

T. C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RİFAMPİSİNE DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
KOMPLEKS SUŞLARINDA RİFABUTİNE ÇAPRAZ DİRENÇ VE
EŞLİK EDEN MUTASYONLARIN DNA DİZİ ANALİZİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Araş. Gör. Nalan SÜRÜCÜOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU

MANİSA-2024

ÖNSÖZ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince verdikleri destek ve katkılarından dolayı başta tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğluna ve yine tez çalışmalarım ve asistanlığım süresince bilgisi, sevgisi ve güler yüzüyle yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Nuri Özkütük'e; eğitimime büyük katkısı olan, her zaman destek ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Hörü Gazi, Prof. Dr. Sinem Akçalı, Prof. Dr. Semra Kurutepe, Prof. Dr. Talat Ecemiş, Prof. Dr. Kenan Değerli 'ye,

Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Sibel Hurma'ya ve Selin Bölük'e,

Asistanlığım boyunca iyi ve kötü zamanlarda birbirimize destek olduğumuz tüm asistan arkadaşlarıma ve isimlerini sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma,

Gösterdikleri sonsuz sevgi, sabır ve anlayış ile hayatımın her aşamasında bana destek olan, bugünlere gelmemde en büyük emeği sarfeden başta annem Emine Yıldız, babam Rafet Yıldız ve kıymetli ağabeyim Nazım Yıldız olmak üzere sevgili aileme,

En içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Nalan SÜRÜCÜOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks.....	5
2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	6
2.1.1. Dünyada Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	6
2.1.2. Ülkemizde Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	7
2.3. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı.....	8
2.3.1. Örneklerin alınması ve gönderilmesi	9
2.3.2 Örneklerin işlenmesi	11
2.3.3. Mikroskopik inceleme.....	12
2.3.4. Kültür.....	13
2.3.4.1. Katı besiyerleri.....	13
2.3.4.2. Sıvı besiyerleri.....	14
2.3.5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks'in tanımlanması.....	15
2.3.5.1. Fenotipik yöntemler.....	15
2.3.5.2. Genotipik yöntemler.....	16
2.3.5.3. MALDI-TOF MS.....	17
2.3.5.4. İmmünokromotografik yöntem.....	18
2.3.6. Tüberkülozun moleküler tanısı.....	18
2.3.6.1. Klinik örnekten tanı.....	19
2.3.6.2 İlaç direncinin saptanması.....	20
2.3.6.3. Genotiplendirme	21
2.4. İlaç Duyarlılık Testleri.....	23
2.4.1. Kültüre dayalı duyarlılık testleri.....	23
2.4.1.1. Proporsiyon yöntemi.....	24
2.4.2. Moleküler duyarlılık testleri.....	26
2.4.3. İlaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler ve ticari testler.....	27
2.4.3.1 Gerçek zamanlı PZR.....	28
2.4.3.2. Ters hibridizasyon yöntemi.....	28
2.4.3.3. DNA dizileme yöntemi.....	28
2.4.3.4. Ticari moleküler duyarlılık testleri.....	30
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	33
3.1. Çalışma grubu.....	33
3.2. Suşların canlandırılması.....	33
3.3. Rifabutin duyarlılığının fenotipik olarak araştırılması.....	32
3.4. DNA ekstraksiyonu.....	34
3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	34
3.5.1. Primerlerin hazırlanması.....	34
3.5.2. PZR karışımının hazırlanması ve PZR programı.....	35
3.6. Agaroz jel elektroforezi.....	36

3.7. Sanger dizileme ve mutasyon analizi.....	36
3.8.İstatistiksel analiz.....	37
3.9. Etik Kurul onayı.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Fenotipik duyarlılık test sonuçları.....	38
4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları.....	38
4.3. Sanger dizileme sonuçları.....	38
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
6. ÖZET.....	46
7. ABSTRACT.....	47
KAYNAKLAR.....	48



ŞİMGELER VE KISALTMALAR

AMS; Açlık mide sıvısı

ARB: Aside rezistan basil

BAL; Bronkoalveoler lavaj sıvısı

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BOS; Beyin omurilik sıvısı

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

ÇİD: Çok ilaca dirençli

DAP: Mezo-diaminopimelik asit

DSÖ: Dünya Sağlık örgütü

E: Etambutol

GU: Growth unit

H: İzonyazid

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IS6110-RFLP: IS6110 “restriction fragment length polymorphism”

ITS: Internal transcribed spacer

İDT: İlaç duyarlılık testi

KP; Kritik proporsiyon

LJ: Löwenstein Jensen besiyeri

LTBE: Latent tüberküloz enfeksiyonu

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

MIRU-VNTR: Mycobacterial interspersed repetitive unit

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTBK: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

NAAT: Nükleik asit amplifikasyon testleri

NALC: N asetil L sistein

OADC: Oleik asit, sığır albümini, dekstroz, katalaz

PANTA: Polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin

PZA: Pirazinamid

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

R: Rifampisin

RFB: Rifabutin

RR: Rifampisine dirençli

RRDR: Rifampicin resistance determining region

S: Streptomisin

TB: Tüberküloz

TDM: Tüberküloz dışı mikobakteri

YİD: Yaygın ilaca dirençli

YND: Yeni nesil dizileme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 MTBK kültürü için kullanılan besiyeri çeşitleri

13

Şekil 2.2. Antitüberküloz duyarlılık yöntemleri

23

Şekil 3.1. UniPro UGENE programı üzerinde eski ve yeni primerlerin pozisyonları

35

Şekil 4.1. PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü

38



TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısında kullanılan örnekler ve uygunluk durumları	9
Tablo 2.2. Tüberküloz tanı yöntemleri ve sonuçlanma süreleri	19
Tablo 2.3. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçların farklı besiyerlerinde kritik konsantrasyon değerleri	25
Tablo 2.4. Antitüberküloz ilaçlara karşı çapraz direnç ile ilişkili genler ve örnek mutasyonlar	27
Tablo 2.5. Rifampisin/çoklu ilaç dirençli tüberküloz tanısı için en sık kullanılan ticari moleküler testlerin özellikleri	31
Tablo 3.1. PCR bileşenleri ve miktarları	35
Tablo 4.1. MTBK suşlarının fenotipik duyarlılık test sonuçları	38
Tablo 4.2. MTBK suşlarında görülen mutasyonlar ve fenotipik direnç profilleri	39
Tablo 5.1. DSÖ kataloğuna göre çalışmada bulunan mutasyonların güvenilirlik derecelendirmesi	41
Tablo 5.2. <i>rpoB</i> mutasyonları ile rifampisin ve rifabutine fenotipik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması	42

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tarih boyunca insanları etkilemiş olan önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) "2023 Küresel Tüberküloz Raporu"na göre 2022'de 7,5 milyon kişi TB'ye yakalanmış ve 1.3 milyon kişi TB nedeniyle ölmüştür [1]. Covid-19 pandemisine kadar dünyada tek bir enfeksiyöz ajandan kaynaklanan ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almıştır. Tüberküloza bağlı ölümlerin HIV/AIDS'e bağlı ölümlerden iki kat fazla olduğu bildirilmiştir [1].

Tüberküloz önlenilebilen ve tedavi edilebilen bir hastalıktır. Standart tedavi rejimleri ile hastaların yaklaşık %85'i tam olarak tedavi edilebilir. Tedavi edilmeyen hastalarda ise %50 gibi yüksek oranlarda ölüme yol açabilir [1]. Tüberküloz tedavisinde en önemli sorunlardan biri ilaç direncidir. İlaça dirençli suşların ortaya çıkması dünya genelinde halk sağlığını tehdit etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'te (MTBK) ilaç direncinden her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sorumludur. Etkin olmayan ya da düzensiz antibiyotik kullanımı ile duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve ilaca dirençli suşlar seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmektedirler [2]. Dünya Sağlık Örgütü ilaca dirençli TB'yi beş sınıfa ayırmaktadır [3]. İzonyazide (H) Dirençli TB, Rifampisine Dirençli (RR) TB, Çok İlaça Dirençli (ÇİD) TB (R ve H birlikte dirençli), Ön Yaygın İlaç Dirençli TB (R ve herhangi bir florokinolona dirençli) ve Yaygın İlaç Dirençli (YİD) TB (R, herhangi bir florokinolon ve bedakuilin veya linezolidten en az birine dirençli). Küresel olarak 2022'de 410.000 kişide ÇİD-TB veya RR-TB geliştiği bildirilmiştir [1]. İlaça duyarlı TB; H, R, etambutol (E) ve pirazinamid (PZA) ile kombine olarak altı aylık sürede tedavi edilirken, ÇİD-TB ve YİD-TB'de hastaların tedavi süresi 9-24 aya kadar uzayabilir. Bu olguların tedavisinde kullanılan ilaçların hem toksik etkileri hem de maliyetleri çok daha yüksektir. Ayrıca tedavi başarısı ÇİD-TB'de %63'e kadar düşmektedir. Yeni tedavi rejimlerinin uygulanmasına rağmen ÇİD/RR-TB hastalarının yaklaşık %15'inin öldüğü bildirilmiştir [4].

Rifampisin TB tedavisinin en etkin iki ilacından biridir. Sterilize edici etkisi ve basilleri öldürmek için yeterli konsantrasyonlarda kazeum içine geçebilme yeteneği nedeniyle ilaca duyarlı TB tedavisinde izonyazid ile birlikte tedavi rejiminin temelini

oluşturur [5]. Rifampisin direnci ÇİD-TB varlığının bir göstergesi olarak DSÖ tarafından izlenmektedir [6]. Rifabutin (RFB) ve rifapentin gibi diğer rifamisinler de rifampisine benzer özelliklere sahiptir. Rifabutin, R'ye kıyasla daha yavaş bir dağılım hızı ve daha geniş bir dağılım hacmine sahiptir. Başlıca avantajı sitokrom P450 sistemini daha az indüklemesidir. Bu nedenle antiretroviral tedavi rejimi alan HIV ile koinfekte hastalarda rifampisine kıyasla sınırlı ilaç etkileşimine sahip olduğu için TB tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca immunsupresif tedavi alan solid organ alıcılarında ve rifampisin ile ilişkili tolere edilemeyen yan etkileri olan hastalarda da RFB tercih edilmektedir [7,8].

Rifampisine dirençli MTBK suşlarının yaklaşık %96'sında, *rpoB* geninin 81-bp'lik kodonları 507-533'ün "RRDR" (rifampicin resistance determining region) olarak adlandırılan bölgesinde mutasyonlar vardır [9]. *M. tuberculosis* kompleks'te bu gen bölgesindeki belirli mutasyonların hem R hem de RFB çapraz direnç kazandırdığı bildirilmiştir. Ancak RRDR gen bölgesinde bazı kodonlarda (511, 516, 518, 522, 526, 533) belirli mutasyonlara sahip olan RR suşların, belirli amino asit değişimlerine bağlı olarak RFB'ye *in vitro* duyarlı olabildiği ve RFB'nin bu suşlar üzerinde klinik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir [10]. Günümüzde TB laboratuvarlarında RR'nin hızlı tanısı için kullanılan nükleik asit amplifikasyon testlerinin (NAAT) birçoğunda bilinen mutasyonlar hedeflenmekte ve Xpert Ultra gibi bazı testlerde saptanan mutasyonun bildirimi yapılmamaktadır [11]. Fenotipik olarak RR/RFB duyarlı olan suşlarda saptanan mutasyonların bilinmesi RR-TB olgularında ikinci seçenek ilaçlara gerek kalmaksızın hastaların RFB içeren dördümlü ilaç rejimi ile tedavi edilmesine olanak sağlayabilir. Çapraz direncin olmadığı ve RFB tedavisinden yarar görecektir hastaların hızlı tanısı için ilişkili spesifik mutasyonların hızlı moleküler testlerde yer alması tedavi kararında yol gösterici olacaktır. Bu çalışmanın amacı RR veya ÇİD suşlarında RFB'nin çapraz direncini fenotipik olarak araştırıp, DNA dizi analizi ile *rpoB* RRDR gen bölgesindeki direnç fenotiplerinden sorumlu spesifik mutasyonların gösterilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri

Mycobacterium cinsi *Mycobacteriaceae* ailesinde yer alan tek cinstir. Günümüzde prokaryotların isimlendirme (nomenclature) listesinde mikobakteri cinsi içinde 274 tür ve 25 alt tür bulunmaktadır [12]. Bu sayı DNA dizi analizi yöntemlerinin kullanımının artması sonucu her yıl değişmektedir. Mikobakteri türleri içinde *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ve *Mycobacterium leprae* gibi zorunlu patojenlerin yanı sıra fırsatçı patojen ve saprofit türler de yer alır. Bunların çoğu klinik hastalığa neden olabilir ya da bilinen herhangi bir klinik korelasyon olmadan klinik örneklerden izole edilebilir [13].

Mikobakteriler; aerobik, sporsuz, hareketsiz, 0,2-0,6X1,0-10 µm boyutlarında düz veya hafif kıvrık basillerdir. DNA'larındaki yüksek G+C (%61-71) oranı ve hücre duvarlarında mikolik asit içermeleri yönüyle *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamurella* gibi diğer cins bakteriler ile benzerlik gösterirler. Mikolik asit bakterinin boyanmasında alkolle renk gidermeye karşı direnç sağlar ve aside dirençli boyanmalarından sorumludur. Koloni morfolojisi türler arasında değişiklik gösterir; pürüzsüzden (smooth) pürüzlüye (rough) ve pigmentsizden (nonkromojen) pigmentliye (kromojen) kadar değişen koloni görünümleri sergilerler [13].

