mısırda ise ilk olarak MÖ 3700'de karşılaştığı bilinmektedir (Kapur ve ark., 1994). TB basiliinin Mısır'daki tarihsel yolculuğunun MÖ 2400'lü yıllarda başladığı mumyalarda spesifik Pott lezyonlarına rastlanması ve bu iskelet bozulmalarının antik Mısır sanatında gösterilmesiyle kanıtlanmıştır (Zimmerman, 1979). İlerleyen zamanlarda da mumya dokularından TB basiliinin DNA'sının bulunmasıyla mevcut kanıtlar güçlendirilmiştir (Crubézy ve ark., 1998). Bunun aksine Mısırın yazılı kaynaklarında TB hastalığı açıkça belirtilmemekle birlikte papirüslerde bu hastalıktan hiç söz edilmemektedir. Dolayısıyla yazılı kaynaklar sınırlı kalmıştır (Cave ve Demonstrator, 1939). Tarihte veba dışında çok az hastalık günümüze yazılı imza bırakmayı başarabilmiştir. TB'de bu hastalıklardan birisidir (Barbier ve Wirth, 2016). TB'yi tasvir eden ilk yazılı metinlerden Hindistan'daki 3300 yıl öncesine Çin'deki ise 2300 yıl öncesine dayanmaktadır (Brown, 1941). MÖ 460-370 yıllarında yaşamış, Antik Yunan dünyasının önemli isimlerinden olan Hipokrat da “Aforizmalar” ve “Epidemik” adlı eserlerinde TB'nin klinik özelliklerine yer vermiştir. Eserlerinde hastalığın yaygın olarak 18-35 yaş arası genç yetişkinlerde görüldüğünden, kış

aylarından ziyade yaz ve sonbaharda ortaya çıkmasıyla diğer solunum yolu enfeksiyonlarından ayrıldığından bahsetmektedir. TB'nin sıklıkla hastanın ölümüyle sonuçlandığı da Hipokrat'ın vurguladığı konulardandır ( Daniel ve Iversen, 2015a).

Hastalığın şiddetinin dışardan hastayı “tüketiyor” gibi görünmesinden dolayı tarihsel süreçte TB yerine “psithisis pulmonaris”, “beyaz veba”, tüketim (consumption)” gibi isimler kullanılmıştır (Prabhu ve Singh, 2019). 1834 yılında Johann Lukas Schönlein'in önerisi üzerine, hastalığın her formunda tüberküllere rastlanmasından ötürü “Tüberküloz” ismi literatüre girmiştir. TB'nin bulaşıcı bir hastalık olduğuyla ilgili ilk açıklamalar 16. yüzyılda Girolamo Fracastoro tarafından yapılmıştır. 1679'da Sylvius de la Boe TB'nin akciğerleri nasıl etkilediğini, patolojik ve anatomik özelliklerine vurgu yaparak “Opera Medica” adlı eserinde açıklamıştır (Barberis ve ark., 2017). 1720 yılında TB "müthiş derecede küçük canlıların" neden olduğu bir hastalık şeklinde Benjamin Marten tarafından tanımlanmış ve bulaşın gerçekleşebilmesi için hasta bireylerle yakın temas olması gerektiği bildirilmiştir. Marten, basilin vücuda girdikten sonra lezyonlara yol açmasına neden olan “çok küçük canlılar” dan kaynaklanmış olabileceğini tahmin eden ilk kişiydi ve bu varsayımlarını “yeni bir tüketim teorisi” adlı eserinde açıkça belirtmiştir. (Doetsch, 1978). 1779 yılında akciğer dışında bağırsak ve karaciğer gibi diğer organlarda da tüberküllere rastlanmasıyla omurilik çökmesiyle karakterize edilen bir TB enfeksiyonu olan Pott hastalığı tanımlanmıştır (Sternbach, 1996). 1865 yılında TB'nin hastalığa yatkın kişilerde kendiliğinden ortaya çıktığına inanılan bir dönemde Fransız askeri cerrah Jeon-Antoine Villemin, TB'nin bulaşıcı bir hastalık olduğunu kanıtlayan ilk deneyleri gerçekleştirmiştir. Villemin, TB basilinin Koch tarafından tanımlanmasından 17 yıl önce basilin enfekte kadavra dokusundan tavşana, inekten tavşana ve tavşandan tavşana bulaşabileceğini yaptığı denemelerle göstermiştir (Daniel, 2015b).

Bundan sonraki dönem modern bakteriyolojinin kurucusu Robert Koch ve onun TB basilini keşfine giden yoldaki çalışmalarını kapsamaktadır. Bu çalışmalar içerisinde basilin boyanması ve katı kültürde izolasyonu iki önemli yenilik olarak literatüre geçmiştir. (Petrie, 1943). Koch, mevcut boyama yöntemlerinin TB basilini boyamada yetersiz kaldığını belirterek metilen mavisi ve karşıt boya olarak vesuvin kullanarak modifiye edilmiş bir yöntemle basili mikroskop altında gözlemlemeyi başarmıştır.

Ardından Paul Erlich ile birlikte boyama protokolü üzerinde çalışmaya devam etmişlerdir. (Cambau ve Drancourt, 2014). Koch, patates ve agar içeren katı besiyerlerini kullanarak saf bakteri kültürleri elde etmek için yeni yöntemler üzerinde çalışmıştır. Aslında basilin izolasyonunda kullanmadan önce de bu katı besiyerlerini tanımlamıştır ve besiyerlerini temelde inek veya koyun serumu kullanarak zenginleştirmiştir (Koch, 2018a). TB basilini izole eden, besiyerinde kültürünü gerçekleştiren ve patojeni yeniden laboratuvar hayvanlarına bulaştırarak hasta etmeyi başaran Koch, bu başarılı sonuçlarını 24 Mart 1882’de Berlin Fizyoloji Derneğine sunmuştur. Ardından hastalığın etiolojisini anlatan, TB ile mücadelede önemli katkıları olan “Die Aetiologie der Tuberculose” adlı eserini yayınlamıştır (Koch, 2018b). Koch, TB basilinin keşfi ve bununla ilgili araştırmalarından ötürü 1905 yılında tıp alanında Nobel ödülüne layık görülmüştür (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1905/koch/facts/>, Erişim tarihi: 14 Haziran 2023). TB basilinin ilk izolatları ise günümüzde Londrada Hunterian Müzesi’nde sergilenmektedir (Brierley, 2005).

Keşiften sonraki dönemde ise TB ile mücadeleye yönelik önemli gelişmeler yaşanmıştır. Bunlardan en önemlisi Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısı olmuştur. Leon Charles Albert Calmette ve Camille Guérin 1908 ile 1921 yılları arasında, *Mycobacterium bovis* suşunun 200’den fazla kez alt kültürünü yaparak seri pasajlar gerçekleştirmişlerdir. Suş, safralı, gliserinli ve patatesli bir besiyerinde 3 haftada bir yeniden kültüre edilerek 11 yıl boyunca pasajlanmıştır. Sonuç itibarıyla basilin virülansını kaybetmesini sağlayarak TB’ye karşı BCG aşısını geliştirmişlerdir (Lange ve ark., 2022). 1943 yılında Selman Waksman tarafından TB’ye karşı ilk etkili bulunan antibiyotik streptomisin keşfedilmiştir. Bu olay da beraberinde Waksmana 1952 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır (Sakula, 1988). İlerleyen yıllarda diğer anti-TB ilaçlar keşfedilmiş ve keşfedilen antibiyotiklerin tek başına kullanılınca direnç neden olabileceği anlaşıncı kombine antibiyotik uygulamaları denenmiştir.

Günümüzde ise hala önemli bir küresel halk sağlığı sorunu olmaya devam eden TB’nin eradikasyonu için DSÖ tarafından stratejiler geliştirilmekte ve bunlara paralel olarak ulusal eylem planları uygulanmaktadır. DSÖ’nün üye devletleri ve Birleşmiş milletler (BM), 2014 yılından bu yana BM sürdürülebilir kalkınma hedefleri doğrultusunda TB’yi

bitirme stratejisini (End TB) uygulamaya koyarak, tüm yılların en ölümcül patojeni olan *M. tuberculosis*'i yeryüzünden eradike etmeyi amaçlamaktadır. TB'yi bitirme stratejisi, 2030 yılına kadar TB insidansını %80, TB kaynaklı ölümleri %90 oranında azaltmayı ve TB'den etkilenen aileler için katastrofik maliyetleri %100 oranında ortadan kaldırmayı hedeflemektedir (<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy>, Erişim tarihi: 14 Haziran 2023).

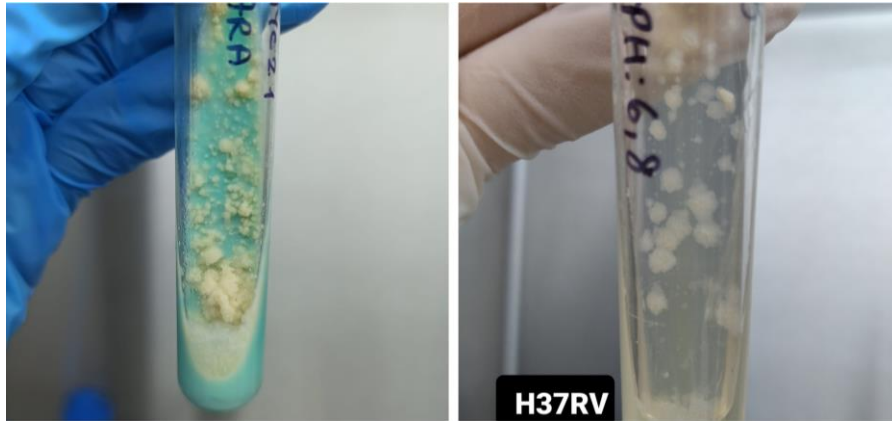
## 2.2. Dünyada ve Türkiye’de Tüberkülozun Epidemiyolojisi

*M. tuberculosis*, geçmişten günümüze kadar toplum sağlığının en ölümcül ajanlarından biri olmaya devam etmektedir. DSÖ’nun 2022 yılında yayınladığı rapora göre 2021 yılında dünyada 10.6 milyon kişi TB basili ile enfekte olmuş ve 1.6 milyon kişi TB nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Hindistan, Endonezya, Myanmar ve Filipinler ölümlerin en fazla görüldüğü ülkeler arasında yerini almaktadır. 2019 yılında 1.4 milyon, 2020 yılında 1.5 milyon olan bu sayıdaki artış 2017’ye geri döndüğünü göstermektedir (WHO, 2022a). Geride bıraktığımız son 3 yılda, COVID-19 pandemisinin TB’nin tanı ve tedavisine erişimi üzerindeki olumsuz etkisi hala devam ettiği için bu etki küresel TB hedeflerinde kaydedilen ilerlemenin de tersine dönmesine neden olmuştur (Comella-del-Barrio ve ark., 2021). 21. yüzyılın önemli bir sorunu olan antimikrobiyal direnç de bunlara ilave olarak TB tedavisinde yeni ilerlemeler kaydedilmesini daha da zorlaştırmıştır. İlaça dirençli vaka sayısı 2020 yılında 156,982 iken 2021 yılında %6,4’lük bir artışla 166, 991’ e (ÇİD-TB ve YİD-TB vaka toplamı) yükselmiştir (WHO, 2022a). 84.8 milyon nüfusa sahip ülkemizde 2021 yılında yaklaşık 15,000 kişi TB hastalığına yakalanırken, 970 kişi TB nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Yeni TB vakalarının ise %2.4’ünün ÇİD-TB olduğu bilinmektedir. Hasta bireylerin tedavilerindeki başarı oranı ise 2020 yılına göre %81 olarak bildirilmiştir (WHO, 2022a)

2019 yılında dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri sıralamasında 13. sırada yerini alıp tek bir enfeksiyöz ajandan kaynaklanan en önemli ölüm nedeni olan TB hastalığının, 2020 ve 2021 yıllarında COVID-19’dan sonra ikinci sırada yer alacağı öngörüler arasındadır (WHO, 2022a).

### 2.3. *M. tuberculosis*'in Bakteriyolojik Özellikleri

*M. tuberculosis* basiliinin yaklaşık 1-10 µm boy uzunluğuna (genellikle 3-5 µm) ve 0.2-0.6 µm genişliğine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Işık mikroskobu altında tipik formu olarak düz veya hafif kıvrımlı çubuk (basil) formunda görünmektedir. Yayma yapılan kültürün süresine ve ortam koşullarına bağlı olarak kokobasil formunda da görülebilir (Barrera, 2007). Aerobik solunum yapan TB basili, oksijence zengin akciğer dokuları gibi bölgelerde hücre içi patojen olarak gelişimi sürdürmektedir. Hareketsiz ve spor oluşturmeyen TB basili yaklaşık 18-24 saate bir ikiye bölünerek jenerasyon süresini tamamlamaktadır. *In vitro* kültür ortamında ise yaklaşık 10-14 gün içerisinde gözle görülebilir büyüklükte deve tüyü renginde, morfolojik olarak “R” (rough: kaba, pürüzlü) koloni tipinde kuru ve pürtüklü koloniler oluşturmaktadırlar (Şekil 2.1). Lipitçe zengin hücre duvarı basile hidrofobik özellik kazandırarak kümelenmeye meyilli hale getirmektedir. Aynı zamanda bazı bileşenlere karşı geçirgenliğini de azaltmaktadır (Gordon ve Parish, 2018; <https://tbcindia.gov.in/WriteReadData/1892s/6995271860Training%20manual%20M%20tuberculosis%20C%20DST.pdf>, Erişim tarihi: 14 Haziran 2023).



**Şekil 2.1.** Lowenstein-Jensen (LJ) (soldaki) ve AYC.2.2 agar (sağdaki) besiyerindeki *M. tuberculosis* H37Rv kolonileri

*M. tuberculosis* birçok ilaç için potansiyel hedef olan lipit açısından zengin kompleks bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı arabinogalaktan, lipoarabinomannan ve lipomannanları içeren **lipopolisakkaritlerden**, kalın bir **peptidoglikan** tabakasından ve mikolik asitler, glikolipidler ve fitiyoserol dimikoserosatlarından oluşan bir **dış zar** içermektedir(Vilchèze, 2020).

TB basilleri hücre duvarındaki yüksek lipit içeriğinden ötürü kristal viyoleyi tutamadığı için gram özelliklerinden bahsedilmez. Ancak gram pozitif bakterilerle daha yakından ilişkili oldukları düşünülmektedir (Barrera, 2007). *M. tuberculosis* karbol fuksin yöntemleriyle (Kinyoun ve Erlich Ziehl-Neelsen-EZN) veya florokrom (Auramin-Rhodamin) yöntemleriyle boyanabilmektedir. Bir kere boyandığı zaman asit ve alkol gibi renksizleştirici kimyasallarla boyayı bırakmazlar. Bu yüzden de “aside-dirençli basil” olarak tanımlanırlar (Pfyffer, 2015).

#### 2.4. Mikobakterilerin Taksonomisi

Mikobakteriler, bakteriler aleminin Actinobacteria sınıfının Actinomycetales takımında yer alan Micobacteriaceae ailesinin üyeleridir (Tablo 2.1) ([https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=963806#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963806#null), Erişim tarihi: 14 Haziran 2023). Mikobakterium cinsi *M. tuberculosis* ve *M. leprae* gibi başlıca insan patojenlerini, fırsatçı patojenler olan *M. abscessus* ve *M. avium* gibi tüberküloz dışı mikobakterileri (TDM) içeren 190’dan fazla türü kapsamaktadır. (Meehan ve ark., 2021). TB hastalığından sorumlu olan MTBK, *M. tuberculosis*, *M. africanum* (insana adapte olan türler) *M. bovis*, *M. caprae*, *M. orygis*, *M. microti*, *M. mungi*, *M. suricattae*, *M. pinnipedii*, şempanze basili ve Dassie basili (diğer hayvanlara adapte olan türler) olmak üzere 11 ayrı tür ya da ekotip içermektedir (Soler-Camargo ve ark., 2022). Genetik açıdan, bu kompleksin tüm üyeleri, nükleotid düzeyinde %99,9 benzerliğe ve aynı 16S rRNA dizilerine sahip olmaları sebebiyle yüksek oranda korunmuştur. Genetik yakınlıklarına rağmen kompleks üyelerinin konak tercihleri, patojenitesi ve coğrafi dağılımları birbirinden farklılık göstermektedir (Bajaj ve ark., 2021). Konak tercihlerine bakıldığında *M. tuberculosis* ve *M. africanum* sıklıkla insanlardan, *M. bovis* sığırlardan, *M. caprae* keçilerden, *M. microti* tarla farelerinden ve



diğer kemirgenlerden, *M. pinnipedii* deniz memelilerinden, *M. mungi* firavun farelerinden, *M. orygis* antilop türlerinden, *M. suricattae* mirketlerden izole edilmektedir (Clarke ve ark., 2016; Riojas ve ark., 2018).

**Tablo 2.1** *M. tuberculosis*'in taksonomik sınıfı

| Taksonomik Hiyerarşi |                                   |
|----------------------|-----------------------------------|
| <b>Alem</b>          | Bacteria                          |
| <b>Alt Alem</b>      | Posibacteria                      |
| <b>Sınıf</b>         | Actinobacteria                    |
| <b>Alt Sınıf</b>     | Actinobacteridae                  |
| <b>Takım</b>         | Actinomycetales                   |
| <b>Alt takım</b>     | Corynebacterineae                 |
| <b>Aile</b>          | Mycobacteriaceae                  |
| <b>Cins</b>          | Mycobacterium                     |
| <b>Tür</b>           | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |

Yakın zamanda yapılan filogenomik ve karşılaştırmalı genomik analizler neticesinde Gupta ve ark tarafından mikobakterium cinsinin beş yeni cinse bölünmesiyle mikobakteri taksonomisinde revizyon yapılması önerilmiştir. Bu beş yeni cinsin dördü mycolicibacterium, mycolicibacter, mycolicibacillus ve mycobacteroidesi içeren TDM'den, bir tanesi ise düzeltilmiş bir mycobacterium cinsinden oluşmaktadır (Gupta ve ark., 2018). TB basilinin taksonomisiyle ilgili olarak önerilen bir diğer önemli yaklaşım ise MTBK üyelerinin tek bir türü temsil edebilecek kadar birbirleriyle yakın ilişkili olduğudur. Yapılan analizler, MTBK üyelerinin ayrı birer tür olarak sınıflandırmak için yeterli çeşitlilik gösteremediğini bunların tek bir genotür olarak değerlendirilmesinin daha uygun olacağını göstermektedir. Yani daha önce adı geçen türlere karşılık gelen filogenetik grupların, artık varyantlar olarak yeniden düzenlenmesi gerekmektedir(Garcia-Betancur ve ark., 2012; Riojas ve ark., 2018).

