



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PULMONER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDAN İZOLE
EDİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARINDA
MOKSİFLOKSASİN DİRENCİNİN EPİDEMİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Taylan BOZOK

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

ADANA-2015



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PULMONER TÜBERKÜLOZLU HASTALARDAN İZOLE
EDİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARINDA
MOKSİFLOKSASİN DİRENCİNİN EPİDEMİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Taylan BOZOK

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

**Bu çalışma TF2013LTP12 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA-2015

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım günden bugüne üstün bilgi ve tecrübesinden yararlanma imkanı bulduğum, ileriki mesleki yaşamımda da kendisini örnek almaktan övünç duyacağım danışman hocam Prof. Dr. Fatih Köksal'a, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Fügen Yarkın'a, Prof. Dr. Akgün Yaman'a ve Prof. Dr. Macit İlkit'e teşekkürlerimi sunarım. Eğitim dönemim boyunca yardımlarını esirgemeyen bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e, birlikte çalışma imkanı bulduğum çok değerli bölüm arkadaşlarıma ve tüm Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD ailesine teşekkür ederim.

Ayrıca beni sabırla büyüten, bu günlere getiren, yaşamımın her döneminde desteklerini sonuna kadar veren anne ve babama, bir insanın hayatında yaşayabileceği en güzel anları bana yaşattığı için Bitaneme çok teşekkür ederim.

Dr. Taylan Bozok

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMA LİSTESİ	VI
ÖZET VE ANAHTAR SÖZCÜKLER	VIII
ABSTRACT-KEYWORDS	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tüberküloz	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.3. Sınıflandırma	8
2.1.4. Hücre Yapısı	12
2.1.4.1. Peptidoglikan Tabaka	12
2.1.4.2. Mikolik Asit Yapısı	13
2.1.4.3. Lipoglikan Yapı	14
2.1.4.4. Wax D	14
2.1.4.5. Trehaloz-6,6-Dimikolat (Kord Faktör)	14
2.1.4.6. Genetik Özellikleri	14
2.1.5. Tüberkülozda Bulaş ve Patogenez	15
2.1.6. Tüberkülozda İmmun Cevap	16
2.1.7. Tüberküloz Tanısı	17
2.1.7.1. Klinik Tanı	17
2.1.7.2. Tüberkülin deri testi (TDT) ve İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST)	19
2.1.7.3. Laboratuvar Tanısı	20
2.1.7.3.1 Mikroskopi	21
2.1.7.3.2 Kültür	21
2.1.7.3.3. Fenotipik Testler	23
2.1.7.3.4. Moleküler Testler	23
2.1.8. Tüberküloz Tedavisi	24
2.1.9. İlaç direnci ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri	25
2.1.9.1. İlaç Direnç Mekanizması	26
2.1.9.2 Antibiyotik Duyarlılık Testleri	27
2.1.9.2.1. Fenotipik Testler	27
2.1.9.2.1.1. Klasik Kültür Yöntemleri	28
2.1.9.2.1.1.1. Orantı (Proporsiyon) Yöntemi	28
2.1.9.2.1.1.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi	29
2.1.9.2.1.1.3. Direnç Oranı Yöntemi	29
2.1.9.2.1.2. Hızlı Kültür Yöntemleri	30
2.1.9.2.1.2.1. Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460-BD)	30
2.1.9.2.1.2.2. Floresan Kültür Sistemi (BACTECMGIT 960-BD)	30

2.1.9.2.1.2.3. Kolorimetrik Kültür Sistemi	31
2.1.9.2.1.2.4. Karbondioksit Oluşumunu Tespit Eden Sistem; ESP Culture System II (Accumed)	31
2.1.9.2.1.2.5. E Test (AB BIODISK)	32
2.1.9.2.1.3. Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler	32
2.1.9.2.1.3.1. Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi	32
2.1.9.2.1.3.2. Biyoluminesans Yöntemi	32
2.1.9.2.1.3.3. Flow Sitometri Yöntemi	33
2.1.9.2.2. Moleküler Yöntemler	33
2.1.9.2.2.1. DNA Dizi Analizi	33
2.1.9.2.2.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (PCR SSCP)	34
2.1.9.2.2.3. Heterodupleks analizi	34
2.1.9.2.2.4. Microarray analiz	35
2.1.9.2.2.5. Gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR)	35
2.2. Moksifloksasin	36
2.2.1. Moksifloksasinin Tarihçesi	36
2.2.2. Moksifloksasinin Yapısı Etki Mekanizması	37
2.2.3. Moksifloksasin ve Tüberküloz	39
2.2.4. Kinolon Direnci	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Tüberküloz Suşlarının Seçilmesi	41
3.2. Seçilen İzolatların Pasajlanması	41
3.3. İzolatların Moksifloksasin Duyarlılıklarının LJ Proporsiyon Yöntemi ile Belirlenmesi	41
3.3.2. Uygulanacak İlaç Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	42
3.3.3. İlaçlı ve İlaçsız LJ Besiyerlerinin Hazırlanması	42
3.3.4. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması ve Ekim	43
3.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi	43
3.4. Moleküler Yöntemler	44
3.4.1. DNA Ekstraksiyonu	44
3.4.2. .PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	44
3.4.3. PCR Ürününün Agaro Jel Elektrophorez İle Gösterilmesi	45
3.4.4. PCR ürünlerinin saflaştırılması	46
3.4.5. Dizi Analizi	47
4. BULGULAR	49
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. Runyon Sınıflandırması	9
Tablo 2. Woods ve Washington Sınıflandırması	10
Tablo 3. Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri	22
Tablo 4. MTK türlerinin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri	23
Tablo 5. Tip II Bakteriyel Topoizomerazlar	39
Tablo 6. Moksifloksasin MİK değerleri	49
Tablo 7. ÇİD görülmeyen TB suşları arasındaki Moksifloksasin direnç oranları	50
Tablo 8. İllere göre direnç dağılımı	51
Tablo 9. <i>gyrA</i> Mutasyonu tespit edilen örnekler	52
Tablo 10. ÇİD TB görülmeyen örnekler	52
Tablo 11. ÇİD TB görülen örnekler	55

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. Tüberküloz basilinin evrimsel gelişimi	11
Şekil 2. <i>M.tuberculosis</i> hücre duvar yapısı	13
Şekil 3. TDT Reaksiyonunun değerlendirilmesi	20
Şekil 4. Moksifloksasinin molekül yapısı	37
Şekil 5. PCR ürününün agaroz jelde UV ışıktaki incelenmesi	46
Şekil 6. <i>ABI Prism 310 Genetic Analyzer</i> cihazı	47
Şekil 7. MİK değeri $\geq 16\mu\text{g/mL}$ olan örneğin dizi analizi	56
Şekil 8. ÇİD TB görülen 21 nolu örneğin <i>gyrA</i> 530 bp dizi analizi (kodon 89 mut.)	56

KISALTMA LİSTESİ

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMTD	: Amplified <i>M. tuberculosis</i> Direct Test
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCG	: Bacille Calmette-Guerin
BD	: Becton Dickinson
CCD	: Charge-coupled device
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD	: Çoklu İlaç Dirençli
DĞİT	: Doğrudan Gözetimli İlaç Tedavisi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxynucleotide
ddNTP	: Dideoxynucleotide
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMB	: Etambutol
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FDA	: Food and Drug Administration
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFN	: İnterferon
İL	: İnterlökin
İDT	: İlaç Duyarlılık Testi
İGST	: İnterferon Gama Salınım Testi
INH	: İzonyazid
LJ	: Löwenstein Jensen
MGIT	: Mycobacterial Growth Indicator Tube
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MKH	: Milenyum Kalkınma Hedefleri
MOX	: Moksifloksasin

MTK	: <i>Mycobacterim tuberculosis</i> Kompleks
NAA	: Nükleik Asit Amplifikasyon
NK	: Naturel Killer
PAS	: Para-aminosalisilik Asit
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PNL	: Polimorf nüveli lökositler
PPD	: Pürifiye Protein Derivesi
PZA	: Pirazinamid
RD	: Region of Difference
RIF	: Rifampisin
RNA	: Ribonükleik asit
QRDR	: Quinolone Resistance Determining Region
SSCP	: Single Strand Conformation Polymorphism
STR	: Streptomisin
TB	: Tüberküloz
TDM	: Tüberküloz Dışı Mikobakteri
TDI	: Tüberkülin Deri Testi
TH	: T Helper
TLR	: Toll Like Reseptor
TC	: T sitotoksik
TU	: Tüberculin Unit
UV	: Ultraviyole
YİD	: Yaygın İlaç Dirençli

ÖZET

Pulmoner Tüberkülozlu Hastalardan İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Moksifloksasin Direncinin Epidemiyolojik Özellikleri ve Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada bölgemizdeki klinik materyallerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının moksifloksasin duyarlılıklarının fenotipik yöntemlerle tespit edilmesi ve bölgesel direnç oranlarının belirlenmesi ayrıca fenotipik direnç ile *gyrA* genindeki mutasyonların ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen pulmoner tüberkülozlu hasta örneklerinden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarından çoklu ilaç direnci görülmeyen sıralı 100 izolat ile çoklu ilaç direnci tespit edilen 37 izolat dahil edilmiştir. Bu izolatların Löwenstein-Jensen proporsiyon yöntemi kullanılarak moksifloksasin'e duyarlılıkları belirlenmiş ve epidemiyolojik özellikleri araştırılmıştır. Yine bu izolatların *gyrA* bölgesinin dizi analizi yapılmış ve ilaç duyarlılık oranları ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Fenotipik duyarlılıkları test edilen 137 izolatın 25'inde (% 18,2) moksifloksasine karşı direnç bulunmuştur. Çoklu ilaç direnci görülmeyen-ve çoklu ilaç direnci görülen suşlar arasındaki direnç oranları sırasıyla % 17 ve % 21,6 olarak tespit edilmiştir. 25 dirençli klinik izolatın gönderildiği bölgelere göre dağılımına baktığımızda; izolatlardan 10'unun Adana, 6'sının Gaziantep, 5'inin Hatay, 3'ünün Mersin ve 1'inin de Kahramanmaraş iline ait oldukları tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların *gyrA* bölgesinin dizi analizi sonucuna göre toplamda 6 örnekte tek baz mutasyonuna rastlanmıştır. Mutasyonların pozisyonları Asp94Tyr, Asp94Gly, Ala90Val, Gly88Ala ve iki örnekte de Asp89Asn şeklinde tespit edilmiştir. Mutasyon görülen örneklerin ikisi moksifloksasine fenotipik olarak duyarlı bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda moksifloksasine karşı gelişen direncin tüberküloz tedavisine sekonder olamayacağı tespit edilmiştir. Oluşan direnç ile genin analiz edilen kısmındaki mutasyonların ilişkisinin yetersiz olduğu ve yüksek dirençten farklı moleküler mekanizmaların sorumlu olacağı görülmüştür. Moksifloksasin direncinin araştırılmasının daha geniş vaka grupları ve izolatlar kullanılarak devam ettirilmesi ayrıca bu grup ilaçlara karşı kısa sürede direnç gelişme ihtimalinin varlığı ve non-spesifik endikasyonlarda daha sınırlı kullanılması gerektiğinin ısrarla anlatılmasının önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *gyrA*, Moksifloksasin, Mutasyon, *Mycobacterium tuberculosis*, Proporsiyon.

ABSTRACT

Investigation of Epidemiological Characteristics and Molecular Mechanisms of Moxifloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Pulmonary Tuberculosis Patients

Objective: In this study, it is aimed to determine the moxifloxacin sensitivities of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in our region and to specify the regional resistance rates besides to investigate the relation of phenotypical resistance with mutations in *gyrA* gene.

Materials and Method: Sequential 100 isolates that are seen to be non-multi drug resistant and 37 isolates that are determined as multidrug resistant among *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patient's samples which sent to Region Tuberculosis Laboratory of Adana were included in this study. Drug sensitivity rates and DNA Sequencing of *gyrA* region of these isolates are compared again.

Findings: Resistance to moxifloxacin is found in 25 of 137 (18,2 %) isolates of which phenotypic susceptibilities were tested. Resistance rates among strains which seen to have multidrug resistance and those which have not multidrug resistance were 17 % and 21,6 % respectively. Looking at the distribution according to regions which sent 25 clinical isolates; it is determined that 10 of isolates were belonged to Adana, 6 to Gaziantep, 5 to Hatay, 3 to Mersin and 1 to Kahramanmaraş province. Among all isolates included in study, Single bases mutation was encountered in 6 samples in total according to DNA sequencing result of *gyrA* region. The positions of mutations were identified as Asp94Tyr, Asp94Gly, Ala90Val, Gly88Ala and in 2 samples as Asp89Asn. Two of the samples which mutation is seen were found to be sensitive to moxifloxacin phenotypically.

Result: At the end of our study it is determined that, resistance developed to moxifloxacin would not be secondary in the treatment of tuberculosis. It is seen that different molecular mechanisms will be responsible from high resistance and the relation between resistance and mutations in the analysed gene is insufficient. It is concluded that research on moxifloxacin resistance should be continue with wider case groups and isolates also it will be important to persistently explain that there is a probability of resistance development in a short time to these group of drugs and it is required to use them more limited in non-specific indications.

Keywords: *gyrA*, Moxifloxacin, Mutation, *Mycobacterium tuberculosis*, Proportion.

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis Kompleks* (MTK) grubuna ait mikroorganizmaların yol açtığı kronik, granümatöz ve nekrotizan bir hastalıktır. Bu hastalık insan vücudunda tipik olarak akciğeri etkilemekte ancak akciğer dışında da birçok sisteme yerleşip primer veya sekonder tüberküloz enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir. İnsanlık tarihi kadar eski olmakla birlikte günümüzde enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm sebepleri arasında *Human Immunodeficiency Virüs* (HIV) den sonra ikinci sırada yer alan pulmoner tüberküloz, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığını tehdit eden major global sağlık problemlerinden birisi olma özelliğini hala sürdürmektedir. Dünya üzerinde her üç kişiden birisinin TB basili ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2014 Global Tüberküloz Raporu'na göre 2013 yılında 9 milyon yeni TB vakası tespit edilmiş ve bunların 1,5 milyonu ölmüştür. Ölenlerin en az 400.000'ini HIV ile enfekte hastaların oluşturduğu tahmin edilmektedir. DSÖ'nün 1990 da başlattığı tüberkülozla mücadele stratejileri ile 2000–2013 yılları arasında 37 milyon insana etkili bir şekilde tanı koyulmuş ve tedavi edilmiştir. DSÖ'nün ileriye yönelik koyduğu hedeflerde 2015 yılında TB prevalansının ve hastalığa bağlı ölümlerin 1990'lı yıllara göre % 50 oranında azaltılmasını sağlamak ve 2035 yılına kadar TB vakalarını ve bu hastalığa bağlı ölümleri en aza indirmek suretiyle global TB epidemisini sonlandırmak bulunmaktadır.^{1,2}

Son yıllarda alınan önlemler ve uygulanan doğrudan gözetimli ilaç tedavisi (DGİT) ile hastalığın insidansında ciddi bir azalma meydana gelmiştir. Ancak dünyada HIV enfeksiyonlu vaka sayısında meydana gelen artış ve çoklu ilaç dirençli (ÇİD)- yaygın ilaç dirençli (YİD) TB suşlarının sık görülmeye başlaması TB epidemisinin kontrolünü güçleştirmektedir. Aynı zamanda enfeksiyonun tedavisi sırasında antibiyotik kullanım miktarının artması ve tedavi süresinin uzaması da hasta açısından ciddi toksisitelere neden olmaktadır. Bu nedenle yeni antitüberküloz ilaç geliştirme çalışmaları devam etmekle birlikte kullanımda olan bazı antibakteriyel moleküllerinde TB tedavisinde etkinliği araştırılmaktadır. DSÖ'nün 2012 raporunda; hali hazırda TB tedavisinde ikinci seçenek olarak kullanılan ve 4. Kuşak florokinolon olan gatifloksasin

ve moksifloksasinin birinci seçenek ilaçlardan etambutol veya izoniazid' in yerini alabileceği belirtilmektedir.³

Klinik semptomlar açısından bir çok enfeksiyon hastalığı ile karıştırılabilen TB'da deri testlerinin yorumundaki güçlük, laboratuvar tanıda önemli olan radyolojik bulguların non-spesifik ve yetersiz, klinik materyalde bakterinin gösterildiği konvensiyonel boyama yöntemlerinin duyarlılığının % 40-60 kadar düşük ve bakterinin üretildiği katı besiyerine dayalı kültür yöntemlerinin de yavaş oluşu gibi sebepler ile başlanan ampirik tedaviler enfeksiyon suşlarında sekonder ilaç direnci gelişimine yol açabilmektedir. Bu nedenle pulmoner sıvıda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilme gibi önemli farmakokinetik özellikler sahip olan ve bu sebeple de alt solunum yolu enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde sık olarak kullanılan florokinolon grubu antibiyotiklere karşı MTK suşlarının duyarlılıklarının bilinmesi önemlidir. Bir ön kabul olarak kaverndeki sayısı en fazla 10^6 olan tüberküloz basilinden kinolon grubu ilaçlara karşı direnç gelişme riskinin 10^{-3} olduğu göz önüne alınırsa, aslında pulmoner tüberküloz tedavisinde rezerv ilaç olarak korunması gerektiği halde günümüzde alt solunum yolu enfeksiyonlarında sık kullanılan moksifloksasin'e, non-spesifik tedavi öncesi veya süresinde gelişebilecek muhtemel direnç, bu ilacın TB tedavisinde bir alternatif olarak kullanımını sınırlandırabilir. Günümüzde moksifloksasin direncinin moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda direncin moleküler mekanizmasının aynı zamanda florokinolon direncinin de görülmesinde önemli bir yere sahip olan gyrA geninin QRDR (quinolone resistance-determining region) bölgesindeki spesifik mutasyonların olduğu tespit edilmiştir. Ancak direncin epidemiyolojik özellikleri ile ilgili literatürde yeterli çalışmaya rastlanmamaktadır. Özellikle MTK suşlarında primer moksifloksasin direnci ile ilgili moleküler düzeyde çalışma yok denecek kadar azdır. Oysa alt solunum yolları non-spesifik enfeksiyonlarında molekülün ampirik kullanımına bağlı olarak hastada kolonize MTK üyeleri arasında gelişmesi muhtemel direnç, bu molekülün ampirik tüberküloz tedavisindeki endikasyonunu etkileyecektir.

Chen ve arkadaşlarının yaptığı sistematik derleme ve meta-analiz bir çalışmada 770 araştırma incelenmiş. TB tanısı almadan önce florokinolon kullanımı öyküsü olan hastalarda, florokinolon tedavisi hiç uygulanmamış hastalara göre TB tanısında ortalama 19,03 günlük bir gecikme olduğu gözlenmiş ve çalışmalar arasında belirgin bir

farklılık tespit edilmemiş. Bunun yanında yapılan çalışmalar antitüberküloz tedavi öncesi ampirik olarak alınan kısa süreli florokinolon tedavileri MTK suşlarının florokinolon duyarlılıklarının ciddi oranlarda azalmasına yol açtığı gösterilmiş.^{4,5}

Moksifloksasin ile yapılan faz-3 klinik çalışmalarda duyarlı tüberküloz vakalarında 4 aylık birincil tedaviye eklenmesi, TB tedavisinin etkinliğini ve kür oranlarını artırdığı, hastalığa bağlı ölüm ve hastalığın bulaş oranlarını azalttığı görülmüş. Conde ve ark. yaptığı bir çalışmada birincil tedavide kullanılan etambutol yerine moksifloksasin kullanılarak klasik tedavi ile farklılıklar karşılaştırılmış. Klasik tedavi alan hastalarda kültür negatifliği tedavinin 2. haftasında % 3 iken, moksifloksasin kullanan grupta % 25'e ulaştığı gösterilmiş.^{6,7}

Moksifloksasin literatürde yer alan birçok çalışma sonuçları ile de desteklediği gibi TB tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Ancak tüberküloz dışı enfeksiyon tedavisinde florokinolon grubu antibiyotik kullanımının yaygınlığı göz önüne alındığında, özellikle de çapraz direnç geliştirme ihtimalinin de yüksek olması sebebi ile, yeni tanı almış kişilerden izole edilen MTK suşlarında florokinolon grubu antibiyotiklere duyarlılık da azalmanın olması doğal olarak beklenebilir.