Mikobakteri hücre duvarı, ilk kez 1995 yılında tanımlanmıştır [14]. Hücre duvarı %60 lipit, %15 polipeptit, %25 karbonhidrat içerir. Peptidoglikolipid hücre duvarı, meso-diaminopimelik asit, alanin, glutamik asit, glukozamin, muramik asit, arabinoz ve galaktoz içerir. Mikolik asitler serbest lipidler (örneğin; trehaloz-6,6-dimikolat) ile birlikte hidrofobik geçirgen bir bariyer oluştururlar. Diğer önemli yağ asitleri balmumu maddeleri (wax D), fosfolipidler, mikoserozik ve fitienoik asitlerdir. Hücresel yağ asitlerinin değişik paternleri arasında *Actinomycetales* üyelerinin birkaçının tek bir hücre komponenti olan tüberkülostearik asit bulunur. Hücre duvarının kompleks lipidleri fazla içermesi, yaygın anilin boyalarının geçişini engeller. Gram yöntemi ile kolayca boyanmamalarına rağmen mikobakteriler genellikle gram pozitif kabul edilirler [15].

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı tipik gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzerdir. İçte sitoplazmik membran ve üzerinde kalın bir peptidoglikan tabaka yer alır. Lipoarabinomannan sitoplazmik membrandan köken alarak hücre duvarı boyunca uzanır. Diğer bakterilerden farklı olarak peptidoglikan tabakasında N-asetil muramik asit yerine N-glikolil muramik asit bulunmaktadır. Peptid birimlerinde mezo-diaminopimelik asit (DAP) ve glutamik asit üzerinde birer amid grubu bulunmakta ve diğer bakterilerden farklı olarak inter-peptid bağlar, D-ala-mezo-DAP ve mezo-DAP-DAP bağları bulunmaktadır. Peptidoglikan tabaka üzerinde arabinogalaktan yer alır ve tabakaya fosfodiester bağları ile bağlanmıştır. Fosfodiester bağı duvara esas sağlamlığını vermektedir. Bu yapıya kovalan olarak bağlanan mikolik asit molekülleri mikolat adını alır. Hücre duvarının en dışında mikolik asitlerin yer aldığı tabaka bulunur ve üzerinde serbest lipidler ve polipeptitler yer almaktadır. Yüzey glikolipitleri antijenik özellikleri güçlü olan türe özgü mikozitleri (peptidoglikolipit, oligoliposakkarit), fenolik glikolipitleri ve sulfatidleri içerir [16]. Mikobakterilerin hidrofobik özelliğini arttıran glikolipitler hücre duvarı kuru ağırlığının %25'ini oluştururlar.

Mikobakteri hücre duvarının zengin yapısı bakterinin konak hücrelerine karşı savunmasında önemli rol oynar. Hücre duvar lipidlerinden biri olan 6'6'- trehaloz dimikolat (kord faktör) basillerin paralel diziliminden sorumludur. Çeşitli sitokinlerin salınımına bağlı olarak MTB'nin virülansını arttırdığı polimorf nüveli lökosit migrasyonunu inhibe ettiği, kronik granulom oluşumunu tetiklediği ve adjuvan etki gösterdiği bilinmektedir [16]. Sulfolipidler makrofajlara karşı bakterinin direncini artırırken, mikolik asit içeren glikolipitler aktive olmamış makrofajda fagozom-lizozom füzyonunu engellemektedir. Mikolik asit güçlü bir şekilde hidrofobiktir ve hidrofilik antibiyotiklere, oksidatif hasara ve kompleman birikimine karşı koruma sağlamak için basillerin etrafında bir kabuk oluşturur [14]. Hücre duvarının en dışında bulunan peptid zincirleri de antijenik özellik taşırlar ve hastada gelişen hücresel aşırı duyarlılıktan sorumlu tutulmaktadır [16].

Mikobakterilerin çoğalmaları için gerekli en uygun ısı derecesi, türler arasında geniş çapta değişkenlik göstermektedir (<30-45°C). Diğer bakteriler ile karşılaştırıldığında, mikobakteri türlerinin çoğunun üremesi yavaş olup, yaygın olarak kullanılan besiyerlerinde jenerasyon süreleri yaklaşık 20 saattir. En uygun koşullarda, türlere bağlı olmak üzere gözle görülebilir kolonilerin oluşması için geçen süre birkaç

günden altı haftaya kadar uzayabilir [15]. Üremeleri için albüminden zengin yumurta veya serum temelli besiyerleri gereklidir. *M. tuberculosis* pH 6.0 ile 7,6 arasında üreyebilmektedir. Aerob basiller olmakla birlikte ortamda CO₂ bulunması üremeyi hızlandırır. Mikroaerofilik ortamda bölünmeyen ama canlı basillerin varlığı MTB'nin düşük oksijen basıncını tolere edebildiğini göstermektedir. Basil bu koşullarda yıllarca yaşayabilir fakat fermentatif metabolizmaya dönüşümünün indüklenmesi için minimal oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç duyar [15]. Tüberküloz basilleri çok düşük ısılarla dahi dayanabilmektedir. Canlılığı 2-4°C ile -70°C arasında uzun bir dönem için korunabilir. Güneş ışığı, ısı ve ultraviyole radyasyona ise oldukça duyarlıdır. Balgam veya sıvılarda 30 ile 37°C arasında canlılığını bir hafta içerisinde kaybeder.

Mikobakteriler epidemiyolojik özelliklerine, hastalıkla ilişkilerine ve in vitro üreme özelliklerine göre dört ana gruba ayrılırlar [13]: MTBK, *M. leprae*, *Mycobacterium ulcerans* ve tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM). MTB ve MTBK içindeki yakından ilişkili türler yavaş üreyen bakterilerdir [13]. Klasik olarak TDM'ler üreme hızlarına ve pigmentasyonlarına göre Runyon tarafından dört grupta sınıflandırılmıştır;

Runyon Grup I: Fotokromojenler; Yavaş ürerler ve ışıkla karşılaştıktan sonra pigment üretirler. En önemli türler; *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. intermedium*

Runyon Grup II: Skotokromojenler; Yavaş ürerler ve hem karanlıkta hem ışıktaki pigment üretebilirler. *M. szulgai*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. goodii*.

Runyon Grup III: Nonkromojenler; Işıktaki karşılaşmalar da pigment üretmezler, *M. avium intracellulare*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*.

Runyon Grup IV: Hızlı Üreyenler; Üreme hızları ortalama yedi gündür. *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* [16].

2.1.1. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi

Mycobacterium tuberculosis kompleksi, insanlar da dahil olmak üzere geniş bir memeli spektrumunu enfekte eden ve TB etkeni olan mikobakteri türlerini içermektedir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi üyeleri MTB, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium*

caprae, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii* ve yakın zamanda tanımlanan *Mycobacterium mungi* ve *Mycobacterium orygis*'den oluşmaktadır [13]. Farklı fenotipler ve memeli konak aralıkları ile karakterize edilmelerine rağmen kompleksin üyeleri %0,01 ila %0,03 eşanlımlı nükleotid varyasyonu ile yüksek genetik homojeniteye sahiptirler ve aralarında önemli bir genetik değişim izi yoktur. Tür düzeyinde tanımlama ihtiyacı yalnızca araştırma amaçlı değil, aynı zamanda epidemiyolojik, halk sağlığı ve terapötik nedenler için de gereklidir [15]. Tüberküloz basili terimi, kompleksin diğer üyelerinin insanlarda çok daha nadir patojen olmaları nedeniyle, tüm TB olgularının yaklaşık %98'inde etken olan MTB ile neredeyse eş anlamlı olarak kullanılmaktadır.

2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Tüberküloz hava yolu ile bulaşan enfeksiyon hastalıklarına tipik bir örnektir. En çok akciğerleri tutmakla birlikte tüm organ ve sistemleri tutabilir [7]. Hastaların öksürmesi, hapsırması ve konuşması ile çevreye yayılan ve TB basili içeren 1 ila 5 µm büyüklüğündeki damlacık çekirdeklerinin solunması ile bulaşır [13,17]. En bulaştırıcı hastalar; balgam mikroskopisinde aside rezistan basil (ARB) pozitif, kaviteli akciğer ve larinks tüberkülozu olan hastalardır. Bulaştırma riski kalabalık ve iyi havalanmayan yerlerde artar [18]. Tüberküloz basili ile enfekte olan her kişide mutlaka hastalık gelişmez. Basil ile karşılaşan ancak hastalık belirtileri olmayan kişilerde MTB antijenlerine karşı kalıcı bağışık yanıt gelişir. Bu duruma Latent TB Enfeksiyonu (LTBE) denir [19]. Enfeksiyonu takip eden sürede hastalık en fazla ilk iki yıl içinde görülmekte olup bunu takip eden yıllar içinde hastalanma riski giderek azalmaktadır [18]. Latent TB enfeksiyonu olan kişilerde yaşam boyu aktif TB geçirme riski %10'dur [18]. Bağışık sistemi baskılanmış hastalarda bu risk daha yüksektir. Tüberküloz hastalığı için bilinen risk faktörlerine örnek olarak HIV pozitif olmak, diyabet, silikozis, bağışık sistemi baskılayan tedaviler, yetersiz beslenme, sigara ve alkolün zararlı kullanımı verilebilir [19].

2.2.1. Dünyada Tüberküloz Epidemiyolojisi

Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birini oluşturan 1,7 milyar insanın MTB ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [1]. Küresel olarak TB insidansı ise yüz binde 133'tür [1]. Tüberküloz hastalarının çoğu düşük ve orta gelirli ölkelerde yaşamaktadır. Tüberküloz olguları en fazla küresel yükün de üçte ikisini oluşturan; Hindistan (%27),

Endonezya (%10), Çin (%7,1), Filipinler (%7), Pakistan (%5,7), Nijerya (%4,5), Bangladeş (%3,6) ve Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde (%3) görülmüştür [1]. Tüberküloz erişkinlerde ve erkeklerde daha sık görülür. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2022 yılında yaklaşık 5,8 milyonu erkek (%55), 3,5 milyonu kadın (%33) ve 1,3 milyon çocuk (%12) olmak üzere 10,6 milyon TB vakası olduğu tahmin edilmektedir [1]. 2022 yılında dünyada 1,3 milyon kişi TB nedeni ile hayatını kaybetmiştir.

Tüberkülozda en önemli sorunlardan biri ilaç direncidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2022 yılında küresel olarak 7,5 milyon yeni TB olgusu ve 410.000 kişide ÇİD-TB veya RD-TB olduğu tahmin edilmektedir. Tedavi başarısı ilaca duyarlı TB olgularında %88, ÇİD/RD-TB olgularında ise %63 olarak bildirilmiştir [1]. Tüberküloza ilişkin 2023 yılında düzenlenen ikinci Birleşmiş Milletler üst düzey toplantısında dirençli TB olgularında yönelik önlemler kapsamında ilaç duyarlılık testlerine evrensel, adil ve uygun fiyatlı erişimin sağlanması talep edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü 2023 yılında, ilaca dirençli TB'yi doğrudan balgam örneklerinden tespit etmek için hedeflenen yeni nesil dizilemenin kullanımını değerlendiren bir kılavuz geliştirme grubu oluşturmuş ve temel bulguları vurgulamak için hızlı bir bildiri yayınlamıştır [20]. Yeni nesil dizilemeye dayalı testler, kapsamlı ilaç duyarlılık testine (İDT) doğru atılmış önemli bir adımdır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün tüm üye devletleri ve Birleşmiş Milletler, 2014 ve 2015 yıllarında DSÖ'nün geliştirdiği “TB’yi Bitirme Stratejisini” (End TB) ve “Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedeflerini” benimseyerek TB salgınına sona erdirmeyi hedeflemişlerdir. Bu hedeflerden birisi de 2030 yılına kadar TB epidemisinin bitirilmesidir. Ülkemiz, End TB Stratejisini benimsemiş olup ulusal TB kontrol eylemlerini de bu hedefler doğrultusunda güncelleyerek uygulamaya devam etmektedir [19].

2.2.2. Ülkemizde Tüberküloz Epidemiyolojisi

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün “Türkiye’de Verem Savaşı 2021 raporuna” göre verem savaş dispanserlerine kayıtlı yeni ve nüks olgu sayısına göre hesaplanan insidans 2019 yılında yüz binde 13,5 olarak gerçekleşirken 2020 yılında yüz binde 10,6 olmuştur [16]. Toplam olgu hızı da 2019 yılında yüz binde 13,7, 2020 yılında yüz binde 10,7 olmuş, 2020 yılında 2019’a göre %22 düşüş

göstermiştir. Bu beklenmedik düşüş COVID-19 pandemisinin bir yansıması olarak değerlendirilmiştir [21].

Türkiye DSÖ verilerinde Avrupa Bölgesinde yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 ve 2021 yılı küresel raporlarında Türkiye'nin 2019 yılı tahmini insidans hızı yüz binde 16, 2020 yılı yüz binde 15 ve tahmini mortalite hızı 2019 yılı için yüz binde 0,39, 2020 yılı için 0,55 olarak verilmiştir [16]. Türkiye ÇİD-TB açısından yüksek hastalık yüküne sahip 30 ülke arasında değildir. Küresel TB 2020 raporunda Türkiye'de tahmini RD/ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,4, önceden tedavi görmüş olgularda ise %9,7 olarak verilmiştir [16]. 2021 Raporunda ise bu tahmini değerlere yer verilmemiştir. Ancak 2020 yılı raporunda 2010-2019 yıllarında ülkemizde yeni olgulardaki ÇİD-TB oranının %5 azalma gösterdiği bildirilmiştir [6].