## 2.5. *M. tuberculosis*'in Genomik Özellikleri

TB'nin doğasının anlaşılmasına büyük katkılar sunan en önemli gelişme 1998 yılında iyi bilinen laboratuvar referans suşu *M. tuberculosis* H37Rv'nin tam genom dizisinin tanımlanmasıdır. *M. tuberculosis* genomu 4.411.529 baz çifti uzunluğunda olup yaklaşık 4000 gen kodlamaktadır. O zamanlarda dizilenen en büyük ikinci mikrobiyal genom olma özelliği taşımaktadır. Genomda 3,924 açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. Bu da genomun potansiyel kodlama kapasitesinin %91 olduğunu göstermektedir (Cole ve ark., 1998). 200'den fazla gen yağ asidi metabolizmasında görev alan enzimleri kodlamaktadır (Tablo 2.2). Bu genlerden 100 tanesinin yağ asitlerinin oksidasyonunda görev aldığı tahmin edilmektedir. *E. coli*'de yağ asidi metabolizmasında 50 enzim, *Streptomyces coelicolor*'da yağ asidi bozunmasında 59 enzim görev almaktadır. *M. tuberculosis*'de yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili çok sayıda enzim bulunması patojenin yağ asitlerini esas karbon kaynağı olarak kullandığı durumlarda enfekte konak dokularındaki basilin büyüme yeteneği ile ilişkilendirilmektedir (Smith, 2003).

**Tablo 2.2.** *M. tuberculosis* genlerinin sınıflandırılması (Lew ve ark, 2011)

| İŞLEV                                   | Gen sayısı<br>(1998) | Gen sayısı<br>(2002) | Gen sayısı<br>(2010) |
|-----------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Lipid metabolizması                     | 225                  | 233                  | 247                  |
| Bilgi yolları                           | 207                  | 229                  | 241                  |
| Hücre duvarı ve hücre süreçleri         | 516                  | 708                  | 773                  |
| Kararlı RNA'lar                         | 50                   | 50                   | 71                   |
| IS elementleri ve bakteriyofajlar       | 137                  | 149                  | 147                  |
| PE ve PPE proteinleri                   | 167                  | 170                  | 168                  |
| Ara metabolizma ve solunum              | 877                  | 894                  | 923                  |
| Düzenleyici proteinler                  | 188                  | 189                  | 195                  |
| Virülans, detoksifikasyon ve adaptasyon | 91                   | 99                   | 228                  |
| Korunmuş varsayımsal işlev              | 910                  | 1051                 | 1081                 |
| Fonksiyonu bilinmeyen proteinler        | 606                  | 272                  | 16                   |

Genomun %65.6'lık kısmı G+C içeriğinden oluşmaktadır. > %80 gibi çok yüksek G+C içeriğine sahip Pro-Glu (PE) ve Pro-Pro-Glu (PPE) çoklu gen ailesine ait bir bölge oldukça dikkat çekmektedir. Total genom kapasitesinin önemli bir kısmını oluşturan bu bölge, farklı ortamlarda mikobakterilerin hayatta kalması ve çoğalabilmesi için kritik önem taşımaktadır (Marri ve ark., 2006; Barrera, 2007).

Yatay gen transferi, mikroorganizmaların evriminde ve genomlarının şekillenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. *M. smegmatis* ve *M. canetti* suşlarının kendi aralarında DNA transferi gerçekleştirebildiği bilinmektedir. Aynı şekilde TB etkeni mikobakterilerde de suşlar arasında DNA transferi hakkında birkaç bilgi mevcuttur. Ancak *M. tuberculosis* suşları arasında yatay gen aktarımına dair herhangi bir kanıt mevcut değildir (Madacki ve ark., 2021).

## **2.6. *M. tuberculosis*'in Patogenezi ve Bulaş Mekanizması**

Tek rezervuarı insan olduğu bilinen TB basili, başta akciğerler olmak üzere merkezi sinir sistemi, iskelet sistemi ve birçok iç organı etkileyebilmektedir. Basiller aktif TB'ye sahip bireylerden havaya saçılan aerosoller ile toplum içerisinde yayılmaktadır. (Churchyard ve ark., 2017). Sağlıklı bireylerde enfeksiyonun başlaması için bulaşıcılıkta kritik öneme sahip olan enfeksiyöz partiküller aracılığıyla yaklaşık 1-5 TB basilinin solunması yeterlidir (Balasubramanian ve ark., 1994). Akciğerlere doğru ilerleyen basiller alveollere ulaştıktan sonra ilk olarak adaptif immün sistem elemanlarının aktivasyonunda önemli rol oynayan makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından yutulur. Bu enfekte hücrelerden salınan tehlike sinyalleriyle enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında diğer immün sistem hücreleri bir araya toplanır ve adaptif bağışıklık sistemi ile birlikte TB basilinin çoğalması ve yayılması engellenir (Rahlwes ve ark., 2023). İmmün sistem granülom adı verilen çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu hücre kümesi içerisinde basilleri muhafaza ederek enfeksiyonun yayılmasını önler. Enfekte olan bireylerin %90'ında bu şekilde bağışıklık yanıtı oluşmaktadır. Bağışıklık tepkisinden bu şekilde kaçmayı başaran basiller latent enfeksiyonu temsil etmektedir ve hastalığın asemptomatik seyretmesine neden olmaktadır (Luo ve ark., 2019; Rahlwes ve ark., 2023). Latent şekilde enfekte olan bu bireylerde bağışıklık sisteminin baskılanması durumunda hastalık yeniden nüksedebilir ve insanın ömrü boyunca bu olasılığın



### **2.7.1 Tüberkülin Deri Testi (TDT)**

Mantoux testi olarak da bilinen bu enfeksiyon testi, TB basilinden elde edilen antijenlerin bir karışımı olan pürifiye edilmiş protein türevini (PPD)’nin intradermal enjeksiyonunu içermektedir. Enjeksiyon sonucunda gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunun meydana gelmesi ve enjeksiyon bölgesinde 48-72 saat içerisinde sertlik oluşumuyla karakterize edilir. Ardından oluşan sertlik milimetre cinsinden ölçülür. Enjeksiyon sonrası tekrardan klinik ziyareti ve önerilen zaman dilimi içerisinde sonuçların okunmasını gerektirir (WHO, 2021). Bu enfeksiyon testinin, BCG ve TDM ile çapraz reaksiyon gösterebilme ihtimali, PPD’nin soğuk zincir gerektiren ürün olması, enjeksiyon sonrası sertliğin yorumlanması için eğitilmiş teknisyen ihtiyacı testin dezavantajları arasında sayılabilir (Hamada ve ark., 2021; Yang ve ark., 2012).

### **2.7.2 İnterferon Gama Salınım Testi (IGRA)**

IGRA enfeksiyon testleri, TB basiline spesifik olan “erken salgı antijenik hedef 6 kDa proteini (ESAT-6)” ve “kültür filtrat proteini 10 (CFP-10)” antijenleri ile uyarılması sonucu T-hücreleri tarafından salınan interferongamma (IFN- $\gamma$ ) miktarına bakarak hücrel immün yanıtını ölçen kan testleridir. BCG ve bazı birkaç istisna dışında TDM’den etkilenmemesiyle TDT’den ayrılmaktadır (WHO, 2021). QuantiFERON-TB Gold Tüp (QFT-GIT) (QIAGEN, Avustralya) ve T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec., İngiltere) testleri 2011 yılında DSÖ tarafından performansları incelenmiş testlerdir. Son zamanlarda yeni nesil olan QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), QFT-GIT’in yerine geçmiştir. Hem T-SPOT.TB hem de QFT-Plus, laboratuvar altyapısı gerektirir ve TDT’ye kıyasla daha maliyetli testlerdir (Hamada ve ark., 2021; WHO, 2011).

## **2.8. TB Tedavisinde Kullanılan Primer Anti-TB İlaçlar**

Standard anti-TB ilaç rejimi antimikrobiyal direncin önlenmesi amacıyla birden fazla ilacın birlikte kombine halde kullanılmasını gerektirir. İlaça duyarlı TB tedavisi için en yaygın önerilen rejim, izoniazid (İNH), rifampisin (RİF), pirazinamid (PZA) ve etambutol (EMB) gibi birinci basamak ilaçları içeren ilk 2 aylık fazdan ve akabinde İNH

ve RİF'in kullanıldığı 4 aylık fazdan oluşmaktadır (Bansal ve ark., 2016). Bu ilaçlar minimum toksisite ile maksimum etkinlik göstermektedirler.

### 2.8.1 İzoniazid (İNH)

Kimyasal adı izonikotinic asit anhidrazid olan İNH antibiyotiği ilk kez 1912'de tanımlanıp 1952'de sentetik bir anti-TB ilaç olarak tedavi rejimine girmiştir. Yüksek bakterisidal aktivite gösterip, dar spektrumlu bir antibiyotik olan İNH, latent TB enfeksiyonunda da profilaktik ilaç olarak kullanılmaktadır (Unissa ve ark., 2016). Ön ilaç olan İNH, KatG tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enzimi sayesinde aktifleşmektedir. Aktivasyon sonrası oluşan ilaç ürünleri, hücre duvarındaki mikolik asitin biyosentezinde rol alan enoil açıl taşıyıcı protein (ACP) redüktaz (InhA) ve beta-ketoaçıl ACP sentaz (KasA) gibi bileşenleri hedef almaktadır (Banerjee ve ark., 1994; Mdluli ve ark., 1998). İlaç özellikle basilin hayatta kalması ve virülansı için esas olan mikolik asitlerin, uzun zincirli  $\alpha$ -alkilin ve  $\beta$ -hidroksi-yag asitlerinin biyosentezini inhibe etmektedir. Başta KatG geni olmak üzere KasA, InhA, AhpC ve ndh gen mutasyonları İNH direncine yol açmaktadır (Silva ve ark., 2003).

### 2.8.2 Rifampisin (RİF)

TB tedavisindeki büyük gelişmelerden birisi *Streptomyces mediterranei*'den üretilen RİF'in 1970'ler de tedavi rejimine girmesidir. RİF antibiyotiği "sterilizasyon etkisi" olarak isimlendirilen özel aktivitesi sayesinde tedavi süresini önemli ölçüde kısaltmaktadır (Iseman, 2002). RİF, TB basilinin RNA polimeraz enziminin  $\beta$  alt birimine bağlanır, protein sentezini hedef alarak bakterisidal etki göstermektedir. RNA polimeraz enzimi ise rpoA, rpoB, rpoC ve rpoZ geni tarafından kodlanan beş alt birim içermekle beraber rpoB genindeki mutasyonlar RİF dirençli mutasyonların %95'inden sorumludur. RİF direncinin oluşması, diğer anti-TB ilaçlara kıyasla nadir de olsa, yaygın kullanımı sebebiyle direnç oranı artmaktadır (Xu ve ark., 2021; Zaw ve ark., 2018).

### 2.8.3 Etambutol (EMB)

İlk olarak 1961 yılında tanımlanan EMB, sterilize edici etkisi zayıf bakteriyostatik bir ilaç olup RİF, PZA ve İNH gibi diğer anti-TB ilaçlarla kombine halde kullanılmaktadır (Xiang ve ark., 2021). Yalnızca replike olabilen aktif TB basillerine etki eden EMB, hücre duvarında yer alan arabinogalakthanın biyosentezinde görevli arabinosil transferaz enzimini hedef almaktadır. Arabinogalakthan ve lipoarabinomannan'ın hücre duvarı arabinanının polimerizasyonunu inhibe etmektedir. EMB'ye dirençli TB basillerinin %70'inde EmbCAB operonundaki mutasyonlara bağlı olarak direnç gelişmektedir (Mikusova ve ark., 1995; Telenti ve ark., 1997).

### 2.8.4 Pirazinamid (PZA)

ÇİD-TB tedavisinin önemli bir parçası olan PZA, ilk olarak 1950'lerde tanıtılmış bir nikotinamid analogudur. İlaç sadece düşük pH'da (pH 5.5) etkinlik göstermesi nedeniyle diğer anti-TB ilaçlardan ayrılmaktadır. Bu da onun semidormant basillere karşı da etkili bir ilaç olmasına neden olmaktadır (Heifets ve Lindholm-Levy, 1992; Mirabal ve ark., 2010). PZA'nın aktif formu olan pirazinoik aside dönüşmesi için, TB basiliindeki pirazinamidaz enzimi gereklidir. Pirazinamidaz enzimini kodlayan pncA geninde meydana gelen mutasyonlar PZA direncinin oluşumundaki ana mekanizmadır (Hirano ve ark., 1997).

### 2.8.5 Streptomisin (STR)

İlk kez 1944 de anti-TB ilaç olarak tanımlanan STR, *Streptomyces griseus*'dan izole edilen bir aminoglikoziddir. Tedavide kullanımı sonrası kısa sürede direnç geliştiği için artık birinci seçenek ilaçlar arasında yer almamaktadır ve klinikte kullanımı sınırlıdır ancak STR direnci hala yaygındır (Rocha ve ark., 2021). STR, ribozomların 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eden bakterisidal bir ajandır. STR direnci çoğunlukla psL, rrs ve gid genlerinde meydana gelen mutasyonlarla ilişkilidir (Finken ve ark., 1993; Spies ve ark., 2011).

## 2.9. İlaç Duyarlılık Testleri (İDT)

21. yüzyılın önemli bir sorunu olan antimikrobiyal direnç kavramı TB tedavisinde kombine ilaç kullanımının esas nedenidir. Doğru antibiyotikle uygun tedavi rejiminin belirlenmesi için tedaviye başlanmadan önce İDT uygulanması gereklidir. DSÖ tarafından da kabul edilen “End TB” stratejisi, TB’nin her türlü formuna sahip her yaştaki kişilerin erken tanı ve hızlı tedavisini savunmaktadır (WHO, 2018). Genel itibariyle İDT, ilaç içeren ve içermeyen ortamlarda bakteriyel büyümenin makroskobik gözlemi, metabolik aktivitenin veya aktivite sonucu oluşan ürünlerin tespiti veya ilgili gen mutasyonlarının moleküler yöntemlerle tespiti olmak üzere üç ayrı ana başlık altında sınıflandırılabilir (Kim, 2005). *M. tuberculosis* için fenotipik İDT, **proporsiyon (orantı) yöntemi, direnç-oran yöntemi ve mutlak konsantrasyon yöntemi** olmak üzere üç geleneksel yöntemi içermektedir. Bu kültür temelli konvansiyonel yöntemler Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar ve yumurta temelli bir besiyeri olan Lowenstein-Jensen (LJ) besiyeriyle uygulanmaktadır. Kültür temelli yöntemler oldukça iyi standardize edilmiş olup hala birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Canetti ve ark., 1963). Ayrıca DSÖ tarafından da “altın standart” yöntemler olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemler TB basilinin inkübasyon süresinin 3-4 hafta kadar uzun bir süre olması nedeniyle zaman alıcıdır ve bulaş riskinden ötürü gelişmiş laboratuvar koşullarını şart koşmaktadır. Fenotipik İDT yüksek biyogüvenlik önlemleri alınarak eğitimli personel tarafından uygulanmalıdır (WHO, 2018).

### 2.9.1 Proporsiyon yöntemi

TB basillerinin ilaç duyarlılıklarının belirlenmesi için en sık tercih edilen kültür temelli yöntemdir. Bu yönteme göre besiyeri olarak yumurta ve agar bazlı besiyerlerinden herhangi biri kullanılarak tek bir kritik konsantrasyonda anti-TB ilaç içeren ortama McFarland no 1 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonunun  $10^{-2}$  dilüsyonundan 0.1 ml, ilaç içermeyen üreme kontrol ortamına ise McFarland no 1 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonunun  $10^{-2}$  ve  $10^{-4}$  dilüsyonundan ayrı ayrı olmak üzere bakteri inokülasyonları gerçekleştirilir. Ardından besiyerleri 3-4 hafta süreyle inkübe edilir.



İnkübasyon sonrası ilaç içeren ortamdaki koloni sayısı ilaç içermeyen ortamdaki koloni sayısına oranlanır ve bu oran yüzde cinsinden ifade edilir. Eğer oran %1'e eşit veya üzerinde ise basil popülasyonu o antibiyotiğe "dirençli", %1'in altında ise basil popülasyonu o antibiyotiğe karşı "duyarlı" olarak kabul edilir. Bu yöntem direkt veya indirekt olmak üzere uygulanabilir. Direkt yöntem de inokulum kaynağı olarak, dekontamine ve konsantre edilmiş klinik örnekler kullanılırken, indirekt yöntemde besiyerinde üremiş taze saf kültürler kullanılır (WHO, 2018).

### **2.9.2 Mutlak konsantrasyon Yöntemi**

Proporsiyon yöntem ile benzer şekilde uygulanmaktadır. Test edilecek kritik konsantrasyonlar laboratuvara göre belirlenir. İlaç içeren ve içermeyen besiyerlerine standart miktarlarda bakteri inokulumlarından inoküle edilir ve tüpler 4 hafta süreyle inkübe edilir. Besiyerlerindeki üremeler şu şekilde değerlendirilir; birleşik büyümeler için 4+, çok sayıda ayrık koloniler için 3+ ve 2+, 50 -100 koloni için 1+ ve 20 -49 koloni için (1+) gibi değerler verilir. Üreme kontrol tüpünde 4+ veya 3+ değerinde üreme gözlenip, ilaç içeren besiyerinde 20'den daha az sayıda koloni gözlenirse bu durum bakteriyel inhibisyon olarak değerlendirilir ve test edilen izolat "duyarlı" olarak kabul edilir. İlaç içeren besiyerinde 20 ya da daha fazla sayıda koloni varsa eğer test edilen izolat "dirençli" olarak kabul edilir (De Waard ve Robledo, 2007).

### **2.9.3 Direnç-Oran Yöntemi**

Bu yönteme göre tüm birinci kuşak anti-TB ilaçlara duyarlı standart laboratuvar suşu H37Rv'nin ve test izolatının test edilen anti-TB ilacın çift kat seri dilüsyonlarını içeren tüp setleri hazırlanır. Hazırlanan besiyerlerine standart miktarda bakteri inokülasyonu yapılır 4 hafta boyunca inkübe edilir. Test sonuçlarının değerlendirmesinde 20 ya da daha fazla koloni içeren tüpler üreme "pozitif" olarak kabul edilirken, MİK 20'den daha az koloni içeren tüpteki en düşük ilaç konsantrasyonu olarak kabul edilir. Test edilen izolatın MİK değeri referans suş H37Rv'nin MİK değerine oranlanır. Bu direnç oranı 2

veya daha az ise izolat o antibiyotiğe karşı “duyarlı”, 8 veya daha üstünde bir direnç oranı varsa izolat o antibiyotiğe karşı “dirençli” olarak değerlendirilir (Heifets, 2000).