Bu çalışmada Bölge Tüberküloz Laboratuvarında klinik materyallerden izole edilen MTK suşlarının moksifloksasin duyarlılıklarını fenotipik yöntemlerle tespit ederek bölgesel direnç oranlarının belirlenmesi ve fenotipik direnç ile *gyrA* genindeki mutasyonlarının ilişkisinin tespiti amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz

2.1.1. Tarihçe

İnsanlık öncesi çağlara kadar uzanan bir geçmişe sahip olan mikobakterilerin 300 milyon yıldan beri dünya üzerinde var olduğu ileri sürülmektedir.⁸ Bazı araştırmacılar tarafından tüberküloz basilinin erken atalarının 3 milyon yıl önce Doğu Afrika’ da bulunduğu ve bu bölgede yaşamış olabilecek eski çağ insanlarını enfekte ettiği düşünülmektedir. Moleküler genetiğin modern teknikleri ve genomun sekanslanması tüberkülozun orijini hakkında daha somut bilgiler vermektedir. MTK’inin modern üyelerinden olan Afrika varyantı *M. africanum* ve *M. canettii* ve yine bunlara ek olarak *M. bovis*’in 15.000-35.000 yıl önce, *M. tuberculosis*’in ise 15.000-20.000 yıl önce atasal suşlarından oluştuğu öne sürülmüştür. *M. tuberculosis*’in genom analizlerinde suşlar arasında bulunan mutasyonların büyük bir kısmının 250 ila 1000 yıl arasında oluşmuş olabileceğini göstermektedir.⁹

Mısır’da 5000 yıldan daha öncesine ait kaynaklarda tüberküloz hastalığına ait iskelet deformitelerine işaret edilmesi bu dönemlerde de tüberküloza bağlı hastalıkların yaygın görüldüğünü göstermektedir. Milattan önce (M.Ö.) 3 binli yıllarda Nil nehri kenarında Dra Abu-el-Naga kasabasında yaşamış olan hemoptizili, kambur bir kız çocuğunda, M.Ö. 1000 yılında yaşamış olan psoras rahip Nesprehân’da ve yine M.Ö. 700’lerde Peru’da yaşamış Pott hastalığı belirtilerine sahip ve henüz 10 yaşındayken ölmüş olan çocuğunun mumyasında yapılan moleküler analizlerde tüberküloz tespit edilmiştir. M.Ö. ve milattan sonraki (M.S.) dönemlerde hastalığın Nil vadisinde, Yunanistan’da Amerika’da, Kuzey Amerika’nın Yeni İngiltere yöresinde ve Avrupa’da beş epidemik yükselme ve ani bir şekilde azalma olduğu verem tarihi araştırmacıları tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu epidemilerin oluşmasında, bağışıklık sisteminin, sosyo-ekonomik olayların ve hastalığın doğal seyrinin etkisi olmuştur. Hipokrat M.Ö. 460’lı yıllarda tüberkülozu erime anlamına gelen ‘fitizis’ olarak tanımlamış ve bu hastalığın daha çok 18-35 yaş insanları arasında sık olarak görüldüğünü eski yunan literatürlerinde yazmıştır. M.S. 174’de bir yunan hekim olan Clarissimus Galen tüberküloz tedavisi için temiz hava, süt içmek, deniz kenarına

seyahat ve egzersiz gibi önerilerde bulunmuştur. Kuzey Amerika’da ve son bin yılda Avrupa’da birçok epidemi meydana gelmiştir. 18-19. yüzyıllarda Avrupa nüfusunun % 70’i tüberküloza yakalanmış ve bunların yedide biri ölmüştür.^{8,9,10,11}

Tüberküloz her ne kadar toplumun yoksul kesiminde yaygın olarak görülse de seçkin sınıfında da kendisini göstermiştir. Kral 8. Henry’nin 9 yaşında tahta çıkan oğlu 6. Edward ve Fransız Kralı 9. Charles bu hastalıktan ölmüşlerdir. Yine Napoleon Bonapart’ın “Tıbbı inanmam, fakat Dr. Corvisard’a inanırım dediği Laennec’in hocası Jean N. Corvisard, Rene Laennec ve iki mesai arkadaşı Xavier Bichat ve Bayle, Cekhov, Nicola Paganini, Frederich Chopin, XIII Louis, Frederich Schiller, Vivien Leigh, Bronte kardeşler (Anne, Emili ve Charlotte), Robert Louis Stevenson, Elenor Roosevelt, Franz Kafka, Pakistan’ın kurucusu Muhammed Cinnah ve Nelson Mandela tüberküloz hastalığı olduğu bilinen ünlülerdir.^{8,12}

Etyolojik ajanla ilgili bir bilgiye sahip olunmamasına rağmen veremin bulaşıcı bir hastalık olduğundan 1546 yılında Fracassaro G. tarafından ‘De Morbus Contagiosus’ adlı kitapta bahsedilmiştir. Marten B. (1722) bu etkenlerin ‘muhteşem küçük canlılar’ olduğu ve hastaların nefesleri ile yayılarak sağlıklı kişilerin vücutlarına girdikleri tanımlamasını yapmıştır. Tüberkülozun tanınması ve patogeneğinde önemli gelişmeler Paris’teki Necker hastanesinde çalışan Rene Laennec’in çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. Henüz beş yaşındayken annesi tüberkülozdan ölen Laennec yakın arkadaşı Bayle ile birlikte 900 otopsi materyalini incelemiştir. Gördükleri patolojik değişiklikleri hastaların yapılan fizik muayene bulguları ile birlikte değerlendirmişler ve bu bulguları yayınladıkları *Traite de L’auscultation Mediate* isimli kitapta toplamışlardır.^{12,13}

M. tuberculosis’in verem hastalığının mikrobi olduğunu 1845-1910 yıllarında yaşamış olan Dr. Robert Koch göstermiştir. Almanya’nın Aşağı Saxony’nda yaşayan 13 çocuklu bir ailenin oğlu olan Koch, Gottingen üniversitesinde yetişmiştir. 1882 de tüberkülozdan ölen 32 yaşındaki bir hastanın akciğerindeki lezyonlarında basili göstermiş, bunu kültürde üretmiş ve üretilen basil ile deney hayvanlarında verem oluşturmuştur. Bu basilleri gösterirken Paul E.’nin geliştirdiği boyayı modifiye ederek kullanmış ve etkenin aside dirençli bir bakteri olduğunu da ispatlamıştır. Yine 1890 larda R. Koch ve Clemence von Pirquet tüberküloz basilini ısı ile öldürerek ‘old tüberkülin’ denilen kahverengi sıvıyı elde ettiler ve bunu hastalığın tedavisi amacıyla kullandılar ancak pek kayda değer sonuç elde edemediler. 1921 yılında Calmette ve

Guerin safralı vasatta tam 20 yıl, 230 pasajla basili hastalık yapamaz duruma getirdiler ve günümüzde de halen kullanılan Bacille Calmette-Guerin (BCG) aşısı için gerekli basil bulundu. 1930 da Seibert F. old tüberkülini saflaştırmış ve bu saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile enfeksiyon varlığını tespit edilmeye başlanmıştır.^{8,13}

Osmanlı İmparatorluğu tarihinde de tüberküloz hastalığının epidemilere neden olduğunu hatta Topkapı sarayına kadar girdiğini yazılı kaynaklarda belirtilmiştir. I. Mahmut ve III. Mustafa da Pott hastalığı olduğu, III. Selim'in Safinaz isimli gözdesinin tüberkülozdan öldüğü, II. Mahmut'un annesi ve ona analık yapan Nakşidil Kadın'ın veremli olduğu, 39 yaşında veremden ölen Abdülmecit'in 18 kadınının 9'unun vereme yakalandığı tarih kitaplarında geçmektedir. Ayrıca son padişah Vahdettin'in İtalya'da ölmesi üzerine yapılan otopsisinde sağ akciğerde tüberküloza bağlı tahrip edilmiş akciğer tespit edilmiştir.⁸

Tüberküloz tedavisinde Romalı doktor Giorgio Bagli'nin bir gözlemi neticesinde pnömotoraks ile hastalar tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bagli, veremli bir hastasının kılıç yaralanması sonucu pnömotoraks geçirmesi ile iyileştiğini gözlemlemiştir. Bu yöntemle tedavide birçok komplikasyon ve başarısızlık nedeniyle bir süre sonra terkedilmiştir. 20. yüzyılın başlarında bol gıda, istirahat ve temiz havanın iyi geldiği düşünülerek yüksek kesimlere sanatoryumlar kurulmuş ve verem hastaları bu bölgelerde tedavi edilmeye çalışılmıştır. Hafif vakalarda iyi sonuçlar alınsa da ağır vakalarda işe yaramadığı görülmüştür. Tüberküloz tedavisinde ilk terapotik ajan olarak para amino salisilik asit (PAS) 1943 yılında Jorgen Lehmann tarafından bulunmuştur. Ancak bu ajanın sadece bakteriyostatik etkinliği olması tedavide sınırlandırmıştır. 1944 yılında ABD'li Waksman'ın *Actinomyces* türü mantardan elde ettiği streptomycin'i bulmasıyla verem hastalığının tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır. Bunu 1952 yılında antimikobakteriyel bir ajan olan isoniazid'in ve 1957 de rifamisinlerin bulunması takip etmiştir. Yine 1954 yılında bulunan pirazinamid (PZA) ve 1962 yılında bulunan ethambutol (EMB) de tüberküloz tedavisinde günümüzde de birincil kullanılan ilaçlar arasındadır.^{8,9,13}

Ülkemizde TB ile etkili bir şekilde mücadele 1950 li yıllarda başlamış ve 1960 da çıkartılan bir yasa ile Verem Savaş Dispanserleri kurulmuştur. Hastalığın mortalitesi 1950 yılına ait istatistiklerde 100.000'de 204 gibi çok yüksek bir düzeyde iken, bu sayının 1980'de 8,8'e ve 2000'de 1,6'ya düştüğü görülmektedir. TB insidansı 1960'ta

verilen ilk değere göre 100.000’de 177 iken 2002’de 24’e düşmüştür. Bu verilere göre yapılan mücadele neticesinde hastalık kontrol altına alınabilmiştir.¹⁴

Son yıllarda kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç, AIDS gibi bağışıklık yetmezliğine yol açan hastalıkların yaygınlaşması bu hastalığın öneminin tekrar artmasına neden olmuştur. Yeni tedavi seçeneklerinin sınırlı oluşu, hasta ilaç uyumsuzluğu ve hastalığın tanısındaki güçlükler pandeminin kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır.

2.1.2. Epidemiyoloji

Tüberküloz solunum yolu ile bulaşan bir hastalıktır ve dünya nüfusunun 1/3 ünün TB basili ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Özellikle düşük sosyoekonomik düzey ve yanlış sağlık politikalarının halk sağlığını kötü yönde etkilediği bölgelerde daha fazla görülmekte olup çoğunlukla genç erişkinleri etkilemektedir. TB nedeniyle ölümlerin % 95 i gelişmekte olan ülkelerdedir. DSÖ 2014 raporlarına göre TB prevalansının 11 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. 2013 yılında dünyada 9 milyon yeni TB vakası tespit edilmiştir ve 1,5 milyon hasta tüberküloz nedeniyle kaybedilmiştir. TB ye bağlı ölümlerin 380.000 lik kısmını HIV ile enfekte hastalar oluşturmaktadır. Dünya üzerinde HIV ile enfekte kişilerin % 75 inde TB bulunduğu ve Afrika bölgesindeki TB lu vakaların % 50 den fazlasında HIV ile birliktelik olduğu DSÖ tarafından bildirilmiştir. 1990 larda başlatılan DGİT stratejisi ile TB enfeksiyonlarının yaygınlığında ve ölüm oranlarında önemli derecede azalma gözlenmiştir. DSÖ tarafından hazırlanan Milenyum Kalkınma Hedefleri (MKH) arasında 2015 yılında hastalığın insidansını düşürmek ve 2050 yılında tüberkülozun bir halk sağlığı problemi olmaktan çıkmasını sağlamak bulunmaktadır. Ancak HIV ile enfekte kişi sayısında son zamanlarda meydana gelen artış ve TB enfeksiyonlarında meydana gelen antibiyotik direnci nedeniyle epideminin kontrol altına alınması giderek güçleşmektedir.^{1,2}

Afrika gibi HIV epidemisinin ve TB vakalarına bağlı ölümlerin yoğun şekilde görüldüğü bölgelerde hastalığın tedavisinin oluşturduğu maliyetin fazla olması sonucu uygulanan kısa süreli tedaviler ÇİD TB ve YİD TB vakalarının sayısında artışa neden olmaktadır. Dünyada 2013 yılında ortalama 480.000 yeni ÇİD TB vakası olduğu tahmin edilmektedir ve sistematik araştırmalar göstermektedir ki TB a bağlı ölümlerin büyük bir kısmını da ÇİD TB vakaları oluşturmaktadır. Bu nedenle bu vakaların tanısının hızlı

bir şekilde konulması ve tedavinin doğru bir şekilde uygulanması gerekmektedir. YİD TB vakaları 2013 inin sonuna kadar dünya çapında 100 ülkede bildirilmiştir ve ÇİD TB vakaları arasında bu oran % 9 olarak tahmin edilmektedir. Bu oran önceki yıllara göre az da olsa artış göstermektedir. ÇİD TB ler arasında florokinolonlara ve parenteral ikincil bir ilaca direnç durumu sırasıyla % 16,5 ve % 22,7 olarak tahmin edilmektedir.^{1,2,15}

Ülkemizdeki TB oranlarına baktığımızda 2005-2006 yıllarında Türkiye genelinde yaklaşık 21.000 tüberküloz vakası varken 2013 yılında kayıtlı toplam tüberküloz vaka sayısı 13.409'a düşmüştür ve bu vakaların 12.352 tanesini yeni tanı almış hastalar oluşturmaktadır. TB vakalarının % 65,5 i HIV yönünden test edilmiştir ve 32 vaka HIV (+) olarak bulunmuştur. Yine ülkemizde ilaç direnç oranlarına baktığımızda toplamda 5.529 olguya İDT yapılmış ve bunlardan 228 tanesinde ÇİD-TB tespit edilmiştir. Yeni tanı alan olgularda ÇİD TB oranı ortalama % 3,2 iken öncesinde tedavi görmüş olgularda bu oran % 22 olarak bulunmuştur.¹⁶

Tüberkülozla ilgili en önemli tehlike hastaların ilaçlarını düzenli kullanmamaları veya tedavilerini yarım bırakmaları sonucunda gelişen ilaç direnci olarak görülmektedir. Bu olgular birinci seçenek TB ilaçlarına dirençlidir ve tedavileri ancak ikinci seçenek TB ilaçları ile mümkündür. Bu da tedavi başarısını oldukça düşürmekte ve tedavi maliyetini arttırmaktadır ve başarısızlık ile sonuçlanan tedaviler hasta kayıplarına neden olmasının yanında dirençli suşların sıklığının artması gibi ciddi halk sağlığı problemlerine de yol açmaktadır.

2.1.3. Sınıflandırma

TB basili; Prokaryot aleminin, *Firmicutes* bölümünün, *Actinobacteria* sınıfının, *Actinomycetales* takımının, *Mycobacteriaceae* ailesinde tek cins olan *Mycobacterium* cinsine ait bir türdür. Bakteriyolojik özellik ve DNA benzerlikleri yönlerinden dolayı yakın ilişkili türlere 'kompleks' adı verilir ve *M. tuberculosis* kompleks (MTK) olarak tanımlanır. MTK içerisinde *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* ve BCG suşu, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* ve son olarak da henüz tanımlanma aşamasında olan *M. orygis* alt türleri bulunmaktadır. Konak tropizmlerinde, fenotipik özelliklerinde ve patojenitelerinde büyük farklılıklar olmasına karşın bu türler

arasında çok yüksek düzeyde genetik homojenite bulunmaktadır. Bu grubun dışında kalan türler ise, Tüberküloz Dışı Mikobakteriler (TDM) olarak adlandırılmıştır.¹⁷

Mikobakteriler için üreme özellikleri ve genetik yapılarına göre çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. İlk olarak katı besiyerinde üreme özelliklerine göre Runyon tarafından 4 grupta sınıflandırılmışlardır (Tablo 1).¹⁸

Tablo 1. Runyon Sınıflandırması¹⁸

Yavaş Üreyen mikobakteriler	Pigmentasyon	Türler
Runyon I	Fotokromojen	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. simiae</i>
Runyon II	Skotokromojen	<i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
Runyon III	Kromojenik olmayan	<i>M. avium-intracellulare</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. terrae</i>
Hızlı Üreyen mikobakteriler		
Runyon IV	Kromojenik olmayan	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. thermoresistibile</i>

1987’de Woods ve Washington bu sınıflandırmayı eksik bulmuş ve klinikle uyumlu, *M. tuberculosis* türünün de içinde olduğu bir sınıflama yapmışlardır(Tablo 2).¹⁹

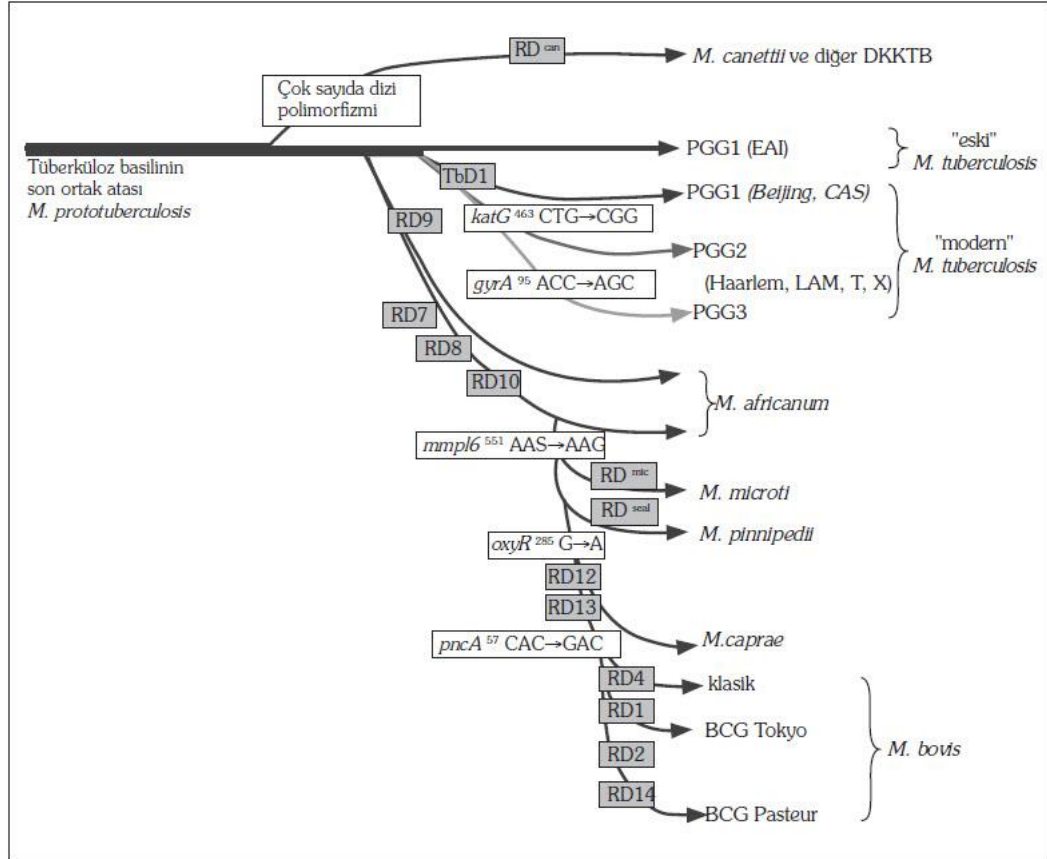
Tablo 2. Woods ve Washington Sınıflandırması¹⁹

Klinik önemi olan mikobakteriler	<i>M. tuberculosis complex</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis (M.bovis BCG)</i> <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> <i>M. canetti</i>		
İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare complex</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae complex</i> <i>M. scrofloceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgari</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. celatum</i>		
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofitik türler	Yavaş üreyenler	Orta hızda Üreyenler	Hızlı üreyenler
	<i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale comp.</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. thermoresistibile</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. paraafortuitum complex</i>

Mycobacterium cinsi içinde yer alan türler, deoksiribonükleik asit (DNA) lerindeki yüksek G+C içeriği (% 61-71 mol) ile hücre duvar yapısında değişik oranlarda mikolik asit içeren diğer cinslere (*Tsukamurella* % 68-74, *Nocardia* % 64-72 ve *Rhodococcus* % 63-73 mol) benzerlik gösterirler.²⁰

MTK türleri arasında meydana gelen bazı gen bölgelerindeki farklılıklar, bu türleri birbirinden ayırmaktadır. Bu türlere ait gen kırılmaları incelendiğinde; MTK içerisinde meydana gelen ilk ayrışmanın 26 farklı gen bölgesindeki delesyon nedeni ile *M. canettii*'de olduğu gözlenmiştir. *M. tuberculosis* RD gen bölgelerini ve RD9 bölgesini koruyarak *M. africanum*, *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. africanum* RD9 bölgesini kaybederek *M. microti* ve *M. bovis* türlerinden; *M. microti* RD9, RD7, RD8 ve RD10 bölgelerini kaybedip, RD12, RD13, RD14, RD4, RD2 ve RD1 gen bölgelerini korumasıyla *M. bovis*'den ayrılmıştır. *M. bovis* RD12, RD13 ve RD4 bölgelerini kaybederek bazı türleri enfekte etme yeteneğini kaybetmiştir. *M. bovis*'in RD1, RD2 ve RD14 gen bölgelerini kaybetmesiyle atenüe BCG suşları ortaya çıkmıştır.