Ülkemiz genelinde 2020 yılında akciğer TB olgularının %91,7'sine mikroskopik inceleme, %90'ına kültür yapılmıştır [21]. Kültür pozitif akciğer TB olgularında İDT yapılma oranı %96,8 iken tüm olgularda bu oran %68,9'dur [21]. Birinci seçenek ilaçlara direnç oranları; tek ilaç olarak en sık H (%5,4) ve S (%4,8) direnci, ikili ilaç olarak HS (%2,4) direnci, üçlü ilaç olarak HRS (%0,7) direnci saptanmıştır. Olgularda toplam direnç oranı %16,7 olarak gerçekleşmiştir [21]. Türkiye'nin 2018 yılı yeni ve nüks olgularında tedavi başarısı %85, 2019 yılı için %83 ve önceden tedavi görmüş olgularında 2018 yılı için %60, 2019 yılı için %54'tür. 2021 yılında verem savaş dispanserlerine kayıtlı hastaların %98,8'nin tedavisi direkt gözetim altında olarak başlanmıştır [21]. Bu oran tedavi başarısını önemli ölçüde etkilemektedir. Ancak ülkemize son yıllarda dirençli TB oranlarının yüksek olduğu Doğu Avrupa ve Türk Devletleri Teşkilatı üyesi ülkelere çok sayıda göçmen gelmiştir. 2019 yılı ÇİD-TB olgularının Türkiye doğumlu olgulardan sonra en sık doğum yeri olan ülkeler Türkmenistan, Kırgızistan ve Özbekistan, 2020 yılında ise Türkmenistan, Somali ve Azerbaycan'dır [21]. Ülkemizde TB tanı ve tedavisi herkes için ücretsizdir. Ancak kayıt dışı göçmenler dirençli TB olgularının kontrolü için bir tehdit oluşturabilirler.

2.3. Tüberkülozun Mikrobiyolojik Tanısı

Tüberküloz tanısında ilk adım hastalığın tipik belirtilerinin aranması ve kuşku durumunda görüntüleme yöntemlerine başvurulmasıdır. Ancak hastalığın kesin tanısı mikrobiyolojik yöntemler ile konur. Günümüzde tıbbi mikrobiyoloji

laboratuvarlarında TB'nin hızlı ve güvenilir tanısına yönelik çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler TB tanısında laboratuvar uygulamalarının önemli bir parçası olmuştur ve ülkemizde de bu yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kültür halen TB tanısında altın standart yöntemdir [17].

Tüberkülozun doğru tanısı için hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın klinik örneğin uygun ve kaliteli olması önemlidir. Bu nedenle TB laboratuvarlarında örnek kabul ve ret kriterlerinin bilinmesi ve uygun örnek gönderilmemesi durumunda klinisyen ile iş birliği yapılması gereklidir.

2.3.1. Örneklerin alınması ve gönderilmesi

Tüberküloz tanısı için laboratuvara hastalığın etkilediği organa bağlı olarak solunum yolu örnekleri, steril vücut sıvıları ve doku örnekleri gönderilmektedir. Basilin izolasyon şansını artırmak için klinik örnekler [17];

- Tercihen anti-TB tedavi başlamadan önce alınmalı,
- Uygun kalitede, yeterli miktarda ve sayıda olmalı, aseptik şartlarda alınmalı,
- Uygun zamanda ve uygun kaplara alınmalıdır. Örnek kapları tek kullanımlık, steril, vida kapaklı, sızdırmaz olmalıdır.

Akciğer ve akciğer dışı TB tanısında kullanılan örnekler ve uygun olmayan örnekler için öneriler Tablo 2.1.'de gösterilmiştir [17].

Tablo 2.1. Tüberkülozun mikrobiyolojik tanısında kullanılan örnekler ve uygunluk durumları

Örnek türü	Uygun örnek	Uygun olmayan örnek	Uygunsuzluk durumunda öneri
Balgam	Ardışık 3 günde aç karnına derin bir öksürükle gelen kıvamlı, en az 3 ml sabah ilk balgam örneği; biri sabah olmak üzere 3 örnek de yeterli olabilir	Örneğin tükürük olması, yetersiz olması, 24 saat biriktirilmiş olması, içinde yiyecek artığı olması, taşıma süresi 3 günü geçmiş örnek	Tekrar örnek almak olanaksız ise kabul edilir, ancak sonuç negatif bulunduğu “yetersiz/uygun olmayan örnek” şeklinde raporda belirtilir

BAL*, Bronş lavajı, endotrakeal/transtrakeal aspirat,	Bronkoskopi örnekleri en az 3 ml olmalıdır	Yetersiz hacimde olması	Örnek, 1 ml gibi çok az miktarda bile olsa kabul edilir; yetersiz olduğu raporda belirtilir
AMS***	Ardışık 3 günde, 8-10 saatlik açlık sonrası sabah hasta yatağından kalkmadan, gastrik tüp ile alınan en az 5 ml, en çok 15 ml örnek	Nötralize edilmeden 4 saatten fazla beklemiş olması	Tekrar örnek almak olanaksız ise kabul edilir, ancak sonuç negatif bulunduğu “uygun olmayan örnek” şeklinde raporda belirtilir
BOS** ve diğer steril vücut sıvıları	BOS en az 2 ml, diğer steril vücut sıvıları en az 10 ml	Yetersiz hacimde olması	Örnek, 1 ml gibi çok az miktarda bile olsa kabul edilir; yetersiz olduğu raporda belirtilir
İdrar	Ardışık 3 günde sabah alınan orta idrar İdrar veremeyen hastalarda kateter idrarı veya suprapubik aspirasyonla alınan idrar	24 saat biriktirilmiş, bekletilmiş idrar, Kateter torbasından alınan idrar	İdrar içeriğinin basillerin canlılığını olumsuz yönde etkilemesi ve diğer mikroorganizmalar ile kontaminasyon nedeniyle reddedilir
Doku biyopsi örneği	Aseptik şartlarda alınan ve fiksatife konmadan steril serum fizyolojik içinde gönderilen en az 1 gram örnek	Yetersiz miktarda olması, gazlı beze/pamuğa sarılmış örnek	Kabul edilir, fakat yetersiz/uygun olmayan örnek olarak raporda bildirilir
Kan ve kemik iliği	Aseptik şartlarda Heparin/SPS içeren steril tüplere ve/veya ticari mikobakteri kan kültür besiyerlerine alınan kemik	Pıhtılaşmış örnek	Kabul edilir, fakat uygun olmayan örnek olarak raporda bildirilir

	iliği veya 5-10 mL kan örneği		
Sürüntü örneği		Sürüntü örneği	Başka örneklerin alınamadığı durumlarda larinks ve yara sürüntü örnekleri işlenir, ancak uygun örnek olmadığı raporda belirtilir

*BAL; Bronkoalveoler lavaj sıvısı, **BOS; Beyin omurilik sıvısı, AMS***; Açlık mide sıvısı

Örneklerin laboratuvara gönderilmesinde aşağıdaki kurallara uyulmalıdır;

- Örnekler, oda ısısında mümkün olan en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Örneklerin laboratuvara ulaştırılması bir saati geçecek ise 24 saate kadar +4°C’de bekletilebilir.
- BOS, kemik iliği, kan örnekleri kesinlikle buzdolabına konulmaz.
- AMS örnekleri 5-15 ml örnek için 100 mg sodyum karbonat ile nötralize edilir ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılır.
- Kurum dışına gönderilecek örnekler için üçlü kap sistemi kullanılmalıdır.

2.3.2. Örneklerin işlenmesi

Mikobakterilerin birçoğu insan mikrobiyota üyelerine göre çok daha yavaş ürer. Bu nedenle solunum yolu örnekleri gibi steril olmayan örneklerde bulunan bakteriler ve mantarlar mikobakteri kültürlerinde aşırı miktarda üreyerek besiyerini kontamine edebilirler. Ancak mikobakteriler lipitten zengin hücre duvarları sayesinde güçlü asit ve alkali maddelere diğer bakterilere oranla dirençlidirler [22]. Bu özelliklerinden yararlanılarak yerleşik mikrobiyotayı ortadan kaldıran, ancak mikobakterilerin canlılıklarını koruyan dekontaminasyon işlemleri geliştirilmiştir. Mikobakteriler güçlü asitlere ve alkalilere karşı dayanıklı olmalarına rağmen tamamen geçirmez değildirler. Bu sert kimyasallara uzun süre maruz kaldıklarında canlılıklarını kaybederler. Bu nedenle dekontaminasyon sürelerine dikkat edilmesi kritik öneme sahiptir.

Balgam, BAL, AMS ve idrar gibi mikrobiyota içermesi muhtemel örneklerin dekontaminasyonu gerekir. Dekontaminasyon için NaOH, okzalik asit gibi kimyasallar kullanılır. Ayrıca örnekteki mukusun ve epitel gibi elemanların arasında bulunan basillerin serbestleşmesini ve homojen halde dağılmasını sağlamak için de NaOH veya N asetil L sistein (NALC) gibi kimyasal maddeler kullanılır [17]. Homojenizasyon dekontaminasyon işlemi için en yaygın kullanılan yöntem NALC-%2 NaOH yöntemidir [13]. Ancak bu yöntem dışında örnek türüne (idrara gibi) ve/veya bilinen hastalık durumuna göre (kistik fibröz gibi) farklı yöntemler de tercih edilebilir.

Homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi sonrası basillerin yoğunlaştırılması için santrifüjleme işlemi uygulanır. Bu amaçla işlenmiş örnekler soğutmalı santrifüjde 3.000xg'lik hızda 15 dakika santrifüjlenir. Steril vücut sıvılarının ve doku örneklerinin işlenmesine gerek yoktur. Sıvılar kültürden önce mutlaka santrifüjlenmelidir. Daha sonra sedimentten mikroskopik inceleme, kültür ve moleküler tanı testleri uygulanabilir.

2.3.3. Mikroskopik inceleme

Mikroskopik inceleme tanı amacıyla ve tedavi alan hastaların izleminde kullanılan basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir [17]. Tüberküloz yükünün yüksek olduğu birçok ortamda, balgamin mikroskopik incelemesi TB belirti ve bulguları ile başvuran bireyleri değerlendirmek için birincil tanı yöntemi olarak kullanılmaya devam etmektedir [23]. Kan dışında bütün klinik örneklerle uygulanabilir. Ancak basilin mikroskopik incelemede saptanabilmesi için yayma yapılan örneğin mililitresinde 5.000-10.000 basil bulunmalıdır. Bu nedenle basil yükü düşük olan akciğer TB olgularında, çocuk hastalarda, HIV pozitif hastalarda ve akciğer dışı TB olgularında ARB görülmeyebilir. Yöntemin özgüllüğünün yüksek olmasına karşın, duyarlılığı örneğin türü ve kalitesine, içerdği basil miktarına, uygulanan yöntem ve okuyucunun deneyimine bağlı olarak %20 ila 85 arasında değişmektedir. Bu nedenle mikroskopik incelemeden sonra mutlaka kültür yapılmalıdır.

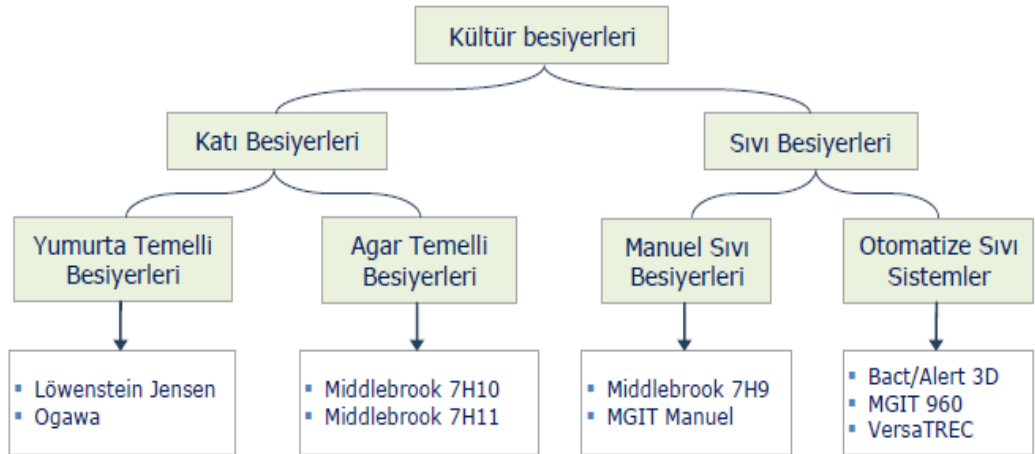
Mikobakterilerin mikroskopik incelemesi için direkt veya işlenmiş örnekten yayma hazırlanabilir. Mikobakterilerin boyanmasında karbol fuksin ve florokrom (floresan) boyama olmak üzere iki farklı yöntem kullanılır. Rutinde en sık karbol fuksin boyama tercih edilmekle birlikte örnek yükü fazla olan ve floresan mikroskop kullanan laboratuvarlarda daha hızlı sonuç vermesi ve daha duyarlı olması nedeni ile florokrom boyama da kullanılmaktadır. Bir preparata negatif diyebilmek için; ışık

mikroskobu ile $\times 1000$ büyütmede en az 300 alan, floresan mikroskobu ile $\times 250$ büyütmede en az 30, $\times 400$ büyütmede en az 70 alan incelenmelidir. Yayma sonuçlarının 24 saat içinde bildirilmesi gerekir [17]. Sonuçlar klinik bulgular ve diğer tanısal testler eşliğinde yorumlanmalı ve kültür ile doğrulanmalıdır. ARB boyamanın kısıtlılıkları şunlardır;

- ARB negatif sonuç hastanın TB olmadığı anlamına gelmez, testin duyarlılığı %20-85 arasında değişkendir.
- Yüksek özgüllüğe rağmen pozitif sonuç hastanın TB olduğu anlamına gelmez, TDM olabilir.
- Canlı/ölü basil ayrımını yapmaz.
- Duyarlı/dirençli basil ayrımı yapmaz.