#### 2.9.4 Otomatize Sıvı Kültür Sistemleri

MGIT 960 (Becton-Dickinson, ABD) BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Fransa) VersaTrek (ESP Myco Culture System II) (Trek Diagnostic, İngiltere) ve BACTEC 460 (Becton-Dickinson, ABD) TB olmak üzere çeşitli otomatize sıvı kültür sistemleri *M. tuberculosis*’in ilaç duyarlılığının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu sistemler bakteriyel büyümenin bir kanıtı olarak metabolik aktiviteyi sürekli izleyen teknolojileri kullanır ve çoğunlukla primer anti-TB ilaç duyarlılıklarını sıvı proporsiyon yöntemini temel alarak değerlendirmektedirler (Inderlied ve Nash, 2005). Bu otomatize sistemler kültür bazlı diğer geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı ilaç duyarlılık sonucu verebilmektedir ancak uygun maliyetli TB teşhisinin ön planda olduğu kaynakları kısıtlı ülkeler ve gelişmiş bir alt yapısı bulunmayan laboratuvarlar için yüksek maliyetli olabilmektedirler (Pai ve ark., 2009). Bu sistemlerin en büyük avantajları katı kültür yöntemleriyle 28-42 gün de alınan İDT sonuçlarını 10 gün kadar kısa bir süreye indirmesidir (WHO, 2018) BACTEC 460 TB, yaygın olarak kan kültürlerinde kullanılan yarı otomatize bir sistemdir.  $^{14}\text{CO}_2$  işaretli radyoaktif substratın besiyerine eklenmesi ve dekarboksilasyon sırasında açığa çıkan  $^{14}\text{CO}_2$ ’ün ölçülmesiyle bakteriyel büyümeyi tespit etmektedir. Ortalama 8-14 gün içerisinde üreme pozitifliği alınabilmektedir. Ancak radyoaktif bileşen kullanılması nedeniyle yeni başka tekniklere geçilmiştir (DeLand ve Wagner, 1969; Siddiqi ve ark., 1981). BacT/ALERT 3D sistemi, kültür tüpleri içerisinde ışıktan etkilenen bir  $\text{CO}_2$  sensörü kullanır. Kültür ortamındaki canlı TB basillerinin ürettiği  $\text{CO}_2$ ’yi, tüp içerisindeki ışığa duyarlı  $\text{CO}_2$  sensörleri ile algılar ve sensörün renginin yeşilden sarıya dönüşmesine neden olur. Ortalama 4-8 gün içerisinde mikobakterileri tespit edebilmektedir (Inderlied ve Nash, 2005; Tortoli ve Palomino, 2007). VersaTrek, ilk olarak kan kültürleri için geliştirilip ardından diğer vücut sıvılarındaki mikobakterilerin tespiti için de kullanma geçen tam otomatize bir sistemdir. Sistem, sıvı kültürdeki TB basillerinin metabolik faaliyetleri sonucu oluşan gaz üretimi ya da tüketimi ile meydana gelen basınç değişikliklerini takip eder. İnkübasyon

süresince sürekli O<sub>2</sub> tüketen TB basillerini, kapalı kültür tüplerinin üst boşluğundaki basıncın azalmasıyla tespit etmektedir. Yaklaşık 4-5 gün içerisinde üreme pozitifliği alınabilmektedir (Inderlied ve Nash, 2005; Tortoli ve ark., 1998). MGIT 960 sistemi ise mevcut otomatize sistemler içerisinde en yaygın kullanılanı olup floresan bazlı tam otomatize bir sistemdir. İçerisinde 7H9 sıvı besiyerine ilaveten tüpün alt kısmında silikona gömülü halde oksijenle söndürülmüş florokrom (rutenyum kompleksi) bulundurulur. İnkübasyon süresince TB basilleri ortamdaki oksijeni tüketir, oksijenin tükenmesiyle birlikte florokrom artık inhibe edilemediğinden UV ışık altında floresan ışıma yapar. Bu ışımlar da cihaz tarafından belli aralıklara ölçülür ve ortalama 6-7 gün içerisinde üreme pozitifliği alınabilmektedir (Inderlied ve Nash, 2005; Siddiqi ve Rüşch-Gerdes, 2006).

#### 2.9.5 Hızlı moleküler Testler

DSÖ, tedaviye başlanmadan önce ilk olarak hızlı moleküler testler ile ilaç direncinin belirlenmesini önermektedir. Moleküler alandaki gelişmeler sayesinde TB basilinin tespiti saatler içerisinde yapılabilmektedir. Amplifikasyona dayalı tekniklerle *M. tuberculosis*'ye özgü nükleik asitler tespit edilebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asit hibridizasyonu ve sekanslama teknikleriyle ilaç direncine neden olan gen mutasyonları saptanabilmektedir (Balasingham ve ark., 2009; Nurwidya ve ark., 2018). Xpert® MTB/RIF (Cepheid, ABD), Truenat® MTB (Molbio Diagnostic, Hindistan), RealTime MTB RIF/INH (Abbott Molecular, ABD), BD MAX™ MDR-TB (Becton-Dickinson, ABD), FluoroType MTBDR (Bruker/Hain Lifescience, Almanya), cobas® MTB RIF/INH (Roche Molecular Diagnostic, ABD), Xpert MTB/XDR (Cepheid, ABD), GenoType MTBDRplus (Bruker/Hain Lifescience, Almanya), Genoscholar™ NTM + MDRTB Detection Kit (NIPRO Corporation, Japonya), GenoType MTBDRsl (Bruker/Hain Lifescience, Almanya), Genoscholar PZA-TB (NIPRO Corporation, Japonya) testleri şu anda *M. tuberculosis*'de ilaç direncinin hızlı tespiti için DSÖ tarafından önerilen moleküler testlerdir. Sanılanın aksine hızlı moleküler testler fenotipik yöntemlere olan gereksinimi ortadan kaldırmamakla beraber tedaviye verilen yanıtları takip etmek, uyumsuz test sonuçlarını karşılaştırabilmek,

moleküler testlerin kullanılmadığı ilaçlar için İDT uygulamak ve ilaç dozu belirleme çalışmalarına kılavuzluk etmek gibi birçok çalışma için hala fenotipik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (WHO, 2022b). Dolayısıyla da hem moleküler hem fenotipik İDT hizmetlerinin TB tedavisinin daha kontrollü şekilde yürütülmesi için birlikte sunulması gereklidir.

### 2.9.6 Kolorimetrik Yöntemler

Kültür bazlı fenotipik yöntemlerin İDT sonuçlarını 3-4 hafta kadar uzun sürede vermesi ve yüksek biyogüvenlik seviyesi gerektirmesi, otomatize sıvı kültür sistemlerinin bunlara nispeten daha kısa sürede sonuç vermesi ancak pahalı teknik ekipmanlarla uygulanıyor olması ve son olarak moleküler testlerin düşük gelirli ülkeler için yüksek maliyetli olması, daha ucuz, güvenilir, hızlı sonuç veren, uygulama açısından kolay ve ekstradan cihaz kullanımı gerektirmeyen basit İDT yöntemlerinin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Bu tür avantajlara sahip yöntemlerin en başında kolorimetrik İDT yöntemleri gelmektedir. *M. tuberculosis* için kolorimetrik yöntemler, ilaca maruz bırakılan TB basillerinin üremesinin belli bir yoğunluğa ulaştığı zaman sıvı kültüre eklenen oksidasyon-redüksiyon indikatörünün indirgenmesini baz alır (Yajko ve ark., 1995). Malaşit yeşili dekolarizasyon testi (MYDT), kristal viyole dekolarizasyon testi (KVDT), NRT (NRT), rezasurin testi, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT) testi, 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) testi, ilaç direncinin hızlı tespiti için kullanılan kolorimetrik yöntemlerdir (Coban ve ark., 2016; Coban ve Uzun, 2013; De Logu ve ark., 2001; Palomino ve ark., 2007a).

**Rezasurin Testi:** İlaç direncinin tespiti için *M. tuberculosis*'de kullanılan ilk indikatörlerden birisidir. Daha önceden “alar mar mavisı” olarak bilinmekte olup, yapılan kütle spektrometresi analizi ile ikisinin de aynı bileşikler olduğu gösterilmiştir (J. C. Palomino ve ark., 2007b). Rezasurin indikatörü, ilk kez sütün test edilmesinde kullanılmış ardından hücre canlılık testlerinde, antimikrobiyal etkinlik testlerinde, memeli hücrelerindeki sitotoksite çalışmalarında ve bakteriyel kontaminasyon

değerlendirmelerinde biyolojik bir gösterge olarak kullanılmıştır. Testin prensibinde mavi renkli floresan olmayan rezasurin boyası bakteride meydana gelen metabolik aktivite sonucu pembe renkli floresan bir bileşik olan resorufine dönüşür(Mann ve Markham, 1998; O'Brien ve ark., 2000). İlk kez Yajko ve ark. tarafından *M. tuberculosis* izolatlarının İNH, RİF, STR ve EMB MİK'lerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Yajko ve ark., 1995) 7H9 sıvı besiyeriyle hem tüpte hem de plaklarda uygulanabilen rezasurin testi yaklaşık 8-10 gün içerisinde sonuç vermekte olup günümüzde de kullanılmaya devam etmektedir (Coban ve ark., 2006; Coban ve ark., 2014a).

**Nitrat Redüktaz Testi (NRT):** Griess yöntemi olarak da bilinen bu test, sıvı besiyerine substrat olarak eklen  $\text{KNO}_3$ 'ün *M. tuberculosis*'deki nitrat redüktaz enzimi sayesinde  $\text{NO}_2$ 'ye indirgenmesi ve ortamdaki  $\text{NO}_2$  nin de kültüre eklenen Griess ayırıcı ile tespit edilmesi esasına dayanır (CDC, 1985). Ortamda  $\text{NO}_2$  varlığında ayıraç ilavesi sonrası anında mor-menekşe rengi oluşmaktadır. Buna göre renk dönüşümü ortamda nitrat redüktaz enzim aktivitesinin olduğunu yani dolaylı olarak canlı TB basillerinin olduğu anlamına gelmektedir. J.P. Griess tarafından kimyasal mekanizmasını keşfedilen NRT, ilk olarak Rusyada bir tüberküloz araştırma enstitüsünde geliştirilmiştir(Golyshevskai ve ark., 1996). *M. tuberculosis* diğer mikobakterilere kıyasla  $\text{KNO}_3$ 'ü daha güçlü indirgeyebilmektedir. Böylelikle de üreme pozitifliği anlamına gelen yoğun mor-menekşe renk oluşumuyla diğer mikobakterilerden ayırt edilebilmektedir (WHO, 1998).  $\text{KNO}_3$  içeren 7H9 sıvı besiyeriyle hem de LJ besiyeriyle uygulanabilen NRT ile, yaklaşık 5-14 gün içerisinde İDT sonuçları alınabilmektedir (Coban ve ark., 2004, 2012). Direkt dekontamine edilmiş klinik örneklerden de çalışılabilen NRT ile, ÇİD-TB ve YİD-TB'nin hızlı tespitinde oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (Martin ve ark., 2014).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışmasının tüm deneysel basamakları Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezinde (AKVUAM) gerçekleştirildi. *M. tuberculosis* suşlarının kullanıldığı aşamalarda tüm işlemler merkezde bulunan biyogüvenlik seviye-3 (BSL-3) laboratuvarında, Class II tip B mikrobiyolojik güvenlik kabininde (MAC-SİSTEM, DEMAİR, Türkiye), kişisel koruyucu ekipmanlarla (3M™ Versaflo™ Powered Air Purifying Respirator (PAPR) TR-300+, ABD) güvenlik önlemleri alınarak yapıldı.

#### 3.1. *M. tuberculosis* Suşları

Çalışmada referans suşlar olarak tüm anti-TB ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* ATCC 27294 (H37Rv) ve dirençli suşlar olarak H37Rv'nin *in vitro* mutant suşları olan *M. tuberculosis* ATCC 35838 (RİF-Dirençli), ATCC 35820 (STR-Dirençli), ATCC 35837 (EMB-Dirençli) suşları kullanıldı. Ayrıca fenotipik ve genotipik olarak direnç profilleri belirlenmiş 1 adet ÇİD-TB izolat ve tüm primer anti-TB ilaçlara duyarlı 2 adet *M. tuberculosis* izolatı çalışmaya dahil edildi. Kullanılan referans suşlar ve klinik izolatlar AKVUAM kültür koleksiyonundan temin edildi.

#### 3.2. Bakteri İnokulumlarının Hazırlanması

Çalışmaya alınan tüm izolatların Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş taze kültürleri kullanılarak inokulumları hazırlandı. İçerisinde 8-10 adet steril cam boncuk ve 3-5 ml serum fizyolojik içeren tüplere taze kültürden koloniler aktarıldıktan sonra tüplerin ağzı sıkıca kapatılıp parafilm ile sarıldı. Sonrasında yaklaşık 1 dakika boyunca 2500 rpm'de vorteks (Onilab MX-S, ABD) ile karıştırılıp ardından aerosollerin ve büyük partiküllerin çökmesi için tüpler dik konumda yaklaşık 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra süpernatant kısmı alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve McFarland densitometre cihazı (BioSan DEN-1, Letonya) kullanılarak her bir suş için McFarland no 1 standardında bakteri süspansiyonları hazırlandı (WHO, 2018).

### 3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

**3.3.1. Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyeri:** Disk temelli yeni yöntemin uygulanmasında Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri (271310 BD Difco™, ABD) kullanıldı. Besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Firma önerilerine ilaveten izolatların nitrat redüktaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla besiyeri içerisine finalde 0.001 g/ml konsantrasyonda olacak şekilde potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>) (960.116 ISOLAB, Almanya) eklendi.

#### *Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyeri hazırlanışı:*

- 7H9 toz besiyeri 4.7 g
- KNO<sub>3</sub> 1.0 g
- Gliserol 2 ml
- Distile su 900 ml

Olacak şekilde tüm toz bileşenler hassas terazide (OHAUS PIONEER™ PA423, ABD) tartıldı ve gliserollü (1.04057.2511 Merck, Almanya) distile su içerisinde karıştırıldı. Besiyeri, 121°C’de 15 dakika 1 atm basınç altında otoklav (NUVE NC 40M, Türkiye) ile steril edildi. Sterilizasyon sonrası su banyosunda (BLULAB BDSB 20, Türkiye) 50-55 °C’ye soğutuldu. Ardından besiyeri içerisine %10 oranında 100 ml Middlebrook OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz) zenginleştirici (211886 BD BBL™, ABD) eklendi. Hazırlanan besiyeri kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında (Hotpoint-Ariston ENTM 18210 V (TK), İtalya) muhafaza edildi.

**3.3.2. Mueller-Hinton II (MH) Agar Besiyeri:** Antibiyotik disklerinin ön deneme çalışmasında uygulanan agar disk difüzyon yöntemi için MH Agar (211438 BD BBL™, ABD) besiyeri kullanıldı. Besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı.

#### *MH Agar Besiyeri hazırlanışı:*

- MH Agar toz besiyeri 38 g
- Distile su 1000 ml

Olacak şekilde toz bileşenler hassas terazide tartıldı ve distile su içerisinde karıştırıldı. Besiyeri, 121°C’de 15 dakika 1 atm basınç altında otoklav ile steril edildi. Sterilizasyon sonrası su banyosunda 50-55 °C’ye soğutuldu. Soğutulan besiyerinden 25’er ml alınarak 90 mm’lik steril cam petrilere dağıtıldı. Agar plaklar oda sıcaklığında katılaştıktan sonra kullanıma kadar +4°C’de buzdolabında saklandı.

**3.3.3 Middlebrook 7H10 Agar Besiyeri:** Altın standart yöntem olarak önerilen agar proporsiyon yöntemin uygulanması için 7H10 agar besiyeri (262710 BD Difco™, ABD) kullanıldı. Besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı.

***Middlebrook 7H10 Agar Besiyeri hazırlanışı:***

- 7H10 toz besiyeri 19 g
- Gliserol 5 ml
- Distile su 900 ml

Olacak şekilde toz bileşenler hassas terazide tartıldı ve gliserollü distile su içerisinde karıştırıldı. Besiyeri, 121°C’de 15 dakika 1 atm basınç altında otoklav ile steril edildi. Sterilizasyon sonrası su banyosunda 50-55 °C’ye soğutuldu. Ardından besiyeri içerisine %10 oranında 100 ml Middlebrook OADC zenginleştirici eklendi. Besiyerinden 200’er ml alınarak 5 adet steril cam şişeye dağıtıldı. Besiyerlerinden biri üreme kontrol besiyeri olarak kullanılacağı için içerisine antibiyotik eklenmedi. Diğer 4 şişeye finalde CLSI tarafından önerilen kritik konsantrasyonlarında olacak şekilde sırasıyla İNH, RİF, STR ve EMB antibiyotikleri hesaplanan miktarlarda besiyeri ortamına eklendi. Besiyerlerinin içerisine eklenecek antibiyotik miktarları aşağıdaki formüle göre belirlendi ve antibiyotiklerin finaldeki kritik konsantrasyonları ile stok solüsyondan alınması gereken miktarları Tablo 3.1 de gösterildi.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

\***C1:** Stok antibiyotik solüsyonun konsantrasyonu (µg/ml)

\***V1:** Stok antibiyotik solüsyonun hacmi (ml)

\***C2:** Çalışmada kullanılacak antibiyotik konsantrasyonu (µg/ml)

\***V2:** Çalışmada kullanılacak antibiyotik solüsyonun hacmi (ml)



**Tablo 3.1** Agar proporsiyon yönteminde kullanılan primer anti-TB ilaçların kritik konsantrasyonları ve besiyerlerine eklenecek miktarları

| <i>Primer Anti-TB İlaçlar</i>       | İNH   | RİF   | STR   | EMB   |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Kritik Konsantrasyon (µg/ml)</i> | 0.2   | 0.5   | 2.0   | 5.0   |
| <i>Stok solüsyon hacmi (ml)</i>     | 0,005 | 0,012 | 0,049 | 0,122 |

8192 µg/ml’lik stok antibiyotik solüsyonlarından tabloda belirtilen miktarlarda alınarak 50-55°C’ye soğutulmuş besiyeri içerisine (200 ml) direkt eklendi. Ardından steril vida kapaklı tüplere 5’er ml besiyeri dağıtıldı. Tüpler yatık pozisyonda ışık almayan ortamda oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Besiyeri katılaştıktan sonra çalışmada kullanılmaya kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi. Antibiyotik etkinliğinin azalmasını engellemek için besiyerlerinin kullanım süresinin 1 ayı geçmemesine özen gösterildi (WHO, 2018).