M. tuberculosis'in RvD1 bölgesinin kaybıyla H37Rv, TbD1'deki ve IS6110 gibi bazı polimorfik gen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda Beijing, Haarlem ve African olarak adlandırılan modern *M. tuberculosis* kökenleri ortaya çıkmıştır (Şekil 1).^{11,12,13,21}



Şekil 1. Tüberküloz basiliinin evrimsel gelişimi²²

Moleküler tekniklerin geliştirilmesi ile birlikte 200'e yakın mikobakteri türü keşfedilmiştir. Bu kadar fazla türün oluşması bakterinin fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılmasını oldukça güçleştirmektedir. Son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından genetik benzerliklerine göre oluşturulan filogenetik ağaçlar ile sınıflandırmalar da yapılmaktadır.²³

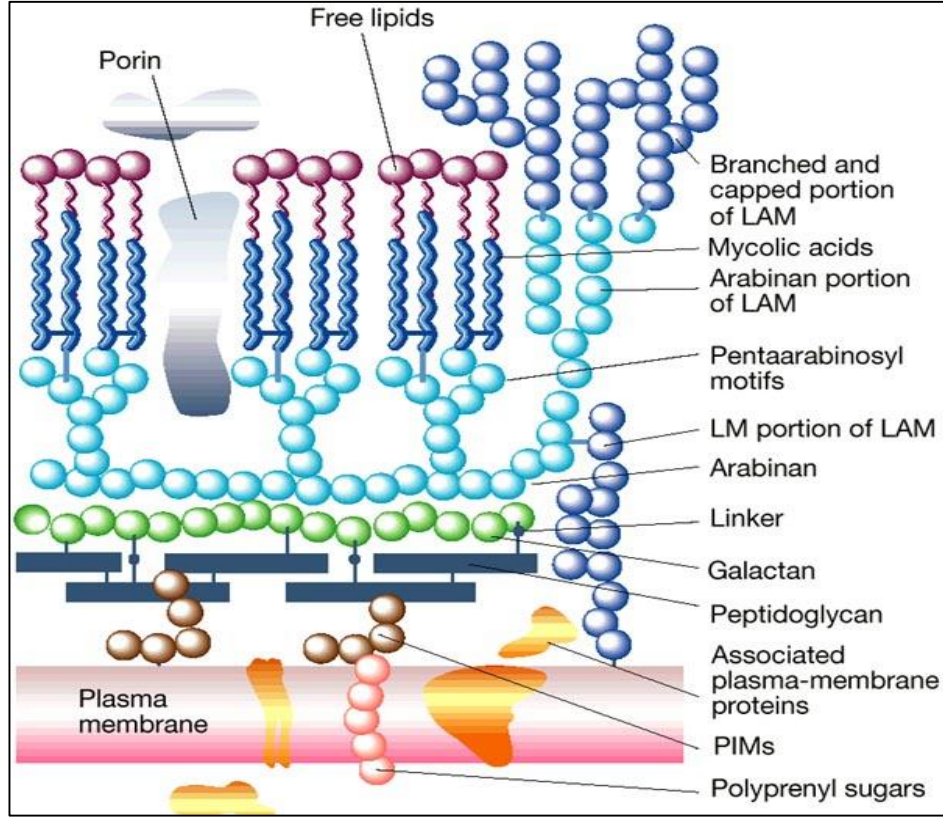
2.1.4. Hücre Yapısı

M. tuberculosis hareketsiz, spor oluşturmeyen ve aerobik bir bakteri olup 0,2-0,6 x 1-10 µm boyutlarında, hafif kıvrımlı veya düz bir basildir. Basilin büyüklüğü ve şekli, üreme ortamına ve süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Basillerin bölünmeden sonra hidrofobik karakterleri sebebi ile birbirlerinden ayrılmadan büyük kümeler şeklinde çoğalmaları kord faktör (*serpentine cord*) olarak tanımlanmıştır.¹⁷

TB basilinin hücre duvar yapısı diğer bakterilere göre oldukça kalın ve lipid oranı yüksektir. Hücre duvarının dış kısmında mikolik asit olarak adlandırılan 60-90 karbonlu, uzun ve dallı yağ asitleri yer alır (Şekil 2). Mikolik asitler arabinogalaktan molekülleri aracılığıyla daha iç kısımlardaki peptidoglikan tabakaya bağlanırlar. Dıştan içe doğru mikolik asit, arabinogalaktan ve peptidoglikandan oluşan bu sağlam yapı, bir zırh gibi hücreyi çevreler. Bu yapının sağlamlığı lipoarabinomannan, mannofosfoinositid, serbest lipid ve polipeptidlerin de katılımıyla daha da artar. Arabinogalaktan tabakası, mikolik asitlerle peptidoglikan arasında köprü görevi gören dallanmış bir polisakkarittir. Hücre duvarının bu kompleks ve kalın yapısı hücreyi birçok ilaç molekülüne karşı doğal dirençli hale getirmektedir. Ayrıca hücre duvarında peptidoglikan bulunması sebebi ile Gram pozitif bakterilere benzeseler de bu yapıdaki lipidlerin fazla olması nedeniyle yaygın anilin boyalarla boyanmaları zordur.²⁴

2.1.4.1. Peptidoglikan Tabaka

TB basilinde hücre duvarının en önemli özelliklerinden birisi kemotip-IV peptidoglikan yapıya sahip olmasıdır. Diğer bakterilerden farklı olarak N-asetilglukozamin ve N-glikozilmuramikasit'in, betaglikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimer yapı bulunmaktadır. Kemotip-IV peptidoglikan yapıda muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formu bulunmakta ve tetrapeptid yan zincirler diaminopimelik asit içermektedir. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalaktanı kovalent olarak bağlar. Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptid yapıda yer alan diaminopimelik asitler ile lizozimlere karşı direnç kazanırlar.¹⁷



Şekil 2. *M.tuberculosis* hücre duvarı yapısı²⁵

2.1.4.2 Mikolik Asit Yapısı

Arabinogalakattan ve glikolipidler arasında yer alan uzun zincirli doymuş yağ asitlerinden olan mikolik asit hücre duvarının önemli yapılarındandır. Mikolik asitler tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini, hücre lipidlerinin % 60'ını oluştururlar. Mikolilarabinogalakattan-peptidoglikan kompleksinde en fazla bulunan mikolik asit türü, oksitlenmiş grupları içermeyen 60 karbon büyüklüğündeki D-mikolik asitlerdir. Yapısında bir çift bağ veya siklopropan halkası içerir. D-mikolik asitler *M.tuberculosis* de dahil olmak üzere bir çok mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25'den fazlasını oluştururlar. Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil köprü ile bir heteropolisakkarit olan arabinogalakattanı kovalent olarak bağlar. Tetrapeptit yapıda yer alan diaminopimelikasitler ile lizozimlere karşı direnç kazanırlar.¹⁷

2.1.4.3. Lipoglikan Yapı

M. tuberculosis hücre duvarında bulunan Lipomannan, fosfatidil-myo-innositol mannozid, lipoarabinomannan ve arabinan moleküllerini içeren patogeneizde önemli görevleri olan yapılardır. Konak hücreye tutunmada etkili olduğu gibi fagositozun ve fagozom-lizozom birleşmesinin engellenmesi birçok virülans faktöründe de etkili oldukları gösterilmiştir.²⁶

2.1.4.4. Wax D

Peptidoglikolipid yapısındadır. Freud adjuvanının etkisini artırıcı özelliğe sahiptir. Tümör geriletici özelliğe sahip olup, BCG aşısının bazı tümörlerde gerilemeye neden olan immünoterapotik etkisinde rolü vardır.²⁷

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

Tüberküloz basilinin küme oluşturmaya neden olur. Adjuvan etkiye sahiptir ve komplemanı alternatif yolla aktive eder. Önemli bir virulans faktörüdür. Granülom oluşumunda rol oynar. PNL göçünü inhibe eder. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasar yapar.^{27,28}

2.1.5. Genetik Özellikleri

M. tuberculosis H₃₇RV'nin genomu 4.411.532 baz çiftinden (bp) oluşmaktadır. Kromozom halkasal yapıda ve *Escherichia coli* genomuyla yaklaşık aynı büyüklüktedir. *M. tuberculosis*'in genomu *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen mikobakteri türlerinden daha kısadır. Bu durum hücre içi ortamdaki genetik izolasyona ve hücre içi ortamda gereksiz olan genlerin kaybına bağlanmaktadır. *M. tuberculosis* genomunun G+C içeriği % 65,6'dır. Yüksek G+C içeriği bakterinin aerobik yaşam şekliyle ilişkilidir. Buna karşın, *M. tuberculosis* anaerobik ortamlara da uyum sağlayabilecek metabolik potansiyele sahiptir. *M. tuberculosis*'in genomunda psödogenler çok az yer kaplamaktadır; genomda yaklaşık her 1,1 kb başına bir gen düşer ve potansiyel kodlama kapasitesinin tamamına yakını (% 91) kullanılır. Son bilgilere göre basilin genomunda 3.993'ü protein 50'si stabil RNA kodladığı düşünülen 4.043 adet gen tanımlanmıştır. Bakteriler arasında genlerin horizontal transferi fajlar, plazmidler ve transpozonlarla olmaktadır. Ancak *M.*

tuberculosis'de virölans veya patojeniteden sorumlu olabilecek horizontal gen transferiyle alınmış genetik adalar gösterilememiştir. *M. tuberculosis*'de patojenite adalarının yanı sıra plazmid de bulunmamaktadır. Buna karşın *M. tuberculosis* genomunun yaklaşık % 4'ü hareketli genetik elemanlar (IS) ve profajlardan oluşmaktadır. Bu elemanın kopya sayısı *M. tuberculosis* H₃₇Rv'de 16 iken farklı kökenlerde 0 ile >25 arasında değişmektedir. Bu özelliği nedeniyle IS6110 temelli tiplendirme yöntemi moleküler epidemiyolojik çalışmalarda başarıyla kullanılmaktadır.²⁹

2.1.5. Tüberkülozda Bulaş ve Patogenez

TB basili, akciğer veya larenks tüberkülozlu hastaların havaya dağılan sekresyonların sıvı kısmının buharlaşarak küçük solid bir maddeye dönüşmesi ve “damlacık çekirdeği” adını alan bu partiküllerin, sağlıklı kişilerce solunum yolu ile alınması sonucu bulaşır. Damlacık çekirdekleri ile organizmaya giren basil senelerce metabolik olarak inaktif (dormant durumunda) kalabilir. Bu dönemde “latent” bir tüberküloz enfeksiyonu söz konusudur.

Solunum yolundan girerek alveollere kadar ulaşabilen basiller burada alveoler makrofajlarca fagosit edilir. Alveoler makrofajlarla olan ilk karşılaşmada basilin dayanıklılığı, basilin virulansı ve alveoler makrofajların bakterisidal aktivitesi olayın seyrini belirleyici değişkenlerdir. Bu dönemde makrofajların gösterdiği antimikrobiyal yanıt ve proinflamatuvar direnç kuvvetli olmadığı için basillerin bir kısmı bütünlüğü bozulmadan canlı kalırken, bir kısmı da makrofajlar içinde kısmen antijenik parçalara ayrılır. Makrofajların tüberküloz basili ile etkileşimleri farklı reseptörleri sayesinde gerçekleşmektedir. Makrofaj reseptörlerinin en önemlileri Fc, kompleman, mannoz, sürfaktan, CD14, CD43, TLR-2 ve TLR-4 reseptörleridir. Konağın doğal savunmasında; üst solunum yolunun fiziksel engeli, fagositoz, fagositik hücrelerin salgıladığı reaktif nitrojen ve oksijen ürünleri, inflamatuvar hücreler ve saldıkları sitokinler, alveoler makrofajların kimyasal yapısını değiştirmesi, apoptoz ve genetik faktörlerin rol oynadığı bilinmektedir.^{30,31,32}

Makrofajlar içinde bulunan bütünlüğü korunmuş, canlı basiller makrofajlar içinde çoğalırlar. Çoğalan basiller alveoler makrofajların bütünlüğünü bozar ve basiller serbestleşir. Makrofajların yıkımıyla açığa çıkan kemokinler farklı inflamatuvar

hücrelerin olay yerine göçüne neden olur. Monositler, T lenfositler, $\gamma\delta$ T lenfositler, NK hücreler de bu dönemde lezyon bölgesine gelmeye başlar. Yeni alveol makrofajları ve monositleri basilleri yutarlar. Basiller çoğalmayı sürdürerek konakçı hücrelerini öldürürler ve yerel yayılma gösterirler. Replikasyon süresi 15-18 saat olan bir tüberküloz basili kontrolsüz çoğalma safhasında 20 günde 54×10^7 basil düzeyine çıkar. Bölgeye göç eden monosit ve lenfositler granülom oluşumunu başlatırlar. Lenfo-hematojen yayılım sırasında basiller en çok akciğerler (apeks), böbrekler, uzun kemikler ve vertebralara yerleşir. Sağlıklı bireylerde lenfo-hematojen yolla vücuda dağılan basillerin oluşturduğu küçük kazeöz odaklar makrofajlarca temizlenmektedir. Büyük kazeöz odaklar ise fibröz bir kapsül ile çevrilerek (tüberkülom) izole edilmektedir.³²

2.1.6. Tüberkülozda İmmün Cevap

TB enfeksiyonunda immün yanıt basilin konak tarafından patojen olarak algılanması ile başlamaktadır. Bunu takiben doğal immün yanıt oluşmakta ve daha sonra kazanılmış immün cevap devreye girmektedir (Kleinnijenhuis ve ark.). Makrofaj veya Dentritik hücreden (DH) salınan IL-12 etkisi ile CD4 T lenfosit, IFN- γ salan TH1 fenotipine farklılaşmaktadır. TB'a karşı esas immün yanıt TH1 aracılı yanıt (IFN- γ ve IL-12 oluşumu) ve TNF- α oluşumu ile ilişkilidir. TH1 hücreleri IFN- γ salınımı ile makrofaj, NK ve CD8 T hücrelerini aktive etmektedir. IFN- γ makrofajın fagositik kapasitesini arttırmakta ve böylelikle makrofaj ve T hücrelerinin etkileşimi ile TB ile mücadele edilmektedir.^{33,34}

IFN- γ oluşturan CD4 T hücreler, TB antijenlerini sunan enfekte makrofajları tanımakta ve bunları öldürmektedir. Enfeksiyonun ilerlemesi genel olarak durdurulmakta ancak, bazı dirençli basiller konak savunmasının kurtulmakta ve dormant basile haline geçmekte ve immün sistemin yok etmesine karşı kalıcı bir hale dönüşmektedir. Bireysel immün duruma bağlı olarak bazı granülamatöz lezyonların bir kısmı mikroçevrede TB'nin varlığını sürdürmesine izin verirken bir kısmı da immün cevabı tamamen baskılamaktadır.³³

CD8 T hücreler, IFN- γ ve IL-15 ve IL-18 gibi monokinler üreterek hücre cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, TB ile enfekte makrofajlara karşı sitotoksik etki göstermekte ve böylece TB'ye karşı konak cevabında önemli bir rol almaktadır. CD8 T hücrelerin başlıca görevi apoptozistir. TC1 hücrelere

dönüşürler ve granzyme ve granulinin enzimlerini sitoplazmalarındaki vakuollerinde biriktirmeye başlarlar. Granüllerinde bulunan perforin ve granülizin maddelerini salgılayarak enfekte konakçı hücreyi lizis yoluyla öldürürler. CD8 T hücrenin enfekte hücreyi öldürmede diğer bir mekanizması Fas-FasL etkileşimini arttırmasıdır. Aktive CD8 T hücrede sentezlenen Fas ligandları, hedef hücre yüzeyinde bulunan Fas reseptörü ile bağlanır. Bu etkileşim sonrasında hedef hücrede kaspaz aktivasyonu ile hücrenin apoptozis süreci başlatılır.^{35,36}

NK hücreleri, TB enfeksiyonunda IFN- γ salınımı ile makrofajın aktivasyonunu sağlamakta ve bakterinin öldürülmesine, fagozomal olgunlaşmaya ve fagositoza katkıda bulunmaktadır. NK hücreleri TB ile enfekte monosit ve makrofajlar tarafından uyarılabilmekte ve apoptozu indüklemektedir. NK hücreler, yüzeylerinde bulunan IgG yapıda antikorların Fc reseptörü olan Fc γ RIIIA reseptörleri (CD16) aracılığıyla, plazma hücreleri tarafından oluşturulan spesifik yapıda IgG antikorlarının hücre yüzeyine bağlanarak işaretlediği tüberküloz basili ile enfekte makrofajı tanırlar ve hedef hücrenin apoptozis yoluyla ölümüne neden olurlar. NK hücrelerin bu fonksiyonu “antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksikite” olarak bilinmektedir. Ayrıca NK hücresi, TB’ye karşı T hücre cevabını da düzenlemektedir.^{37,38}

2.1.7. Tüberküloz Tanısı

Tüberkülozun tanısında altın standart bakteriyolojik olarak etkenin gösterilmesidir. Hastanın değerlendirilmesinde kapsamlı bir tıbbi yaklaşım gerekir: hastanın öyküsü, fizik bulguları, akciğer filmi, tüberkülin deri testi ve İnterferon Gama Salınım Testi ile hastalıktan şüphelenilir ve bakteriyolojik ya da histolojik inceleme ile tanı kesinleştirilir.

2.1.7.1. Klinik Tanı

Tüberküloz hastalarında semptomlar çok spesifik olamamakla beraber öykü ve fizik muayene tanıya oldukça yardımcı olmaktadır. Hastalarda en sık görülen şikayetler; İki haftadan uzun süren öksürük (çoğu zaman balgamla birlikte görülür; bazen kanlı olabilir), halsizlik, iştahsızlık, gece terlemesi, göğüs ağrısı, sırt ağrısı, yan ağrısı (plevra tutulumu olduğunda solunumla değişen ağrı), nefes darlığı (lezyonların yaygın olduğu ya da plevra sıvısının fazla olduğu durumlarda görülür), ses kısıklığıdır (larinks

tutulumunda). Kilo kaybı ve ateş (aralıklıdır; sabahları yoktur, akşam yükselir, gece terlemeyle birlikte düşer) öne çıkan bulgulardır. Hastanın TB açısından riski artıran bir sağlık sorununun olup olmadığı da sorgulanmalıdır. Özgeçmişinde diyabet, bağışıklığı baskılayacak hastalık ya da tedaviler, meslek anamnezi tanıya yaklaşma açısından önemlidir. Ayrıca hastanın son 2 yılda yaşadığı yerler öğrenilmelidir. TB hastalığı ya da şüphesi olan kişilerde, önceden TB hastalığı geçirip geçirmediği öğrenilmelidir. TB hastalığı geçirmişse, tarihi, tanının nerede konulduğu, tedaviye kimin başladığı, başlangıçta balgamda basil olup olmadığı sorulur. Hastalığı döneminde kullandığı ilaçlar ve süresi sorulur. Akciğer tüberkülozunda fizik muayene bulgusu olmayabilir. Seyrek olarak lokalize raller ve öksürük sonrası raller olabilir. Konsolidasyon varlığında bronşiyal sesler duyulabilir. Plevra sıvısı ya da plevra kalınlaşması bulguları olabilir. Hepatomegali, splenomegali erişkin tip tüberkülozda nadirdir. Uzun sürmüş hastalıkta çomak parmak olabilir. Hastaların yarısından çoğunda ateş saptanır. İlerlemiş hastalıkta genel durum bozukluğu, kaşeksi ve dispne görülebilir. Bazen hastalarda eritema nodozum, fliktenüler konjonktivit, lenf bezi büyümesi tespit edilebilir. Tanıya radyolojik tetkiklerin önemli derecede katkısı vardır. Akciğer grafisini değerlendirmeden önce filmin uygun teknikle çekilmiş olmasına dikkat etmek gerekir. Filmin dansitesi iyi olmalı, simetrik çekilmeli, akciğerleri içermeli, hasta derin inspirasyon yapmış şekilde çekilmelidir. Filme ait teknik sorunlar yanlış okumalara neden olabilir. Akciğer tüberkülozunda hemen daima radyolojik bulgu vardır. Nadiren film normal de görülebilir. Primer tüberkülozda genellikle orta ya da alt zonlarda infiltrasyon olur; birlikte aynı taraf hilus lenf bezleri büyür. Büyüyen lenf bezleri bası yaparak atelektazi yapabilir. Konsolidasyon, plörezi görülebilir. Miliyer tutulum olabilir. Eğer primer olay, hücresel bağışıklık geliştikten sonra sürerse kavite olabilir. Bu duruma "ilerleyici primer tüberküloz" denir. "Erişkin tipi akciğer tüberkülozu"nda üst loblarda infiltrasyonlar, kaviteler ve fibrozis görülebilir. Yıkım ve fibroze bağlı hacim kaybı sıktır. Bu lezyonlar tek ya da iki taraflı olabilir. En çok üst lopların apikal ve posterior ile alt lopların superior segmentleri tutulur. Atipik bulgular olabilir; bunlar, alt lob tutulumları, plevra efüzyonu, miliyer gölgeler, kitle lezyonları, mediastende büyümüş lenf bezleri, pnömotorakstır. Kavite sık görülmez. Bu atipik bulgular genellikle diyabet, böbrek yetmezliği ve HIV pozitifliği gibi bağışıklık sistemi bozukluğu olan hastalarda görülür. Akciğer radyolojisinde, lezyonlar tüberkülozu

düşündürebilir; fakat tüberkülozda görülen lezyonlar başka birçok hastalıkta da vardır. Yalnız radyoloji ile tüberküloz tanısı konulamaz.³⁹

2.1.7.2 Tüberkülin Deri Testi (TDT) ve İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST)

Sıklıkla aktif TB düşünülen kişilerde ya da TB ile enfekte kişilerle temas öyküsü bulunanlarda TB bulaşının ve latent TB enfeksiyonunun araştırılması için yapılan testlerdir. TDT uygulanmasında 2 yöntem kullanılır;

1. Mantoux yöntemi: Önkolun volar ya da dorsal bölgesine 0,1 ml 5 TU PPD, 1 ml dizyem taksimatlı bir kullanımlık 26-27 gauge kalınlığında iğne uçlu enjektör ile, iğne ucu yukarıya doğru bakacak şekilde deri içine yapılır. Deride 6-10 mm çaplı bir kabartı oluşmalıdır. Kabartı yayılırsa bu uygulamanın cilt altına yapıldığını gösterir. Bu durumda bir kaç cm uzağında test tekrarlanır. Test yerinde hiperemi ve endurasyon oluşur. Hipereminin çapı önemli değildir. Endurasyonun çapı 48-72 saat sonra palpasyonla, şeffaf bir cetvelle milimetrik olarak önkolun doğrultusuna dik olarak (horizontal) okunur. Palpasyon metodundan başka Sokal'ın tarif ettiği (*ball-pointpen*) kalemle ölçüm metodu ile de endürasyonunun çapı değerlendirilebilir. Bu metotta kalem ucu deri reaksiyonunun 1-2 cm uzağından başlayarak merkeze doğru kalem 45 °C eğik olacak şekilde hareket ettirilir. Endürasyon sınırına ulaşıncaya harekete karşı dirençle karşılaşılır ve bu noktada kalem kaldırılır. Aynı hareket deri reaksiyonunun karşı bölgesinde tekrar edilir ve karşılıklı çizgi lerin arasındaki uzaklık mm olarak ölçülür. Palpasyon ve kalem metodunun karşılaştırılmasının yapıldığı 1997 yılında 96 hastalık çalışmada, kalem tekniği palpasyon tekniğine göre % 38 daha az hatalı bulunmuştur. Endurasyonun çapının kaydedilirken 'negatif' yerine '0 mm' olarak yazılması daha doğrudur. Test yerinde bül, vezikül ve benzeri reaksiyonlar görülebilirse de hasta sağlığı açısından bir tehdit oluşturmaz. Birkaç haftada kendiliğinden düzelecek olan lezyona kesinlikle pomat veya antiseptik sürülmemelidir (Şekil 3).