2.3.4. Kültür

Tüberküloz tanısında altın standart yöntem olan kültür; TB basillerinin üremesine, tanımlanmasına, ilaç duyarlılık testlerine ve epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına olanak sağlar. Kültürde mikobakterilerin üretilmesi için hasta örneklerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması yeterlidir. Mikobakterilerin izolasyon şansını artırmak için katı ve sıvı besiyerinin birlikte kullanımı önerilir [17]. Şekil 2.1’de MTBK kültürü için kullanılan besiyerleri gösterilmiştir.



Şekil 2.1. MTBK kültürü için kullanılan besiyeri çeşitleri

2.3.4.1. Katı besiyerleri

Mikobakterilerin kolonileri ve pigmentasyonları sadece katı besiyerinde görülür. Katı bir besiyeri olan yumurta bazlı Löwenstein Jensen besiyeri (LJ) MTBK'nin üremesi için iyi bir ortam sağlar. Kontaminasyonun önlenmesi için besiyerine %2 malaşit yeşili eklenir. Nalidiksik asit ve penisilin eklenerek hazırlanan modifiye LJ de kullanılabilir. Ancak LJ'de üreme süresi ortalama dört haftadır [24]. Negatif sonuç vermek için sekiz hafta enkübasyon gerekir. *M. tuberculosis*, LJ'de deve tüyü renginde, kuru, düzensiz koloniler yapar. Agar bazlı besiyeri olan Middlebrook 7H10/7H11 besiyerlerinin içeriği basit olduğundan kontaminasyon daha az görülür. Ayrıca agar bazlı besiyerleri şeffaf olduğu için “ince tabakalı agar” (thin layer agar) tekniği ile mikroskop altında incelendiğinde 1-2 hafta içinde MTBK mikrokolonileri izlenebilir [13,25]. Ancak agar bazlı besiyerleri ışığa duyarlıdır ve ışık ile karşılaştığında ortamda MTBK'nin üremesini inhibe eden formaldehit oluşur [17]. Ayrıca üretme özelliğini kazanabilmesi için içine oleik asit, albümin, dekstroz ve katalaz (OADC) eklenmesi ve %5-10 CO₂'li ortamda enkübe edilmeleri gerekir. Bu durum maliyeti artırır.

İnokülumun eşit dağılımını sağlamak için tüpte hazırlanan LJ, vidalı kapakları gevşek bir şekilde en az bir hafta boyunca eğimli bir pozisyonda enkübe edilmelidir [13]. Daha sonra besiyerinin buharlaşmasını ve kurumasını en aza indirmek için tüpler, kapakları sıkılarak dik olarak yerleştirilebilir. Middlebrook 7H10/11 agar ise plakta hazırlanır. Plaklar ideal olarak CO₂ geçirgen plastik torbalara yerleştirilir veya CO₂ geçirgen bantla kapatılır. Eğer inokülumun tamamı emilmemişse plaklar besiyeri tarafı aşağı bakacak şekilde enkübe edilmelidir. Katı besiyerlerinde koloni görünümü oluştuğunda ARB Boyama yapılır, ARB görülürse ve kontaminant bakteri yoksa MTBK ve TDM ayrımı için gerekli testler uygulanır.[13]

2.3.4.2. Sıvı besiyerleri

Son yirmi yılda geliştirilen sıvı besiyerlerinde üreme süresi ortalama iki haftadır. Bu süre katı besiyerindeki üreme süresine oranla çok daha kısadır ve daha erken tanıya olanak sağlar. Ayrıca katı besiyerlerine oranla %10 daha duyarlı oldukları gösterilmiştir [26]. Bu nedenle otomatize sıvı kültür sistemleri günümüzde TB tanısı ve ilaç direnç testi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Otomatize sıvı kültür sistemleri mikobakterilerin üremesine bağlı olarak oksijen, CO₂ veya radyoaktivitedeki değişiklikleri tespit eder. Örneğin BACTEC MGIT 960 sisteminde kullanılan MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) kültür tüpünün dibindeki silikonun içine çözünmüş oksijenin varlığına duyarlı olan bir floresan bileşiği gömülüdür [13]. Başlangıçta, büyük miktarda çözünmüş oksijen, bileşikten floresan emisyonlarını söndürür ve çok az floresan tespit edilebilir. Daha sonra, üreme olan şişelerde oksijenin azalması ile floresan serbest kalarak sinyal oluşturur. BACTEC MGIT 960 cihazı, tüpteki floresan artışını sürekli olarak izler ve bunu üreme birimleri GU (Growth Unit) olarak kaydeder. Bu değer önceden ayarlanmış bir eşiğe ulaştığında, cihaz tüpü pozitif olarak bildirir. Pozitif tüplerden kontaminasyon kontrolü için kanlı agara alt kültür ve ARB yayma yapılır. Yaymada kord oluşumunun gözlenmesi MTBK için önemli bir ipucudur. Kanlı agarda kontaminasyon yoksa ve yaymada ARB izleniyorsa MTBK ve TDM ayırımı için gerekli testler uygulanır [24]

Sıvı besiyerinde kontaminasyon oranı katı besiyerine oranla daha fazladır. Katı besiyerinde kabul edilebilir kontaminasyon oranı %3-5 iken sıvı besiyerinde bu oran %5-10'dur [17]. Kontaminasyonu önlemek için besiyerine ekimden önce antimikrobiyal karışım olan PANTA (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) eklenir. Ancak PANTA bazı mikobakteri türlerinin üremesini baskılayabilir [24].

2.3.5. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks'in tanımlanması

Kültürde üreyen ARB'nin tür düzeyinde tanımlanması gereklidir. Laboratuvar düzeyine göre tüm mikobakteriler tür düzeyinde tanımlanamayabilir. Ancak en azından MTBK-TDM ayırımı yapılmalıdır [17].

Mycobacterium tuberculosis kompleks'in kültürden tanımlanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler bakterinin üreme özelliklerine, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine dayalıdır [27]. Bu testler zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca kesin tanımlama için birkaç testin bir arada uygulanması gerekir. Ancak maliyetleri düşüktür. Bakteri hücre duvarında bulunan mikolik asit analizine dayalı HPLC (High Performance Liquid Chromatography) yöntemi ise uygulama zorluğu ve ekipman gereksinimi nedeni ile TB laboratuvarlarında uygulama alanı bulamamıştır [17]. Günümüzde bu yöntemlerin

yerini hızlı genotipik yöntemler, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) ve immünokromatografik testler almıştır.

2.3.5.1. Fenotipik yöntemler

- Üreme özellikleri

M. tuberculosis kompleks katı besiyerinde yedinci günden sonra ürer. Pigment yapmayan, deve tüyü renginde düzensiz koloniler oluşturur. Sıvı kültürden yapılan ARB boyamanın incelenmesinde yılanvari, halat benzeri yapılar (kord oluşumu) görülür. Üreme özellikleri bakterinin ön tanımlanmasında MTBK-TDM ayırımına yardımcı olmakla birlikte, MTBK'nin kesin tanısı için yeterli değildir [17].

- Biyokimyasal testler

M. tuberculosis kompleks'in tanımlanmasında üç anahtar biyokimyasal test vardır; Niyasin, nitrat redüksiyonu ve katalaz testleri. Tanımlamada üç test bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTBK-TDM ayırımı yapamazlar. Bu testler içinde niyasin testi daha değerlidir. Çünkü MTB dışında niyasin testi pozitif olan mikobakteri sayısı çok azdır. *M. tuberculosis* kompleks'in niyasin ve nitrat redüksiyonu testi pozitif, katalaz testi negatiftir. Paranitrobenzoik asitli besiyerinde üremez [17].

2.3.5.2. Genotipik yöntemler

Kültürde üreyen mikobakterilerin genotipik tanımlanmasında kullanılan yöntemler prob hibridizasyon, ters hibridizasyon ve DNA dizileme yöntemleridir [11,13,17]. Ekipman, donanım ve deneyimli personel gerektiren PZR (polimeraz zincir tepkimesi) restriksiyon enzim analizi ise daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

- Prob hibridizasyon yöntemi

Problar, farklı boyutlara sahip, 50 bp'den kısa oligonükleotidlerdir. Bakterilerdeki rRNA sayıca çok olduğundan problar için uygun bir hedeftir. Ayrıca rRNA dizileri hiper değişken bölgelere ek olarak korunmuş bölgeleri içerir, bu da prob dizisine bağlı olarak tanımlama düzeyinin değişmesine izin verir. Ticari olarak MTBK, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. avium* kompleks, *M. gordonae* ve *M. kansasii* 'yi tanımlayan problar vardır [13]. Fenotipik yöntemlere göre kısa sürede daha doğru

sonuç vermekle birlikte prob hibridizasyon yöntemi ile yalancı negatif ve yalancı pozitif sonuçlar ortaya çıkabilir. Mikobakteri türleri arasındaki benzer diziler yanlış pozitif sonuca, prob ile hibritleşmeyi önleyen polimorfizmler ise yanlış negatif sonuca yol açar. Diğer dezavantajları ise problemlerin sınırlı sayıda mikobakteri türünü tanımlaması ve doğrudan klinik örnekten çalışılamamasıdır.

- Ters hibridizasyon yöntemi (Line probe assay)

Kültür izolatından amplifiye edilmiş biyotinle işaretli PZR ürünlerinin, nitroselüloz şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi temeline dayanır. GenoType MTBC, GenoType NTMDR, GenoType *Mycobacterium* CM, GenoType *Mycobacterium* AS gibi ters hibridizasyon testleri rutin uygulamalarda mikobakterileri hızlı bir şekilde tanımlamak için birincil yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem ile tek aşamada MTBK ve potansiyel patojen birçok mikobakteri türünü ve MTBK içindeki türleri ayırt etmek olasıdır [13].

- DNA dizileme yöntemi

Polimeraz zincir reaksiyon temelli deneyler ile yapılan çalışmalar karışık bir popülasyonda tüm bileşenlerin başarılı bir şekilde saptanması için popülasyon içindeki her bir mikobakteri türünün en az %20 olması gerektiğini göstermiştir. Bu nedenle, türlerin tanımlanmasında en güvenilir yöntem dizileme yöntemleridir [11]. DNA dizi analizi için birçok hedef kullanılır. Ancak 16S rRNA geni en yaygın kullanılan hedeftir. Tüm gen, korunmuş ve değişken bölgeleri de dahil olmak üzere 1,550 bp'dir, ancak 500 bp kullanılarak ayırt edici bir dizi elde edilebilir. Bazı mikobakteri türleri 16S rRNA gen dizilemesine göre ayırt edilemez. Bu durumda diğer genlerin, örneğin ITS (internal transcribed spacer), *rpoB*, *secA*, veya *hsp65* genleri incelenmelidir. *M. tuberculosis* kompleksi içindeki türleri ayırmak için *gyrB* dizi analizi veya delesyon analizi gereklidir [13].

Türlerin tanımlanmasında en güvenilir yöntem dizileme yöntemleridir [11]. Dizi verileri değerlendirilirken önce elde edilen dizinin kalitesi değerlendirilir ve ardından bilinen dizilerle karşılaştırma yapılır. Bunun için NCBI GenBank, MicroSeq, Integrated Database Network System veya RipSeq gibi genel ve/veya ticari veri tabanları kullanılır. Tür düzeyinde tanımlama için %100 özdeşlik gereklidir [13]. Tanımlama sonucu %99,0-%99,9 güvenilirliğe sahip ise “(türler) ile en yakından ilişkili olan Mikobakteri” olarak bildirilmelidir. Özdeşlik %95,0-%98,9 ise, yalnızca cins düzeyinde veya “(16S rRNA) gen dizilimi ile kesin olarak tanımlanamıyor,

Mycobacterium spp ile en yakından ilişkili" yorumuyla bildirilmelidir. Ayrıca, MTBK dışlanabiliyorsa, etkenin “MTBK dışında bir mikobakteri türü olduğu” gibi ek bir bilgi rapora eklenmelidir.

2.3.5.3. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS, mikobakteri suşlarının tanımlanmasında giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır [13]. MALDI-TOF MS, parçacıkların iyonize edildiği, kütle-yük oranlarına göre ayrıldığı ve belirli bir sürenin sonunda iyonların bir dedektöre gitmesi için geçen sürenin belirlenerek ölçüldüğü analitik bir tekniktir. İnceleme sırasında X eksenini boyunca kütle-yük değerleri ve y eksenini boyunca yoğunluk içeren bir spektrum ortaya çıkar. Spektral veriler daha sonra organizmanın olası kimliğini belirlemek için bir veri tabanı ile karşılaştırılır. MALDI-TOF MS'nin doğruluğu hem veri tabanının sağlamlığına hem de elde edilen spektrumların kalitesine bağlıdır. Mikobakterilerin karmaşık hücre duvarlarından dolayı kaliteli spektrumların elde edilmesi zor olabilir. Bu nedenle, koloninin doğrudan hedef plakaya uygulanması yerine boncuklar ile dövülmesini içeren bir ön ekstraksiyon adımının gerçekleştirilmesi gerekir [13].