### 3.4. Ayıraçların Hazırlanması

**3.4.1. Rezasurin Solüsyonu:** Rezasurin testinde kullanılmak üzere %0.01’lik (a/h) konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Bunun için hassas terazide 0.01 g rezasurin sodyum tuzu (R7017 Sigma-Aldrich, ABD) tartıldı ve 100 ml steril distile su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan solüsyon 0.22 µm por çapına sahip membrane filtre (ISOLAB, Almanya) ile steril edildi ve en fazla 1 hafta süreyle +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi (Palomino ve ark., 2004).

**3.4.2. Griess Ayıracı:** NRT’de kullanılmak üzere 1 birim %50’lik (h/h) hidroklorik asit (HCl) (109057 Merck, Almanya), 2 birim %0.2’lik (a/h) sülfanilamid (111799 Merck, Almanya) ve 2 birim %0.1’lik (a/h) n-1-naftil-etilendiamin dihidroklorid’in (222488 Sigma-Aldrich, ABD) bir araya getirilmesi ile Griess ayıracı hazırlandı (Coban ve ark., 2004). HCl hariç diğer bileşenler toz formda kullanıldı.

### **200 ml Griess ayıracı hazırlanması:**

- Sülfanilamid 0,16 g toz + 80 ml steril distile su
- N-1-naftil-etilendiamin dihidroklorid 0,08 g toz + 80 ml steril distile su
- Hidroklorik asit 40 ml

Sülfanilamid ve N-1-naftil-etilendiamin dihidroklorid solüsyonları belirtilen final konsantrasyonlarda olacak şekilde ayrı solüsyonlar halinde hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar başka bir şişe içerisinde birleştirildi ve en son üzerine HCl dikkatlice eklendi. Ayıraç çalışmada kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.5. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması**

Primer anti-TB ilaçlar olan **INH** (I3377 Sigma-Aldrich, ABD), **RIF** (R3501 Sigma-Aldrich, ABD), **STR** (S6501 Sigma-Aldrich, ABD) ve **EMB** (E4630 Sigma-Aldrich, ABD) antibiyotiklerinin ticari toz formları kullanılarak 8192 µg/ml konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlandı. Antibiyotiğin potensine göre stok konsantrasyonunun hazırlanması için tartılması gereken miktar ve çözücü hacmi aşağıdaki formüle göre belirlendi (WHO, 2018).

$$\text{Çözücü (ml)} = \frac{\text{Potens } (\mu\text{g/mg}) \times \text{Ağırlık (mg)}}{\text{Stok konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}$$

Antibiyotiklerin çözücüleri, potensleri ve tartım miktarları tablo 3.2 de gösterildi. RIF hariç tüm antibiyotikler belirtilen çözücülerde çözdürüldükten sonra 0.22 µm’lik membran filtreler ile steril edildi. Ardından 1’er ml hacminde hazırlanarak çalışmada kullanılıncaya kadar -80°C’de muhafaza edildi.

**Tablo 3.2.** Stok antibiyotik solüsyonun hazırlanmasında kullanılan parametreler ve miktarları

| <i>Antibiyotik</i> | <i>Potens (%)</i> | <i>Ağırlık (mg)</i> | <i>Konsantrasyon (µg/ml)</i> | <i>Çözücü</i> | <i>Hacim (ml)</i> |
|--------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|---------------|-------------------|
| <b>İNH</b>         | %99               | 51                  | 8192                         | Distile su    | 6.16              |
| <b>RİF</b>         | %97               | 56                  | 8192                         | Metanol       | 6.63              |
| <b>STR</b>         | %72               | 52                  | 8192                         | Distile su    | 4.57              |
| <b>EMB</b>         | %99               | 56                  | 8192                         | Distile su    | 6.76              |

### 3.6. Antibiyotik Diskleri

Antibiyotik diskleri için 6 mm çapında boş kâğıt diskler kullanıldı. Boş disklerin 100-200 adeti borosilikat cam şişe içerisinde 121°C’de 15 dakika otoklav ile steril edildi. Sterilizasyon sonrası disklerin nemli olma ihtimaline karşı 80°C’ye ayarlı etüvde (BLULAB, Türkiye) minimum 5 saat bekletildi. Tamamen kurutulduktan sonra çalışmada kullanılıncaya kadar 25°C’de oda sıcaklığında muhafaza edildi.

#### 3.6.1 Antibiyotik Disklerinin Hazırlanması

Her bir diske standart bir hacim ve konsantrasyonda antibiyotik solüsyonun emdirilmesi için sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlendi.

**Disklere emdirilecek antibiyotik solüsyonun hacmi:** Disklere emdirilecek antibiyotik solüsyonlarının hacminin belirlenmesi için 10-20 µl arasındaki sıvı hacimleri disklere ayrı ayrı emdirildi ve diskin maksimum 16 µl sıvı tutma kapasitesi olduğu, 16 µl’nin üzerindeki hacimlerde diskten sıvıların taşıdığı ve bulundukları yüzeyde ıslaklık oluşturduğu gözlemlendi. Böylelikle disklere emdirilecek antibiyotik solüsyonun hacmi 16 µl olarak belirlendi.

**Disklere emdirilecek antibiyotik solüsyonunun konsantrasyonu:** Antibiyotikler sırasıyla İNH için 0.2 µg/ml, RİF için 1 µg/ml, STR için 2 µg/ml ve EMB için 5 µg/ml kritik konsantrasyonda ve 1 ml sıvı besiyeri içerisinde test edileceği için, sırasıyla disklerde 0.2 µg İNH, 1 µg RİF, 2 µg STR ve 5 µg EMB olacak şekilde konsantrasyonlarda hazırlandı. Disklerin istenilen ağırlıkta (µg) antibiyotik tozu içermesi için aşağıdaki formül uygulandı.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

- \***C1:** Stok antibiyotik solüsyonun konsantrasyonu (µg/µl)
- \***V1:** Stok antibiyotik solüsyonun hacmi (µl)
- \***C2:** Çalışmada kullanılacak antibiyotik konsantrasyonu (µg/µl)
- \***V2:** Çalışmada kullanılacak antibiyotik solüsyonun hacmi (µl)

Tüm antibiyotikler için sırasıyla hesaplamalar yapıldı (Vineetha ve ark., 2015):

➤ **İNH disklerinin hazırlanması**

$$8,192 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times V1 = 0.2 \mu\text{g}/16 \mu\text{l} \times 4000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 6,10 \mu\text{l}$$

\*6,10 µl stok solüsyondan alınıp 3994 µl steril distile su içerisine eklendi.

➤ **RİF disklerinin hazırlanması:**

$$8,192 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times V1 = 1 \mu\text{g}/16 \mu\text{l} \times 2000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 15,26 \mu\text{l}$$

\*15, 26 µl stok solüsyondan alınıp 1985 µl steril distile su içerisine eklendi.

➤ **STR disklerinin hazırlanması:**

$$8,192 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times V1 = 2 \mu\text{g}/16 \mu\text{l} \times 2000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 30,52 \mu\text{l}$$

\*30,52 µl stok solüsyondan alınıp 1970 µl steril distile su içerisine eklendi.

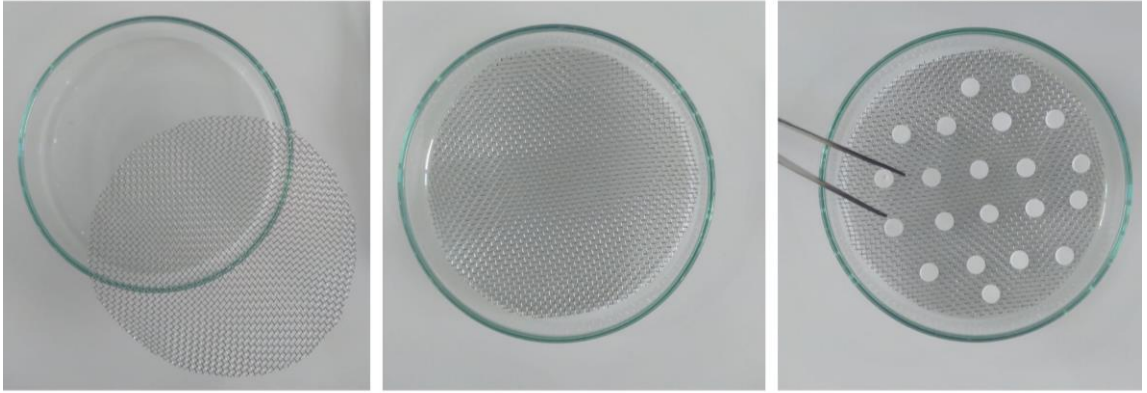
➤ **EMB disklerinin hazırlanması:**

$$8,192 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times V1 = 5 \mu\text{g}/16 \mu\text{l} \times 2000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 76,29 \text{ } \mu\text{l}$$

\*76,29  $\mu\text{l}$  stok solüsyondan alınıp 1924  $\mu\text{l}$  steril distile su içerisine eklendi.

***Disklere antibiyotiklerin emdirilmesi:*** Disklere emdirilecek antibiyotik solüsyonları hazırlandıktan sonra diskler kurutma işlemi için hazırlandı. Her bir antibiyotik solüsyonu için içerisinde 90 mm'lik petri kabının iç ölçülerine uygun şekilde kesilmiş paslanmaz çelik tel örgü bulunan cam petri kapları otoklav ile 121°C'de 15 dakika süreyle steril edildi. Sterilizasyon sonrası petriler kapağı açık bir şekilde öncesinde 2 saat boyunca 90°C'de ısıtılmış etüv içerisinde kurumaya bırakıldı. Tamamen kurumuş tel örgüler üzerine belirli aralıklara steril boş diskler yerleştirildi (Pfeiffer ve ark., 1976; Rippere, 1978). Her bir petri kabına yaklaşık 20 adet disk aralarında en az 5 mm boşluk olacak şekilde dizildi (Şekil 3.1). Hazırlanan antibiyotik solüsyonlarından 16  $\mu\text{l}$  alınarak disklere emdirildi. Disklerin sıvıyı kademeli olarak emmesi için tüm sıvı tek seferde disk üzerine bırakılmadı. İki defa 8  $\mu\text{l}$ 'lik hacimlerde eklendi.



**Şekil 3.1** Antibiyotik disklerinin kurutma için hazırlanması

**Antibiyotik emdirilmiş disklerin kurutulması:** Kurutma aşaması öncesi etüv 90°C’de 2 saat sterilizasyon amaçlı tutuldu. Ardından antibiyotik disklerinin kurutma sıcaklığı olan 50°C ye düşürülerek antibiyotik diskleri üzeri açık bir şekilde 1 saat kurumaya bırakıldı.

**Antibiyotik disklerinin saklanması:** Kurutulmuş antibiyotik diskleri steril, içi boş, şeffaf, polipropilen malzemeden yapılmış, vida kapaklı tüplere tek tek koyuldu. İçerisinde disk bulunan tüpler +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi. Antibiyotik diskleri bu saklama koşullarında sadece 24 saat bekletildi. Diskler 24 saat içerisinde çalışmada kullanıldı ve test edildi. Raf ömrü açısından tez çalışması sonrasında da devam eden süreçte denemeler yapılmak üzere disklerin geri kalanı -20°C de saklandı (Vineetha ve ark., 2015).

### **3.6.2. Disklerin Hazırlık Aşaması ve Etkinliğinin Güvenilirliğinin Test Edilmesi**

*M. tuberculosis* suşlarının ilaç duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla kullanılacak olan, manuel olarak hazırlanan antibiyotik disklerinin hazırlık aşamasının gözden geçirilmesi, disklerin uygun hacimde, doğru konsantrasyonda antibiyotik içerdiğinin doğrulanması ve disk kurutma koşullarının ilaç duyarlılık sonuçları üzerindeki etkisinin belirlenmesi gibi amaçlarla ön deneme çalışması gerçekleştirildi.

Ön deneme çalışmasında *M. tuberculosis* izolatlarına göre çok daha hızlı çoğalabilen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 suşları sırasıyla RİF ve STR için disk difüzyon yöntemiyle test edildi. Her iki bakteri için CLSI tarafından önerildiği şekilde (RİF için 5 µg ve STR için 10 µg) antibiyotik diskleri hazırlandı (CLSI, 2020). Disklerin hazırlanmasında farklı antibiyotik konsantrasyonunun kullanılması dışında tüm aşamalar aynen tekrarlandı.

***Disklere emdirilecek antibiyotik solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi:***

➤ ***RİF antibiyotik disklerinin hazırlanması:***

$$8,192 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times V1 = 5 \mu\text{g}/16 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 38,15 \mu\text{l}$$

\*38,15 µl stok solüsyondan alınıp 961,85 µl steril distile su içerisine eklendi.

➤ ***STR antibiyotik disklerinin hazırlanması:***

$$8,192 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times V1 = 10 \mu\text{g}/16 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 76,29 \mu\text{l}$$

\*76,29 µl stok solüsyondan alınıp 923,71 µl steril distile su içerisine eklendi. Hazırlanan antibiyotik solüsyonları 3.6.1’de anlatıldığı şekilde aynen uygulandı.

***Disk difüzyon yöntemi uygulanması***

Disk difüzyon yöntemi EUCAST tarafından önerildiği şekilde gerçekleştirildi (EUCAST, 2023). Kanlı agarda üremiş taze bakteri kültürleri kullanılarak direkt koloni süspansiyonu metoduyla 0.5 McFarland bulanıklığında ( $1.5 \times 10^8$  KOB/ml) bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar 15 dakika içerisinde MH agar plaklar üzerine steril eküvyon ile üç yönlü olmak üzere hiç boş yer bırakılmadan inoküle edildi. Bakteri ekimi sonrası 5 µg RİF içeren antibiyotik diski *S. aureus* plağına, 10 µg STR içeren antibiyotik diski *E. coli* plağına steril bir pens ile yerleştirildi. Agar plaklar  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 16-18 saat süreyle inkübe edildi.

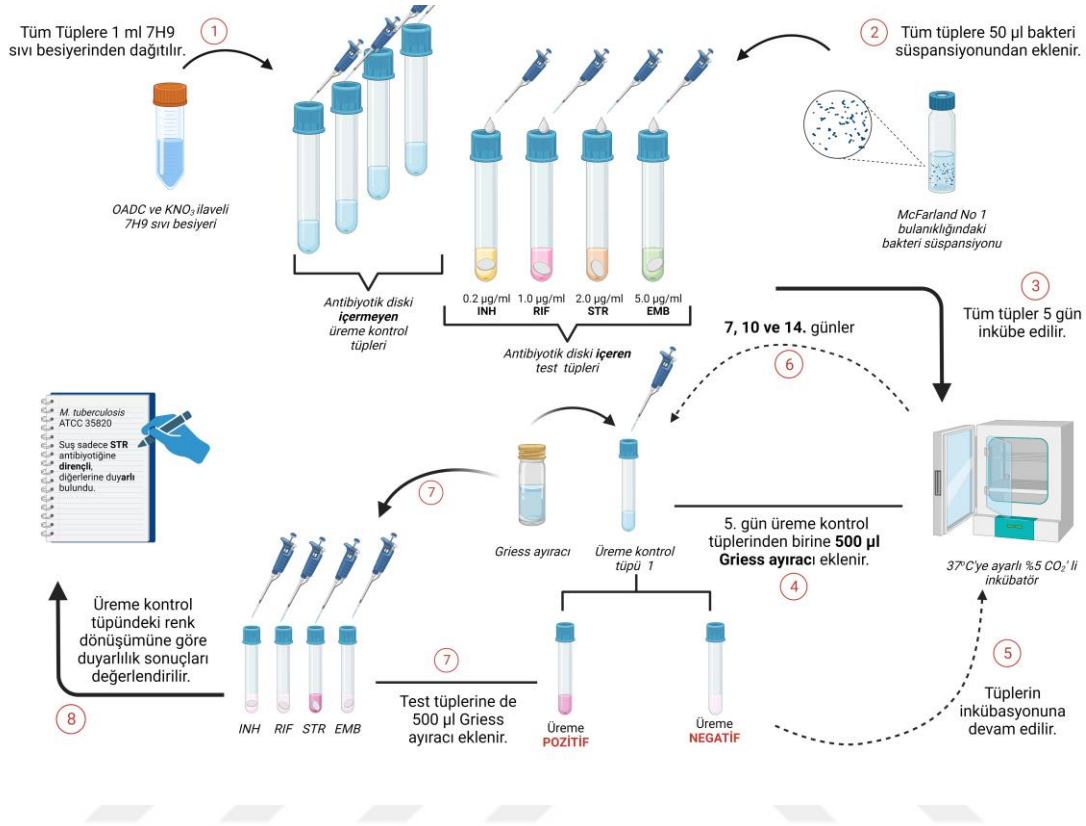
**3.7. Disk Temelli Yeni Fenotipik İlaç Duyarlılık Yöntemi**

Çalışmamızda yeni geliştirilen disk temelli fenotipik ilaç duyarlılık yöntemi kolorimetrik testler olan NRT ve Rezasurin test yöntemleri ile birlikte uygulandı. Her iki kolorimetrik test yöntemi de eş zamanlı olarak aynı bakteriyel inokulumların ve aynı anda hazırlanmış antibiyotik disklerinin kullanımıyla gerçekleştirildi.

### 3.7.1 Disk Temelli Yeni Yöntemin NRT ile Birlikte Uygulanması ve Testin Değerlendirilmesi

Her bir *M. tuberculosis* suşu için 4 adet antibiyotik diski içermeyen üreme kontrol tüpü ve sırasıyla içerisinde 1 adet İNH, RİF, STR ve EMB disklerini içeren test tüpleri hazırlandı. Üreme kontrol ve test tüplerinin içerisine  $\text{KNO}_3$ 'lü ve %10 OADC'li 7H9 sıvı besiyerinden 1 ml dağıtıldı. Ardından tüplere McFarland no 1 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonlarından direkt 50 µl inoküle edildi. İnokülasyon sonrası tüpler %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde 37°C'de 5 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ilk 2 günü tüpler kontaminasyon kontrolü açısından takip edildi. Herhangi bir bulanıklık ve partikül oluşumu ile kontamine olduğu tespit edilen tüplerin inkübasyonu sonlandırıldı ve test için yeniden hazırlandı. İnkübasyonun 5. günü üreme kontrol tüplerinden ilkinde 500 µl Griess ayırıcı eklendi. Üreme kontrol tüpünde anlık olarak mor-menekşe renk oluşumu gözlemlendi ise bu durum üreme pozitifliği olarak kabul edildi ve aynı suş setinin antibiyotik diski içeren test tüplerine de 500'er µl Griess ayırıcından eklenerek test sonlandırıldı. Eğer antibiyotik diski içeren test tüpünde ayıraç ilavesi sonrası en az üreme kontrol tüpündeki kadar yoğun ve canlı bir renk dönüşümü gözlemleniyse test edilen suş o antibiyotik için "dirençli" kabul edildi. Eğer antibiyotik diski içeren test tüpünde ayıraç ilavesi sonrası üreme kontrol tüpündeki renk dönüşümünden daha az yoğun ve açık renkte renk dönüşümleri olduysa test edilen suş o antibiyotik için "duyarlı" kabul edildi. Eğer üreme kontrol tüpünde anlık olarak renk dönüşümü gözlenmediyse antibiyotik diski içeren test tüplerine ayıraç eklenmedi ve ayıraç eklenen üreme kontrol tüpü hariç tüm tüplerin inkübasyonuna devam edildi. İnkübasyonun 7, 10, ve 14. günlerinde de diğer üreme kontrol tüpleri üzerinden aynı işlemler gerçekleştirildi. Üreme kontrol pozitifliğine göre çalışma sonlandırıldı.