2. Multiple Delgi yöntemi: Değişebilir uçlu başlığı olan standart tabancalar kullanılmaktadır. Uçları 'Old Tuberculin' ya da PPD'yi 6 kısa iğneyle deriye enjekte etmektedir. Sonuç 3 ila 7 gün içinde okunur.⁴⁰

BCG'lilerde	
0-5 mm	Negatif kabul edilir
6-14	BCG'ye atfedilir
15 mm ve üzeri	Pozitif kabul edilir, enfeksiyon olarak değerlendirilir
BCG'sizlerde	
0-5 mm	Negatif kabul edilir
6-9 mm	Şüpheli kabul edilir, 1 hafta sonra test tekrarlanır; yine 6-9 mm bulunursa negatif kabul edilir; 10 mm ve üzeri pozitif kabul edilir
10 mm ve üzeri	Pozitif kabul edilir
Bağıışıklığı baskılanmış kişilerde 5 mm ve üzeri pozitif kabul edilir.*	

Şekil 3. TDT Reaksiyonunun değerlendirilmesi⁴⁰

Son yıllarda gerek immünoloji gerekse mikrobiyal genetik bilimlerinde kaydedilen gelişmeler TB enfeksiyonu tanısında yeni yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. BCG kökenlerinde ve TDM'lerin çoğunda bulunmayan, bu nedenle *M. tuberculosis*'e özgül sayılan RD1 geni ürünleri olan ESAT-6 ve CFP-10, tüberküloza özgül T hücrelerinin belirlenmesinde TB hastalığı tanısında test edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda antijene özgül T hücrelerinin TB tanısında kullanılmasını esas alan Quantiferon-TB (QFT), QuantiFERON-TB Gold (QFT-G), QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT-GIT) ve T-SPOT.TB testleri geliştirilmiştir. Bu testler genel olarak IFN- γ salınım testleri olarak adlandırılmıştır.⁴¹

Genel olarak incelendiğinde bugüne kadar yapılan çalışmalar IFN- γ tabanlı testlerin TB enfeksiyonu tanısında TDT'ye göre daha duyarlı ve özgül olduğunu göstermektedir. IFN- γ tabanlı testler birbiri ile karşılaştırıldığında ise yapılan tüm çalışmalar göz önüne alındığında duyarlılıkları ve özgüllükleri arasında büyük farklılıkların olmadığı söylenebilir.

2.1.7.3. Laboratuvar Tanısı

M. tuberculosis tanısında akciğer tüberklozlu hastadan uygun koşullarda alınan klinik materyal, vidalı kapaklı özel taşıma kapları içerisine konularak oda ısısında 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örnekler kalite yönünden makroskopik olarak incelenmeli ve koşullara uygun olmayan örnekler yeniden istenmelidir. Her örnekten hazırlanan preparasyon aside dirençli boyama yöntemleri ile boyanarak incelenmelidir. Sonrasında örnekler dekontaminasyon-homojenizasyon-konsantrasyon işlemlerine tabi tutularak kültüre ekimi yapılmalıdır.

2.1.7.3.1. Mikroskopi

Balgam yayması mikroskopisi basit, hızlı ve ucuz bir tanı yöntemidir. Erlich-Ziehl-Nielsen (EZN) ve Kinyoun boyama tekniklerinde TB basilleri mavi zeminde kırmızı basiller, floresan mikroskopide Auramine-Rhodamine boya kullanılması sonucunda basiller karanlık zeminde sarı floresan verir şekilde görünürler. Direkt boyalı preparasyonlarda, balgamda 5.000-10.000 basil/ml varlığında pozitif sonuç alınabildiği için duyarlılık düşüktür. Teksif işlemi ile duyarlılığı artırılabilir.

2.1.7.3.2. Kültür

Kültür TB tanısı için altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Klinik materyalden basilin kültür ortamında üretilmesi gerek identifikasyon gerekse anti-tüberküloz ilaç duyarlılık testleri için önemlidir. Kullanılan besiyerlerinin nutrisyonel oluşu ve klinik materyalde sıklıkla mikst flora bakterilerinin yer alması ve kros kontaminasyon riskinin yüksek oluşu sebebi ile gelişmiş biyo-güvenlikli laboratuvar düzeneklerine duyulan ihtiyaç, rutin mikobakteri kültür uygulanmasını sınırlı hale getirmektedir. Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan test yöntemleri katı bazlı yavaş ve sıvı bazlı otomatize hızlı sistemler olmak üzere iki başlık altında değerlendirilmektedir. Katı besiyerleri arasında yumurta veya agar bazlı Löwenstein Jensen (LJ), Middlebrook 7H10-7H11 gibi besiyerleri bulunmaktadır (Tablo 3). Bu besiyerlerinde üreme 21. günde fark edilebilir. Sıvı bazlı Middlebrook 7H9 gibi besiyerlerinde 7-11 gün gibi daha erken sürelerde üreme tespit edilebilir. Tipik koloni morfolojisi oluşturmaları ve daha bol üremeleri nedeniyle özellikle primer izolasyonda LJ besiyerinin kullanılması önerilmektedir. Yumurta bazlı besiyerleri opak görünümlü olmasına karşın, agar bazlı besiyerleri şeffaftır. Bu nedenle, ekim yapılan besiyerleri 10-12 gün sonra mikroskop altında incelenirse, oluşan kolonileri görmek mümkün olmaktadır.⁴²

Tablo 3. Mikobakterilerin genel üretim besiyerleri⁴³

Besiyeri	İçerik	İnhibitör Ajan
Löwenstein jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0,025g/100ml
Petragnani	Koagüle tam yumurta, yumurta sarısı, süt, gliserol, patates, patates unu	Malasit yeşili, 0,052 g/100 ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz	Malaşit yeşili, 0.0025g/100ml
Middlebrook 7H11	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albümin, katalaz, gliserol, dextroz, % 0,1 kazein hidrolizat	Malaşit yeşili, 0,0025g/100ml
American Thoracic Society Medium (ATSM)	Koagüle taze yumurta sarısı, gliserol, patates unu	Malasit yeşili, 0,02 g/100 ml

Bunun yanı sıra kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların üremesini etkin bir şekilde engellemek amacıyla selektif besiyerleri olan, LJ Gruft, Mycobactosel LJ, Mitchison selektif 7H11 de kullanılabilir. Primer izolasyonda besiyerlerinden en az birinin selektif olması önerilir.

Günümüzde birçok laboratuvar, konvansiyonel besiyerlerinin yanısıra tüberküloz etkeni bakterilerin izolasyon süresinin çok daha kısa ve izolasyon oranının çok daha yüksek olduğu hızlı kültür sistemleri rutin inceleme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemlerde gaz basıncındaki değişiklikler, CO₂ oluşumu ve oksijen kullanımı florometrik veya kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Primer izolasyonda sıvı besiyerlerine ilave olarak bir de katı besiyeri kullanılması CDC tarafından önerilmektedir ve bu kombinasyonla mikobakterilerin izolasyon şansının arttığı bilinmektedir.^{20,44}

Rutinde kullanılan tam otomatize sistemler;

- ESP II (Extra Sensing Power) (Trek Diagnostics, Inc. ,Westlake, Ohio)
- MB/Bact T (OrganonTeknika, Durham, NC)
- BACTEC 9000 MB (BD Biosciences, Sparks, MD)
- BACTEC MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube, BD)

2.1.7.3.3. Fenotipik Testler

M. tuberculosis .kompleksi içinde yer alan türleri üreme hızları, koloni morfolojileri ve bazı biyokimyasal testlerle ayırt etmek mümkündür. Ancak her zaman kesin tür tanımlanması yapılamamaktadır. Ayırım için koloni morfolojileri, oksijen kullanımı, niasin birikimi, nitrat redüktaz aktivitesi, katalaz aktivitesi, üreme hızı, tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (TCH) direnci ve pirazinamidaz üretimine bakılır. 1980 lerde hücre duvarındaki mikolik asitlerin incelenmesi prensibi ile çalışan yüksek performanslı likid kromatografi ile mikobakterilerin identifikasyon metodu kullanılmaya başlanmıştır(Tablo 4).^{13,42}

Tablo 4. MTK türlerinin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri⁴⁵

Testler	<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.bovis</i>	<i>M.bovis</i> <i>BCG</i>	<i>M.africanum</i>	<i>M.microti</i>	<i>M.canettii</i>
Morfoloji	R	R	R	R	R	S
Pirazimidaz	+	-	-	+	+	+
Niasin	+	-	-	+/-	+	-
Nitrat kullanımı	+	-	-	+/-	-	+
Üreaz	+/-	-	+	+/-	+/-	+
TCH duyarlılığı	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Oksijen	Aerobik	Mikroaerofilik	Aerobik	Mikroaerofilik	Mikroaerofilik	Bilinmiyor
Piruvat kullanması	-	+	+	-	-	-

2.1.7.3.4. Moleküler Testler

TB tanısında kültür altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, tanıda oldukça yavaş bir yöntem olması nedeniyle son zamanlarda kısa sürede tanı koyma hedefine yönelik moleküler testler ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. Gerek toplum sağlığı açısından gerekse hastane enfeksiyonlarının kontrolü açısından hastalığın hızlı tanısı ve etkili sağaltımı önem taşımaktadır.

NAA temeline dayalı ve Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylanmış birçok moleküler sistem vardır. Bunlardan birisi Amplicor MTB (Roche Diagnostic Systems); Polymerase chain reaction (PCR) temeline dayanır. Bir diğeri ise Amplified *M. tuberculosis* Direct Test (AMTD) olup, GenProbe-Transcription-

Mediated-Amplification (TMA) temeline dayanır. Amplicor MTB yayma pozitif solunum yolu örneklerinde, AMTD ise yayma pozitif ve yayma negatif solunum yolu örneklerinde FDA onaylıdır. Son zamanlarda DSÖ tarafından önerilen NAA temelli, TB tanısında ve aynı zamanda ilaç direncinin hızlı tespitinde kullanılan FDA tarafından onay almış Xpert MTB/RIF Assay (Cepheid) birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle ÇİD TB enfeksiyonunun yaygın olarak görüldüğü bölgelerde bu yöntemin kullanılması ile tanı ve ilaç direncinin hızlı bir şekilde tespit edilmesi ve enfeksiyonun yayılım hızının azaltılması planlanmaktadır.⁴⁶

Bugün tüberküloz tanısında kültür altın standart olma özelliğini korumaktadır ve moleküler testlerin hiç biri kültür yöntemlerinin yerini alamamıştır. Doğrudan tanı amacı ile moleküler testleri kullanmaya karar verirken kullanıcılardan ve uygulamalardan kaynaklanan birçok problem olabileceği bilinmeli, üretici firma önerilerine kesinlikle uyulmalı, kalite kontrol standartları kesin şekilde uygulanmalı ve son derece seçici ve dikkatli olunmalıdır. Bu testlerin sonuçları mutlaka kültür, mikroskopi ve klinik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir.⁴⁷

2.1.8. Tüberküloz Tedavisi

Tüberküloz tedavisi, uzun bir süreyi kapsayan ve hasta uyumu gerektiren bir süreçtir. DSÖ'nün de önerdiği şekilde hastanın tedaviye uyumunu sağlamak ve tedaviyi sonuçlandırmak için DGİT stratejisi uygulanması şarttır. Tedavi başarısının sorumluluğu, öncelikli olarak ulusal halk sağlığı programına ya da tedaviyi sağlayan kişiye aittir. Tüberküloz tedavisi ile ilgili kişi ya da kuruluşların sorumlulukları hastalara sadece uygun bir tedavi rejimini başlamakla bitmemektedir, aynı zamanda başlanan tedaviyi başarılı bir şekilde tamamlamak ve bu süreç içinde tedavi uyumunu en yüksek düzeyde sağlamak gerekmektedir.

Tüberküloz tedavisinin amaçları:

- 1) Balgam kültürlerini en kısa sürede negatif hale getirmek ve hastalığın sağlıklı bireylere bulaşını önlemek,
- 2) Hasta bireylerde tam tedaviyi sağlamak yaşam kalitesini düzeltmek
- 3) Nüksleri önlemek
- 4) İlaç dirençli tüberküloz suşlarının ortaya çıkmasına engellemek
- 5) Hastalığa bağlı ölümleri önlemektir.

Tüberküloz tedavisinde etkin antibiyoterapi Streptomisin'in keşfi ile başlamıştır. Antitüberküloz ilaç tedavisinin kullanılması mevcut basillerinin büyük çoğunluğunun ölmesine neden olmakta ve klinikte hızlı bir düzelmeyi sağlamaktadır. Ancak tekli antibiyoterapide kullanılan ajana karşı kavernom içerisinde direnç geliştirmiş basiller bulunabilmekte ve hastalık nüks etmektedir. Bunu önlemenin yolu etkin bakterisidal aktiviteye sahip çoklu antibiyoterapi ile mümkün olmuştur.⁴⁸

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar, birinci seçenek (first line, primer, major) ve ikinci seçenek (second line, sekonder, minör) ilaçlar olarak iki grup altında incelenebilir. Birincil antitüberküloz ilaçlar izoniazid (INH), rifampisin (RIF), streptomisin (STR), etambutol (EMB) ve pirazinamid'den (PZA) oluşmaktadır. Bu ilaçların toksisiteleri düşüktür ve kombine kullanılmaları durumunda oldukça etkililerdirler. Basiller duyarlı olduğu sürece tüberküloz tedavisi bu ilaçlardan oluşan tedavi rejimleri ile yapılmalıdır. Ancak ÇİD TB vakalarında tedaviye ikinci seçenek ilaçlar eklenmektedir. İkinci seçenek ilaçlar arasında da PAS (Para-amino salisilik asit), kanamisin, amikasin, kapreomisin, ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, etiyonamid, tiyoasetazon ve sikloserin gibi ilaçlar yer almaktadır.⁴⁸

2.1.9. İlaç Direnci ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Tüberkülozun günümüzde halen global bir halk sağlığı problemi olarak önümüzde durmasının en önemli nedenlerinden birisi ilaç dirençli izolat sayısındaki artıştır. Tüberküloz basiline karşı etkinliği kanıtlanmış bir çok bakterisidal ajan olmasına rağmen monoterapilerde gelişmesi muhtemel bir mutasyona bağlı olarak enfeksiyon nüks etmektedir. Etkin bir tedavi için çoklu ajan kullanımı ve uzun süreli bir uygulama şarttır. Ancak günümüzde gerek hasta uyumsuzluğu gerekse yanlış tedavi politikaları MTK suşlarında görülen ilaç direnç seviyesini oldukça yukarılara çekmiştir. Birincil antitüberküloz (anti-TB) ilaçlardan INH ve RIF direncine ek olarak herhangi bir florokinolona ve parenteral verilen ikinci seçenek anti-TB ilaçlardan en azından birisine direnç geliştirmiş suşlarla enfekte vakalar YİD TB kabul edilmekte ve tedavisi çok zorlaşmaktadır. ÇİD TB ve YİD TB ile enfekte vakalarının gecikmeden tespiti, uygun önlemlerin alınması ve tedavinin bir an önce başlanması hastalığın yayılmasını önlemede büyük önem taşımaktadır. Moleküler tekniklerin geliştirilmesiyle MTK in

bütün genomunun analiz edilmesi, ilaç direncinin mekanizmalarının aydınlatılmasına büyük katkılar sağlamıştır.⁴⁹

2.1.9.1. İlaç Direnç Mekanizması

M. tuberculosis hücre duvar yapısının zengin mikolik asit içeriği bakteriye düşük permeabilite sağlamakta ve antibiyotik gibi birçok kemoterapötik ajana karşı doğal direnç kazandırmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda eflüks mekanizmasının da tetrasiklinler, florokinolonlar ve aminoglikozidler gibi antibiyotiklere karşı doğal dirençte önemli bir faktör olduğu gösterilmektedir.⁵⁰

Kazanılmış ilaç direnci bakterilerde genellikle plazmidler, transpozonlar veya integronlar gibi mobil genetik elementlerle horizontal gen aktarımı yolu ile oluşmaktadır. Ancak mikobakterilerde direnç gelişimi sıklıkla kromozomda oluşan spontan mutasyonların sonucu oluşmaktadır. Tedavi sürecinde dirençli suşların seleksiyonu meydana gelmekte ve enfeksiyon yeniden ortaya çıkmaktadır. ÇİD TB fenotipinde suşlarda tek bir gen mutasyonu dirence sebep olarak gösterilemese de, diğer ilaçlara karşı direnç gelişiminin başlangıcında bir ilaca karşı direnci sağlayan klasik mutasyonlar ve takip eden diğer mutasyonel değişimlerin birikimi arasındaki kompleks ilişki ÇİD TB fenotiplerine sebep olmaktadır. Prokaryotlarda her replikasyon için mutasyon gelişme oranı 0,0033 gibi düşük bir düzeydedir. Mutasyon oranı her baz çifti için genom büyüklüğü ile ters orantılıdır. Eski çalışmalar mutasyon oranının seçilen ilaca bağımlı olduğunu iddia etmiştir. Ancak ilk seçenek antitüberküloz ilaçların çoğu için, dirence sebep olan bilinen mutasyonları da karşılayacak şekilde, bir basilde spontan mutasyon görülme ihtimalleri hesaplandığında, her hücre bölünmesinde mutasyon görülme ihtimalinin 10^{-9} olduğu gösterilmiştir. İki ilaçlı bir kombinasyon tedavide bu ihtimal 10^{-18} olmaktadır. Bu hesaplama ile dirence sebep olduğu bilinen gen/genlerdeki beklenen mutasyon ihtimali dikkate alındığında, RIF için mutasyon riski $3,32 \times 10^{-9}$, INH için $2,56 \times 10^{-8}$, STR için $2,29 \times 10^{-8}$ ve EMB için $1,00 \times 10^{-7}$ 'dir. Eş zamanlı olarak RIF+INH'da dirence sebep olabilecek mutasyonların bir basilde görülme ihtimali ise $1,00 \times 10^{-14}$, INH+RIF+EMB için; $1,00 \times 10^{-20}$ ve RIF+INH+STR için; $1,00 \times 10^{-25}$ 'dir. Diğer taraftan aktif bir kavernde en çok görülebilecek bakteri sayısı 10^8 basildir. Kısacası tedavi esnasında aktif bir kavernde RIF dirençli basil gelişme ihtimali en fazla 0-1 arasındadır.^{49,51}

2.1.9.2 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı riskini ve antitüberküloz ilaçlarına karşı direnç gelişimini arttırmaktadır. CDC kültüründe MTK izole edilen her hastaya, üç aylık bir tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden veya tedaviye klinik yanıtızsızlık olan bütün hastalara direnç testi yapılmasını önermektedir. Ayrıca dirençli tüberküloza sahip bir hasta ile temas öyküsü bulunanlar, HIV ile infekte olup kaviter lezyonları olanlar, düşük sosyoekonomik şartlarda yaşayanlar, yüksek ilaç direnci bulunan (primer izoniazid direnci % 4'den fazla) bölgelerde olanlar tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir.⁵²

MTK in antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede en güvenilir ve en hızlı yöntemi bulmak amacıyla çok sayıda duyarlılık yöntemi geliştirilmiştir. İlaç duyarlılık testleri;

- 1) İlaç içeren ve içermeyen kültür ortamında üremenin makroskopik olarak izlenmesi
- 2) Metabolik aktivitenin ya da ürünlerinin ölçümü ya da ürünlerinin tespiti
- 3) Mikobakterifaj ile lizis
- 4) Moleküler tekniklerle genetik mutasyonların tespiti esaslarına dayanır.