MALDI-TOF MS yavaş ve hızlı üreyen mikobakterilerin tanımlanmasında güvenilir sonuçlar verir. Ancak *M. abscessus* kompleks'in alt türleri ve MTBK üyeleri MALDI-TOF MS ile ayırt edilememektedir. Yavaş üreyen mikobakterileri araştırırken, MALDI-TOF MS tanımlaması için yeterli biyokütle biriktirmek amacıyla genellikle 14 ila 21 günlük kültürler kullanılır. Ancak bu durum tanımlama süresinin uzamasına yol açar.

2.3.5.4. İmmünokromatografik yöntem

Bu yöntem MTBK'ye özgü bir antijen olan MPT64 antijeninin monoklonal antikorlar kullanılarak yatay akış testi (lateral flow assay) ile belirlenmesine dayanır [13]. Kısa sürede MTBK-TDM ayrımının yapılabildiği, kolay, güvenilir ve ucuz bir testtir. Katı veya sıvı kültürden çalışılabilir. Ancak MPT64 proteinini kodlayan gende mutasyon olması durumunda, bazı *M. bovis* BCG izolatlarında ve *M. africanum* varyantlarında negatif sonuç verebilir [13].

2.3.6. Tüberkülozun moleküler tanısı

Tüberkülozun erken tanısı hastalığın kontrolü ve tedavi başarısında büyük önem taşır. Tüberküloz basilinin üreme hızının yavaş olması mikrobiyolojik tanıda altın standart olan kültürün geç sonuç vermesine neden olur. Mikroskopik inceleme ise hızlı sonuç vermekle birlikte duyarlılığı düşüktür ve MTBK ile TDM'yi ayırt edemez. Bu nedenle moleküler yöntemler tüberkülozun hızlı ve güvenilir tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüberküloz tanısında kullanılan yöntemler ve sonuçlanma süreleri Tablo 2.2.'de gösterilmiştir [11].

Tablo 2.2. Tüberküloz tanı yöntemleri ve sonuçlanma süreleri

Test		Süre
I	Klinik örnekten NAAT ile tanı	1 gün
II	Klinik örnekten veya izolattan NAAT ile direnç	1-2 gün
III	ARB boyalı mikroskopik inceleme	1 gün
IV	Kültür	6-8 haftaya kadar
	Sıvı besiyeri	Ortalama 10-14 gün
	Katı besiyeri	Ortalama 3-4 hafta
V	Kültürden tanımlama; prob hibridizasyon, ters hibridizasyon, DNA dizileme	1 gün
VI	Sıvı besiyerinde 1. seçenek ilaçlara direnç testi	1-2 hafta
VII	İkinci seçenek ve yeni ilaçlara direnç testi	
	Sıvı besiyeri	1-2 hafta
	Katı besiyeri	3-4 hafta

NAAT: nükleik asit çoğaltma testi

Dünya Sağlık Örgütü 10 yılı aşkın süredir TB tanısında hızlı moleküler yöntemlerin klinik örnekten tanı ve rifampisin direncinin saptanması için kullanılmasını önermektedir [23]. Tüberküloz tanısında moleküler yöntemler başlıca üç amaçla kullanılırlar;

1. Klinik örnekten tanı
2. İlaç direncinin saptanması
3. Genotiplendirme

2.3.6.1. Klinik örnekten tanı

Klinik örnekten TB tanısı için farklı gen bölgelerini hedef alan NAAT'leri kullanılır. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi ile son yıllarda bu yöntemler de klinik örnekten tanı amacı ile kullanılmaya başlamıştır[11]. Rutin laboratuvar uygulamalarında ticari kitler kullanılmaktadır. Bu testlerde eş zamanlı olarak R ve/veya H direnci saptanabilir. Dünya Sağlık Örgütü akciğer TB kuşkulu hastaların ilk solunum yolu örneğinden başlangıç testi olarak NAAT kullanımını önermektedir [23]. Yayma pozitif örneklerde NAAT duyarlılık ve özgüllük değerleri sırası ile %96 ve %85 iken, yayma negatif örneklerde bu değerler %66 ve %98'dir [28]. Ticari NAAT'lerinin çoğu sadece solunum yolu örnekleri için onaylanmıştır. Ancak akciğer dışı TB tanısı için de yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Klinik örnekten NAAT'leri tek başına uygulanmamalı, mikroskopik inceleme ve kültürün yerini almamalıdır [7,11,17]. Yayma ve NAAT sonuçları birlikte değerlendirilmelidir. Yayma pozitif, NAAT negatif bir sonuç örnekte TDM varlığını düşündürebilir. Aynı zamanda NAAT'leri ölü ve canlı basilleri ayıramadığından kültürün yerini alamazlar. Bu nedenle tedavi takibinde de kullanılamazlar. Ülkemizde NAAT'lerin kullanım endikasyonları maliyetleri de göz önüne alınarak aşağıdaki şekilde belirlenmiştir [7];

1. HIV ile ilişkili TB kuşkulu olgular
2. BOS, bronkoscopi örnekleri, biyopsi örnekleri gibi zor elde edilen örneklerde klinik tanıyı desteklemek için

Günümüzde TB tanısı için en sık kullanılan NAAT yöntemleri ve ticari testlere örnekler aşağıdadır [23];

1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi
Xpert MTB/RIF ve Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid), BD MAX MDR-TB (Becton Dickinson), FlouroType MTB (Hain Lifescience/Bruker), Abbott RealTime MTB (Abbott), Cobas MTB (Roche)
2. İzotermal çoğaltma yöntemleri
Loop-mediated" izotermal çoğaltma; TB-LAMP (Eiken)
Transkripsiyon aracılı amplifikasyon; E-MTD (GenProbe)
3. Ters hibridizasyon yöntemi
Genotype MTBDRplus sürüm 1 ve sürüm 2 (Hain Lifescience/Bruker)

Klinik örnekten moleküler tanı için kullanılan testler MTBK tanımlamasına yöneliktir. Diğer mikobakteri türlerinin ayırt edilmesi genellikle kültürde üreme olduktan sonra LPA veya DNA dizileme yöntemleri ile yapılır.

2.3.6.2 İlaç direncinin saptanması

Tüberkülozda ilaç direnci tedavi başarısını büyük ölçüde etkiler. Dirençli olguların erken tanısının ve direnç testi sonuçlarına dayalı tedavinin verilmesinin HIV pozitif hastalarda bile mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir [29]. Bu nedenle moleküler yöntemler ile ilaç direncinin erken tanısı TB kontrolü için çok önemlidir. Fenotipik direnç testleri altın standart yöntemler olarak kabul edilmekle birlikte sonuçlanmaları örnek alındıktan sonra 4-12 hafta gibi uzun süre gerektirir. Moleküler testler ise direkt klinik örnekten çalışıldığında 1-2 gün içinde sonuç verir. Ayrıca kontamine örnekler ile de çalışmak mümkündür [11].

Fenotipik direnç testleri zaman alıcı olduğundan DSÖ hızlı tanı rehberinde TB kuşkulu hastalarda direkt klinik örnekten başlangıç testi olarak tek başına rifampisin veya rifampisin ile izoniyazid direncinin moleküler yöntemler ile test edilmesini önermektedir [23]. Ülkemizde kullanılan Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi'nde moleküler direnç testlerinin, direnç kuşkusu olan hastalarda yapılması önerilmiştir[7]. Dirençli TB kuşkusu olan hasta grubu şunlardır;

1. Daha önce tedavi öyküsü olanlar
2. Önceden tedavi olmuş hasta ile temas öyküsü olanlar
3. Yüksek direnç oranı olan ülke veya bölgelerden gelenler
4. ÇİD-TB temaslı hastalar
5. Tedaviye iyi yanıt vermeyen hastalar
 - a. Tedavinin üçüncü ayında hala yayma pozitif hasta
 - b. Tedaviye klinik yanıt vermeyen hasta

Moleküler olarak rifampisine dirençli bulunan hastalarda refleks test olarak mutasyonun ikinci bir moleküler testle veya DNA dizi analizi ile doğrulanması önerilmektedir [30]. Üreme olduktan sonra fenotipik ilaç duyarlılık testleri de uygulanmalıdır.

2.3.6.3. Genotiplendirme

Tüberküloz basillerinin genotiplendirilmesi, mikroorganizmanın evrimi, direnç gelişimi ve hastalığın epidemiyolojisi hakkında bilgilerimizin artmasında önemli bir araç olmuştur [31]. Genotiplendirmenin temel prensibi etkenin DNA'sının incelenerek, suşlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılmasıdır. Bunun için DNA'da bulunan bazı genetik belirteçler kullanılır. Bu bir anlamda etkenin parmak izinin (fingerprinting) çıkarılmasıdır. DNA yapıları benzer olan, yani küme oluşturan suşların aynı kaynaktan kazanılmış olduğu düşünülür. Tüberkülozun genotiplendirmesine ilişkin çalışmaların uygulama alanları aşağıda özetlenmiştir [32];

1. Tüberküloz basilinin bulaş zincirine ilişkin çalışmalar

- a. Yeni bulaşların tanımlanması, kuşkulu salgının doğrulanması,
- b. Belirli insan topluluklarında veya kurumda bulaşın değerlendirilmesi
- c. Tüberküloz enfeksiyonunun gelişmesine ilişkin risk faktörlerinin tanımlanması

2. Endojen reaktivasyon/ekzojen reenfeksiyon ayrımının yapılması,

3. Laboratuvar da çapraz bulaşın saptanması,

4. Suşların coğrafik dağılımının belirlenmesi,

5. Farklı kurumlarda ilaç direnç sıklığının belirlenmesi,

6. Hastalar arasında ya da aynı hastada ilaca dirençli TB gelişiminin izlenmesi

7. Hastalarda farklı suşlar ile karışık enfeksiyon olup olmadığının aranması,

8. İleri çalışmalar için kullanılacak suşlarının toplanması,

9. Suşa özgü bulaş/enfeksiyon hızı oranlarının saptanması,

10. Çalışılan toplumda baskın suşların belirlenmesi,

11. Toplumda virülansı yüksek olan suşların tanımlanması,

12. Tüberküloz basilinin evriminin incelenmesi.

M. tuberculosis suşlarını en doğru ayırt edebilecek yöntem her bir suşun DNA'sının bütünü dizi analizini çıkarmaktır. Ancak bu yöntem maliyetli olduğundan genotiplendirme çalışmalarında sıklıkla bakteri genomunda bulunan ve tekrarlayan DNA dizileri analiz edilir [32]. Tüm canlıların genomlarında tekrarlayan diziler vardır. Bakteri genomunda bulunan bu diziler, dağılmış tekrarlar (interspersed

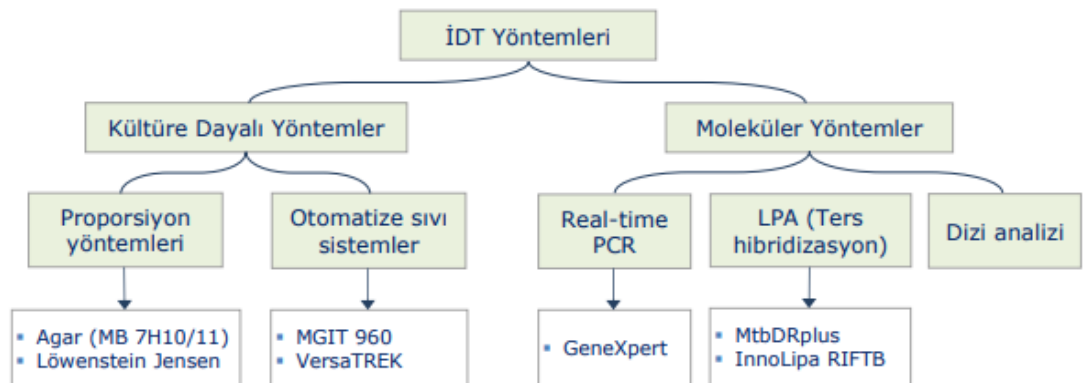
repeats) ya da ardışık tekrarlayan (tandem repeats) diziler şeklinde olabilmektedir. Tekrarlayan DNA dizileri epidemiyolojik ve evrimsel ilişkilerin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir [32,33]. Günümüzde en çok kullanılan genotiplendirme yöntemleri;

1. IS6110 “restriction fragment length polymorphism” (IS6110-RFLP)
2. “Mycobacterial interspersed repetitive unit” (MIRU-VNTR)
3. “Spacer-oligonucleotide typing”dir (spoligotipleme)
4. DNA dizileme

Genotiplendirme yöntemlerinin her biri avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Ancak maliyet sorunu dışında günümüzde en güvenilir yöntem DNA dizileme yöntemi olarak kabul edilmektedir [31]. DNA dizileme yöntemlerinin direkt klinik örnekten 24-48 saat içinde sonuç verecek şekilde geliştirilmesi, maliyet ve biyoinformatik problemlerinin çözülmesi ile kullanım yaygınlığının artacağı düşünülmektedir [17].

2.4. İlaç Duyarlılık Testleri

Tüberkülozda ilaç direnci tedavinin başarısını ve hastalığın kontrolünü olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle her hastada kültürde üreyen ilk suştan standart tedavide kullanılan birinci seçenek ilaçlara duyarlılık testi yapılması gereklidir[17]. İlaç duyarlılık testlerinde kültüre dayalı fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılır. Şekil 2.2’de antitüberküloz ilaçlar için kullanılan duyarlılık test yöntemleri gösterilmiştir [17].