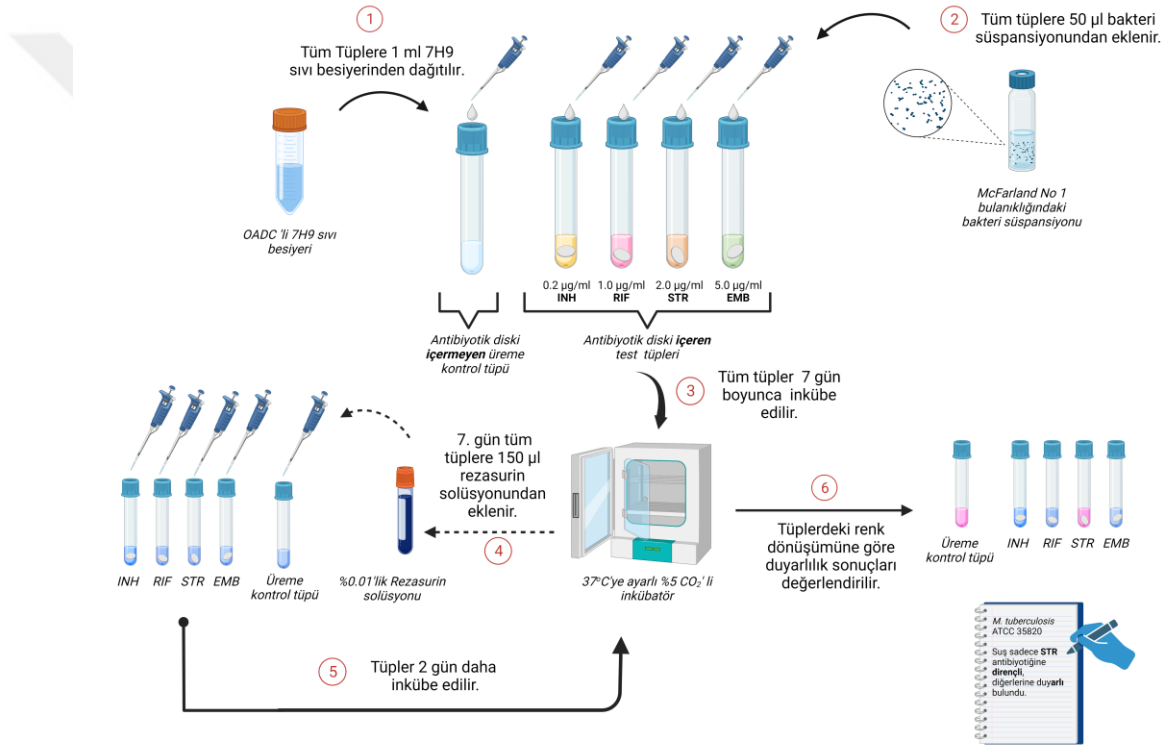


**Şekil 3.2.** Disk temelli yeni yöntemin NRT ile birlikte uygulanması

### 3.7.2 Disk Temelli Yeni Yöntemin Rezasurin Testi ile Birlikte Uygulanması ve Testin Değerlendirilmesi:

Her bir *M. tuberculosis* suşu için 1 adet antibiyotik diski içermeyen üreme kontrol tüpü ve sırasıyla içerisinde 1 adet İNH, RİF, STR ve EMB disklerini içeren test tüpleri hazırlandı. Üreme kontrol ve test tüplerinin içerisine %10 OADC'li 7H9 sıvı besiyerinden 1 ml dağıtıldı. Ardından tüplere McFarland no 1 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonlarından direkt 50 µl inoküle edildi. İnokülasyon sonrası tüpler %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de 7 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun ilk 2 günü tüpler kontaminasyon kontrolü açısından takip edildi. Herhangi bir bulanıklık ve partikül oluşumu ile kontamine olduğu tespit edilen tüplerin inkübasyonu sonlandırıldı ve test için yeniden hazırlandı. İnkübasyonun 7. gününde üreme kontrol tüpü ve test tüplerinin tümüne %0.01'lik rezasurin solüsyonundan 150 µl eklendi ve tüpler aynı inkübasyon koşullarında 48 saat daha inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda üreme kontrol tüpünde

başlangıçta mavi renkli olan rezasurin solüsyonunun üreme pozitifliğinin göstergesi olarak pembe renge dönüşmesiyle test sonlandırıldı ve ilaç duyarlılık sonuçları değerlendirildi. Üreme kontrol tüpünde pembe renk oluşumu üreme pozitifliğini göstermektedir. Test tüplerinde ise pembe renk dönüşümü sonucu test edilen suş o antibiyotiğe karşı “dirençli” kabul edilirken, renk dönüşümünün olmaması yani başlangıçtaki indikatör rengi olan mavi rengin aynı kalması sonucu test edilen suş o antibiyotiğe karşı “duyarlı” kabul edildi.



**Şekil 3.3** Disk temelli yeni yöntemin rezasurin testi ile birlikte uygulanması

### 3.8. 7H10 Agar Besiyerinde Proporsiyon Yöntemin Uygulanması ve Testin Değerlendirilmesi

Kültür-temelli fenotipik ilaç duyarlılık yöntemleri DSÖ tarafından şu anda “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Geliştirilen disk temelli yeni ilaç duyarlılık yönteminin duyarlılık sonuçlarının doğruluğunu karşılaştırmak amacıyla aynı suşlar altın standart kabul edilen 7H10 Agar besiyerinde proporsiyon yöntemi ile de ilaç duyarlılıkları açısından test edildi.

Testin uygulanmasında her bir *M. tuberculosis* suşu için 1 adet antibiyotiksiz besiyeri içeren üreme kontrol tüpü ve sırasıyla içerisinde daha önceden belirtilen kritik konsantrasyonlarda İNH, RİF, STR ve EMB içeren antibiyotikli test tüpleri hazırlandı. Tüplere 1 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonlarının  $10^{-2}$  dilüsyonundan 100 µl ekim yapıldı. İnokülasyon sonrası tüpler %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de 21 gün süre ile inkübe edildi. İnkübyasyonun ilk 2 günü ve ilerleyen günlerde belirli aralıklarla tüpler kontaminasyon kontrolü açısından takip edildi. Kontamine olduğu tespit edilen tüplerin inkübyasyonu sonlandırıldı ve yeniden hazırlandı. 21 günlük inkübyasyonun sonunda tüpler kontrol edildi. Üreme kontrol tüpünde yeteri kadar üreme olmaması durumunda bazı suşlar için inkübyasyon süresi 28 güne kadar uzatıldı. İnkübyasyon sonrası *M. tuberculosis* suşlarının ilaç duyarlılıkları %1 orantı yöntemine göre değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre anti-TB ilaç içeren besiyerindeki koloni sayısının kontrol besiyerindeki koloni sayısına oranı %1'den az ise suş o antibiyotik için “duyarlı”, %1'e eşit ya da daha fazla sayıda koloni varsa suş o antibiyotik için “dirençli” kabul edildi. Bu durum, basil popülasyonlarının %1'i veya daha fazlasında direnç gözlemlenirse kültürün dirençli olarak bildirildiğini ifade etmektedir.

### **3.9. İlaç Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması ve İstatiksel Analizi**

Disk temelli yeni ilaç duyarlılık yönteminin rezasurin test sonuçları ile NRT sonuçları ayrı ayrı agar proporsiyon test sonuçları ile karşılaştırıldı. İlaç duyarlılık yöntemlerinin karşılaştırmaları özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve uyum açısından değerlendirildi (FDA, 2007).

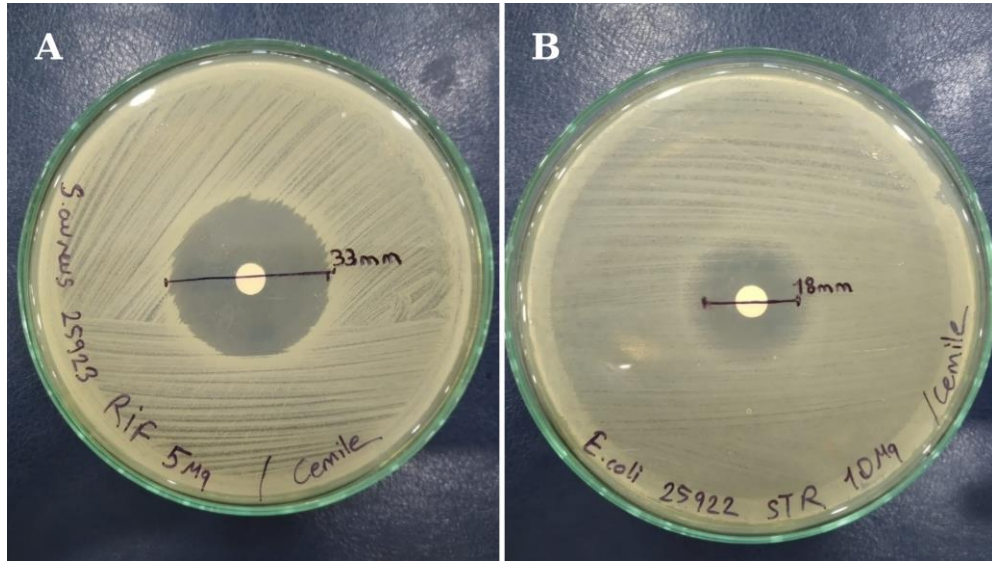
## 4. BULGULAR

### 4.1. Disk Difüzyon Test Sonuçları

Ön deneme çalışması yapılan *S.aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 25922 suşları için inkübasyon sonrası agar plaklarda oluşan zon çapları kumpas ile ölçüldü. Ölçülen zon çapları ve CLSI tarafından belirtilen kalite kontrol (KK) aralıkları Tablo 4.1 de gösterildi. *S. aureus* ATCC 25923 suşu için RİF diskinin zon çapı 33 mm olarak, *E. coli* ATCC 25922 suşu için STR diskinin zon çapı 18 mm olarak ölçüldü. Her iki antibiyotik diskinin de zon çapları CLSI'n önerdiği aralıkta bulundu (Şekil 4.1).

**Tablo 4.1.** CLSI tarafından RİF ve STR için belirenen KK aralıkları ve ölçülen zon çapları

| Test Suşları                | Antibiyotik | Miktar (µg) | KK Aralığı (mm) | Zon Çapı (mm) |
|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------|---------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | RİF         | 5           | 26-34           | 33            |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922   | STR         | 10          | 12-20           | 18            |



**Şekil 4.1.** Disk difüzyon test sonuçları, A) *S.aureus* plağında RİF diski için ölçülen zon çapı, B) *E. coli* plağında STR diski için ölçülen zon çapı

#### 4.2. Disk Temelli Yeni Yöntemin NRT ile Belirlenen Duyarlılık Sonuçları

Disk temelli yeni geliştirilen ilaç duyarlılık yönteminin NRT sonuçlarına göre; referans suşlar içerisinde *M. tuberculosis* ATCC 27294 suşu tüm antibiyotiklere duyarlı, ATCC 35838 (RİF-Dirençli) suşu sadece RİF antibiyotiğine dirençli, ATCC 35820 (STR-Dirençli) suşu sadece STR antibiyotiğine dirençli, ATCC 35837 (EMB-Dirençli) suşu sadece EMB antibiyotiğine dirençli olarak bulundu. Kültür koleksiyonundan alınan daha önce referans yöntemle tanımlanması yapılarak duyarlılık sonucu bilinen izolatlardan ÇİD-TB olarak seçilen ÇİD-1 izolatı tüm primer anti-TB ilaçlara dirençli olarak; duyarlı izolat olarak seçilen D-1 ve D-2 izolatları ise tüm primer anti-TB ilaçlara karşı duyarlı olarak tespit edildi. Duyarlılık sonuçları ve sonuçların elde edildiği süreler Tablo 4.2 de verildi.

**Tablo 4.2.** Disk temelli yeni yöntemin NRT ile belirlenen ilaç duyarlılık sonuçları

| <i>M. tuberculosis</i> | Sonuç  | Primer Anti-TB İlaçlar |     |     |     |
|------------------------|--------|------------------------|-----|-----|-----|
|                        |        | İNH                    | RİF | STR | EMB |
| ATCC 27294 (H37Rv)     | 7.Gün  | S                      | S   | S   | S   |
| ATCC 35838 (RİF-R)     | 5.Gün  | S                      | R   | S   | S   |
| ATCC 35820 (STR-R)     | 5.Gün  | S                      | S   | R   | S   |
| ATCC 35837 (EMB-R)     | 7. Gün | S                      | S   | S   | R   |
| ÇİD-1                  | 5. Gün | R                      | R   | R   | R   |
| D-1                    | 7.Gün  | S                      | S   | S   | S   |
| D-2                    | 5.Gün  | S                      | S   | S   | S   |

#### 4.3. Disk Temelli Yeni Yöntemin Rezasurin Testi ile Belirlenen Duyarlılık Sonuçları

Tüm suşların inkübasyonun 7. günü rezasurin solüsyonunun ilavesi sonrası 2 gün içerisinde renk dönüşümüne göre duyarlılık sonuçları değerlendirildi. Disk temelli yeni geliştirilen ilaç duyarlılık yönteminin rezasurin test sonuçlarına göre; referans suşlar içerisinde *M. tuberculosis* ATCC 27294 suşu tüm antibiyotiklere duyarlı, ATCC 35838 (RİF-Dirençli) suşu sadece RİF antibiyotiğine dirençli, ATCC 35820 (STR-Dirençli) suşu sadece STR antibiyotiğine dirençli, ATCC 35837 (EMB-Dirençli) suşu sadece EMB antibiyotiğine dirençli bulundu. Klinik izolatlardan ÇİD-1 test edilen tüm primer

ilaçlara dirençli bulundu. D-1 ve D-2 izolatları ise tüm primer anti-TB ilaçlara karşı duyarlı olarak tespit edildi (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** Disk temelli yeni yöntemin rezasurin testi ile belirlenen ilaç duyarlılık sonuçları

| <i>M. tuberculosis</i> | Primer Anti-TB İlaçlar |     |     |     |
|------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                        | İNH                    | RİF | STR | EMB |
| ATCC 27294 (H37Rv)     | S                      | S   | S   | S   |
| ATCC 35838 (RİF-R)     | S                      | R   | S   | S   |
| ATCC 35820 (STR-R)     | S                      | S   | R   | S   |
| ATCC 35837 (EMB-R)     | S                      | S   | S   | R   |
| ÇİD-1                  | R                      | R   | R   | R   |
| D-1                    | S                      | S   | S   | S   |
| D-2                    | S                      | S   | S   | S   |

#### 4.4. Agar Proporsiyon Yöntemi ile Belirlenen İlaç Duyarlılık Sonuçları

Tüm suşların ve klinik izolatların inkübasyonun 21. günü %1 orantı yöntemine göre ilaç duyarlılık sonuçları değerlendirildi. Referans suşlar içerisinde *M. tuberculosis* ATCC 27294 suşu tüm antibiyotiklere duyarlı, ATCC 35838 (RİF-Dirençli) suşu sadece RİF antibiyotiğine dirençli, ATCC 35820 (STR-Dirençli) suşu sadece STR antibiyotiğine dirençli, ATCC 35837 (EMB-Dirençli) suşu sadece EMB antibiyotiğine dirençli bulundu. Klinik izolatlardan ise ÇİD-1 test edilen tüm primer ilaçlara dirençli olarak bulunurken, D-1 ve D-2 suşları tüm primer anti-TB ilaçlara karşı duyarlı olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** Agar proporsiyon yöntem ile belirlenen ilaç duyarlılık sonuçları

| <i>M. tuberculosis</i> | Primer Anti-TB İlaçlar |     |     |     |
|------------------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                        | INH                    | RIF | STR | EMB |
| ATCC 27294 (H37Rv)     | S                      | S   | S   | S   |
| ATCC 35838 (RIF-R)     | S                      | R   | S   | S   |
| ATCC 35820 (STR-R)     | S                      | S   | R   | S   |
| ATCC 35837 (EMB-R)     | S                      | S   | S   | R   |
| ÇİD-1                  | R                      | R   | R   | R   |
| D-1                    | S                      | S   | S   | S   |
| D-2                    | S                      | S   | S   | S   |

#### 4.5. İlaç Duyarlılık Testlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları

Yeni geliştirilen ilaç duyarlılık yönteminin NRT sonuçları ile agar proporsiyon test sonuçları arasında özgüllük %100, duyarlılık %100, PPD %100, NPD %100 ve uyum %100 olarak bulundu (Tablo 4.5). Yeni geliştirilen ilaç duyarlılık yönteminin rezasurin test sonuçları ile agar proporsiyon test sonuçları arasında ise yine aynı şekilde özgüllük %100, duyarlılık %100, PPD %100, NPD %100 ve uyum %100 olarak bulundu (Tablo 4.6).