MTK in antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla uygulanan deneylerde, direkt ve indirekt olmak üzere 2 yöntem kullanılmaktadır. Direkt yöntemde, preparatında aside dirençli bakteri görülen klinik örneklerin, mililitresindeki ortalama bakteri sayısı hesaplanarak, homojenizasyon-dekontaminasyon işlemleri sonrasında ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekimi yapılır. İndirekt yöntemde ise, klinik örneklerden saf kültür halinde aside dirençli bakteri izole edilir, uygun inokulum hazırlanarak ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekim yapılır.⁵²

2.1.9.2.1. Fenotipik Testler

a- Klasik Kültür Yöntemleri

- Orantı (proporsiyon) Yöntemi
- Mutlak Konsantrasyon Yöntemi
- Direnç Oranı Yöntemi

b- Hızlı Kültür Yöntemleri

- Radyometrik Kültür Sistemi
- Floresan Kültür Sistemi
- Kolorimetrik Kültür Sistemi
- Karbondioksit Oluşumunu Tespit Eden Sistem
- E-test

c- Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

- Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi (LRP)
- Biyoluminesans Yöntemi
- Flow Sitometri Yöntemi

Fenotipik testlerin değerlendirilmesinde iki kavram önem taşımaktadır. Bunlardan birisi olan kritik konsantrasyon; ilaçlı besiyerinde, belli bir oranda veya miktarda bakteri üremesine izin veren antibiyotik konsantrasyonunu ifade etmektedir. Diğer kavram olan kritik proporsiyon ise, kritik konsantrasyonun üremesine izin verildiği dirençli basil topluluğunun oranıdır. Yapılan klinik ve bakteriyolojik çalışmalar sonucunda antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, genel olarak % 1 düzeyi kriter alınarak ayarlanır. İlaçlı besiyerinde üreyen bakteri sayısı % 1'in altında ise bakteri o ilaca duyarlı, % 1'in üzerinde ise dirençli olarak kabul edilmektedir.

2.1.9.2.1.1. Klasik Kültür Yöntemleri**2.1.9.2.1.1.1. Orantı (Proporsiyon) Yöntemi**

Antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak % 1 düzeyi kriter alınarak ayarlanır. Direncin % 1 oranını tayin etmek için kontrol besiyerinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı besiyerindekinden 100 defa daha azdır. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu test için koagulasyondan önce ilaç eklenmiş LJ besiyeri, Middlebrook 7H10 kullanılabilir. İlaçsız kontrol besiyerinde 200-300 koloni

oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun olanıdır. Bu yoğunlukta basil içeren örneğin elde edilebilmesi için önce kültürde üretilmiş bakteriden 1,0 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanır. Hazırlanmış homojen süspansiyondan 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} veya 10^{-2} , 10^{-4} lük dilüsyonlar hazırlanmaktadır. Bu dilüsyonlardan ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaçlı besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılmış tüpler 3–4 hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Test edilen suş belli bir antibiyotiğe karşı % 1 veya daha yüksek oranda dirençli ise sonuç dirençli; % 1'in altındaki oranlarda dirençliyse sonuç duyarlı olarak yorumlanır. Oran hesaplanırken şu formül kullanılır;

$$\frac{\text{İlaçlı besiyerindeki koloni sayısı}}{\text{Kontrol besiyerindeki koloni sayısı}} \times 100 = \text{Direnç Yüzdesi}$$

Bu yöntem indirekt olarak primer kültürde üremiş bakteriden veya direkt olarak mikroskopide aside dirençli bakteri görülen hasta materyalinden yapılabilir. Uzun yıllar test edilmiş, metodolojik çalışmalar yapılmış, uluslararası komitelerce onaylanmış bir yöntemdir.⁵²

2.1.9.2.1.1.2. Mutlak Konsantrasyon Yöntemi

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, 2×10^3 - 1×10^4 cfu/ml mikobakteri içeren inokulum ekilir. İnokulum miktarı 100.000 basili geçmemelidir. İlk değerlendirme ikinci haftanın sonunda yapılır. Son değerlendirme dördüncü haftanın sonunda yapılır. İlaçlı besiyerinde 20'den fazla koloni olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Yeterli metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir. Ekim örneğinin hassas bir şekilde hazırlanması yöntemin en önemli zorluğudur.⁵²

2.1.9.2.1.1.3. Direnç Oranı Yöntemi

Bu testle farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri belirlenebilmektedir. İlaçlı besiyeri içeren tüplerin bir sırasına antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H₃₇Rv inoküle edilir. Bu yöntemde 10^5 cfu/ml'lik inokulum kullanılır. Test edilen kökenin MİK değeri, *M. tuberculosis* H₃₇Rv'nin MİK değerinden

8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Değerlendirilmesi zordur, yeterli metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir.⁵²

2.1.9.2.1.2. Hızlı Kültür Yöntemleri

2.1.9.2.1.2.1. Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460-BD)

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden geçirilen klinik örneklerden, zenginleştirilmiş 14C işaretli palmitik asit içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan şişelere (Middlebrook 7H12) ekim yapılır. Yağ asiti kullanılıncaya 14 CO₂ ortaya çıkar ve şişeler periyodik olarak BACTEC 460 cihazına yerleştirilerek 14 CO₂ tespit edilmeye çalışılır. Oluşan 14 CO₂ miktarı üreme indeksi (GI) olarak cihaz tarafından tespit edilir. GI: 500 olunca duyarlılık testi yapılır. Bir antitüberküloz ilaç besiyerine eklendiğinde organizma duyarlı ise üreme baskı altına alınır. Bu kontrole kıyasla günlük üreme indeksinde azalma veya çok küçük artış şeklinde tespit edilebilir. Organizma dirençliyse çok az veya hiç baskılanma görülmez. Direncin % 1 oranını tayin etmek için kontrol şişesinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı şişedekinden 100 defa daha azdır. DSÖ standart olarak önerdiği bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçların yanı sıra bazı sekonder antitüberküloz ilaçların duyarlılık testleri de yapılabilmektedir. Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıklarının olması dezavantajıdır. Geleneksel yöntemlerle ortalama 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktadır.⁵³

2.1.9.2.1.2.2. Floresan Kültür Sistemi (BACTEC MGIT 960-BD)

Middlebrook 7H9 içeren dip kısmı ruthenium kompleksi bulunan silikon bir tabaka ile kaplı tüpler kullanılmaktadır. Tüp içinde bulunan oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen UV ışınına karşı floresan ışımazken, oksijenin mikobakteri veya kontaminant mikroorganizmalar tarafından kullanılarak tüketilmesi ve CO₂ birikmesi sonrası tüp dibine gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresan vermektedir. Tespit edilen floresan miktarı üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir. Duyarlılık testi için ilaçsız ve ilaçlı tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme tespit edildikten

sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve tespit edilme zamanı BACTEC 460 ile aynıdır. Rayoizotop kullanılmaması avantajıdır. Sürekli monitörizasyon ile 960 tüpün aynı anda takibini sağlaması ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü daha azdır. Ancak kontaminasyon oranları yüksektir.⁵²

2.1.9.2.1.2.3. Kolorimetrik Kültür Sistemi

MB / BacT / ALERT MB.

Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur. Etambutol için duyarlılığı düşüktür.⁵²

Alamar Blue Oxidation-Reduction Indicator (Accumed)

Bakteri ilaçlı ve ilaçsız Middlebrook besiyerlerine ekilerek 10-14 gün inkübe edilir. Kontrol tüpüne Alamar mavisi eklenip, 50°C'de 2 saat bekletilir. Rengin maviden pembeye dönmesi üreme olduğunu gösterir. Üreme tespit edilmişse aynı işlem ilaçlı tüplere uygulanır. Pembeye dönmenin görüldüğü tüplerde üreme olduğu, o tüplerdeki ilaçlara karşı bakterinin dirençli olduğu tespit edilir. Üremenin ne zaman olacağı tam olarak tahmin edilemediğinden birden fazla kontrol tüpü hazırlanması ve belli aralıklarla bu tüplerde üreme araştırılması gerekmektedir.⁵³

2.1.9.2.1.2.4. Karbondioksit Oluşumunu Tespit Eden Sistem; ESP Culture System II (Accumed)

Modifiye Middlebrook 7H9 sıvıbesiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçlar test edilebilmektedir.⁵²

2.1.9.2.1.2.5. E Test (AB BIODISK)

Primer antitüberküloz ilaçlara karşı MİK değerlerini belirlemek için kolay bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkatli olunması gerekmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada E test ile 7H11 agar proporsiyon metodu arasında uyum isoniazid, rifampisin, streptomisin, etambutol için sırasıyla % 83,1, % 78,8, % 84,7, % 80,5 olarak tespit edilmiş olup sonuçlandırma süresi E test için 7 gün, agar proporsiyon için 21 gün olarak bulunmuştur.⁵²

2.1.9.2.1.3. Bakteri Varlığına Dayanan Yöntemler

2.1.9.2.1.3.1. Lusiferaz Taşıyıcı Faj Yöntemi

Bu yöntemde, ateş böceğinin lusiferaz genini taşıyan bir mikobakteri fajı kullanılmaktadır. Bilindiği gibi, fajlar kendilerine özgü canlı bakterileri enfekte ederler. Lusiferaz geni taşıyan bir faj ile enfekte olan mikobakterilerde lusiferaz geninin transkripsiyonu ve faj çoğalması ile bol miktarda lusiferaz eksprese edilir. Ortama lusiferaz enziminin substratı olan lusiferin eklendiğinde, mikobakteri hücre duvar ve membranını hızla geçen lusiferin, adenozin trifosfat (ATP) varlığında lusiferazın katalize ettiği bir kimyasal reaksiyon sonucunda oksilusifenine dönüşür ve ışık oluşur. Oluşan ışık bir luminometre veya fotometre ile ölçülebilir. Oluşan ışığın miktarı faj enfeksiyonu ve hücre ATP miktarına yani ortamdaki canlı mikobakteri sayısına bağlıdır. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı bakteriler ışık oluşturmaz iken, dirençli olanlar ışık oluşturmaya devam eder.⁵³

2.1.9.2.1.3.2. Biyoluminesans Yöntemi

Yaşayan tüm canlılarda ATP varlığına dayanan bir yöntem olup bakteriyel kültürlerden ATP ekstraksiyonu ve ölçülmesi ile yapılır. Uygun konsantrasyonlarda McFarland 0,5'e göre bulanıklığı ayarlanmış süspansiyondan ilaçlı tüplere eklenir. İlaç içermeyen kontrol tüpleri ile birlikte 35°C'de 10 gün enkübe edilir. Daha sonra bu kültürlerden alınan bir miktar sıvı, 0,1 µl Tris tamponu ve EDTA içeren cam tüplerde beş dakika kaynatılarak hücreler parçalanır, oda ısısında soğutulur ve üzerine ATP monitorize edici madde eklenerek ışık üretimi yönünden luminometre ile incelenir. Oluşan ışık miktarı, hücre ATP ile doğru orantılıdır. Ortamda ne kadar çok canlı

hücre varsa ışık üretimi o kadar fazladır. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı olanlar ışık üretimi yapamaz. ATP aktivitesinin kontrol kökenine göre % 40 veya daha altına inmesi, o ilaca karşı duyarlılığı gösterir. Sonuçlar ortalama bir haftada alınır.⁵³

2.1.9.2.1.3.3. Flow Sitometri Yöntemi

Flow sitometri, bir sıvı akımı içinde tek tek geçmekte olan hücreler veya biyolojik partiküllerin, fizik ve kimyasal özelliklerini sensörler aracılığı ile ölçebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, *M. tuberculosis*'in floresein diasetat'ı hidrolize etmesi ve oluşan floresans veren mikobakterilerin flow sitometrik analiz ile tespiti esastır. Çeşitli konsantrasyonlarda antitüberküloz ilaç içeren ve kontrol olarak ilaç içermeyen Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde 24-48 saat enkübe edilen bakteri kültürüne floresein diasetat eklenir ve canlı mikobakterilerin floresein diasetatı hidrolize etmesi sonucu oluşan floresan mikobakteriler flow sitometri ile tespit edilir. Antimikobakteriyel ajanlara duyarlı mikobakteriler floresein diasetatı daha az hidrolize eder. Bakteri üremesi gerekmediği için 24 saat gibi kısa sürede sonuç alınır.

2.1.9.2.2. Moleküler Yöntemler

M. tuberculosis' de ilaçlara karşı direnci tespit etmede kullanılan konvansiyonel tekniklere ek olarak ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla hızlı sonuç verebilen moleküler yöntemler de geliştirilmiştir. DNA dizi analizi, , PCR SSCP, Heterodupleks analiz, *Microarray* analiz ve Real-time PCR gibi yöntemler en yaygın kullanılanlar arasındadır. Minimal bakteriyel üreme gerektirmesi birkaç saat içerisinde sonuç verebilmesi moleküler yöntemlerin avantajlarındanır. Dirence yol açmayan sessiz mutasyonların da tespit edilmesi yanlış sonuçlara neden olabileceği için dezavantajları arasında kabul edilebilir.⁵⁴

2.1.9.2.2.1. DNA Dizi Analizi

Mikroorganizmaların genom dizilimlerinin ortaya çıkarılması ve ilaç direncine sebep olan mutasyonların tespit edilmesi için en güvenilir yöntem olan DNA dizi analizi, CLSI tarafından altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde en yaygın olarak, Sanger'ın geliştirdiği zincir sonlandırma yöntemi kullanılmaktadır. Bu

yöntemde, DNA polimerazlar deoksi nükleotid trifosfatlara (dNTP) ek olarak, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubuna sahip olmayan işaretli dideoksi nükleotid trifosfatları (ddNTP) kullanır. Sentezlenen DNA zincirine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde reaksiyon durmakta ve zincir, eklenen işaretli nükleotid ile sonlanmaktadır. Manuel olarak yapılan DNA dizi analizinde reaksiyon tüplerinde oluşan farklı DNA parçaları, poliakrilamit jelde görüntülenebilmektedir. Bu sistemde DNA parçalarının görünür hale getirilmesi için primerler radyoaktif madde ile işaretlenebilir veya ortama, senteze katılan radyoaktif bir nükleotid eklenebilir. Otomatik olarak yapılan DNA dizi analizinde ise, reaksiyonun başlangıcında floresans veren madde ile işaretli ddNTP kullanılarak, baz dizilimi görünebilir hale getirilmektedir. Mutasyon tespitinde kullanılması en çok önerilen yöntem olmasına rağmen, pahalı olması ve teknik donanım gerektirmesi nedeniyle rutin kullanımı sınırlıdır.^{55,56,57}

2.1.9.2.2.2. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (PCR SSCP)

Yaklaşık 200 nükleotidlik bir DNA parçasındaki tek nükleotid değişikliğini %90 oranında tespit edebilen bu yöntemde, mutasyonların bulunduğu varsayılan bölge PCR ile çoğaltıldıktan sonra, ısı ile denatüre edilir. Denatürasyondan sonra, tek zincirli DNA molekülleri kendine özgül ikincil yapılarına göre şekil alırlar ve ayrıştırılmak üzere akrilamit jele yüklenirler. Tek bir nükleotid değişikliği bile bu özgül yapıyı etkilediği için, elektroforetik harekette fark yaratır. Jelde mutasyonun bulunduğu DNA zincirleri, kontrole göre farklı pozisyonunda bulunan DNA bölgeleridir. DNA dizi analizine göre daha az zahmetli olan bu sistemde otomatize cihazların geliştirilmesi sonucu erken zamanda direnci tespit edebilmektedir.^{55,58,59}

2.1.9.2.2.3. Heterodupleks analizi

Heterodupleks analizi yöntemi, kontrol bir DNA ile karşılaştırma yolu ile bir gende mutasyon olup olmadığının gösterilmesini amaçlayan hızlı bir moleküler yöntemdir. Bu amaçla önce mutasyonların görüldüğü gen bölgesi, ilaca duyarlı bir kontrol bakteri ve ilaç direnci araştırılan hasta suşundan, PCR ile ayrı ayrı çoğaltılır. Elde edilen ürünlerden bir kısmı yeni bir tüpte karıştırılır. Bu tüp 95°C'ye kadar ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Sonra tüp yavaş yavaş

soğutulduğunda DNA zincirleri kendilerine uygunluk gösteren dizileri tanıyarak yeniden bir araya gelir. Eğer araştırılan DNA, kontrol DNA'ya tam uygunluk gösteriyorsa, iki zincir arasında tam düzgün bir birleşme meydana gelir ve homodupleksler oluşur. Araştırılan DNA'da mutasyon varsa, bu noktadaki uygunsuzluğa bağlı zincirlerde tam bir birleşme olmaz ve heterodupleksler oluşarak bu bölgenin üç boyutlu yapısında farklılık ortaya çıkar. Bu DNA parçaları elektroforez ile ayrıştırıldığında tam uyumluluk gösteren zincirlerden farklı hızda yürürler. Böylece farklı bir band olarak görünerek, mutasyon varlığının tespit edilmesini sağlarlar. Heterodupleks yöntemi, radyoaktif olmaması ve 24 saatte sonuç alınabilmesinin yanında, uygulanması DNA dizi analizinden daha kolay olması gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanında özel ve pahalı bir mutasyon tespit etme jeli gerektirmesinden ötürü rutin kullanımda tercih edilmemektedir.^{55,60}

2.1.9.2.2.4. Microarray analiz

'Gen çipleri' olarak da ifade edilen '*microarray*' ler, araştırmalar için geniş çaplı olarak kullanılmaktadırlar. Mikobakterilerin tanımlanması ve direncin genetik olarak tespit edilmesinde uygulama alanları mevcuttur. *Microarray* yöntemleri umut vaat eden yöntemler olmasına rağmen, pahalı sistemler olması nedeniyle sadece araştırma alanlarında kullanılmaktadır ve rutin kullanıma henüz girmemiştir.⁶¹

2.1.9.2.2.5. Gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR)

M. tuberculosis'in elektroforez aşamasına gerek kalmadan PCR ile eş zamanlı tespit edilmesine yarayan real-time PCR yöntemi aynı zamanda mutasyon ve buna bağlı olarak ilaç direncinin tespit edilmesinde de kullanılabilir. İlaç direncinin real-time PCR ile tespiti, dirence sıklıkla neden olan mutasyonların bakteri genomunun belirli yerlerinde kümelenmesi durumunda faydalı olmaktadır. Böyle durumlarda mutasyon bölgelerini kapsayacak şekilde tasarlanmış problarla mutasyonun ve dolayısıyla ilgili ilaca karşı direncin tespit edilebilmesi mümkün olmaktadır. Mutasyon saptanması için kullanılan problardan bir tanesi mutasyon aranan bölgeye, diğeri ise bu bölgenin hemen yakınındaki bölgeye komplementer olarak hazırlanmaktadır. Mutasyon bölgesine bağlanan ve alıcı boya molekülü ile işaretli proba "tespit probu", tespit probunun yakınına bağlanan ve verici boya molekülü ile işaretlenmiş proba ise

“bağlantı probu” adı verilir. Aralarında 1-5 nükleotid uzaklık olacak şekilde yerleşen problemler, DNA zincirine bağlandıklarında, alıcı ve verici boya molekülleri yanyana gelir. DNA çoğaltılmasını takiben, tüpler 95°C’ye kadar ısıtılır ve iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması sağlanır. Daha sonra tüpler 55°C’ye kadar hızla soğutulur, uygun sıcaklıkta problemlerin hedef DNA dizisine bağlanmalarına olanak sağlanır. Problemler ve hedef DNA bölgesi arasında % 100 uyum varsa, probun bağlanması düzgün olacaktır; eğer mutasyon varsa, eşleşme bozuklukları ortaya çıkacaktır. Tüpler yavaş yavaş 55°C’den 95°C’ye ısıtılır ve tespit probunun belirli bir sıcaklıkta bağlandığı bölgeden ayrılması beklenir. Floresansın en hızla düştüğü bu ayrılma sıcaklığı, erime sıcaklığı tepe (EST) değerini vermektedir. Mutasyon olması durumunda eşleşme bozukluklarından ötürü prob daha erken ayrılmaktadır. Bundan dolayı EST değeri mutasyon varlığında ve yokluğunda farklı paternler göstermektedir. Test sonucunda duyarlı suşlar ile dirençli mutant suşların erime sıcaklığı tepe değerleri karşılaştırılarak, test edilen izolatların ilgili ilaca karşı duyarlı veya dirençli olduğu söylenebilmektedir.^{56,61,62}

2.2. Moksifloksasin

2.2.1. Moksifloksasinin Tarihçesi

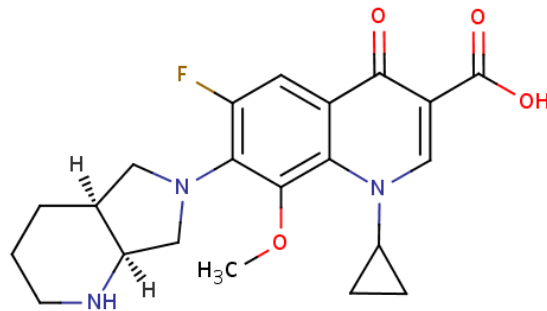
Moksifloksasin kinolon grubu bir antibiyotiktir. Bir Amerikan ilaç şirketi olan Bayer tarafından üretilmiş sentetik dördüncü kuşak florokinolondur. Lesher ve arkadaşları tarafından 1962 yılında antimalaryal bir ilaç olan klorokin sentezi sırasında tesadüfen keşfedilen nalidiksik asitle başlayan kinolonların tarihi bugün çok sayıda ve yaygın kullanılan üyelerin geliştirilmesiyle geniş bir aileye dönüşerek devam etmektedir.