Şekil 2.2. Antitüberküloz duyarlılık yöntemleri

2.4.1. Kültüre dayalı duyarlılık testleri

Tüberküloz basillerinde ilaç direnci spontan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu nedenle hastalığı oluşturan basil popülasyonu içinde çok düşük oranda dirençli mutantlar bulunabilir. Fenotipik ilaç duyarlılık testleri, dirençli mutantlar belli bir oranın üzerinde olduğunda ilacın tedavide etkili olamayacağı temeline dayanır [17]. Direnç oran yöntemi, mutlak konsantrasyon yöntemi ve proporsiyon yöntemi bu temele dayanır. Ancak inokulum standardizasyonundaki sorunlar ve uygulama zorlukları nedeni ile direnç oran yöntemi ve mutlak konsantrasyon yöntemi tercih edilmemektedir [34].

2.4.1.1. Proporsiyon yöntemi

Günümüzde yaygın olarak kullanılan proporsiyon yönteminin amacı bir ilacın besiyerinde bulunan belli bir konsantrasyonuna (kritik konsantrasyon) dirençli olan bakterilerin oranının (kritik proporsiyon) %1'in üzerinde olup olmadığını saptamaktır [17]. Test edilecek bakteri suşu değişik dilüsyonlarda (10^{-2} - 10^{-4}) standardize edilerek ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine ekilir. Kontrol besiyerine inoküle edilen bakteri miktarı ilaçlı besiyerine göre 100 kat daha azdır. Kritik konsantrasyonda ilaç içeren besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Bu oran %1 veya daha yüksek ise test edilen suş o ilaca karşı dirençli olarak rapor edilir. Bu kavram hastadaki bakteri popülasyonunu temsil edecek kadar katı besiyerinde üreyen kolonilerden çalışma yapıldığında geçerlidir. Ticari otomatize sıvı kültür sistemlerinde de benzer şekilde proporsiyon yönteminin prensibi temel alınmaktadır [17,34].

İlaç duyarlılık testleri direkt örnekten veya indirekt kültürde üreyen suştan yapılabilir. Ancak direkt testte kontaminasyon olasılığı yüksektir. Kültürden yapılan indirekt test ise zaman alıcı olmakla birlikte başarı oranı yüksektir. Kültüre dayalı yöntemlerde antibiyotikli besiyerlerinde test için bulundurulması gereken kritik ilaç konsantrasyonları kullanılan yöntem, besiyerine ve test edilen antibiyotiğe göre farklılık göstermektedir [17,35]. Katı besiyeri olarak; Löwenstein Jensen besiyeri, Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11 agar, sıvı besiyeri olarak Middlebrook 7H9 broth kullanılabilir [17]. Tablo 2.3'te kullanılan besiyerine göre birinci seçenek ilaçların kritik konsantrasyon değerleri gösterilmiştir [36].

Tablo 2.3. Birinci seçenек antitüberküloz ilaçların farklı besiyerlerinde kritik konsantrasyon değeri (µg/ml)

İlaç	Besiyeri		
	Löwenstein Jensen	Middlebrook 7H9 broth (MGIT)	Middlebrook 7H10 agar
Streptomisin	4.0 (KP* %10)	1.0	2.0
İzoniiazid	0.2	0.1	0.2
Rifampisin	40.0	1.0	1.0
Etambutol	2.0	5.0	5.0
Pirazinamid	-	100	-

*KP; kritik proporsiyon

Agar proporsiyon yöntemi iyi standardize edilmiş güvenilir bir yöntemdir ve CLSI tarafından referans yöntem olarak kabul edilir [37]. Löwenstein Jensen proporsiyon yöntemi ise ekonomik olması nedeni ile kullanılan bir yöntemdir. Duyarlılık testlerinde katı besiyerinde üremiş dört haftadan daha eski olmayan koloniler kullanılır [17]. Ancak bu yöntemler zaman alıcıdır. Sıvı besiyerinde kültüre dayalı otomatize yöntemler ise sonuç alma süresini önemli derecede kısaltır. Tam otomatize sıvı kültür sistemleri içinde duyarlılık testi için en yaygın kullanılanlar şunlardır;

1.BACTEC MGIT 960 sistemi

Klinik örneklerdeki mikobakterileri sıvı besiyerinde oksijen tüketimine bağlı olarak floresan yöntemi ile saptar. Kültür tüplerinde modifiye Middlebrook 7H9 broth ve büyüme faktörleri bulunur. Tüplerin dip kısmı oksijene duyarlı rutenyum kompleksi emdirilmiş silikon bir tabaka ile kaplıdır [38]. Kullanılan sistemde tüp içindeki oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen UV ışını ile floresans ışına oluşmaz. Ancak üreme olması durumunda oksijenin kullanılmasına bağlı olarak artan CO₂ sonucu floresans ışına olur. Saptanan floresans üreme indeksi olarak değerlendirilir. Direncin %1 oranını tayin etmek için kontrol şişesinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı şişedekinden 100 kat daha azdır. Duyarlı bakteriler ilaçlı tüplerde inhibe olurken, dirençli bakteriler üreyerek floresans verir. Bu sistemle birinci seçenек ve bazı ikinci seçenек anti-TB ilaçlar için ilaç duyarlılık testi yapılabilir [15, [39,40].

2.VersaTREK sistemi

VersaTREK, mikobakterilerin kültür ve ilaç duyarlılık tespiti için kullanılan otomatize bir sistemdir [24]. İçerisinde modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 broth ve selüloz sünger içeren kültür şişeleri kullanılır. Cihaz, şişelerin başlık alanındaki gaz basıncını sürekli olarak izler. Mikroorganizmaların üremesi ile tükenen oksijen, gaz basıncında değişikliklere neden olur ve bu da cihaz tarafından tespit edilir. Standart bakteri süspansiyonu, ilaçlı VersaTREK Myco şişesine ve ilaçsız kontrol şişesine aktarılır. Test, kontrol şişesi pozitif sinyal verdikten üç gün sonra sonlandırılır. Bu süre zarfında herhangi bir ilaç içeren şişenin pozitif olması, test suşunun o ilaca dirençli olduğunu gösterir [24].

3.BacT/ALERT 3D sistemi

BacT/ALERT 3D, kolorimetrik ve tam otomatik bir sistemdir. Modifiye Middlebrook 7H9 broth, sığır serum albümini, katalaz ve kazein içeren BacT/ALERT MP şişeleri kullanılmaktadır [41]. Mikobakterilerin çoğalması sonucu şişede üretilen CO₂, şişenin altındaki sensörün renginin yeşilden sarıya değişmesine neden olur [42]. Bu renk değişikliği, yansıyan ışık yoğunluğundaki değişiklikler olarak algılanır ve veriler bir veri tabanı tarafından toplanarak analiz edilir [41].

2.4.2. Moleküler duyarlılık testleri

Kültüre dayalı ilaç duyarlılık testleri altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte zaman alıcı ve teknik açıdan zordur. Günümüzde özellikle rifampisin direncinin belirlenmesinde moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır [35]. Moleküler duyarlılık testlerinde MTBK DNA'sındaki ilaç direncinden sorumlu olduğu bilinen mutasyonlar aranır. Bazı mutasyonlar ilaç-hedef etkileşimini etkilemeden polimorfik değişikliklere neden olarak sessiz kalabilir [29]. İzolatların %10-40'ında ise -direnç mekanizması bilinmemektedir [43]. DNA dizileme yöntemlerinin yaygınlaşması ile dirençten sorumlu yeni mutasyonlar gösterilmeye başlanmıştır.

Moleküler direnç yöntemlerinin bazı kısıtlı yönleri vardır [11]. Bu testlerde sessiz mutasyonlar yanlış direnç sonucu verebilir. Ayrıca ticari testlerde saptanamayan ve dirence yol açan mutasyonlar olabilir. Bazı mutasyonlar ise düşük düzeyde dirence yol açabilir. Bu olgularda yüksek dozda ilaç kullanılarak tedaviye yanıt alınabilir.

Rifampisine dirençten sorumlu mutasyonlar çok iyi bilinmektedir [43]. Rifampisine dirençli suşların %95'inden fazlasında *rpoB* geninin 81 bp'lık bir (507-533) bölgesinde (RRDR; rifampisin direncini belirleyen bölge) mutasyonlar vardır. Bu mutasyonlar RNA polimerazın ilaca olan affinitesini azaltır. Bu durumda genellikle yüksek düzeyde direnç ortaya çıkar ve tüm rifamisinlere direnç vardır. Bununla birlikte 522, 516, 518 ve 522. kodonlardaki özgül mutasyonlar rifampisin ve rifapentine düşük dirence yol açabilir ve RFB ve rifalazil duyarlı kalırlar [44]. Rifabutin bu durumda kombine tedavide bir seçenek olarak kullanılabilir. Ancak diğer ilaçlar için bu ilişki henüz bilinmemektedir.

Bazı anti-tüberküloz ilaçlar arasında çapraz direnç görülebilir. Örneğin izoniyazid ve etiyonamid arasında, ikinci seçenek ilaçlardan florokinolonlar için ve enjekte edilen ilaçlar için çapraz direnç bildirilmiştir [45]. Tablo 2.4'te çapraz dirence eşlik eden genetik mutasyonlara örnekler gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Antitüberküloz ilaçlara karşı çapraz direnç ile ilişkili genler ve örnek mutasyonlar

Çapraz direnç	Gen bölgesi	Örnek mutasyonlar
Rifampisin, rifabutin	<i>rpoB</i>	Q513E, Q513K, Q513L, Q513P, S531L, S531F, S531W, H526D, H526Y, H526R, D516A + R529Q
İzoniyazid, etiyonamid	<i>inhA</i>	c-15t
Amikasin, kanamisin, kapreomisin	<i>rrs</i>	a1401g, a1484t
Bedakuilin, klofazimin	<i>Rv0678</i>	S63R, R134Stop
	<i>pepQ</i>	A14ins c, R271del c, L44P
Siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin	<i>gyrA</i>	G88C, A90V, S91P, D94N, D94G, D94Y, N538D, E540V
	<i>gyrB</i>	R485C + T539N
Levofloksasin, ofloksasin	<i>gyrB</i>	D500H, D500N

2.4.3. İlaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler ve ticari testler

Dünya Sağlık Örgütü tüberkülozu bitirme stratejisi hedeflerine ulaşmak için tüm ortamlarda tanı ve R direncinin belirlenmesi için ilk tanı testi olarak moleküler hızlı testlerin kullanılmasını önermektedir [23].

Klinik örnekten veya izolattan moleküler direnç testlerinde kullanılan başlıca yöntemler şunlardır [11];

1. Gerçek zamanlı PZR
2. Ters hibridizasyon yöntemi
3. DNA dizileme yöntemi

2.4.3.1 Gerçek zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR, hızlı tanı testlerinin geliştirilmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, genellikle iki temel yaklaşım benimsenir. İlk yaklaşım, amplifikasyon sonucunda oluşan herhangi bir çift sarmallı DNA'nın spesifik olmayan floresan boyalar ile saptanmasıdır. Etidyum bromür, syber green veya eva green gibi boyalar bu amaçla kullanılabilir. İkinci yaklaşım ise, amplikonlar ve probalar arasındaki hibridizasyonun saptanmasıdır. Bu yaklaşımda, amplikonlar spesifik floresan ile etiketlenmiş diziye özgü problemlerle hibridize olur. Her bir probun belirli bir erime sıcaklığı vardır ve bu sıcaklık, hedef mutasyonların varlığını yansıtır. Gerçek zamanlı PZR testleri ilaç direnci taraması için geliştirilirken bu özellikten yararlanmıştır [46].

Gerçek zamanlı PZR'nin avantajları arasında düşük kontaminasyon riski (DNA ekstraksiyonundan sonraki tüm adımların tek tüpte gerçekleştirilmesi) ve hızlı sonuç vermesi bulunur. Ancak, yöntemin bazı önemli dezavantajları da vardır. Bunlar arasında pahalı olması, özel ekipman ve deneyimli teknisyenler gerektirmesi, kullanılan problemlerin sayısının reaksiyon başına sınırlı olması ve sınırlı hedefleri tespit edebilmesi yer alır. Bu durum, birçok mutasyon barındıran MTBK için büyük bir dezavantaj olarak öne çıkar [46].

2.4.3.2. Ters hibridizasyon yöntemi

Ters hibridizasyon yöntemi, DNA-DNA hibridizasyon testlerine dayanan ve birden fazla prob kullanarak farklı mutasyonların eşzamanlı tespitine olanak tanıyan bir yöntemdir [47]. İlk olarak, DNA ekstraksiyonu ve hedef amplifikasyon işlemleri

gerçekleştirilir. Daha sonra, amplikonlar, hedef dizilere tamamlayıcı olan spesifik oligonükleotid problara hibridize edilir ve bir şeridin yüzeyinde immobilize edilir. Hibridizasyon sonrası yapılan birkaç yıkama işlemi ile spesifik olmayan bağlanmalar ortadan kaldırılır ve amplikon-prob hibritleri, şerit üzerinde renkli bantlar olarak gözlemlenir. Bu bantlar, farklı mutasyonların varlığını belirtir. Tüm bu işlemlerin geri dönüş süresi 5-7 saat arasında değişir [46].

2.4.3.2. DNA dizileme yöntemi

DNA dizileme DNA'yı hızlı bir şekilde analiz etmek için başvuru referans yöntemidir [48]. Türlerin tanımlanması, örneklerdeki bilinen veya yeni mutasyonların, insersiyon ve delesyonların saptanmasına, ilaç duyarlılığının belirlenmesine ve mikroorganizmanın evriminin değerlendirilmesine olanak sağlar [46].