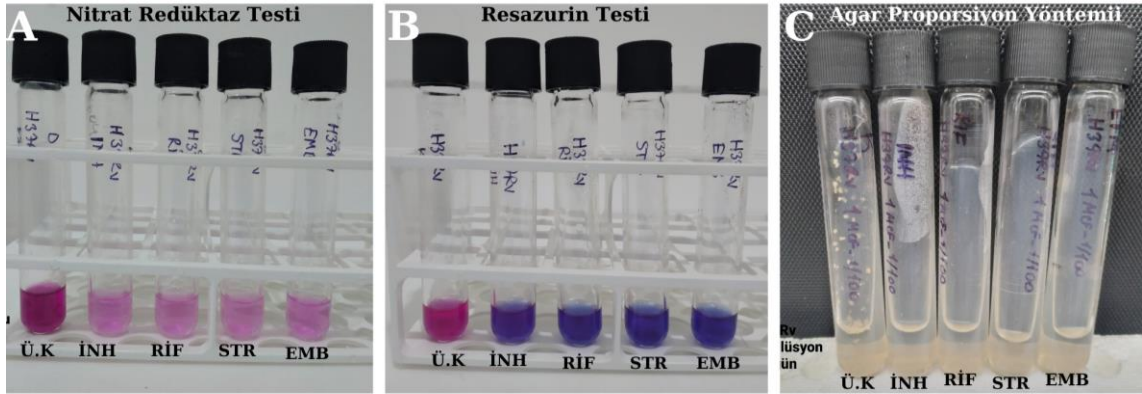
**Tablo 4.5.** NRT ve agar proporsiyon test sonuçlarının karşılaştırması

| AgarProporsiyon Yöntemi |       |   |   |          |            |     |     |      |
|-------------------------|-------|---|---|----------|------------|-----|-----|------|
| Nitrat Redüktaz         |       |   |   | Özgüllük | Duyarlılık | PPD | NPD | Uyum |
|                         | Testi | R | S | (%)      | (%)        | (%) | (%) | (%)  |
| INH                     | R     | 1 | 0 | 100      | 100        | 100 | 100 | 100  |
|                         | S     | 0 | 6 |          |            |     |     |      |
| RIF                     | R     | 2 | 0 | 100      | 100        | 100 | 100 | 100  |
|                         | S     | 0 | 5 |          |            |     |     |      |
| STR                     | R     | 2 | 0 | 100      | 100        | 100 | 100 | 100  |
|                         | S     | 0 | 5 |          |            |     |     |      |
| EMB                     | R     | 2 | 0 | 100      | 100        | 100 | 100 | 100  |
|                         | S     | 0 | 5 |          |            |     |     |      |

**Tablo 4.6** Rezaurin testi ve agar proporsiyon test sonuçlarının karşılaştırması

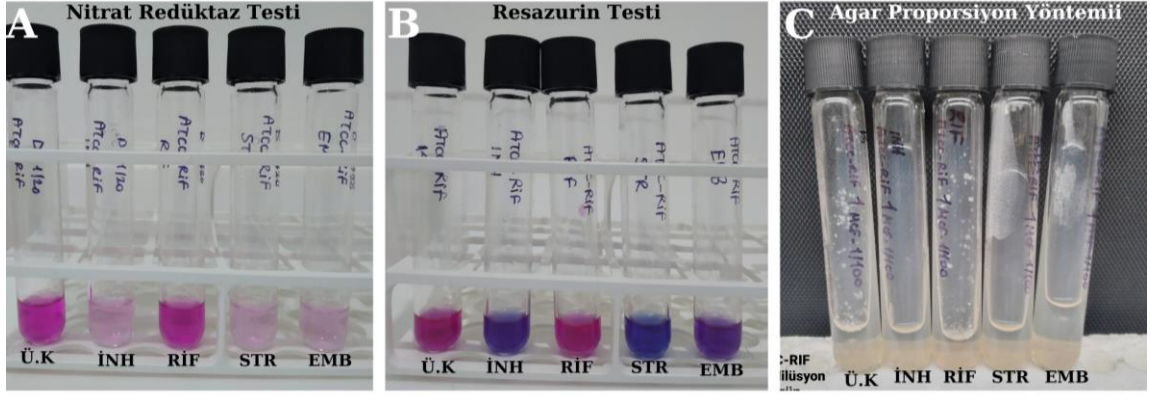
|                |   | AgarProporsiyon Yöntemi |   |  | Özgüllük<br>(%) | Duyarlılık<br>(%) | PPD<br>(%) | NPD<br>(%) | Uyum<br>(%) |
|----------------|---|-------------------------|---|--|-----------------|-------------------|------------|------------|-------------|
| Rezaurin Testi |   | R                       | S |  |                 |                   |            |            |             |
| INH            | R | 1                       | 0 |  | 100             | 100               | 100        | 100        | 100         |
|                | S | 0                       | 6 |  |                 |                   |            |            |             |
| RIF            | R | 2                       | 0 |  | 100             | 100               | 100        | 100        | 100         |
|                | S | 0                       | 5 |  |                 |                   |            |            |             |
| STR            | R | 2                       | 0 |  | 100             | 100               | 100        | 100        | 100         |
|                | S | 0                       | 5 |  |                 |                   |            |            |             |
| EMB            | R | 2                       | 0 |  | 100             | 100               | 100        | 100        | 100         |
|                | S | 0                       | 5 |  |                 |                   |            |            |             |

Her üç yöntem ile alınan ilaç duyarlılık sonuçları her suş ve izolat için ayrı ayrı karşılaştırmalı olarak gösterildi (Şekil 4.2-Şekil 4.8).

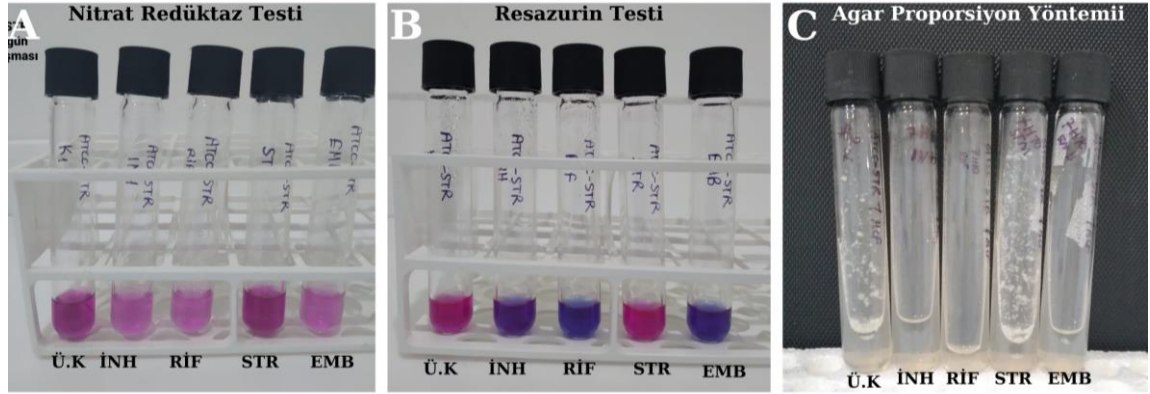


**Şekil 4.2.** *M. tuberculosis* H37Rv'nin ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Rezaurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları

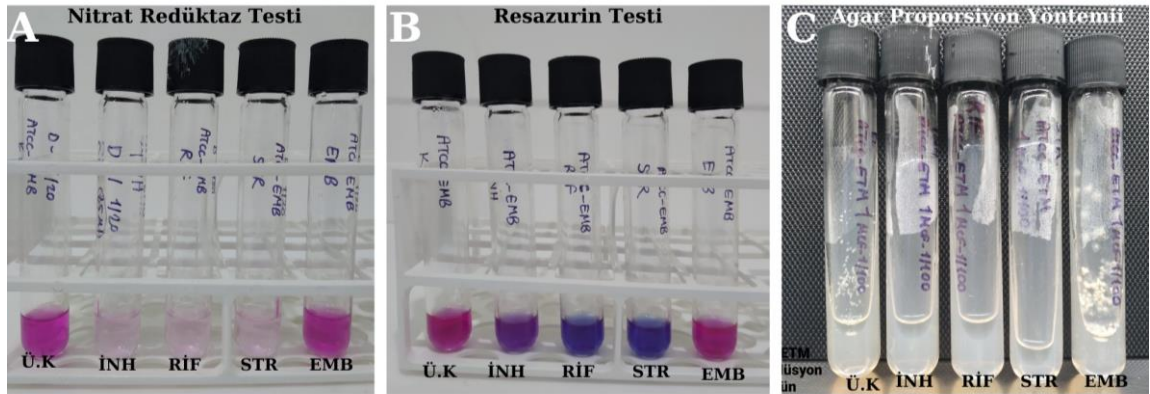




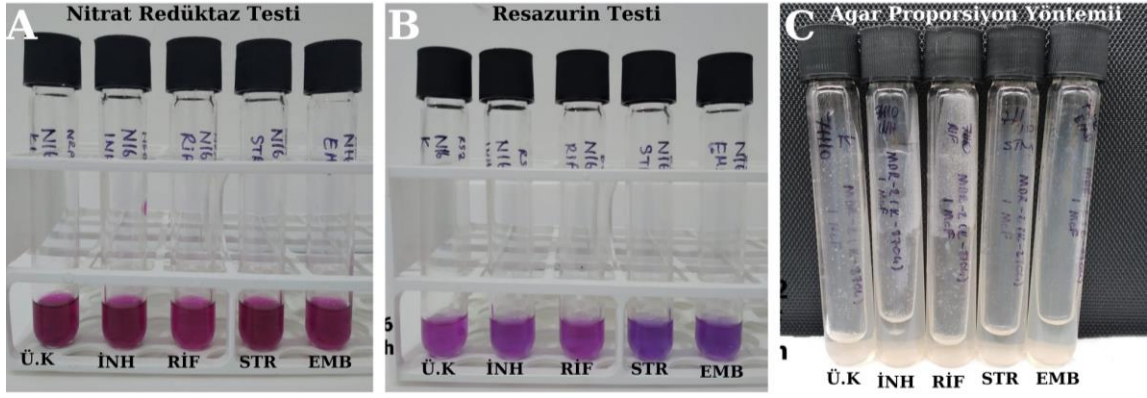
**Şekil 4.3.** *M. tuberculosis* ATCC 35838 (RİF-Dirençli) suşunun ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Resazurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları



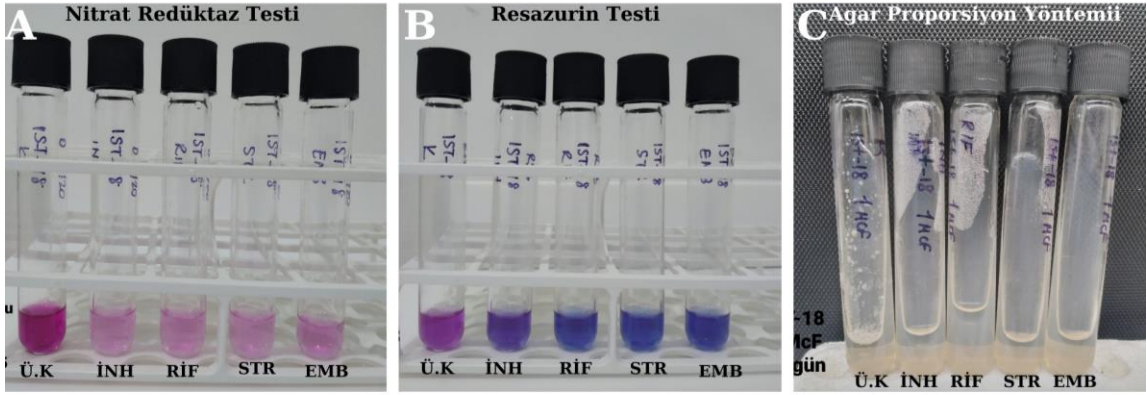
**Şekil 4.4.** *M. tuberculosis* ATCC 35820 (STR-Dirençli) suşunun ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Resazurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları



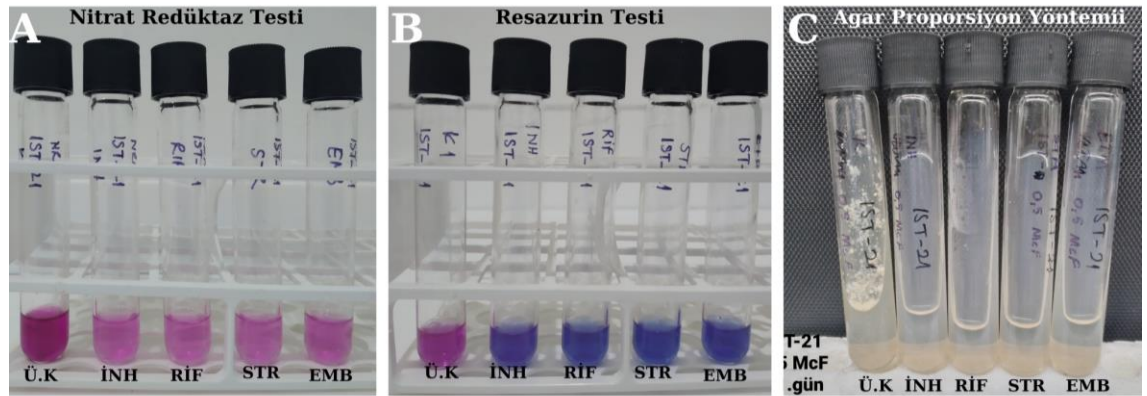
**Şekil 4.5.** *M. tuberculosis* ATCC 35837 (EMB-Dirençli) suşunun ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Resazurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları



**Şekil 4.6.** *M. tuberculosis* ÇİD-1 izolatının ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Resazurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları,



**Şekil 4.7.** *M. tuberculosis* D-1 izolatının ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Resazurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları



**Şekil 4.8.** *M. tuberculosis* D-2 izolatının ilaç duyarlılık sonuçları, A) NRT sonuçları, B) Resazurin test sonuçları, C) Agar proporsiyon yöntemi test sonuçları

## 5. TARTIŞMA

Antibiyotik diskleri *M. tuberculosis*'in de dahil olduğu çeşitli mikobakterilerin ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde 1970'li yıllarda kullanılmıştır (Griffith ve ark., 1967). Antibiyotik disklerinin kullanıldığı yöntemlerin en başında “agar disk difüzyon yöntemi” gelmekte olup *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* ve *M. avium* kompleks'in ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Gayathri ve ark., 2010; Jarboe ve ark., 1998; Wallace ve ark., 1979). Bir diğer yöntem ise ilk kez Wayne ve Krasnow tarafından geliştirilen “agar disk elüsyon yöntemi” olup kendi döneminin ilaç duyarlılık testlerinde yaşanan sorunlara karşı geliştirilmiş alternatif bir yöntemdir (Wayne ve Krasnow, 1966). Çoğunlukla *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. abscessus* gibi hızlı büyüyen mikobakterilerin ilaç duyarlılık testlerinde kullanılmıştır (Inderlied, 1994). *M. marinum* ve *M. fortuitum*' da sülfanamidlere ve diğer antibiyotiklere karşı ilaç duyarlılığının belirlenmesinde (Stone ve ark., 1983), *M. tuberculosis* ve *M. avium* kompleks üyelerinin ise siproflaksasin MİK'lerinin belirlenmesinde kullanılmış ve test sonuçları agar dilüsyon yöntemiyle tamamen uyumlu bulunmuştur (LaBombardi ve Cataldo-Caputza, 1993).

Disk elüsyon yöntemi, diğer bakterilerin ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan disk difüzyon yöntemine benzetmekle birlikte, *M. tuberculosis*'in bazı spesifik özelliklerinden dolayı disk difüzyon yönteminin bazı modifikasyonlarını içermektedir. Örneğin *M. tuberculosis*'in kümelenmeye meyilli olması ve koloni morfolojisinden kaynaklı, antibiyotik diskinin olduğu bölgede oluşan inhibisyon zonunun keskin ve net oluşamaması, duyarlılık sonucunun okunmasında belirsizliğe neden olabilir. Bu sebepten ötürü disk elüsyon yönteminde antibiyotik diskleri bakteri inoküle edilmiş agar plaklarının yüzeyine koyulmaz. Quadrant steril boş petrilere antibiyotik diskleri yerleştirilir, üzerine belirli hacimde katı besiyerinin dökülerek diskin besiyeri içerisine gömülü halde kalması sağlanır ve sonrasında antibiyotik diskli besiyerinin yüzeyine bakteri inokülasyonu yapılır. Ancak disk elüsyon yönteminin *M. tuberculosis* için sadece

bir dönem kadar kullanılıp unutulması ve yaygın olarak kullanılamamasının esas nedeni antibiyotik diskli besiyerlerinin uzun süre stabil kalamamalarıdır. Antibiyotik diskleri bu modifiye yöntemde ya +4 °C’de soğukta kurutuluyor ya da liyofilize ediliyordu. Bu şekilde diskler stabil kalabilirdi ancak disklerin eklendiği katı besiyerleri antibiyotiklerin aktivitelerinin kaybına neden olmaktaydı (Wayne ve Krasnow, 1966).

Griffith ve Bodily tarafından 7H10 agar kullanılarak disk elüsyon yöntemi üzerine yapılan stabilite çalışmasında 37 °C’de İNH için 1-2 haftada, RİF için 2 haftada, EMB için 2-4 günde, sikloserin (CS) için 4-7 günde, etiyonamid (ETA) için 1 haftada antibiyotiklerin aktivitelerinde %50 oranında kayıp olduğu, STR ve para-aminosalisilik asit (PAS)’de ise 4 hafta sonunda daha minör düzeyde aktivite kaybı olduğu bildirilmiştir (Griffith ve Bodily, 1992). *M. tuberculosis* ‘in de optimum inkübasyon sıcaklığının 37°C olduğu ve uzun inkübasyon periyoduna ihtiyaç duyduğu göz önüne alınırsa agar disk elüsyon yöntemi ile alınan İDT sonuçları stabilitesini koruyamayan antibiyotikler ve *M. tuberculosis* gibi yavaş büyüyen mikobakteriler için yanlış duyarlılıklara neden olabilir.

Antibiyotiklerin besiyeri içerisinde çok uzun süre stabil kalamamaları, etkinliklerinde düşüş gözlenmesi sadece agar disk elüsyon yöntemi için değil diğer ilaç duyarlılık yöntemleri için de bir sorun teşkil etmektedir. 7H9 sıvı besiyerinde 37°C’de 14 günlük inkübasyonunda İNH ve RİF’in konsantrasyonlarında düşüş gözlemlendiği, 7 günlük inkübasyonun ardından yapılan UPLC ölçümleri ile RİF için %92, İNH için %54 oranında konsantrasyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir (Schoutrop ve ark., 2018). En etkili anti-TB ilaçlardan biri olan RİF, duyarlılığının tespitinde oldukça hassasiyet isteyen bir antibiyotiktir. Çünkü RİF dirençli izolatların %90’ın da İNH’a da direnç görüldüğü için ÇİD-TB vakalarında RİF direnci bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Ramaswamy ve Musser, 1998). RİF için LJ ve 7H9 sıvı besiyerinde yapılan stabilite çalışmalarına göre 37°C’de 1 haftalık inkübasyonun ardından yaklaşık %50 oranında ilacın degradasyona uğradığı, 3 hafta sonunda LJ besiyerinde RİF eğrisine saptanmadığı

bildirilmiştir. Aynı çalışma RİF'in +4°C'de her iki besiyerinde de daha stabil olduğunu vurgulamaktadır (Yu ve ark., 2011). Trimetoprim/sülfametaksazol, RİF, amikasin ve kanamisin için 37°C'de 2 haftalık inkübasyonun sonunda, minosiklin ve trimetoprim için ise 1 haftalık inkübasyonun sonunda antibiyotiklerin aktivitesinde yaklaşık %50 oranında düşüş gözlemlendiğini gösteren başka çalışmalar da mevcut verileri destekler niteliktedir (Davis ve ark., 1987; Ryneerson ve ark., 1971).