İlk bulunan üyelerin etki spektrumu kısıtlı ve farmakodinamik-farmakokinetik özellikleri de iyi olmadığından günümüzde kullanımları söz konusu değildir. Geniş etki spektrumlu ve yaygın kullanım alanına sahip, aynı zamanda iyi farmakokinetik özellikleri olan kinolonlar 1980’ den sonra kullanıma girmeye başlamışlardır. Molekülün C6 pozisyonuna bir flor eklenmesiyle elde edilen yeni moleküller florokinolon olarak adlandırılmış ve ikinci kuşak kinolonlar olarak sınıflandırılmıştır. Bu değişiklik grup üyelerine daha iyi bir gram negatif etkinlik ve ilave olarak gram

pozitif etkinlik kazandırmıştır. Norfloksasin (1986) bu grubun ilk üyesi olup bunu siprofloksasin (1987) ve ofloksasin (1988) izlemiştir. Siprofloksasin güçlü antipsödomonal etkiye de sahip olup, daha sonra sentezlenen moleküller dahil en güçlü antipsödomonal kinolon olma özelliğini sürdürmektedir. 1990'lı yıllar ise üçüncü kuşak kinolonların geliştirildiği yıllar olmuştur. Üçüncü kuşak kinolonların etki spektrumu özellikle pnömokoklara karşı olmak üzere artmış gram pozitif etkinlik ve anaeroplara karşı orta derecede etkinlik olarak özetlenebilir. Son olarak 2000 li yıllarda dördüncü kuşak florokinolonların geliştirilmiştir. Ancak yan etkileri nedeniyle günümüzde sadece moksifloksasin ve gemifloksasin kullanılmaktadır. Moksifloksasin ülkemizde 2002 yılında kullanıma girmiştir.⁶³

2.2.2. Moksifloksasinin Yapısı Etki Mekanizması

Dördüncü kuşak bir florokinolon olan moksifloksasinde, 1. pozisyonda siklopropil grubu, 7. pozisyonda bir çift halka yapısı ve 8. pozisyonda bir metoksi grubu vardır (Şekil 4). Yapı ve aktivite ilişkisi incelendiğinde, 1. pozisyonda siklopropile sahip bileşiklerde 8. pozisyondaki en uygun yapının metoksi grubu olduğu görülmüştür. Bu metoksi grubunun antibiyotiğin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir.⁶⁴



Şekil 4. Moksifloksasinin molekül yapısı

Kinolonlar DNA sentezini direkt olarak inhibe eden tek antimikrobiyal gruptur; etkileri bakterisidaldir. Bakteri hücreesindeki temel hedefleri DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV enzimleridir. Etkilerini bu enzimleri inhibe ederek ve DNA enzim komplekslerindeki DNA'nın ayrılmasını hızlandırarak gösterirler.

DNA giraz enzimi, kinolonların hedefi olarak tanımlanan ilk enzimdir. Bu enzim, *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan ikişer adet alt birimden oluşan *gyrA* ve *gyrB* proteinlerinden meydana gelen bir tetramerdir. Kinolonlar A ünitesinin amino terminaline bağlanır. Topoizomeraz IV, *parC* ve *parE* genlerince kodlanan, *parC* ve *parE* olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır (Tablo 5). Yapısal olarak DNA giraz ile benzer olan Topoizomeraz IV'te *parC*, *gyrA*'nın, *parE* ise *gyrB*'nin homologudur. Topoizomeraz IV, yavru DNA molekülleri arasındaki bağlantıyı ayırarak DNA replikasyonunda rol oynar. DNA giraz'ın görevi olan; DNA içine negatif süperkırımları katabilme yeteneği bulunmamaktadır. Kinolonlar, enzim-DNA komplekslerini, DNA'nın kırılmasını takiben stabilize ederek görev yaparlar. Bu kompleks, hücrenin onarmayı başaramayacağı şekilde bir DNA kırılmasını çoğaltarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Kinolonlar, DNA giraz'a tek başına bağlanmaktansa DNA ve DNA-giraz kompleksine bağlanmaktadırlar *M. tuberculosis*'de topoizomeraz IV bulunmadığı için kinolonların buradaki tek hedefi DNA girazdır.⁶⁵

Bazı koşullar altında bakterideki DNA replikasyonunun kinolon tarafından inhibisyonu, bakterinin ölmesinden ayrı düşünülebilir. Bakterinin ölmesi için Topoizomeraz-DNA kompleksi ile kinolon etkileşimine ek olarak başka olayların da olduğu akla gelmektedir. Özellikle RNA ve protein sentez inhibitörleri, bazı kinolonların bakteriyel DNA sentezini inhibe etmelerine yönelik olan yeteneklerini etkilememektedirler. Bakteriyel DNA sentezinin inhibisyonu tek başına bakterileri öldürmek için yeterli bir sebep olarak görünmemektedir. Kinolonları neden olduğu bakteriyel DNA hasarının onarımında rol alan *recA* gibi gen ürünleri, öldürmeye katkıda bulunmaktadır. Çünkü eksik görev yapan *rec* mutantlarının, kinolonlara aşırı duyarlı olduğu görülmüştür. Ampisilin grubu antibiyotiklere karşı duvar yapısındaki değişiklikten dolayı öldürülmesi azalan *hipA* mutantlarının, kinolonlarca da daha az öldürüldüğü görülmüştür. Benzer durum *hipQ* mutantlarında da izlenmiştir. Bu gen ürünlerinin görevleri bilinmemektedir, beta laktam ve kinolon grubu antibiyotiklerin

hedefleriyle ayrı ayrı etkileşimlerinden sonra bakterilerin ölümü için gerekli olan ve birbiriyle örtüşen ortak yolların olabileceği fikrini akla getirmektedirler.^{65,64}

Tablo 5. Tip II Bakteriyel Topoizomerazlar

Enzim	Enzim alt ünitesi	Gen
DNA gyrase	<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i>
	<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i>
Topoizomeraz IV	<i>parC</i>	<i>parC</i>
	<i>parE</i>	<i>parE</i>

2.2.3. Moksifloksasin ve Tüberküloz

Moksifloksasin spesifik bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılmak üzere ilk kez 1999 yılında FDA tarafından onay almıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda moksifloksasinin bakterisidal özelliğinin sparfloksasin, levofloksasin ve ofloksasine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, 10-13 saatlik uzun bir yarı ömrünün olması, moksifloksasinin sadece ÇİD TB olgularının tedavisinde değil, aynı zamanda duyarlı izolatlara bağlı ortaya çıkan olguların tedavisinde birincil ilaç olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir. Yapılan birçok çalışmada en güçlü bakterisidal aktivitenin özellikle yeni kuşak florokinolonlarda olduğu gösterilmiştir. Diğer bir deyişle sparfloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasin gibi diğer florokinolonlar, TB tedavisinde siprofloksasine göre daha etkilidirler.^{64,66}

2.2.4. Kinolon Direnci

Florokinolonların *in vivo* ve *in vitro* koşullarda *M. tuberculosis*'e karşı etkinliği mevcuttur. İlaç direnci olan tüberküloz vakalarında ve ilaç intoleransı durumlarında başlangıç tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak florokinolon grubu antibiyotik kullanımının yaygınlığı ve verilen kısa süreli tedaviler *M. tuberculosis* suşlarında ilaç direncinin oluşması sonucunu doğurmuştur. Son zamanda yapılan çalışmalarda florokinolon direncinin çoğunlukla *gyrA* bölgesindeki meydana gelen mutasyonlar

sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Fenotipik olarak kinolon grubu antibiyotiklere dirençli olduğu bilinen *M. tuberculosis* izolatlarının % 42-85’inde *gyrA*’nın QRDR bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir. Bunun yanında az da olsa *gyrB* geninde de mutasyonlar tespit edilmiştir.^{64,66,67}

Bu durumda direnç için farklı mekanizmaların da sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu olasılıklar arasında, *gyrA* ve *gyrB*’de QRDR bölgesi dışında herhangi bir yerde meydana gelen bir mutasyon olabileceği gibi, ilaca karşı hücre duvarı geçirgenliğinde azalma veya eflüks pompası gibi, ilacın hücre içinde birikiminin engellenmesine yönelik olan mutasyonlar da olabilir. *M. tuberculosis*’deki kinolon direncine ilişkin bugüne kadar yapılan çalışmalarda dirence sebep olan mutasyonların yerleri tespit edilmiştir. Buna göre řu ana kadar en sık tespit edilen mutasyonlar *gyrA* genindeki 94., 91., 90. ve 88. kodonlar olup, bunların yanında daha nadir de olsa, 80., 83., 84., 87. ve 89. kodonlarda da mutasyonlar gösterilmiştir. *gyrB* genindeki kinolon direncini belirlemeye yönelik yapılan bazı çalışmalarda ise 495., 510. ve 538. kodonlarda mutasyonlar tespit edilmiştir.^{68,69}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tüberküloz Suşlarının Seçilmesi

Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi - Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarına gönderilen örneklerden LJ ve MGIT besiyerinde üretilmiş ve birincil ilaçlara duyarlılıkları belirlenmiş MTK suşları çalışma için seçilmiştir. Toplamda 137 izolat iki grup halinde çalışmaya dâhil edilmiştir. Birinci grup Eylül-Ekim-Kasım 2013 tarihlerinde izole edilen ÇİD TB olmayan sıralı 100 MTK izolatu, ikinci grup ise Ocak 2012–Aralık 2013 de izole edilen ÇİD-TB tespit edilen 37 MTK izolatu olarak belirlenmiştir.

3.2. Seçilen İzolatların Pasajlanması

Stok besiyerindeki (LJ ya da MGIT 7H9) *M. tuberculosis* izolatları Löwenstein-Jensen besiyerine pasajlandıktan sonra, 37°C’ de 4-6 hafta inkübe edilerek üretildi. İlk ekimden sonra haftada bir kere mikobakteriyel üreme açısından kontrol edildi. Yeterli üreme gözlenen izolatların inkübasyonları sonlandırılarak 4°C de muhafaza edildi.

3.3. İzolatların Moksifloksasin Duyarlılıklarının LJ Proporsiyon Yöntemi ile Belirlenmesi

3.3.1. İlaç Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmada kullanılan moksifloksasin(Sigma) antibiyotiğinin potensine göre aşağıdaki formül kullanılarak 10.000 µg/mL stok solüsyonu hazırlandı ve -70 °C de muhafaza edildi. Çözücü olarak 0,1N NaOH çözeltisi kullanıldı. Besiyerine koymak için hazırlanan sonraki solüsyonlar steril deiyonize su ile dilüe edildi.

$$\frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon}(\mu\text{g/ml})}{\text{Potens}(\mu\text{g/mg})} = \text{Ağırlık (mg)}$$

3.3.2. Uygulanacak İlaç Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

LJ proporsiyon yönteminde çalışılacak ilaç konsantrasyonlarının belirlenmesi için referans suş dahil 10 izolat seçildi. İzolatların hem LJ hem de MGIT960 besiyerinde farklı konsantrasyonlarda moksifloksasin duyarlılıklarına bakıldı ve MİK değerleri belirlendi. Tüm örnekler için LJ proporsiyon yönteminde uygulanacak konsantrasyonlar literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılarak 0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16 µg/mL olarak belirlendi.

3.3.3. İlaçlı ve İlaçsız LJ Besiyerlerinin Hazırlanması

1. 2,4 gr Monopotasyum fosfat (KH₂PO₄)
0,24 gr Magnezyum sülfat
0,6 gr Magnezyum sitrat
3,6 gr L-Asparajin tuzları tartıldı.
2. Tuzlar steril bir erlenmayer içerisine konuldu ve üzerine 600 ml distile su ilave edildi.
3. Tuzların çözülmesi ve sterilizasyon için 121°C'de 15 dk otoklavda bekletildi daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
4. Taze, iri boy 25 adet yumurtanın dış kabuğu iyice fırçalanarak temizlendi.
5. Yumurtaların dış yüzeyi % 70 lik alkol içerisinde 1 saat bekletilerek steril edildi.
6. Yumurtalar steril bir balona tek tek kırıldı ve homojen hale gelinceye kadar çalkalandı.
7. Daha önceden hazırlanmış tuz karışımına 12 ml steril gliserol ilave edildi.
8. Hazırlanmış olan solüsyona % 2'lik malaşit yeşilinden 20 ml ilave edildi.
9. Önceden hazırlanmış olan yumurta sıvısı steril bir spançdan geçirilerek filtre edildi ve hazırlanmış olan solüsyona 1000 ml ilave edildi ve çalkalanarak karıştırıldı.
10. Hazırlanan karışımın besiyerinin pH değeri 6,8-7 civarında olmasına dikkat edildi.
11. Hazırlanan karışımın yeterli miktardaki kısmı kontrol besiyeri olarak kullanılmak üzere ilaçsız olarak steril tüplere 6'şar ml döküldü.

12. Kalan besiyeri son konsantrasyonları 0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16 µg/mL olacak şekilde 8 farklı steril şişeye belli miktarlarda bölünerek üzerlerine belirlenen miktarlarda ilaç solüsyonu ilave edildi.
13. Üzeri etiketlenmiş tüplere 6'şar ml olacak şekilde döküldü.
14. Bu tüplerin hepsi yatık bir şekilde koagülatöre konuldu. 85°C' de 2 saat koagüle edildi.
15. 18-24 saat 37°C' de sterilit kontrolü yapıldıktan sonra ekim yayıncaya kadar 2-8°C' de buzdolabında saklandı

3.3.4. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması ve Ekim

LJ stok besiyerinde üretilmiş olan bakterilerden, öze ile birkaç koloni alınarak, içinde 3 ml steril distile su bulunan steril tüpe aktarıldı ve koloninin homojenize olarak şekilde dağılması sağlandı. Daha sonra bu tüpten 10⁻² ve 10⁻⁴ lik steril su içerisinde dilüe edilmiş bakteri süspansiyonları hazırlandı. 10⁻² lik süspansiyondan ilaçlı besiyerlerine ve 1. kontrol besiyerine, 10⁻⁴ lük süspansiyondan da 2. kontrol besiyerine 0,3 mL eklendi. Bu işlem her örnek için ayrı ayrı uygulandı ve kontrol olarak H₃₇RV suşu kullanıldı. Ekim yapılan besiyerleri güneş ışığı ve formaldehit gibi gazlardan korunarak 37°C' lik etüvde 3-4 hafta bekletildi ve bu süre boyunca besiyerlerinin durumu 2-3 günlük aralıklarla kontrol edildi. İlk hafta yapılan kontrollerde herhangi bir kontaminasyon olup olmadığına bakıldı. İkinci haftadan sonra kontrol tüpünde yeterli üreme olan örneklerde değerlendirme yapıldı.

3.3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

LJ proporsiyon yönteminde 3-4 haftalık inkübasyondan sonra kontrol besiyerinde yeterli üremenin gözlenmesinin ardından yapılan değerlendirmede, MİK değeri, 1. kontrol besiyerine göre bakteriyel üremenin % 99'undan fazlasını inhibe eden veya 2. kontrol besiyerinden daha az üremeye neden olan en düşük ilaç konsantrasyonu olarak belirlendi. Oran hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\frac{\text{İlaçlı besiyerindeki koloni sayısı}}{\text{Kontrol besiyerindeki koloni sayısı}} \times 100 = \text{Direnç Yüzdesi}$$

3.4. Moleküler Yöntemler

3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

1. LJ stok besiyerinde üretilmiş olan bakterilerden bir öze dolusu alınıp 0,5 mL 1xTE buffer içeren 1,5ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve süspanse edildi.
2. 80°C' de 30 dk inkübe edilerek bakteriler inaktive edildi.
3. 15000 x g (12700 rpm)' de 15 dk santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı.
4. 0,5 mL 1xTE buffer ilave edildi.
5. 15000 x g' de 15 dk santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı.
6. 0,25 mL 1xTE buffer ilave edildi.
7. Tüpe 50–100 µl cam boncuk (SIGMA acid washed glass beads) ilave edildi.
8. 2 dk MICKLE (Mickle tissue disintegrator) cihazında mekanik hücre parçalama işlemine tabi tutuldu.
9. 15000 x g' de 10 dk santrifüj edildi ve üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
10. -20°C de saklandı.

3.4.2. .PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Primerler

gyrAF (5'- AGACACGACGTTGCCGCCTG-3')

gyrAR (5'- CTGACCCGTTGGCCAGCAGG-3')

gyrA QRDR bölgesini içeren 530 bp lik bölgenin amplifikasyonu için primerler sentezletildi.

6 µL	dH2O
12,5 µL	2x PCR Master Mix (Thermo Scientific)
1 µL	DMSO (Dimethyl Sulfoxide)
0,25 µL	gyrAF (25 pmol/µL)
0,25 µL	gyrAR (25 pmol/µL)
5 µL	DNA

PCR reaksiyon karışımı mikobakteri DNA'sı içermeyen temiz bir odada hazırlandı ve reaksiyon tüpleri Termal Cycler Cihazına (Applied Biosystem AB) yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırıldı;

95°C	5 dk.		
94°C	30 sn.	}	40 döngü
56°C	45 sn.		
72°C	1 dk.		
72°C	10 dk.		
4 °C	∞		

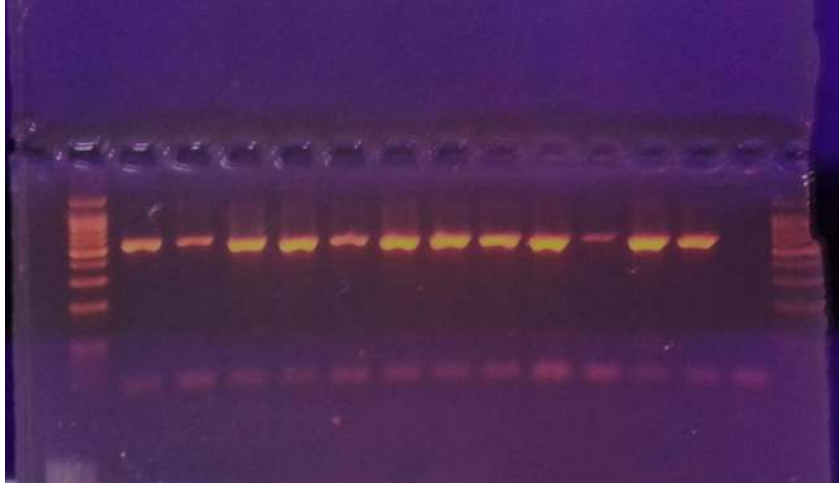
3.4.3. PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforez İle Gösterilmesi

a-Agaroz Jel Hazırlanışı

1. 200 mL 1xTBE' ye 4 gr *ultrapure agarose* (Sigma) eklenerek mikrodalga fırında içinde tanecik görülmeyecek şekilde kaynatıldı.
2. İçine 10 µl etidyum bromür eklendi ve karıştırıldı.
3. Karışım taraklar yerleştirilmiş tankın içine döküldü.

b-PCR ürününün jele yüklenmesi

1. Oda ısısında katılaştıran jelden tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve içerisinde 1xTBE tamponu olan tank içerisine yerleştirildi
2. Jel üzerindeki kuyulara 5µl örnek ile 1µl loading buffer karıştırılarak yükleme yapıldı. İlk ve son kuyuya marker yüklendi(GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus).
3. Tank güç kaynağına (BioRad) bağlandı. 120 volt akımda 1 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi.
4. Daha sonra jel ultraviyole ışık altında incelendi.
5. Yaklaşık 500-600 bp aralığında bant oluşturan örnekler pozitif olarak kabul edildi ve dizi analizi işlemine alındı (Şekil 5).



Şekil 5. PCR ürününün agaroz jelde UV ışıktaki incelenmesi

3.4.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi analizinden önce ortamdan reaksiyonu etkileyecek olan nükleotid, primer ve diğer kimyasalların uzaklaştırılması amacı ile PCR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi “SentroPure® PCR ürünü saflaştırma ve jelden DNA ekstraksiyon kiti (SENTROMER®)” kullanılarak protokole önerildiği şekilde yapıldı.

1. Steril 1,5 ml tüp içerisine, her 1µl PCR ürünü için 4 µl SG solüsyonu (DNA immobilizasyonunu sağlar, pH 6,6) eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
2. Karışım SentroSpin koluna kolonuna aktarıldı, 13000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
3. SentroSpin kolonuna 500µl solüsyon SW (DNA’nın arınmasını sağlar, pH 7,5) eklendi, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü. İşlem bir kez daha tekrarlandı.
4. SentroSpin kolon 1 dakika boş olarak santrifüj edildi ve kalan etanol uzaklaştırıldı.
5. SentroSpin kolonu 1,5 ml’lik temiz mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek başlangıç PCR ürünü miktarı kadar solüsyon SE (DNA’nın toplanmasını sağlar, pH 8,5) kolonun tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA toplandı.