Sanger dizileme DNA dizi analizinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem zincir sonlandırma yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Substrat olarak deoksi nükleotid trifosfatlar (dNTP) ve dideoksi nükleotid trifosfatları (ddNTP) ve DNA polimeraz enzimi kullanır. DNA polimerazın zincir sonlandırıcı ddNTPler ile rastgele DNA polimeri oluşturmaya dayanan bir dizileme yöntemidir. DNA dört deoksiribonükleotid trifosfatın (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) birbirine bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir ve her yeni nükleotid bir önceki nükleotidin 3'OH ucuna eklenir. ddNTP ler ise 3'OH ucu içermez ve böylece zincir uzamasının durdurulmasına neden olurlar. Sentez sırasında zincire eklenen ddNTPler reaksiyonu durdurarak ve zincirin son nükleotidini oluştururlar. Oluşan DNA dizileri kapiller jel elektroforezi ile okunur [49]

Son yıllarda giderek yaygın kullanılmaya başlayan yeni nesil dizileme (YND) yöntemi ise birden fazla DNA parçasını paralel olarak dizileyebilen, daha sonra bir araya getirilen ve biyoinformatik analizler kullanılarak bir referans genomla eşleştirilen Sanger tabanlı olmayan dizileme teknolojisidir [47]. Bu yöntem dünya çapında çeşitli klinik referans laboratuvar ortamlarında ilaca dirençli tüberkülozun hızla tanısında büyük potansiyele sahiptir. Birden fazla gen bölgesi veya ilgilenilen genomun tamamı için hızlı, ayrıntılı dizi bilgisi sağlamaktadır [47].

Yeni nesil dizileme yöntemi genetik materyalin hızlı ve kapsamlı analizi için bir dizi işlem basamağını içerir. Dizilenecek DNA örneklerinden kütüphane hazırlığı;

DNA moleküllerinin rastgele kesilerek parçalara ayrılması ve bu DNA parçalarının adaptör diziler vasıtasıyla bağlanması, solid bir yüzey veya emülsiyon damlalar içindeki boncuklar üzerindeki bu genomik kütüphanenin amplifikasyonu ve dizileme aşamalarıdır [50]. Hedefli YND testleri, tek bir testle birçok ilaca karşı direnci tespit etmek için seçilen genlerin amplifikasyonunu YND teknolojisiyle birleştirir. Hedeflenen YND testleri, dirençle ilişkili spesifik mutasyonları tanımlamak için genlerin tamamını sorgulayabildiğinden, bu tür testler, DSÖ tarafından önerilen diğer moleküler testlerle karşılaştırıldığında daha iyi doğruluk sağlayabilir [51]. Ancak bu testlerin maliyeti, mevcut laboratuvar iş akışlarına entegrasyonu, teknik eğitim ve teknolojinin kullanımına yönelik beceri gereksinimi, dizilen verilerinin yönetimi ve klinik yorumlanmasına ilişkin uzman rehberliğine duyulan ihtiyaç nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır [47].

2.4.3.3. Ticari moleküler duyarlılık testleri

Dünya Sağlık Örgütü 2021 yılında güncellediği hızlı tanı testleri rehberinde ticari tanı ve direnç testlerini altyapı gereksinimleri, donanım ve teknik beceriler dikkate alarak düşük, orta veya yüksek karmaşık olarak sınıflandırmıştır [23];

1. Düşük karmaşık testler; Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/RIF Ultra, Xpert MTB/XDR (Cepheid), Truenat (Molbio)
2. Orta karmaşık otomatize testler; Abbott RealTime MTB, Abbott RealTime MTB RIF/INH (Abbott), BD MAX MDRTB (Becton Dickinson), Cobas MTB, Cobas MTB-RIF/INH (Roche), FlouroType MTBDR, FlouroType MTB (Hain Lifescience/Bruker)
3. Pirazinamid direncini de saptayan yüksek karmaşık testler; GenoType MTBDR_{plus} v1 and v2; GenoType MTBDR_{sl}, (Hain Lifescience/Bruker), Genoscholar NTM+MDRTB II; Genoscholar PZA-TB II (Nipro)

Ülkemizde rifampisin/çoklu ilaç direnci için en sık kullanılan ticari moleküler duyarlılık testleri ve özellikleri Tablo 2.5’te özetlenmiştir.

Tablo 2.5. Rifampisin/çoklu ilaç dirençli tüberküloz tanısı için en sık kullanılan ticari moleküler testlerin özellikleri*

Test	Yöntem	Hedef gen	İlaç	Özellikler
Xpert MTB/RIF Ultra	Gerçek zamanlı PZR	<i>rpoB</i> RRDR	Rifampisin	4 vahşi tip SMB prob Vahşi tipe oranla Tm'deki kayma mutasyonu gösterir Mutasyonları belirtmez
Genotype MTBDR	Ters hibridizasyon yöntemi	<i>rpoB</i> RRDR	Rifampisin	5 vahşi tip prob 4 Mutant prob D516V (MUT1); D526Y (MUT2A); H526D (MUT2B); S531L (MUT3)
		<i>katG</i> kodon 315	İzoniyaizid	1 vahşi tip prob 2 Mutant prob S315T1 (ACC); MUT S315T2 (ACA)
Genotype MTBDRplus	Ters hibridizasyon yöntemi	<i>rpoB</i> RRDR	Rifampisin	8 vahşi tip prob 4 mutant prob D516V (MUT1); D526Y (MUT2A); H526D (MUT2B); S531L (MUT3)
		<i>katG</i> kodon 315	İzoniyaizid	1 vahşi tip prob 2 mutant prob S315T1 (ACC); MUT S315T2 (ACA)
		<i>inhA</i> promoter	İzoniyaizid	2 vahşi prob 4 mutant prob C-15T (MUT1); A-16G (MUT2); T-8C (MUT3A); T-8A (MUT3B)
Flurotype MTBDR	Gerçek zamanlı PZR Asimetrik PZR	<i>rpoB</i>	Rifampisin	Saptanan mutasyonlar: T508A; S509T; E510H; L511P; S512K; Q513L; Q513P; Q513R; D516A; D516F; D516V; D516Y;

				N518I; S522L; S522Q; H526C; H526D; H526G; H526L; H526N; H526P; H526Q; H526R; H526S; H526Y; R529K; S531F; S531L; S531L; S531Q; S531W; L533E; L533P
		<i>katG</i>	İzoniyaaid	Saptanan mutasyonlar: S315T (ACC/A); S315N; S315R Mutasyonları belirtmez
		<i>inhA</i> promoter	İzoniyaaid	Saptanan mutasyonlar: G-17T; A-16G; C-15T; G-9A; T-8A; T-8C; T- 8G Mutasyonları belirtmez
BD MAX MDR-TB	Gerçek zamanlı PZR TaqMan prob	<i>rpoB</i> ,	Rifampisin	Saptanan mutasyonlar: Ser512Gly; Ser531Trp; Met515Ile; Asp516Tyr; Ser509Arg; His526Arg; Asp516Val; Ser531Leu; Leu511 Pro; Leu533Pro Mutasyonları belirtmez
		<i>katG</i>	İzoniyaaid	Ser315Thr; Ser315Ile; Ser315Asn; Ser315Ser Mutasyonları belirtmez
		<i>inhA</i> promoter	İzoniyaaid	C-15T; G-9A; T-8G; Mutasyonları belirtmez

*Kaynak11'den alınmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubu

Çalışmaya 2000-2020 yılları arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarlarında çeşitli klinik örneklerden izole edilerek MGIT besiyerinde stoklanmış olan 43 R dirençli ve kontrol grubu olarak 23 R duyarlı MTBK suşu dahil edildi. Kontrol suşu olarak *Mycobacterium tuberculosis* H33Rv kullanıldı. Kültür için LJ besiyeri ve MGIT 960 otomatize kültür sistemi kullanıldı. Mikroskopik incelemede kord oluşturan ve BD MGIT TBc İdentifikasyon Testi (Becton Dickinson, ABD) pozitif olan suşlar MTBK olarak tanımlandı. Aynı hastaya ait birden fazla suş araştırmaya dahil edilmedi. Suşların birinci seçenek anti-TB ilaç duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 sisteminde belirlendi. İlaç konsantrasyonları; S, I, R, E için sırası ile 1,0 µg/ml, 0,1 , 1,0 µg/ml ve 5,0 µg/ml'dir [37]. İlaç duyarlılık profili belirlenen suşlar MGIT sıvı besiyerinde -20 °C'de saklandı.

3.2. Suşların canlandırılması

Stok suşlarını canlandırmak için MGIT sıvı besiyeri kullanıldı. Sıvı besiyerinden 100 µl hacim alınarak MGIT 960 kültür şişesine aktarıldı ve şişeler kültür sistemine yüklendi. Üreme sinyali alındıktan sonra RFB için ilaç duyarlılıkları araştırıldı.

3.3. Rifabutin duyarlılığının fenotipik olarak araştırılması

Rifabutin duyarlılığı MGIT 960 sıvı kültür sistemi kullanılarak indirekt proporsiyon yöntemi ile araştırıldı. Rifabutin kritik konsantrasyon değeri 0.5 µg/ml olarak alındı [52]. Duyarlılık testinde en fazla 3 – 5 günlük taze kültür süspansiyonları kullanıldı.

Rifabutinin %98 (CAS no 72559-06-09, Sigma-Aldrich, ABD) 5 mg ilaç tozu metanolde çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra distile su ve %95 etanol ile seyreltilerek 42 µg/ml çalışma konsantrasyonu elde edildi [53]. Bu dilüsyonlar, -20⁰ C'de küçük alikotlarda donduruldu. CLSI tarafından önerilen 0.5 µg/ml kritik konsantrasyon elde etmek için 7 ml MGIT besiyerine 100 µl çalışma konsantrasyonundaki RFB eklendi [52]. Besiyerlerine ayrıca zenginleştirici olarak 0.8

ml OADC (oleik asit, sığır albümini, dekstroz, katalaz) içeren BACTEC MGIT 960 SIRE supplement eklendi. Her bir suş için bir antibiyotikli bir antibiyotiksiz kontrol besiyerleri hazırlanarak indirekt proporsiyon yöntemi ile duyarlılık sonuçları belirlendi. Duyarlılık sonuçları tamamlandıktan sonra DNA dizi analizi için sıvı kültürlerden DNA ekstraksiyonu basamağına geçildi.

3.4. DNA ekstraksiyonu

Her bir suştan steril eppendorf tüpü içinde 1,5 ml yoğun bakteri süspansiyonu hazırlandı. Tüpler 16000g'de 30 saniye santrifüjlendikten sonra üstteki sıvı atıldı. DNA ekstraksiyonu için GeneMark Bacteria Genomic DNA Purification kiti (DP025) kullanıldı. Elde edilen template DNA'lar PZR ve dizi analizi çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

3.5. Polimeraz zincir reaksiyonu

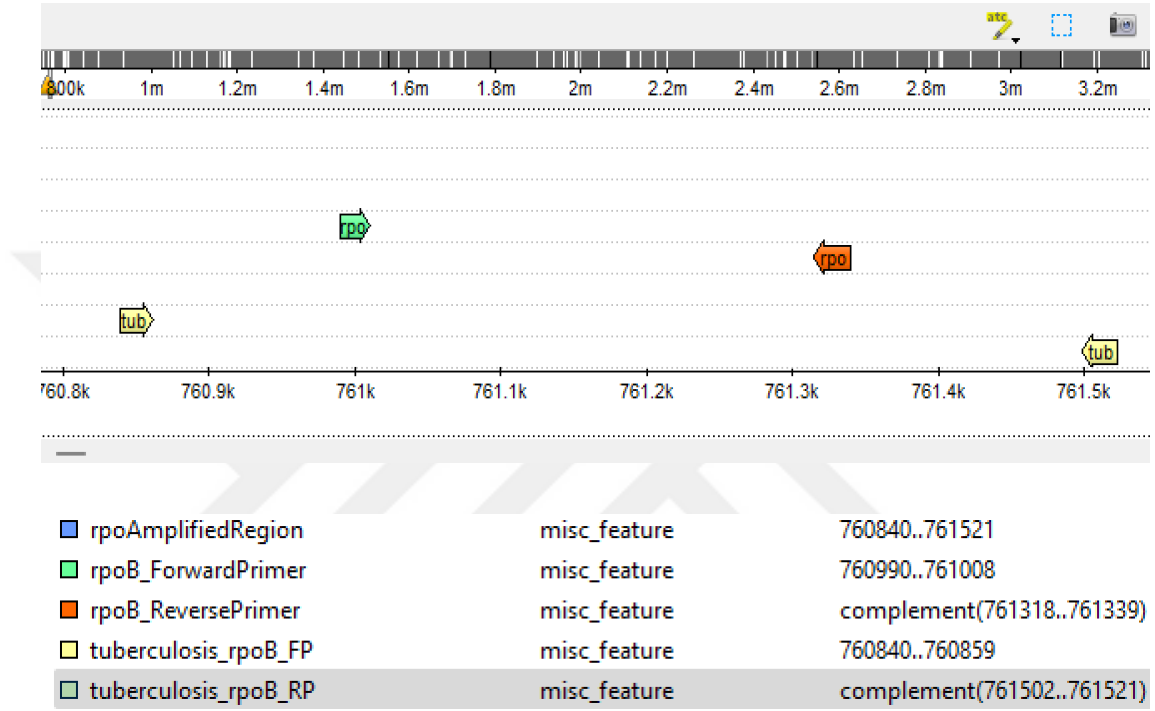
3.5.1. Primerlerin hazırlanması

M. tuberculosis'te rifampisin direncinden sorumlu olan *rpoB* geninin 350 bp uzunluğunda RRDR gen bölgesinin amplifikasyonu için literatür taraması yapıldı ve forward primer olarak GGGAGCGGATGACCACCCA, reverse primer olarak GCGGTACGGCGTTTCGATGAAC seçildi [55]. NCBI primer BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sayfasından *M. tuberculosis* genomu üzerinde eşleşen bölgeler kontrol edildi ve birden fazla eşleşme olduğu görüldü. Amplifikasyon protokolü, 95°C'de 5 dakikalık bir denatürasyon adımının ardından 95°C'de 30 saniye, 62°C'de 30 saniye ve 72°C'de 50 saniyelik 35 döngüden ve 72°C'de 2 dakikalık son bir uzatma adımından oluşmuştur [54]. Amplikonlar %1 agaroz jelde 100 voltta 70 dk yürütüldü. Ancak 350 bp bölgesinde ürün görülmedi. Sıcaklık yükselterek primerin hedef bölgeye özgün olarak bağlanması denendi, ancak amplifikasyon olmadı. NCBI veri tabanından *M. tuberculosis* H37Rv genomu indirildi. UniPro UGENE programı ile eldeki primerlerin bağlandığı bölge bulundu. Bu bölgeden 200 bp sağ ve sola genişletilerek 750 bp'lik genom bölgesi (orta kısmında 350 bp'lik hedeflenen bölgeyi de içeriyor) alındı. Bu bölge NCBI Primer BLAST programı ile primer tasarımı kullanıldı. NCBI Primer BLAST sonucunda 682 bp uzunluğunda tek ürün ortaya çıkaracak primerler bulundu;