1970'li yıllarda disk difüzyon yönteminde birtakım modifikasyonlar yaparak *M. tuberculosis* de de uygulanabilir hale getirmek için geliştirilen agar disk elüsyon metodundan ilham alarak yeni modifikasyonlarla *M. tuberculosis*'de ilaç duyarlılığının belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirdik. Yöntem aslında gram negatif basillerin kolistin MİK'inin belirlenmesinde (Butt ve ark., 2022; Simner ve ark., 2019; Singh ve ark., 2022), anaerobik bakterilerin  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarında (Jorgensen ve ark., 1986) kullanılmak üzere performansı değerlendirilmiş ve referans yöntemlerle de yüksek uyumluluk gösteren "sıvı disk elüsyon" yönteminden de bazı modifikasyonlar içermektedir. Sıvı disk elüsyon yöntemi dünya genelinde gram negatif bakterilerin artan kolistin direnci nedeniyle polimiksin antibiyotiklerin test edilmesinde karşılaşılan zorlukları ortadan kaldırmak için CLSI tarafından oluşturulan bir çalışma grubunun değerlendirmelerde bulunduğu alternatif yöntemlerden biridir (Humphries ve ark., 2019). Sıvı disk elüsyon yönteminde kolistin direncinin tespiti için 10 veya 25 ml besiyerlerine 1, 2 ve 4 adet olmak üzere 10  $\mu$ g'lık antibiyotik diskleri eklenmektedir ancak geliştirilen yeni yöntem temelinde DSÖ tarafından önerildiği gibi ilaçları tek bir kritik konsantrasyonda olacak şekilde tek bir antibiyotik diski ile test etmektedir. Bunun için antibiyotik diskleri finalde DSÖ'nün önerdiği kritik konsantrasyonda ilaç içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan antibiyotik diskleri agar disk elüsyon yönteminden farklı olarak %10 OADC'li ve KNO<sub>3</sub>'lü 7H9 sıvı besiyeri içerisinde test edilmektedir. Bu sayede antibiyotik diski bakteri inokülasyonu aşamasına kadar besiyerinde muhafaza edilerek aktivitesini kaybetmeyecek yalnızca inokülasyondan kısa bir süre önce ortama eklenerek aktivite kaybı önlenmiş olacaktır. Antibiyotiklerin inkübasyon süresi boyunca stabilitelerine katkıda bulunacak bir diğer modifikasyon ise ilaç duyarlılık sonuçlarını değerlendirmek için 21 gün kadar uzun bir süre gerekmiyip hızlı kolorimetrik

yöntemlerle 5-10 gün içerisinde sonuç alınabilmesidir. 37°C’de zamanla antibiyotiklerin etkinliğinin azaldığı yapılan stabilite çalışmalarında gösterildiği için inkübasyon süresi ne kadar kısalsın, antibiyotik bozulmasına bağlı olarak yanlış ilaç duyarlılık sonucu alma ihtimali de azalacaktır. Yani böylelikle yeni geliştirilen disk temelli yöntemde hem inkübasyon öncesinde hem de inkübasyon süresince antibiyotikler diğer kültür yöntemlerine kıyasla besiyeri içerisinde minimum bozulmayla daha stabil kalacaktır.

Antibiyotik stabilitesini etkileyebilecek bir diğer parametre ise antibiyotik disklerinin hazırlık aşamasındaki kurutma sıcaklığıdır. DSÖ tarafından önerilen kritik konsantrasyona uygun olacak şekilde antibiyotik içeren diskler ticari olarak mevcut olmadığından çalışmamızda antibiyotik diskleri manuel olarak hazırlanmıştır. Bunun bir sonucu olarak da hazırlanan disklerin çalışmada kullanılıncaya kadar etkinliğinde bir düşüş olmaksızın muhafaza etmek için kurutulması gerekiyordu. Disklerin kurutulması için soğuk ortamda kurutma veya liyofilizasyon işlemi yerine kuru sıcak hava tercih edildi. Kurutma sıcaklığı için de 60°C’de 5 dk süreyle, 40°C’de 15 dk süreyle, 37 °C’de 4 saat süreyle, 37°C’de 20 dk süreyle, 24-28°C’de 3 saat süreyle olmak üzere farklı sıcaklık ve süreler diğer araştırmacılar tarafından önerilmekteydi (Epoke ve ark., 2004; Ogba ve ark., 2017; Pfeiffer ve ark., 1976; Rippere, 1978; Thompson, 1950; Vineetha ve ark., 2015). Öneriler arasında fikir birliği olmamasından ötürü çalışmamızda disklerin tamamen kuruması için agar proporsiyon yöntem uygulanırken antibiyotiğin besiyerine eklendiğindeki besiyeri sıcaklığı olan 50-56°C aralığı seçildi ve 50°C’de 1 saat süreyle diskler etüvde kurutuldu. 1 saatin sonunda yapılan kontrolde disklerin tamamının kuruduğu, herhangi bir nem belirtisi olmadığı görüldü. Disklerin tamamen kurumasında tabi ki de cam petriyle temasını engelleyip havada kurutma amacıyla kullanılan çelik tel örgülerin ve steril etüvde petri kapağı açık şekilde kurutmanın da etkisi vardı.

Disk difüzyon yöntemiyle *M. tuberculosis*’e kıyasla daha hızlı çoğalabilen *E. coli* ve *S. aureus* suşlarını kullanarak gerçekleştirilen ön deneme çalışması da aslında disklerin hazırlık aşamasının ve kurutma koşullarının ilaç duyarlılık sonuçları üzerindeki etkisini belirlemek ve disk hazırlık aşamasının gözden geçirilmesi amacıyla yapılmıştır. Disk difüzyon test sonuçlarına göre *S. aureus* ATCC 25923 suşu için RİF diskinin zon çapı 33



mm olarak (beklenen aralık 26-34 mm), *E. coli* ATCC 25922 suşu için STR diskinin zon çapı 18 mm olarak (beklenen aralık 12-20 mm) ölçüldü. Her iki antibiyotik diskinin de zon çapları CLSI'nın önerdiği aralıktaydı. Yeni geliştirilen yöntemdeki disklerle aynı koşullarda, aynı şekilde fakat disk difüzyon testinin gereği olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antibiyotik diskleri yapılan ön deneme çalışmasında ilaç duyarlılık test sonucunu etkileyebilecek herhangi bir olumsuz faktörün olmadığını göstermektedir. Yeni geliştirilen yöntemin ilaç duyarlılık sonuçlarının referans yöntemle ve agar proporsiyon yöntemle alınan sonuçlarla uyumlu bulunması da bunu doğrulamaktadır.

Hazırlanan antibiyotik diskleri +4°C'de sadece 24 saat muhafaza edilip hemen ardından çalışmada kullanıldı. Dolayısıyla antibiyotik disklerinin aktivitesini yitirmeden ne kadar süre kaç derecede muhafaza edileceği sürenin kısıtlı olmasından ötürü belirlenememiştir. Ancak şu anda ayrı ayrı +4°C ve -20°C'de muhafaza edilen antibiyotik diskleri ilerleyen süreçte belirli aralıklarla raf ömrü belirleme çalışmalarında kullanılacaktır.

Disk temelli yeni yöntemin daha önceden bilinen, birçok araştırmacı tarafından performansları değerlendirilmiş ve iyi şekilde standardize edilmiş hızlı kolorimetrik yöntemler olan NRT ve rezasurin testi ile kombine uygulanıyor olması yöntemin en büyük avantajıdır. Bu yöntemlerden ilki olan NRT'nin doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek için Coban ve ark tarafından İNH için 35, RİF için 38, EMB ve STR için 22 araştırmanın dahil edildiği bir meta-analiz çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre İNH, RİF, EMB ve STR için sırasıyla birleştirilmiş duyarlılıklar %96, %97, %90, %82; birleştirilmiş özgüllükler ise %99, %100, %98, %96 olarak gösterilmiştir. İlaç duyarlılık sonuçları indirekt yöntemle ortalama 5-14 gün içerisinde alınabilirken, direkt yöntemle 5-28 gün arasında alınabilmektedir (Coban ve ark., 2014b). Yeni yöntemin kombine edildiği bir diğer kolorimetrik yöntem olan rezasurin testi, İNH için 14, RİF için 15, STR için 6 ve EMB için 5 araştırmanın yer aldığı bir meta-analiz çalışmasında tanısal doğruluğu ve güvenilirliği açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre birleştirilmiş duyarlılıklar İNH için %96, RİF için %97, EMB ve STR için %92 olarak gösterilirken; birleştirilmiş

özgüllükler İNH için %96, RİF için %99, EMB için %86 ve STR için %90 olarak gösterilmiştir(Coban ve ark., 2014a). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki hem NRT hem de rezasurin testi ÇİD-TB izolatların hızlı tespiti için doğruluğu ve güvenilirliği yüksek testlerdir.

Disk temelli yeni bir yöntemin geliştirildiği çalışmamızda 4 tanesi referans suş, 1 tanesi ÇİD-TB ve 2 tanesi duyarlı izolattan oluşan toplam 7 *M. tuberculosis* suşu iki farklı kolorimetrik yöntemle birlikte test edilip, ilaç duyarlılık sonuçları altın standart yöntem olarak kabul gören agar proporsiyon test sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Her iki kolorimetrik test sonuçları ile agar proporsiyon sonuçları arasında %100 özgüllük, %100 duyarlılık %100 PPD, %100 NPD ve %100 uyum saptandı (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). Agar proporsiyon yönteminde tüm suş ve izolatların ilaç duyarlılıkları üremenin yeterli düzeyde olması nedeniyle inkübasyonun 21. gününde değerlendirildi. Rezasurin test sonuçları ise tüm suş ve izolatlarda inkübasyonun 7. günü ayıraç ilavesi sonrası 48 saat içerisinde üreme kontrol tüplerinde pembe rengin oluşmasıyla test sonuçları değerlendirildi. NRT de ise referans suşların 2 tanesinin de (RİF-dirençli ve STR-dirençli suşlar) 5. günde, 2 tanesinin de (H37Rv ve EMB-dirençli suşlar) 7. günde, klinik izolatların ise 2 tanesinde (ÇİD-1 ve D-2 izolatları) 5. günde, 1 tanesinde (D-1) 7. günde ilaç duyarlılık sonuçları alındı (Tablo 4.2). Her üç yöntem içerisinde en hızlı sonuç veren NRT oldu. Üstelik ayıraç eklendikten sonra renk dönüşümü anlık olarak gerçekleştiğinden hemen duyarlılık sonucu belirlendi.

DSÖ tarafından açıklanan verilere göre ÇİD-TB ve YİD-TB vakalarındaki artış, ilaç duyarlılık yöntemlerinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. İlaç duyarlılık testlerine evrensel erişimi savunan DSÖ, her ne kadar moleküler tanı ve duyarlılık da ciddi ilerlemeler kaydedilse de kültür temelli yöntemleri altın standart olarak kabul etmektedir. Ancak kültür temelli yöntemler tamamen basilin üreme yeteneğinden kaynaklı uzun inkübasyon süreleri gerektirmektedir. Üstelik uygulama açısından da zahmetli ve yüksek biyogüvenlik seviyesi gerektiren bu yöntemler hala daha kullanılmaktadır. Ancak kültür temelli yöntemler kullanımı gittikçe yaygınlaşan hızlı kolorimetrik yöntemlerle birlikte kullanıldığında daha hızlı sonuç verebilmektedir.



Üstelik mevcut kolorimetrik yöntemlerden en önemli iki tanesi oluşturan NRT ve rezasurin testi çok eskilerden beri kullanılmakta olup iyi standardize edilmiş, referans yöntemlerle yüksek düzeyde duyarlılık, özgüllük ve uyum gösteren yöntemlerdir. Mevcut ilaç duyarlılık yöntemlerinin birtakım modifikasyonlarını içeren yeni geliştirdiğimiz disk temelli yöntem, sıvı kültür ortamında primer anti-TB ilaçların kolorimetrik yöntemlerle kombine halde test edilmesini içermektedir. Yöntemimiz bu sayede hem testin uygulanmasında hem de test sonuçlarının değerlendirilmesinde araştırmacıya oldukça kolay ve pratik adımlar sunmaktadır. İlaç duyarlılık sonucunun 5-10 gün içerisinde alınabiliyor olması ÇİD-TB izolatların hızlı tespitine de imkân tanımaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yeni geliştirilen disk temelli ilaç duyarlılık yöntemi hızlı kolorimetrik yöntemlerle kombine halde uygulandığı için diğer kültür temelli yöntemlere kıyasla daha hızlı ÇİD-TB tespiti yapabilmektedir. Bunun yanı sıra antibiyotik stabilitesini korumada disk temelli olmasından ötürü diğer yöntemlerden daha avantajlıdır. Yöntem uygulanma açısından kolay ve pratik, komplike olmayan aşamalardan oluşmaktadır. Aynı zamanda kolorimetrik olduğundan sonuçlarının değerlendirilmesinde cihaz kullanımı ve ekstra uzmanlık gerektirmez.

Yeni yöntem şu anda sadece primer anti-TB ilaçların duyarlılıklarını belirlemek üzere standardize edilmiş koşulları içermektedir. Ancak ilerleyen çalışmalarda florokinolon grubu ilaçlardan en az birini ve ek olarak A grubu anti-TB ilaçlardan olan tedavi rejimine sonradan dahil edilen bedakulin ve linezolid antibiyotiklerinden de en az birinin disk temelli yöntem içerisine dahil edilmesi gereklidir. Böylece yeni yöntem ile YİD-TB'nin de hızlı tespiti yapılabilir.

Yeni disk temelli yöntemde istenilen konsantrasyona uygun şekilde ticari antibiyotik diskleri mevcut olmadığından diskler manuel olarak hazırlandı. Ancak DSÖ tarafından önerilen kritik konsantrasyonlara uygun şekilde antibiyotik içeren yeni antibiyotik disklerinin endüstriyel ölçekte üretilmesi yeni yöntemin daha fazla araştırmacı tarafından tercih sebebi olacağı ve yöntemin yaygınlaştırılmasına katkı sağlayacağı tahmin edilmektedir.

Çalışmada disk temelli yeni bir yöntemin geliştirilmesi amaçlandığı için test edilecek izolat sayısı 4 tanesi referans suş olmak üzere toplamda 7 *M. tuberculosis* suşuyla sınırlandırılmıştır. Yeni yöntemin güvenilirliğinin, performansının ve referans yöntemlerle olan uyumunun başka merkezlerde başka araştırmacılar tarafından da değerlendirilmesi gereklidir. Daha fazla izolatla çok merkezli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Asmar S, Drancourt M. Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries. *Front Microbiol.* 2015; 6:1184.
- Bajaj AO, Saraswat S, Knuuttila JEA, Freeke J, Stielow JB, Barker AP. Accurate Identification of Closely Related *Mycobacterium tuberculosis* Complex Species by High Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:656880.
- Balasingham SV, Davidsen T, Szpinda I, Frye SA, Tønjum T. Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy. *Mol Diagn Ther.* 2009;13(3):137-151.
- Balasubramanian V, Wiegeshaus EH, Taylor BT, Smith DW. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis.* 1994;75(3):168-178.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1994 14;263(5144):227-30.
- Bansal R, Sharma D, Singh R. Tuberculosis and its Treatment: An Overview. *Mini Rev Med Chem.* 2018;18(1):58-71.
- Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1):E9-E12.
- Barbier M, Wirth T. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4).
- Barrera L. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, eds. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. Tuberculosis textbook.* First ed. 2007. P: 93-112
- Brierley R. Hunterian Museum re-opens. *The Lancet Infect Dis.* 2005; 5(4), 207.
- Brown L. The Story of Clinical Pulmonary Tuberculosis. *Radiology.* 1941;37(1):108-109.
- Butt T, Butt A, Yasmin S, Taj S, Tariq N, Bano S. Antibiotic Disk Elution Method to Determine the Colistin Susceptibility against Enterobacterales and Non-fermenter Bacteria. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2022;32(6):820-822.
- Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(3):196-201.

- Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler Ht, Meissner G, Mitchison Da Sula L. *Mycobacteria: Laboratory Methods For Testing Drug Sensitivity And Resistance*. Bull World Health Organ. 1963;29(5):565-78.
- Cave AJE, Demonstrator A. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. Br J Tuberc Dis Chest. 1939;33(3):142-152.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta, GA.
- Churchyard G, Kim P, Shah NS, Rustomjee R, Gandhi N, Mathema B, Dowdy D, Kasmar A, Cardenas V. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. J Infect Dis. 2017;216(6):629-635
- Clarke C, Van Helden P, Miller M, Parsons S. Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. J S Afr Vet Assoc. 2016;87(1):1322.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30 th ed. USA, 2020
- Coban AY, Akbal AU, Bicmen C, Albay A, Sig AK, Uzun M, Selale DS, Ozkutuk N, Surucuoglu S, Albayrak N, Ucarman N, Ozkutuk A, Esen N, Ceyhan I, Ozyurt M, Bektore B, Aslan G, Delialioğlu N, Alp A. Multicenter evaluation of crystal violet decolorization assay (CVDA) for rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Rep. 2016; 6:39050.
- Coban AY, Birinci A, Ekinici B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. Int J Antimicrob Agents. 2004;24(3):304-6.
- Coban AY, Cekic Cihan C, Bilgin K, Uzun M, Akgunes A, Cetinkaya E, Durupinar B. Rapid susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin with resazurin method in screw-cap tubes. J Chemother. 2006;18(2):140-3.
- Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Palomino JC, Martin A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. Int J Mycobacteriol. 2014a;3(4):230-41.
- Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Martin A. Nitrate reductase assay for rapid detection of isoniazid, rifampin, ethambutol, and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2014b;52(1):15-9.

- Coban AY, Uzun M. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the malachite green decolourisation assay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 Dec;108(8):1021-3
- Coban AY, Uzun M, Akgunes A, Durupinar B. Comparative evaluation of the microplate nitrate reductase assay and the rezasurin microtitre assay for the rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(5):578-81.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998 11;393(6685):537-44.
- Comella-Del-Barrio P, De Souza-Galvão ML, Prat-Aymerich C, Domínguez J. Impact of COVID-19 on Tuberculosis Control. Arch Bronconeumol. 2021; 57:5-6.
- Crubézy É, Ludes B, Poveda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D. Identification d'ADN de *Mycobacterium* dans un mal de Pott égyptien de 5400 ans. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences- Serie III, 1998;321(11):41-951.
- Daniel TM, Iversen PA. Hippocrates and tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2015a;19(4):373-4.
- Daniel TM. The history of tuberculosis. Respir Med. 2006;100(11):1862-70.
- Daniel TM. Jean-Antoine Villemin and the infectious nature of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2015;19(3):267-8.
- Davis CE Jr, Carpenter JL, Trevino S, Koch J, Ognibene AJ. In vitro susceptibility of *Mycobacterium avium* complex to antibacterial agents. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987 Nov;8(3):149-55.
- De Logu A, Uda P, Pellerano ML, Pusceddu MC, Saddi B, Schivo ML. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid, and streptomycin in liquid medium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20(1):33-9.
- DeLand FH, Wagner HN. Early detection of bacterial growth, with carbon-14-labeled glucose. Radiology, 1969;92(1):154-155.