Bu saflaştırılmış DNA örnekleri dizi analizi için kullanılabilecek kadar -20°C’ de saklandı.

3.4.5. Dizi Analizi

M. tuberculosis in DNA giraz geninin içinde QRDR bölgesini de içeren 530 bp lik parçasının dizi analizi *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* cihazı kullanılarak tüm örnekler için yapıldı. Referans olarak H₃₇RV suşu kullanıldı.

Bu cihaz, F. Sanger tarafından geliştirilen “dideoksi zincir sonlandırma yöntemi” prensibine dayanmaktadır ve gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Bu yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP’lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3’ pozisyonunda OH grubu yerine H atomu taşıyan ddNTP’leri (dideoksiribonükleozit trifosfat) de substrat olarak kullanmasına bağlıdır. Floresan boyalı olan ddNTP’ler zincir uzamasının durmasına ve son nükleotidi işaretli olan her uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına neden olurlar. Oluşan ürünler kapiller elektroforezde yürütülürken sonlanan her dizide bulunan ddNTP’ler bir lazer sistemi ile uyarılarak yaydığı farklı dalga boyundaki floresanlar CCD kamera ile kaydedilir. Veriler bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrilir.



Şekil 6. *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* cihazı

İlk olarak saf haldeki PCR ürünlerine Cycle Sequencing uygulaması yapıldı. Bu aşamada forward primerler kullanılarak hem dNTP hem de ddNTP içeren reaksiyon karışımı ile tek zincirli amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. İşlem BigDye®

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol olarak da PGEM DNA ve M13 primerleri kullanıldı

.Her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Ready Reaxion Mix (RR-100) 5x	4µl
Sequencing Buffer 5x	4µl
gyrA-F	4µl
dH ₂ O	4µl
Saf PCR ürünü	4µl
Toplam	20µl

Cycle sekans için hazırlanan örnekler için termal cycle cihazında aşağıdaki ısı döngüleri ayarlandı.

96°C	10 sn	} 25 döngü
50°C	5 sn	
60°C	4 dk	
4°C	∞	

Cycle Sequencing ürünleri, sekans cihazına yüklenmeden önce tekrar saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research) protokolünde önerildiği şekilde kullanıldı.

1. 5-20 µl cycle sekans ürününe 240 µl “Sequencing Binding Buffer” eklendi.
2. Karışım Zymo-Spin™ IB kolona aktarıldı.
3. 13,000 rpm (15,000-16,000 x g) de 30 saniye santrifüj edildi.
4. Spin kolona 300 µl “Sequencing Wash Buffer” eklendi ve 13,000 rpm (15,000 - 16,000 x g) de 30 saniye santrifüj edildi.
5. DNA’ yı toplamak için kolona, 20 µl % 20’lik formamid eklendi ve kolon 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 13,000 rpm (15,000 - 16,000 x g) de 15 saniye santrifüj edildi.

Elde edilen saf *cycle sequencing* ürünü sekans cihazına yüklendi ve cihaz kullanım prosedürlerine uygun bir şekilde çalışıldı (Şekil 6). Elde edilen sonuçlar *Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems)* programında analiz edildi.

4. BULGULAR

Moksifloksasin direncinin tespitinde fenotipik yöntemlerin önemi ve direncin moleküler mekanizmalarının belirlenmesi amacı ile planlanan çalışmada 100'ü ÇİD görülmeyen 37'sinde de ÇİD tespit edilen toplamda 137 *M. tuberculosis* izolatu analiz edilmiştir. Fenotipik olarak direncin değerlendirilmesinde agar proporsiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için referans suş dahil 10 izolatu içeren ön çalışmada izolatların çoğunluğunun LJ besiyerindeki moksifloksasin MİK değerinin MGIT960 besiyerindeki elde edilen MİK değerinden 4 kat fazla olduğu bulunmuştur. Literatürdeki benzer çalışmalarda elde edilen veriler ve DSÖ'nün MGIT960 sisteminde moksifloksasin için önerdiği kritik konsantrasyon değeri de (0,25 µg/mL) dikkate alınarak LJ besiyerinde moksifloksasin direnci için kritik konsantrasyon değeri olarak, referans suşun (*H₃₇RV*) ve izolatların büyük çoğunluğunun duyarlı olduğu konsantrasyon olan, 1 µg/mL kabul edilmiştir. Bu değer ve üzerindeki konsantrasyonlar da üreme tespit edilen örnekler dirençli, daha düşük konsantrasyonlarda üreme gösteren örnekler duyarlı olarak kabul edilmiştir.⁶⁹

Bu kriter baz alınarak yapılan değerlendirmede; çalışmaya dahil edilen test suşlarının % 17'si ÇİD görülmeyenler, % 21,6'sı da ÇİD görülen suşlar arasından olmak üzere toplamda izolatların % 18,2'sinde fenotipik olarak moksifloksasine karşı duyarlılık kaybı olduğu, duyarlılık kaybının % 9,4 oranı ile 13 suşta 2 µg/mL düzeyinde olmasına karşılık % 1,3 oranı ile 2 suşta 16 µg/mL düzeyinde olduğu tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6: Moksifloksasin MİK değerleri

Moksifloksasin MİK değeri µg/mL		DUYARLI İZOLAT					DİRENÇLİ İZOLAT				
		0,125≥	0,25	0,5	1	Toplam	2	4	8	≥16	Toplam
ÇİD-TB GÖRÜLMİYEN	S	11	14	21	37	83	8	3	5	1	17
	%	11	14	21	37	83	8	3	5	1	17
ÇİD-TB GÖRÜLEN	S	1	1	9	18	29	5	0	2	1	8
	%	2,7	2,7	24,3	48,6	78,3	3,5	0	5,4	2,7	21,6
Toplam	S	12	15	30	55	112	13	3	7	2	25
	%	8,7	10,9	21,9	40,1	81,75	9,4	2,1	5,1	1,4	18,2

ÇİD göstermeyen 100 suş arasındaki moksifloksasin'e direnç oranı, major antitüberküloz ilaçların tamamına duyarlı 88 suş arasında 14 izolat ile % 16, majör ilaçlardan en az birisine direnç gösteren 12 suş arasında ise bu oranın 3 suş ile % 25'e ulaştığı görülmüştür (Tablo 7).

Tablo 7: ÇİD görülmeyen TB suşları arasındaki Moksifloksasin direnç oranları

Moksifloksasin Direnci	İlk seçeneklere Duyarlı S: 88		En az bir ilk seçenek Dirençli S: 12		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Moksifloksasin MİK ≤1µg/mL	74	84	9	75	83	94,3
Moksifloksasin MİK >1µg/mL	14	16	3	25	17	5,7
Toplam	88	88	12	12	100	100

S: Örnek Sayısı

Fenotipik olarak Moksifloksasin direnci tespit edilen 25 klinik izolatın materyalin gönderildiği bölgelere göre dağılımı irdelendiğinde bu izolatlardan 10'unun Adana, 6'sının Gaziantep, 5'inin Hatay, 3'ünün Mersin ve 1'inin de Kahramanmaraş ili Verem Savaş Dispanserlerinden gönderilen örneklerle ait oldukları tespit edilmiştir. ÇİD görülmeyen suşlar arasında Moksifloksasin direncinin % 29,2 ile en yüksek oranda Adana suşlarında görüldüğü bunu % 20 ile Kahramanmaraş bölgesi suşlarının izlediği, ÇİD tespit edilen suşlar arasında en yüksek oranda direncin ise % 50 ile Hatay bölgesinden gönderilen klinik materyallerden izole edilen suşlar arasında görüldüğü

bunu Gaziantep (% 33,3) ve Adana bölgesindeki (% 17,6) suşlarının izlediği tespit edildi (Tablo 8).

Tablo 8. İllere göre direnç dağılımı

İller	ÇİD-TB görülmeyen			ÇİD-TB		
	MOX ≤1µg/mL	MOX >1µg/mL	Toplam	MOX ≤1µg/mL	MOX >1µg/mL	Toplam
Adana	17	7 % 29,2	24	14	3 % 17,6	17
Adıyaman	2	0	2	0	0	0
Gaziantep	20	4 % 16,7	24	4	2 % 33,3	6
Hatay	20	1 % 4,8	21	4	4 % 50	8
Kahramanmaraş	4	1 %20	5	1	0	1
Kilis	1	0	1	1	0	1
Mersin	14	3 %17,6	17	3	0	3
Osmaniye	5	0	5	2	0	2

MOX: Moksifloksasin

Moksifloksasin direncinin moleküler mekanizmasını tespit amacı ile çalışmaya dahil edilen 137 klinik izolatın kinolon direncinde sorumlu olarak gösterilen *gyrA* geninin 530 bp lik fragmentinin dizi analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu referans suş ile karşılaştırıldığında, kodon-95 Ser→Thr polimorfizmi hariç, toplam 6 örnekte birer nokta mutasyonuna rastlanmıştır. Mutasyon türleri Asp94Tyr, Asp94Gly, Ala90Val, Gly88Ala ve iki örnekte de Asp89Asn şeklinde tespit edilmiştir. Mutasyon içeren 5 örnekte Ser95Thr polimorfizminin de mevcut olduğu gözlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 9: gyrA mutasyonu tespit edilen örnekler

Örnek Nu:	Barkod Nu:	Gönderen Merkez	Birincil Anti-TB ilaç Duyarlılıkları				Kodon 95	Moksifloksasin MİK değeri µg/mL	gyrA QRDR mutasyonu
			S	İ	R	E			
54	35913	Ceyhan VSD	H	H	H	H	ACC	2	GAC94TAC (Asp→Tyr)
D10	16710	Çukurova Devlet H.	H	R	R	R	ACC	0,5	GAC89AAC (Asp→Asn)
D11	19159	Antakya VSD	R	R	R	H	ACC	2	GAC94GGC (Asp→Gly)
D21	25031	Mersin VSD	R	R	R	H	ACC	1	GAC89AAC (Asp→Asn)
D30	28728	Çifteminare VSD	R	R	R	H	AGC	2	GGC88GCC (Gly→Ala)
D32	29793	Antakya V.S.D.	H	R	R	H	ACC	≥16	GCG90GTG (Ala→Val)

S: Streptomisin, İ: İzoniyaizid, R: Rifampisin, E: Etambutol, H: Duyarlı, R: Dirençli, V.S.D: Verem Savaş Dispanseri

Mutasyon izlenen örneklerin ikisinde moksifloksasin MİK değeri sırasıyla 0,5 ve 1 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Diğer dört tanesinin MİK değerleri 1 µg/mL in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Mutasyon tespit edilen ve fenotipik olarak duyarlı bulunan bu iki örnekte de Asp89Asn mutasyonu olması dikkati çekmektedir (Tablo 10).

Tablo 10. ÇİD TB görülmeyen örnekler

Örnek Nu	Pr. No	Gönderen Merkez	S	I	R	E	Moksifloksasin MİK mg/L	Kodon 95	Mutasyon
1	34727	Nizip V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
2	34745	İskenderun V.S.D	H	R	H	H	≤0,125	ACC	-
3	34748	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
4	34749	Antakya V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
5	34750	Antakya V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
6	34754	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
7	34778	Çifteminare V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
8	34789	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	0,5	ACC	-
9	34790	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	1	ACC	-
10	34791	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	1	AGC	-
11	34831	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
12	34851	Kahramanmaraş V.S.D	H	H	H	R	1	ACC	-
13	34867	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
14	34904	Mersin V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
15	34934	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,5	AGC	-
16	35001	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
17	35027	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	2	ACC	-
18	35034	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-

Tablo 10. ÇİD TB görülmeyen örnekler (Devamı)

Örnek Nu	Pr. No	Gönderen Merkez	S	I	R	E	Moksifloksasin MIK mg/L	Kodon 95	Mutasyon
19	35067	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	1	ACC	-
20	35071	Çifteminare V.S.D	H	H	H	H	2	AGC	-
21	35077	Ceyhan V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
22	35085	Mersin V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
23	35087	Mersin V.S.D	H	R	H	H	2	ACC	-
24	35152	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	AGC	-
25	35156	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	4	AGC	-
26	35185	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	AGC	-
27	35205	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	2	ACC	-
28	35210	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
29	35224	Gaziantep 1 nolu V.S.D	R	H	H	H	2	ACC	-
30	35327	Tarsus V.S.D	R	R	H	H	1	AGC	-
31	35342	Osmaniye V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
32	35386	Gaziantep 1 nolu V.S.D	R	H	H	H	0,25	ACC	-
33	35404	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	1	AGC	-
34	35441	Antakya V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
35	35447	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	AGC	-
36	35469	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
37	35475	Kozan V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
38	35501	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
39	35530	Mersin V.S.D	H	R	H	H	2	ACC	-
40	35532	Mersin V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
41	35587	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	8	AGC	-
42	35589	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	0,25	ACC	-
43	35599	Antakya V.S.D	H	H	H	H	2	ACC	-
44	35606	Tarsus V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
45	35607	Adıyaman V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
46	35609	Ortadoğu H.	R	H	H	H	≤0,125	ACC	-
47	35721	Adana Numune EAH	H	H	H	H	4	AGC	-
48	35771	Mersin V.S.D	H	R	H	H	1	ACC	-
49	35802	Osmaniye V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
50	35837	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
51	35888	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	R	H	H	0,5	ACC	-
52	35900	Kahramanmaraş V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
53	35903	Kahramanmaraş V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
54	35913	Ceyhan V.S.D	H	H	H	H	2	ACC	GAC94TAC
55	35920	Mersin V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
56	35939	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
57	35940	Gaziantep 1 nolu V.S.D	R	H	H	H	1	ACC	-
58	35941	Adana Kadın Doğ.H.	H	R	H	H	1	AGC	-
59	36020	Kilis V.S.D	H	H	H	H	0,5	AGC	-
60	36027	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
61	36028	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-

Tablo 10. ÇİD TB görülmeyen örnekler (Devamı)

Örnek Nu	Pr. No	Gönderen Merkez	S	I	R	E	Moksifloksasin MIK mg/L	Kodon 95	Mutasyon
62	36061	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	≥16	AGC	-
63	36089	Adıyaman V.S.D	H	H	H	H	0,25	AGC	-
64	36094	Mersin V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
65	36099	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	0,5	AGC	-
66	36115	Ceyhan V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
67	36140	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
68	36141	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
69	36149	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
70	36159	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	8	AGC	-
71	36168	Osmaniye V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
72	36181	Osmaniye V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
73	36216	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
74	36225	Çukurova Devlet H.	H	H	H	H	1	ACC	-
75	36228	Tarsus V.S.D	H	H	H	H	8	AGC	-
76	36238	Osmaniye V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
77	36371	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
78	36472	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
79	36519	Kahramanmaraş V.S.D	H	H	H	H	4	ACC	-
80	36548	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	H	H	H	8	AGC	-
81	36596	Silifke V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
82	36602	Mersin V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
83	36608	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
84	36610	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
85	36613	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
86	36643	Ceyhan V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
87	36798	Çifteminare V.S.D	H	H	H	H	1	AGC	-
88	36856	Gaziantep 2 nolu V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
89	36916	Çifteminare V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
90	36919	Silifke V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
91	36922	Mersin V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
92	36953	İskenderun V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
93	36955	İskenderun V.S.D	H	H	H	H	1	ACC	-
94	37132	Elbistan V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
95	37236	Mersin V.S.D	H	H	H	H	≤0,125	ACC	-
96	37258	İskenderun V.S.D	H	H	H	H	0,5	ACC	-
97	37264	Tarsus V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
98	37360	Karşıyaka V.S.D	H	H	H	H	8	AGC	-
99	37375	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-
100	37383	Antakya V.S.D	H	H	H	H	0,25	ACC	-

S: Streptomisin, I: İzoniyaizid, R: Rifampisin, E: Etambutol, H: Duyarlı, R: Dirençli, V.S.D: Verem Savaş Dispanseri

Tablo 11. ÇİD TB görülen örnekler

Örnek Nu	Pr. No	Gönderen Merkez	S	I	R	E	Moksifloksasin		Kodon 95	Mutasyon
							MIK mg/L			
1	35088	İskenderun V.S.D	R	R	R	H	8		ACC	-
2	35384	Gaziantep 1 nolu V.S.D	R	R	R	R	1		ACC	-
3	35824	Tarsus V.S.D	R	R	R	R	1		ACC	-
4	36071	Karşıyaka V.S.D	R	R	R	H	0,5		ACC	-
5	36683	Çukurova Devlet H.	R	R	R	H	2		ACC	-
6	36849	Gaziantep 2 nolu V.S.D	R	R	R	R	8		AGC	-
7	36950	İskenderun V.S.D	R	R	R	H	1		AGC	-
8	16321	İskenderun V.S.D	H	R	R	H	≤0,125		AGC	-
9	16531	Çukurova Devlet H.	R	R	R	H	2		ACC	-
10	16710	Çukurova Devlet H.	H	R	R	R	0,5		ACC	GAC89AAC
11	19159	Antakya V.S.D	R	R	R	H	2		ACC	GAC94GGC
12	19599	Çukurova Devlet H.	R	R	R	R	1		ACC	-
13	20640	Gaziantep 1 nolu V.S.D	R	R	R	R	1		ACC	-
14	21250	Çukurova Devlet H.	R	R	R	R	1		AGC	-
15	24049	Antakya V.S.D	R	R	R	H	0,25		AGC	-
16	24274	Çukurova Devlet H.	H	R	R	H	0,5		ACC	-
17	24355	Çifteminare V.S.D	R	R	R	R	1		ACC	-
18	24393	Çukurova Devlet H.	H	R	R	H	1		ACC	-
19	24509	Gaziantep 1 nolu V.S.D	H	R	R	H	1		ACC	-
20	24956	Çifteminare V.S.D	H	R	R	H	1		AGC	-
21	25031	Mersin V.S.D	R	R	R	H	1		ACC	GAC89AAC
22	25308	Antakya V.S.D	H	R	R	H	2		ACC	-
23	25377	Gaziantep 1 nolu V.S.D	R	R	R	H	0,5		ACC	-
24	25705	Tarsus V.S.D	R	R	R	H	1		ACC	-
25	25710	Çukurova Devlet H.	H	R	R	H	0,5		ACC	-
26	26273	Çukurova Devlet H.	R	R	R	H	1		ACC	-
27	26404	Antakya V.S.D	H	R	R	H	0,5		ACC	-
28	28101	Kahramanmaraş V.S.D	R	R	R	H	0,5		ACC	-
29	28349	Çukurova Devlet H.	R	R	R	H	1		AGC	-
30	28728	Çifteminare V.S.D	R	R	R	H	2		AGC	GGC88GCC
31	29366	Kilis V.S.D	H	R	R	R	1		ACC	-
32	29793	Antakya V.S.D	H	R	R	H	≥16		ACC	GCG90GTG
33	29917	Çukurova Devlet H.	R	R	R	H	1		ACC	-
34	29964	Karşıyaka V.S.D	H	R	R	H	1		AGC	-
35	31950	Osmaniye V.S.D	R	R	R	H	0,5		ACC	-
36	37497	Çukurova Devlet H.	R	R	R	R	0,5		AGC	-
37	37896	Osmaniye V.S.D	R	R	R	H	1		AGC	-

S: Streptomisin, I: İzoniyaizid, R: Rifampisin, E: Etambutol, H: Duyarlı, R: Dirençli, V.S.D: Verem Savaş Dispanseri

The chromatogram shows the DNA sequence: CCGC A C G G C G A C G T G T C G A T C T A C G A C A G C C. The sequence is color-coded by base: C (blue), G (black), A (green), and T (red). The sequence is divided into two segments, 229 and 241. The mutation is indicated by a red arrow pointing to the 'A' at position 94, which is labeled 'Kodon 94 A→?C'. Another red arrow points to the 'C' at position 90, which is labeled 'Kodon 90 C→T'.

Applied Biosystems

S/N G-86 A:34 T:33 C:59
KB.bcp
KB 1.1 Cap:13

d21
KB_310_POP4_BDTr3_36Rapid.mob
Pis 1378 to 7440 PK1 Loc:1378
Version 5.1 HISQV Bases: 503

Inst:Sol/Name 310/ABI PRISM 3130
Dec 15, 2014 11:51PM, PST
Collection Date Unassigned
Spacing:10.3 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned

1 13 25 37 49 61 73 85 97 109 121

1185
790
395
0

133 145 157 169 181 193 205 217 229 241

1185
790
395
0

253 265 277 289 301 313 325 337 349 361 37

1580
1185
790
395
0

385 397 409 421 433 445 457 469 481 493

1185
790
395
0

56

5. TARTIŞMA

Son yıllarda artan ilaç direnç problemi ve kesin tanı konulmasında halen zorluklar olması nedeniyle TB çağımızın büyük sağlık problemleri arasındaki yerini korumaktadır. Her yıl DSÖ tarafından açıklanan dünyada TB'la ilgili epidemiyolojik veriler, uygulanan tanı, tedavi ve koruyucu hekimlik tedbirlerine bağlı olarak özellikle akciğer tüberkülozu insidansında geçmiş yıllara göre büyük oranlarda azalma kaydedilse de, anti-tüberküloz ilaçlara karşı artan direnç tüberküloz tehdidinin devamını sağlamaktadır. Ancak yeni moleküller üzerinde yapılan araştırmalar ve kullanımda olan diğer anti-bakteriyel ajanlarla yapılan denemeler mevcut ilaçlar ile uzun ve toksik etkisi yüksek olan akciğer tüberkülozu tedavisi açısından umut vadetmektedir. Yeni geliştirilen sentetik florokinolonlardan moksifloksasin ve gatifloksasin, DSÖ tarafından tedavide kullanılmasına dair yeterli veriye ulaşılması durumunda anti-tüberküloz tedavide birinci seçenek ilaçlar arasına alınmasının önerileceği bildirilmektedir.²

Florokinolonlar akciğer tüberkülozu tedavisinde gittikçe artan öneme sahip antibiyotiklerdir. Bu grupta yer alan ilaçlar farmokodinamik özelliklerin artırılması amacı ile moleküle eklenen ek rezidüel ile daha etkin hale gelmelerine karşılık artmış toksisiteye de sahiptirler ve ancak sınırlı endikasyonda kullanılmaları istenir. Ancak bu moleküller son yıllarda bütün dünyada klinik örneklerden izolasyon oranları artış gösteren ÇİD *M. tuberculosis* suşlarla enfekte ve/veya majör ilaçları tolere edemeyen hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle moleküle eklenen halojenler gibi rezidüel ile etki spektrumu genişletilmiş, moksifloksasin gibi moleküllerin oral formunun kullanım kolaylığı getirmesi nedeniyle de klinisyenler tarafından solunum yolu veya üriner sistem enfeksiyonları gibi basit endikasyonlarda *subtreatment* doz ve sürelerde yoğun olarak kullanılması, muhtemeldir ki diğer bir çok önemli patojen gibi *M. tuberculosis* suşlarında da non-spesifik olarak bu ilaçlara karşı primer direnci provoke edecektir. Oysa yapılan araştırmalarda florokinolon grubu ilaçların makrofajlar içerisine penetre olarak burada bakterisidal aktivite gösterdikleri ve bu farmakokinetik avantajın latent TB tedavisinde etkili olabileceği belirtilmiştir. Ancak son yıllarda akciğer tüberkülozundan izole edilen *M. tuberculosis* suşlarında florokinolon direncinde artış görüldüğü bununla tedavi başarısızlıklarına yol açabileceği belirtilmektedir.^{70,71}

Florokinolon grubu ilaçlara karşı muhtemel direnç gelişimi, irdelemenin yapıldığı hasta gruplarının özellikleri, kontrol programlarının etkinliği, coğrafi bölge, sosyo-kültürel yapı gibi enfeksiyon hastalıklarının insidansını etkileyen faktörlere bağlı olarak farklı çalışmalarda farklı oranlarda bildirilmiştir. Ancak oransal farklılıklarda fenotipik yöntemlerin standardize edilememiş güvenilir olamayan protokollere dayalı olması buna karşılık moksifloksasin direnci ile ilgili moleküler mekanizmaların ve genomdaki ilgili mutasyonların bilinmemesinin de rolü önemlidir. Literatürde de, bu sebeplerle olması muhtemeldir, moksifloksasin direnci ve kritik konsantrasyonlar için yapılmış fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Ho ve arkadaşları (2014) Avusturya ve Yeni Güney Galler’de yaptığı çalışmada 357 MTK örneğinin MGIT960 yöntemiyle moksifloksasin direncinin araştırılması sonucu sadece 2 örnekte direnç bulunabilmişler ve bu örneklerden bir tanesinin ÇİD TB suşu olduğu bildirilmişlerdir. Ancak bu çalışmada MGIT960 besiyerinde moksifloksasin için kritik konsantrasyon değeri 0,5 µg/mL olacak şekilde değerlendirilmiş.⁷²

Jabeen ve arkadaşları (2014) yaptığı bir çalışmada Pakistan’da 2010-2014 yıllarında tanımlanan TB suşlarında florokinolon direncindeki artış dikkati çekmektedir. Çalışmada 2010 yılında tespit edilen 2.059 ÇİD olmayan suşdan 214 (% 10,3) tanesinde florokinolon direnci tespit edilmiş. Bu oran 2013 yılında 332/1.710 (% 19,4) olarak bulunmuş.⁷³

Sahly ve arkadaşları (2011) tarafından Amerika’nın Teksas eyaletinde yapılan çalışmada TB izolatlarının % 1,8 inde, Rafiq ve arkadaşlarının (2011) Pakistan’da yaptığı bir çalışmada da 2006-2009 arasında tespit edilmiş 205 TB suşunun % 5,9’unda florokinolon direnci tespit edilmiş. Yine Casat ve arkadaşlarının (2000) İspanyada yaptığı bir çalışmada TB suşlarında ofloksasin direnci araştırılmış ve izolatların % 6’sında direnç tespit edilmiş.

Bizim moksifloksasin direncini tespit için kullandığımız kritik konsantrasyon kendi laboratuvarımızda referans suş için tespit ettiğimiz 1 µg/mL oldu. Bu şartlar altında ÇİD görülmeyen suşlardaki direnç oranımız % 17, ÇİD tespit edilen suşlar arasındaki direnç oranımız % 21,6 olmak üzere genel de 137 test suşu arasında % 18,2 idi. Bizim bulgumuz kritik eşik daha yüksek olmasına rağmen Ho ve arkadaşlarının bulguları ile kıyaslanamayacak ölçüde yüksektir. Buna karşılık Pakistanda Rafiq ve

arkadaşlarının yaptıkları çalışmada elde ettikleri % 5,9'luk direnç oranından daha yüksek olmasına karşılık yine Pakistan'da Jabeen ve arkadaşlarının ÇİD görülmeyen suşlardan elde ettikleri % 10,3 ve % 19,4'lük direnç oranı ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu grup da değerlendirilen örnek sayıları, sırası ile 2.059 ve 1.710 çalışmanın yapıldığı yıllar, sırası ile 2010 ve 2014 birlikte irdelendiğinde 2014 de artış direnç bizim aynı yıl tamamladığımız % 17'lik direnç oranımızdan daha yüksektir. Pakistandan bildirilen üç farklı çalışmanın yapıldığı yıllar ve direnç oranları dikkate alındığında Moksifloksasin direncinin genel enfeksiyon insidansının yüksek olduğu ülkelerde ve yıllara bağlı olarak artmakta olduğunu çarpıcı şekilde ortaya koymaktadır. Nitekim Ho ve arkadaşlarının Avustralya ve Yeni Zellanda izolatları için bildirdikleri orana benzer şekilde Sahly ve arkadaşlarının 2011 yılında Amerika'nın Teksas eyaleti izolatları için bildirdikleri % 1,8 Casat ve arkadaşlarının İspanya kökenli izolatlar için verdikleri % 6 direnç oranları bizim oranlarımızda oldukça düşüktür. Bu sonuçlar bir taraftan Moksifloksasine karşı artmakta olan direnci gösterirken diğer taraftan da non-spesifik enfeksiyonlarda bu grubun yaygın kullanımının önemini ima etmektedir. Bizim ÇİD görülmeyen suşlar arasında anti-tüberküloz ilaçların tamamına duyarlı olan 88 test suşumuz arasında bile direnç oranımız 14 izolat ile % 16 dır. Bu gruptaki direnci genel kullanım dışında izah etmek gerçekten zordur. Nitekim bizim bölgesel direnç dağılımımız da ÇİD olmayan suşlarda Adana'da direnç oranımızın yüksek olmasına karşılık ÇİD görülen suşlarda güney ve doğu bölgelerde oranın daha yüksek olması tüberküloz dışı kullanımın önemini akla getirmektedir. Bu konuda kesin kanı daha fazla sayıda suşun değerlendirildiği, hasta bilgilerine ulaşılmış yeni ve süreklilik arz eden çalışmalar sonucu oluşacaktır.

Biz çalışmamızda moksifloksasin direncinin kinolon direncinden sorumlu hedef gen fragmentinde ilişkilendirilebileceği muhtemel mutasyonları tespit için tüm suşlarda hedef dizinin analizini yaptık. Çalışmada fenotipik olarak moksifloksasin direnci gösteren 4 suş ile moksifloksasin duyarlı bulunan 2 suş dışında test izolatlarının hiç birisinde *gyrA* geninin QRDR bölgesini içeren 530 bp lik kısmında mutasyon tespit edemedik. Moksifloksasin duyarlı 2 suşta da 89. kodonda Asp→Asn değişimine sebep olan GAC→AAC mutasyonu görülürken dirençli suşların 2 sinde 94. kodonda mutasyon olduğunu diğer 2 mutasyonunda 88 ve 90. kodonlarda gerçekleştiğini tespit ettik. Bu veriler moksifloksasin direnci için muhtemelen farklı kodonlarda mutasyonlar

olabileceğini veya eflüks sistemi gibi, ki bu sistemin etkili olmadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir, farklı mekanizmaların etkili olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *M. tuberculosis* klinik izolatlarında ilk seçenek anti-tüberküloz ilaçlar arasında gösterilmeye başlanan Moksifloksasine karşı direncin ve bu amaçla kullanılacak fenotipik yöntemler ile direncin moleküler mekanizmalarının tespiti amacı ile planlanan çalışma sonunda;

- 1- Moksifloksasin direncinin fenotipik olarak; ÇİD gösteren suşlar arasında % 21,6 ÇİD tespit edilemeyen suşlar arasında da % 17 olmak üzere %18,2 olduğu
- 2- Direnç gelişiminin anti-tüberküloz ilaçların tamamına duyarlı olan suşlarda da % 16 gibi yüksek oranlarda olduğu ve bunun molekülün tüberküloz tedavisine sekonder geliştirdiği bir direnç olamayacağı
- 3- Nitekim bulunan bu oranların; batı toplumlarından daha yüksek olduğu, genel enfeksiyon oranlarının bizim gibi yüksek olduğu doğulu toplumlar ile benzerlik gösterdiği
- 4- Moksifloksasin direncinde polimorfizmin sık görüldüğü *gyrA* geni 95. kodon ile ilgili olamayacağı ve genin analiz edilen diğer kısımlarında izlenen mutasyonların dirençle ilişkisinin yetersiz olduğu
- 5- Fenotipik özelliklere dayanarak tespit ettiğimiz yüksek dirençten farklı moleküler mekanizmaların sorumlu olacağı görülmüş olup

M. tuberculosis klinik izolatlarında moksifloksasin direncinin araştırılmasının daha geniş vaka grupları ve izolatlar kullanılarak devam ettirilmesi, elde edilen verilerin ülke genelinde bütün klinisyenler ile paylaşarak bu grup ilaçlara karşı kısa sürede direnç gelişme ihtimalinin varlığı ve şayet bu moleküller rezerv moleküller olarak kabullenilecek ise non-spesifik endikasyonlarda daha sınırlı kullanılması gerektiğinin ısrarla anlatılmasının önemli olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2014. Geneva, WHO/HTM/TB/2014.8
2. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2013. Geneva, WHO/HTM/TB/2013.11
3. **World Health Organization.** Global Tuberculosis Report 2012. Geneva, WHO/HTM/TB/2012.6
4. **Chen TC, Lu PL, Lin CY, Lin WR, Chen YH.** Fluoroquinolones are associated with delayed treatment and resistance in tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* **2011**; 15(3):211-216.
5. **Ginsburg AS, Grosset JH, Bisha WR.** Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis* **2003**; 3:432-442.
6. **Cox H, Ford N, Keshavjee S, McDermid C, Schoen-Angerer T, Mitnick C, Goemaere E.** Rational use of moxifloxacin for tuberculosis treatment. *Lancet Infect Dis* **2011**; 11:259-260.
7. **Conde MB, Efron A, Loreda, Muzy De Souza GR, Graça NP, Cezar MC, Ram M, Chaudhary MA, Bishai WR, Kritski AL, Chaisson RE.** Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial. *Lancet Infect Dis* **2009**; 373:1183-1189.
8. **Barış İY.** Çağlar Boyu Tüberküloz. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun **2003**:1-7.
9. **Daniel TM.** The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* **2006**; 100:1862-1870.
10. **Daniel TM.** Captain of death: the story of tuberculosis. University of Rochester Press. Rochester, New York, **1997**.
11. **Köksal F.** Tüberküloz basilinin kaynağı ve evrimi. *Tüberküloz Sempozyum Kitapçığı* **2003**:34-47.
12. **Barış İY.** Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi. *Toraks Kitapları* **2010**; 11:1-16.
13. **Zeytinli ÜO.** Çukurova bölgesinde akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen mycobacterium tuberculosis suşlarının spoligotyping ve MIRU-VNTR yöntemiyle tiplendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2010**.
14. **Vidinel İ.** Türkiye’de tüberküloz hastalığına tarihsel bir bakış. *Toraks Kitapları* **2010**; 11:17-24.
15. **Glaziou P, Falzon D, Floyd K, Raviglione M.** Global epidemiology of tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med* **2013**; 34:3-16.
16. **T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Güncel Tüberküloz İstatistikleri. Erişim: (<http://tuberkuloz.thsk.saglik.gov.tr/etkinlikler/guncel-istatistikler/869-tb.html>) **2013**, Erişim tarihi: 9.10.2014
17. **Köksal F, Yaman A.** Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu. Samsun, **2003**:34-47.
18. **Brown-Elliott BA, Wallace RJ.** Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **2002**; 15:716-46.
19. **Woods GL, Washington JA.** Mycobacteria other than mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis* **1987**; 79:275-279.

20. **Pfyffer GE.** *Klinik Mikrobiyoloji.* 9. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık Ltd Şti, **2009**:543.
21. **Palomino JC, Leão SC, Ritacco V.** *Tuberculosis.* 1st Ed, **2007**:63-64
22. **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, Soolingen D, Cole ST.** A new evolutionary scenario for the mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci* **2002**; 99:3684-3689
23. **Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omai B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V.** Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* **2005**; 1(1):55-61.
24. **Alp A.** Tüberküloz Basili ve Özellikleri. *Toraks Kitapları* **2010**; 11:48-51.
25. **Park SH, Bendelac A.** progress CD1-restricted T-cell responses and microbial infection, *Nature* (Elektronik Journal) **2000**; 406:788-792
26. **Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L.** mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology* **2004**; 53(2):391-403.
27. **Kıyan M.** *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:419-455.
28. **Schwander SK, Torres M, Seda E.** Enhanced responses to m. tuberculosis antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* **1998**; 178:1434-1445.
29. **Çavuşoğlu C.** Mycobacterium tuberculosis genomu ve genetik özellikleri. *Toraks Kitapları* **2010**; 11:56-57.
30. **Ernst JD.** Macrophage receptors for mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **1998**; 66:1277-1281.
31. **Pieters J.** Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* **2001**; 3(3):249-255.
32. **FÖ Eyüboğlu.** Tüberküloz patogenezi. *Toraks Kitapları* **2010**; 11:67-66.
33. **Ahmad S.** Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical and Developmental Immunology* (Electronic Journal) **2011**; Article ID:814943 Erişim: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/814943>
34. **Kleinnijenhuis, J., Oosting M, Joosten LAB, Netea, MG, Van Crevel R.** Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology* (Electronic Journal) **2011**; Article ID:405310 Erişim: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/405310>
35. **Kaufmann SH.** How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nature Reviews Immunol* **2001**; 1:20-30.
36. **Flynn JL, Chan J.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **2001**; 19:93-129.
37. **Albayrak N.** Mycobacterium tuberculosis man-lam antijeninin fibroblast -makrofaj kokültür modelinde makrofaj polarizasyonuna etkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara **2014**.
38. **Li B, Bassiri H, Rossman MD, Kramer P, Eyuboglu AF, Torres M, Sada E, Imir T, Carding SR.** Involvement of the fas/fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma-delta t cells: a mechanism for the loss of gamma-delta t cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Immunol* **1998**; 161:1558-1567.
39. **T.C. Sağlık Bakanlığı.** Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Ankara, **2011**.

40. **Ketenci AÇ.** Tüberküloz hastalarının ev içi temaslarında tüberküloz enfeksiyonu tanısında tam kan γ -interferon testi (Quantiferon-TB gold) ile tüberkülin cilt testinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Yedikule Göğ Hast ve Göğ Cer EAH, İstanbul **2004**.
41. **Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, Shigeto E, Harada N, Mitarai S, Okada M, Suzuki K, Inoue Y, Tsuyuguchi K, Sasaki Y, Mazurek GH, Tsuyuguchi I.** Specific detection of tuberculosis infection an interferon_based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**; 170:59-64.
42. **Peterson R.** Molecular epidemiology of tuberculosis. Karolinska Institutet, Sweden, **2009**.
43. **Wayne LG, Kubica GP.** Mycobacteria. In: P.H.A.Sneath, Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co, Baltimore JCM **1986**; 2:1435-1457.
44. **Kıyan M.** Mycobacteriaceae. In: Ustaçelebi S, Cengiz AT, Eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Ankara: Günes Kitabevi, **1999**: 419-455.
45. **Bifani P, Kurepina N, Mathema B, Wang X, Kreiswirth B.** Genotyping of mycobacterium tuberculosis clinical isolates using IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis. *BMC* **2009**; 551:173-188.
46. **Winn WJ, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger D, Woods G,** Eds. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th Ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, **2006**: 1064-1124.
47. **Inderlied CB.** Mycobacteria. In: Cohen J, Powderly WG, Eds. *Infectious Diseases* 2nd Ed. Mosby **2004**: 2285-2308.
48. **World Health Organization.** Treatment of Tuberculosis Guideline 4th. Ed. **2010**.
49. **Köksal F.** Mycobacterium tuberculosis'te direnç problemi. I.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya, 12-16 Kasım **2011**: 92-94.
50. **De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G.** Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbio Rev* **2006**; 30:36-52.
51. **Gillespie SH.** Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans* **2007**; 35:1317-1320.
52. **Tansel Ö.** Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım, Samsun, **2003**: 347-351.
53. **Saniç A, Çoban A.** Mikobakteriler ve laboratuvar tanı kitabı. Samsun, **1999**: 23-26.
54. **Çavuşoğlu C.** Mycobacterium tuberculosis'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar TanıYöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun, **2003**: 367.
55. **Telenti A, Persing DH.** Novel strategies for the detection of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. *Research in microbiology* **1996**; 147:73-79.
56. **Durmaz R.** DNA Baz Dizi Analizi. Durmaz R, Ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd, **2001**: 169-171.
57. **Silva, PA, Ainsa, J.** From basic science to patient care. In: Palamino JC, Leao SC, Rittacco V, Eds. *Tuberculosis* 2007, **2007**: 593-634.
58. **Cole ST, Telenti A.** Drug resistnace in mycobacterium tuberculosis. *Eur Respir J* **1995**; 8:701-713.

59. **Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ.** Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14:836-871.
60. **Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP.** Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**; 38:2380-2386.
61. **Winn WJ, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger D, Woods G.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2006**:132-165.
62. LightCycler System: Real Time PCR. Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, **1999**.
63. **Hooper DC, Strahilevitz J.** Quinolones. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin, Eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice Infectious Diseases*, 7th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2010**; 35:487-510.
64. **Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR.** Fluoroquinolones, tuberculosis and resistance. *Lancet Infect Dis* **2003**; 3:432-442.
65. **Bryskier A, Lowther J.** Fluoroquinolones and tuberculosis. *Expert Opin Investig Drugs*, **2002**; 11:233-258.
66. **D Rose, Blackman A, Eden S, Li H, Maruri F, Shintani A, Alexander C, Kaiga A, Stratton CW, Warkentin J, Tang YW, Sterling TR.** High proportion of fluoroquinolone-resistant mycobacterium tuberculosis isolates with novel gyrase polymorphisms and a gyrA region associated with fluoroquinolone susceptibility. *J Clin Microbiol* **2012**; 50(4):1390-1396.
67. **Wang J., Lee LN, Lai HC, Wang SK, Jan IS, Yu CJ, Hsueh PR, Yang PC.** Fluoroquinolone resistance in mycobacterium tuberculosis isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 59:860-865.
68. **Jarlier V, Nikaido H.** Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **1994**; 123:11-18.
69. **World Health Organization** Policy Guidance on TB Drug Susceptibility Testing (DST) of Second-line Drugs. Geneva, WHO/HTM/TB/2008.392.
70. **Auwers PV, Matsumoto T, Husson M.** Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **1988**; 22:185-192.
71. **Rastogi N, Labrousse V, Goh KS.** In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of mycobacterium tuberculosis and comparative intracellular activities against the virulent H₃₇Rv strain in human macrophages. *Curr Microbiol* **1996**; 33:167-175.
72. **Ho J, Jelfs P, Sintchenko V.** Fluoroquinolone resistance in non-multidrug-resistant tuberculosis-a surveillance study in New South Wales, Australia, and a review of global resistance rates. *Int J Infect Dis* **2014**; 26:149-153.
73. **Jabeen K, Shakoor S, Malik F, Hasan R.** Fluoroquinolone resistance in mycobacterium tuberculosis isolates from Pakistan 2010–2014: implications for disease control. *International Journal of Mycobacteriology* **2015**.(Baskida)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Taylan BOZOK

Doğum Tarih ve Yeri : 01/01/1986 – NİĞDE

Medeni Durumu : Evli

Adres : Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Telefon : 0 505 488 2888

Faks :-

E.posta : taylanbozok@hotmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Varsa Mezuniyet Derecesi :-

Görev Yerleri : Niğde Merkez Bağlama Sağlık Ocağı

Dernek Üyelikleri :-

Alınan Burslar :-

Yabancı Dil(ler) : İngilizce

Diğer Hususlar :-