- De Waard JH, Robledo J. Chapter 12: Conventional Diagnostic Methods. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, eds. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. Tuberculosis textbook. First ed. 2007. P: 421-424
- Doetsch RN. Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions". Microbiol Rev. 1978;42(3):521-8.
- Epoke J, Igumbor E, Asuquo A, Tichawowona C. Locally prepared antibiotic sensitivity discs: a substitute for imported commercial discs. Global Journal of Pure and Applied Sciences. 2004;9(4):453-456.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 11.0, EUCAST 2023.
- Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Böttger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol. 1993;9(6):1239-46.
- Food and Drug Administration (FDA). 2007. Guidance for Industry and FDA Staff-Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests. USA.
- Garcia-Betancur JC, Menendez MC, Del Portillo P, Garcia MJ. Alignment of multiple complete genomes suggests that gene rearrangements may contribute towards the speciation of Mycobacteria. Infect Genet Evol. 2012 Jun;12(4):819-26.
- Gayathri R, Therese KL, Deepa P, Mangai S, Madhavan HN. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. J Postgrad Med. 2010 Apr-Jun;56(2):76-8.
- Golyshevskaya VI, Korneev AA, Chernousova LN, Selina LG, Kazarova TA, Grishina TD, Safonova SG, Puzanov VA, Nikolaeva GM, Fadeeva NI. Primenenie novykh mikrobiologicheskikh tekhnologii v diagnostike tuberkuleza [New microbiological Techniques in diagnosis of tuberculosis]. Probl Tuberk. 1996;(6):22-5.
- Gordon SV, Parish T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. Microbiology (Reading). 2018;164(4):437-439.
- Griffith M, Barrett ML, Bodily HL, Wood RM. Drug Susceptibility Tests for Tuberculosis using Drug Impregnated Disks. Am J Clin Pathol. 1967;47: 812-817.
- Griffith ME, Bodily HL. Stability of antimycobacterial drugs in susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36(11):2398-402.

- Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol.* 2018; 9:67.
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005 Sep;1(1):e5.
- Hamada Y, Cirillo DM, Matteelli A, Penn-Nicholson A, Rangaka MX, Ruhwald M. Tests for tuberculosis infection: landscape analysis. *Eur Respir J.* 2021;58(5):2100167.
- Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? *Lancet.* 1984;2(8410):1015-1016.
- Heifets L, Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(5):1223-5.
- Heifets L. Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bastian I, Portaels F, eds. *Multidrug-Resistant Tuberculosis. Resurgent and Emerging Infectious Diseases*, vol 1. Springer, Dordrecht. 2000, p: 133-143.
- Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(2):117-22.
- Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, Stump S, Lopez M, Macesic N, Uhlemann AC, Kohner P, Cole N, Simner PJ. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *J Clin Microbiol.* 2019;57(11):e01269-19.
- <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy>, Erişim tarihi: 14 Haziran 2023.
- <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1905/koch/facts/>, Erişim tarihi: 14 Haziran 2023.
- [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=963806#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963806#null), Erişim tarihi: 14 Haziran 2023.
- <https://www.cdc.gov/tb/topic/testing/whobetested.htm>, Erişim Tarihi:6 Haziran 2023.
- <https://tbcindia.gov.in/WriteReadData/l892s/6995271860Training%20manual%20M%20tuberculosis%20C%20DST.pdf>, Erişim tarihi: 14 Haziran 2023.

- Inderlied CB. Antimycobacterial susceptibility testing: present practices and future trends. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13(11):980-93.
- Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial Agents: In Vitro Susceptibility Testing and Mechanisms of Action and Resistance. In: Lorian V, eds. Antibiotics in laboratory medicine. 5 th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, p: 155-225.
- Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. Eur Respir J. 2002;20(36 suppl):87S- 94s.
- Jarboe E, Stone BL, Burman WJ, Wallace RJ Jr, Brown BA, Reves RR, Wilson ML. Evaluation of a disk diffusion method for determining susceptibility of Mycobacterium avium complex to clarithromycin. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;30(3):197-203.
- Jorgensen JH, Redding JS, Howell AW. Evaluation of broth disk elution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria with the newer beta-lactam antibiotics. J Clin Microbiol. 1986;23(3):545-50.
- Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is Mycobacterium tuberculosis 15,000 years old? J Infect Dis. 1994;170(5):1348-9.
- Kiazyk S, Ball TB. Latent tuberculosis infection: An overview. Can Commun Dis Rep. 2017;43(3-4):62-66.
- Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. Eur Respir J. 2005;25(3):564-569.
- Koch R. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen (1881). In: Robert Koch. Klassische Texte der Wissenschaft. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. 2018a: p 45-11
- Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose (1882). In: Robert Koch. Klassische Texte der Wissenschaft. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. 2018b: p 113-131
- LaBombardi VJ, Cataldo-Caputal L. Ciprofloxacin susceptibility testing by MIC and disk elution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(7):1556-7.
- Lange C, Aaby P, Behr MA, Donald PR, Kaufmann SHE, Netea MG, Mandalakas AM. 100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin. Lancet Infect Dis. 2022;22(1):e2-e12.
- Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList--10 years after. Tuberculosis (Edinb). 2011;91(1):1-7.



- Luo Y, Suliman S, Asgari S, Amariuta T, Baglaenko Y, Martínez-Bonet M, Ishigaki K, Gutierrez-Arcelus M, Calderon R, Lecca L, León SR, Jimenez J, Yataco R, Contreras C, Galea JT, Becerra M, Nejentsev S, Nigrovic PA, Moody DB, Murray MB, Raychaudhuri S. Early progression to active tuberculosis is a highly heritable trait driven by 3q23 in Peruvians. *Nat Commun.* 2019;10(1):3765.
- Madacki J, Orgeur M, Mas Fiol G, Frigui W, Ma L, Brosch R. ESX-1-Independent Horizontal Gene Transfer by *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *mBio.* 2021;12(3):e00965-21.
- Mann CM, Markham JL. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol.* 1998 ;84(4):538-44.
- Marri PR, Bannantine JP, Golding GB. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(6):906-25.
- Martin A, Imperiale B, Ravolonandriana P, Coban AY, Akgunes A, Ikram A, Satti L, Odoun M, Pandey P, Mishra M, Affolabi D, Singh U, Rasolofo V, Morcillo N, Vandamme P, Palomino JC. Prospective multicentre evaluation of the direct nitrate reductase assay for the rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2014 ;69(2):441-4.
- Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane DD, Musser JM, Barry CE 3rd. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science.* 1998;280(5369):1607-10.
- Meehan CJ, Barco RA, Loh YE, Cogneau S, Rigouts L. Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021;71(9):004922.
- Mikusová K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(11):2484-9.
- Mirabal NC, Yzquierdo SL, Lemus D, Madruga M, Milián Y, Echemendía M, Takiff H, Martin A, Van der Stuyf P, Palomino JC, Montoro E. Evaluation of colorimetric methods using nicotinamide for rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2729-33.
- Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, Yunus F. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam Med J.* 2018;54(1):1-9.

- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421-6.
- Ogba OM, Udo NI, Inyang-Etoh PC, Olorode OA. Evaluation of the Potency of Commercial and Locally Prepared Antibiotic Discs on Clinical Bacterial Isolates in Calabar, Nigeria. *International Journal of Biomedicine & Life Sciences.* 2017;2(1): 1-7.
- Pai M, Minion J, Sohn H, Zwerling A, Perkins MD. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges. *Clin Chest Med.* 2009;30(4):701-16.
- Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(8):754-62.
- Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid colorimetric methods for the determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;4: 29-37.
- Palomino JC, Martin A, Von Groll A, Portaels F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2008;75(2):161-6.
- Petrie GF. Robert Koch: Founder of modern bacteriology. *Nature.* 1943;152(3867):683-684.
- Pfeiffer RR, Engel GL, Coleman D. Stable antibiotic sensitivity disks. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9(5):848-51.
- Pfyffer GE. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, Warnock DW, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 11 th ed. Wiley Online Library; 2015: 536-569.
- Prabhu R, Singh V. The History of Tuberculosis: Past, Present, and Future. *Adv Microbiol.* 2019; 9(11): 931-942.
- Rahlwes KC, Dias BRS, Campos PC, Alvarez-Arguedas S, Shiloh MU. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence.* 2023 ;14(1):2150449.
- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79(1):3-29.
- Riojas MA, McGough KJ, Rider-Riojas CJ, Rastogi N, Hazbón MH. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*,

- Mycobacterium microti and Mycobacterium pinnipedii are later heterotypic synonyms of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 ;68(1):324-332.
- Rippere RA. Effects of paper on performance of antibiotic-impregnated disks. *J Pharm Sci*. 1978 Mar;67(3):367-71.
- Rocha DMGC, Viveiros M, Saraiva M, Osório NS. The Neglected Contribution of Streptomycin to the Tuberculosis Drug Resistance Problem. *Genes (Basel)*. 2021;12(12):2003.
- Rynearson TK, Shrouts JS, Wolinsky E. Rifampin: in vitro effect on atypical mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1971;104(2):272-4.
- Sakula A. Selman Waksman (1888-1973), discoverer of streptomycin: a centenary review. *Br J Dis Chest*. 1988 Jan;82(1):23-31.
- Schoutrop ELM, Brouwer MAE, Jenniskens JCA, Ferro BE, Mouton JW, Aarnoutse RE, van Ingen J. The stability of antimycobacterial drugs in media used for drug susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;92(4):305-308.
- Siddiqi SH, Libonati JP, Middlebrook G. Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1981;13(5):908-12.
- Siddiqi, Salman H, Rüsç-Gerdes, S. MGIT Procedure Manuel: For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). 2006. p: 1-89
- Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4471-4.
- Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, Campeau S, Kazmi AQ, Bell DT, Lewis S, Tamma PD, Humphries R, Hindler JA. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin *In Vitro* Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol*. 2019;57(2):e01163-18.
- Singh A, Bhatia M, Rekha S, Rani D, Kamboj P, Chakraborty D, Gupta P. Comparative Evaluation of Colistin Broth Disk Elution Method With Two Commercially Available Systems for Colistin Susceptibility Testing Against Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: A Single-Center Exploratory Study. *Cureus*. 2022 May 31;14(5):e25549.

- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):463-96.
- Soler-Camargo NC, Silva-Pereira TT, Zimpel CK, Camacho MF, Zelanis A, Aono AH, Patané JS, Dos Santos AP, Guimarães AMS. The rate and role of pseudogenes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microb Genom. 2022;8(10):mgen000876.
- Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, da Silva PE, Zaha A. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB gene. J Clin Microbiol. 2011;49(7):2625-30.
- Steingart KR, Ramsay A, Dowdy DW, Pai M. Serological tests for the diagnosis of active tuberculosis: relevance for India. Indian J Med Res. 2012;135(5):695-702.
- Sternbach G. Percivall Pott: tuberculous spondylitis. J Emerg Med. 1996;14(1):79-83.
- Stone MS, Wallace RJ Jr, Swenson JM, Thornsberry C, Christensen LA. Agar disk elution method for susceptibility testing of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium fortuitum* complex to sulfonamides and antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1983;24(4):486-93.
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med. 1997;3(5):567-70.
- Thompson BA. Dried Disc Technique for Determining Sensitivity to the Antibiotics. J Clin Pathol. 1950 May;3(2):118-21.
- Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, Simonetti MT, Volpe G, Nardi G, 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. J Clin Microbiol. 1998 May;36(5):1378-81.
- Tortoli E, Palomino JC. Chapter 14: New Diagnostic Methods. In: Palomino JC, Leao SC, Ritacco V, eds. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. Tuberculosis textbook. First ed. 2007. P: 441-486
- Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Genet Evol. 2016; 45:474-492.
- Vilchèze C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. Appl. Sci. 2020; 10(7):2278.

- Vineetha N, Vignesh RA, Sridhar D. Preparation, Standardization of Antibiotic Discs and Study of Resistance Pattern for First-Line Antibiotics in Isolates from Clinical Samples. *Int j appl res.* 2015;1(11):624-631.
- Wallace RJ Jr, Dalovisio JR, Pankey GA. Disk diffusion testing of susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979 Nov;16(5):611-4.
- Wayne LG, Krasnow I. Preparation of tuberculosis susceptibility testing mediums by means of impregnated disks. *Am J Clin Pathol.* 1966 Jun;45(6):769-71.
- World Health Organization (WHO).1998. Laboratory Services In Tuberculosis Control Culture Part III. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2011. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: policy statement. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2018. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2021. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis-rapid diagnostics for tuberculosis detection. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2022. Global Tuberculosis Report 2022.WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2022. Manual for selection of molecular WHO-recommended rapid diagnostic tests for detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. WHO, Geneva, Switzerland
- Xiang X, Gong Z, Deng W, Sun Q, Xie J. Mycobacterial ethambutol responsive genes and implications in antibiotics resistance. *J Drug Target.* 2021;29(3):284-293.
- Xu G, Liu H, Jia X, Wang X, Xu P. Mechanisms and detection methods of *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin resistance: The phenomenon of drug resistance is complex. *Tuberculosis (Edinb).* 2021; 128:102083.
- Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, Babst A, Hadley WK. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2324-7.
- Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;66(3):273-80.

Yu X, Jiang G, Li H, Zhao Y, Zhang H, Zhao L, Ma Y, Coulter C, Huang H. Rifampin stability in 7H9 broth and Löwenstein-Jensen medium. J Clin Microbiol. 2011;49(3):784-9.

Zaw MT, Emran NA, Lin Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Infect Public Health. 2018;11(5):605-610.

Zimmerman MR. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. Bull N Y Acad Med. 1979;55(6):604-8.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                     |           |                |     |
|---------------------|-----------|----------------|-----|
| <b>Adı</b>          | Cemilenur | <b>Uyruğu</b>  | T.C |
| <b>Soyadı</b>       | ATAŞ      | <b>Tel no</b>  |     |
| <b>Doğum tarihi</b> |           | <b>e-posta</b> |     |

### Eğitim Bilgileri

|                      | <b>Mezun olduğu kurum</b>                                                           | <b>Mezuniyet yılı</b> |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>Lise</b>          | Aksu Anadolu Lisesi                                                                 | 2017                  |
| <b>Lisans</b>        | Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü                                | 2021                  |
| <b>Yüksek Lisans</b> | Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim Dalı | 2023                  |
| <b>Doktora</b>       |                                                                                     |                       |

### İş Deneyimi

| <b>Görevi</b> | <b>Kurum</b> | <b>Süre (yıl-yıl)</b> |
|---------------|--------------|-----------------------|
|               |              |                       |
|               |              |                       |
|               |              |                       |
|               |              |                       |

| <b>Yabancı Dilleri</b> | <b>Sınav türü</b> | <b>Puanı</b> |
|------------------------|-------------------|--------------|
| İngilizce              | YÖKDİL            | 58.75        |
|                        |                   |              |

### Proje Deneyimi

| <b>Proje Adı</b>                                                                                                                                  | <b>Destekleyen kurum</b>                      | <b>Süre (Yıl-Yıl)</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> İzolatlarında Primer AntiTüberküloz İlaç Duyarlılığı Üzerine İnokulum Konsantrasyonunun Etkisinin Araştırılması | Akdeniz Üniversitesi Normal Araştırma Projesi | 2022-                 |
|                                                                                                                                                   |                                               |                       |

|                                                                                                                                                                                                         |                                                                 |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------|
| In Siliko tasarlanan AKVUAM1 ve AKVUAM2 sentetik peptidlerinin İnsan Akciğer Fibroblast hücre hattı MRC5 ve <i>Mycobacterium tuberculosis</i> izolatlarına karşı etkinliklerinin in vitro araştırılması | Akdeniz Üniversitesi Normal Araştırma Projesi                   | 2022- |
| Seftazidim-Avibaktam ve Amoksisilin-Klavulanik Asitin AntiTüberküloz Etkinliğinin E-Test Yöntemiyle Araştırılması                                                                                       | Akdeniz Üniversitesi Özlenen Öğrenci Bilimsel Araştırma Projesi | 2023- |
| Çok ilaca dirençli <i>Mycobacterium tuberculosis</i> izolatlarında bedakulin direncinin belirlenmesi ve direnç ile ilişkili atpE pepQ ve Rv0678 gen mutasyonlarının araştırılması                       | Akdeniz Üniversitesi Normal Araştırma Projesi                   | 2023- |

#### Burslar-Ödüller:

#### Yayınlar ve Bildiriler:

#### Yayınlar:

1. Yıldırım, K., **Atas, C.**, Simsek, E., & Coban, A. Y. (2023). The Effect of Inoculum Size on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology Spectrum*, e00319-23.
2. Kutlu, E., Emen, F. M., Yıldırım, K., **Ataş, C.**, Demirdogen, R. E., Yesilkaynak, T., ... & Çoban, A. Y. (2023). Novel thiourea derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*: synthesis, characterization and molecular docking studies. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 1-10.
3. Şimşek, E., Koçak, O., Yıldırım, K., Kuruoğlu, A., Taşkın, N. D., Bozkurt, S., ... & Çoban, A. Y. (2023). The Anti-angiogenic and Anti-microbial Effect of Diosmin: Potential Receptor Interactions via Molecular Docking. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(2), 422-431.



### **Bildiriler:**

1. Yıldırım K., **Ataş C.**, Şimşek E., Çoban AY. İnokulum miktarı *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının ilaç duyarlılık sonuçlarını gerçekten etkiliyor mu? Yoksa bu sadece bir varsayım mı? XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16 Kasım 2022
2. Bozkurt S., **Ataş C.**, Baran M., Çoban AY. Plant Active Ingredients and Aging, 2<sup>nd</sup> International Congress on Multidisciplinary Natural Sciences and Engineering, 1-2 Aralık 2022
3. Ličina M., **Ataş C.**, Yıldırım K., Tanyel Akçit E., Simsek E., Çoban AY. The Importance of Bedaquiline in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis, International Europa Scientific Researches Conference, 25-26 Şubat 2023
4. **Ataş C.**, Ličina M., Yıldırım K., Simsek E., Çoban AY. *In Vitro* Culture Models In Latent Tuberculosis Infection, Latin American International Congress on Natural and Applied Sciences-IV, 13-15 Mart 2023
5. Görgüç S., **Ataş C.**, Yıldırım K., Simsek E., Çoban AY. Investigation of the Blood Microbiome Profile, Latin American International Congress on Natural and Applied Sciences-IV, 13-15 Mart 2023

### **Kitap Bölümleri**

1. Yıldırım K., **Ataş C.** Üç boyutlu yapısı bilgisayar temelli yöntemler ile belirlenmiş proteinler. Nükleer Membran Reseptör Proteinleri, ss. 35-48, Efe Akademik Yayıncılık, 2022