rpoB forward primer: GTCAGACCACGATGACCGTT

rpoB reverse primer: TAGTCCACCTCAGACGAGGG

Şekil 3.1. UniPro UGENE programı üzerinde eski ve yeni primerlerin pozisyonları gösterilmiştir. Şekilde ikinci ve üçüncü sıradaki primer dizisi, kullanılan ilk primerlerin genomda yer aldığı bölümü, dördüncü ve beşinci sıradaki primerler ise yeni tasarımı yapılan primerlerin genomda oturduğu kısmı göstermektedir. En baştaki bölge (rpoAmplifiedRegion) ise PZR ile çoğaltılan ve Sanger ile dizilenen bölgenin *M. tuberculosis* H37Rv genomundaki başlangıç ve bitiş pozisyonlarını göstermektedir.



Şekil 3.1. UniPro UGENE programı üzerinde eski ve yeni primerlerin pozisyonları

3.5.2. PZR karışımının hazırlanması ve PZR programı

Her örnek için 0,2 ml'lik eppendorf tüpüne son hacmi 20 µl olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. PZR bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)
GeneMark RP02-II DNA Polymerase Mix (5X)	4
Primer karışımı	1
10ul F (100mM) + 10ul R (100mM) + 80ul distile su	

Distile su	14
DNA	1
Toplam Hacim	20

PZR karışımları vortekste (Nüve NM-110) karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR tüplerine paylaştırılıp, üzerlerine DNA örneği kondu ve ısı döngü cihazına (BioRad CFX96) yerleştirildi. PZR programı toplam 30 döngü olarak aşağıdaki şekilde uygulandı;

Başlangıç aktivasyon basamağı: 94°C'de 2 dakika

Denatürasyon 94°C'de 30 saniye

Bağlanma 58°C'de 20 saniye

DNA zincirinin uzaması 72°C'de 40 saniye

Son uzama 72°C'de 5 dakika

PZR işlemi tamamlandıktan sonra örnekler elektroforez işlemi için +4°C'de saklandı.

3.6. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinden 4 ul, %3'lük agaroz jele yüklenerek 100 volt ile 1 saat yürütülerek elektroforez işlemi (Thermo Scientific) gerçekleştirildi. Elektroforez tamponu olarak TBE kullanıldı. 10XTBE konsantre stok şeklinde hazırlanan tampon kullanılmadan önce 1XTBE olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı. Jelde yürütülen DNA'ların büyüklükleri belli DNA fragmanlarını içeren moleküler ağırlık standardı (DNA ladder) ile kıyaslanarak saptandı. Sonuçlar UV transluminatörde (Vilber Lourmat) incelendi. Agaroz jel elektroforezinde beklenen bantları içeren amplifikasyon ürünleri değerlendirildi. Değerlendirme sonrasında elde edilen PZR ürünleri DNA dizi analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.7. Sanger dizileme ve mutasyon analizi

Amplifikasyon ürünleri, işaretli dideoksinükleotidleri içeren "Thermo Fisher Scientific Sanger Sequencing Kit A38073" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanarak, sense ve antisense zincirlerinin gen bölgesine özgü primerleri ile "Cycle Sequence" PZR yapıldı. Daha sonra, "Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi

gerçekleştirildi ve kromatografi şeklinde DNA dizi analizi verileri elde edildi. Dizi analizi sonrası kromatogram dalgalarının pik uzunlukları karşılaştırıldı ve gerekli düzeltmeler yapıldı. Sanger dizilerinin analizi R programlama dili v4.4.1 ile gerçekleştirildi. SangeranalyseR v1.40.0 paketi kullanılarak Sanger dosyaları okundu, kötü okunan kısımlar çıkarıldı. İleri ve geri okumalar hizalanarak birleştirildi. Biostrings v2.72.1 ve pwalgn v1.0.0 kütüphaneleri kullanılarak bu diziler, NCBI veritabanından indirilen referans Mycobacterium Tuberculosis H37Rv (taxid 83332) genomuna hizalandı ve bu hizalama sonucu oluşan farklılıklar ortaya çıkarıldı (SNPler ve indeller Her bir örneğe ait dizisi çıkarılmış olan bu gen bölgeleri, PubMed Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans H37Rv dizi verileri “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” sekans analiz programı ile RRDR gen bölgesindeki spesifik nükleotid değişiklikleri belirlendi.

Sanger Dizileme Triogen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

3.8. İstatistiksel analiz

Araştırmada mutasyonların sıklığı yüzdelik değerler ile hesaplandı.

3.9. Etik Kurul onayı

Çalışma protokolü Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından 01.02.2023 tarihli ve 1656 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fenotipik duyarlılık test sonuçları

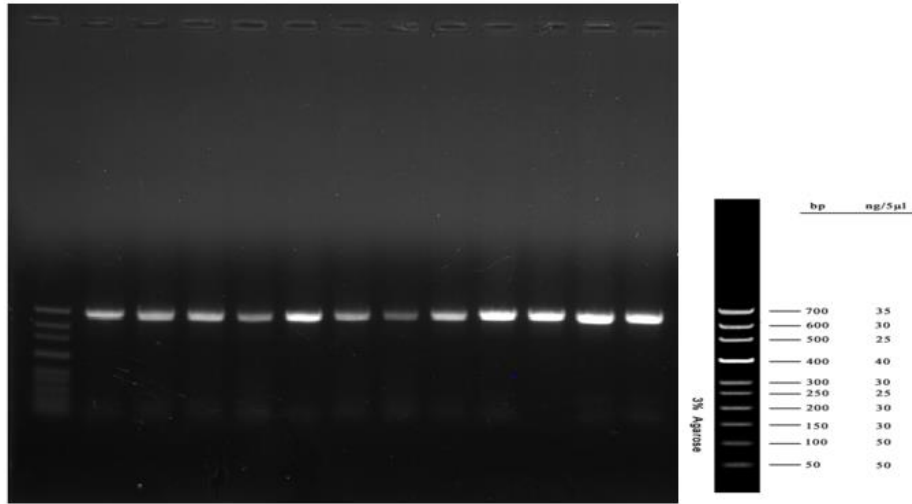
Çalışmada RR 43 suşun 39'u (%91) RFB dirençli, dört tanesi (%9) ise RFB duyarlı bulunmuştur. Rifampisine duyarlı 23 suşun tamamı aynı zamanda RFB'ye de duyarlıdır (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. MTBK suşlarının fenotipik duyarlılık test sonuçları

	Rifabutin dirençli	Rifabutin duyarlı	Toplam
Rifampisin dirençli	39 (%91)	4 (%9)	43
Rifampisin duyarlı	-	23 (%100)	23

4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları

PZR ürünlerinin %3 agaroz jel elektroforezinin UV ışık altındaki görüntülerine örnek olarak 9-20. kontrol suşlarının sonuçları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.1. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntüsü

4.3. Sanger dizileme sonuçları

Araştırmada rifampisine dirençli 43 suşun *rpoB* RRDR gen bölgesinin (*E. coli* numaralandırma sistemine göre kodon 507-533) dizi analizi sonucu toplam 44 eş anlamlı (sessiz) olmayan mutasyona eşlik eden tek nükleotid polimorfizmi saptanmıştır. Rifampisine duyarlı olan kontrol suşlarında ise mutasyon

bulunmamıştır (vahşi tip). Tanımlanan mutasyonlar yedi farklı genetik varyant oluşturmuş ve varyantlardan bir tanesinde ikili mutasyon görülmüştür.

Rifampisin dirençli olgularda görülen mutasyonlar sıklık sırasına göre S531L (%76), H526Y (%12), D516Y (%4), H526D (%2), L511P (%2), M515I (%2) ve L533P (%2) olarak bulunmuştur. Bu mutasyonlardan D516Y, L511P, M515I ve L533P, RFB duyarlılığı ile ilişkili olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. MTBK suşlarında görülen mutasyonlar ve fenotipik direnç profilleri

Kodon*	Nükleotid Değişimi	Aminoasit Değişikliği		Sayı (%)	Fenotipik direnç
531	TCG → TTG	S531L	Ser - Leu	33 (%76)	R ^R /RFB ^R
526	CAC → TAC	H526Y	His - Tyr	5 (%12)	R ^R /RFB ^R
526	CAC → GAC	H526D	His - Asp	1 (%2)	R ^R /RFB ^R
516	GAC → TAC	D516Y	Asp - Tyr	2 (%4)	R ^R /RFB ^S
511	CTG → CCG	L511P	Leu - Pro	1 (%2)	R ^R /RFB ^S
533	CTG → CCG	L533P	Leu-Pro	1 (%2)	R ^R /RFB ^S
515 +516	ATG → ATC	M515I	Met - Ile	1 (%2)	R ^R /RFB ^S
	GAC → TAC	D516Y	Asp - Tyr		
Vahşi tip				23	R ^S /RFB ^S

R: Rifampisin, RFB: Rifabutin, ^R Dirençli, ^S Duyarlı

*Kodonlar *Escherichia coli* numaralandırma sistemine göre dir.

Rifampisin dirençli/RFB duyarlı bulunan dört suшта GAC516TAC, CTG511CCG, ATG515ATC ve CTG533CCG mutasyonları, bir suшта ise; ATG515ATC ve GAC516TAC ikili mutasyonu bulunmuştur. Her iki ilaca da fenotipik olarak dirençli bulunan 39 suшта en sık gözlenen mutasyon TCG531TTG iken (%85, 33/39), RFB duyarlı dört suшта en sık GAC516TAC (%50, 2/4) mutasyonu gözlenmiştir (Tablo 4.2.).

5. TARTIŞMA

Tüberkülozda ilaç direnci tedavi başarısını engelleyen önemli bir sorundur. İlaç direncinin belirlenmesinde fenotipik duyarlılık yöntemleri altın standart olmakla birlikte hızlı tanı testleri klinisyenin erken dönemde etkili bir tedavi rejimine karar vermesine büyük ölçüde yardımcı olur [4,55]. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü, TB tedavisinin en etkili ajanı olan R için ve RR olgularda en azından florokinolonlar için hızlı direnç testlerinin kullanımını önermektedir [55]. Günümüzde direkt klinik örnekten tanı için kullanılan moleküler testlerin birçoğu aynı zamanda RR'yi de belirlemektedir. Ancak bu testlerde sınırlı sayıda mutasyon saptanmakta ve testlerin birçoğunda mutasyonların tipi rapor edilmemektedir. Rifampisin ile RFB arasında çapraz direnç sık görülmekle birlikte bazı mutasyonların R'ye düşük düzeyde dirence yol açtığı, bazı mutasyonların varlığında ise RFB'ye fenotipik duyarlılık olduğu gösterilmiştir Fenotipik olarak RR suşlarda %13-28 oranında RFB'ye duyarlılık bildirilmiştir [5,56,57]. Araştırmada bu oran %9 (4/43) olarak bulunmuştur. Bu oran literatürde bildirilen değerlerden düşük olmakla birlikte, bu olguların erken dönemde saptanarak R yerine, oral kullanılabilen, sterilizan etkili ve antiretroviral ilaçlar gibi ilaçlarla etkileşimi düşük olan RFB verilmesi tedavi başarısını olumlu yönde etkileyebilir.

Dünya Sağlık Örgütü dirençli TB olgularının yönetimine katkı sağlamak ve bu olguların hızlı tanısı için 2021 yılında “MTBK'deki mutasyonlar ve ilaç direnciyle ilişkileri” kataloğunun ikinci basımını yayınlamıştır [58]. Bu katalogda çok sayıda suştan elde edilen bir veri setine dayanarak direnç ile ilişkilerine göre mutasyonlar beş gruba ayrılmıştır. Grup 1 ve Grup 2 varyantları, klinik olarak anlamlı fenotipik direnci temsil eder. Bir başka deyişle bu mutasyonlara sahip kökenlerde fenotipik direnç, DSÖ tarafından onaylanan kritik konsantrasyon düzeylerinde bulunur. Grup 2'de yer alan mutasyonlar direnç ile ilişkili geçici (interim) mutasyonlardır. Grup 3'te önemi belirsiz olan, Grup 4 ve 5'te ise dirençle ilişkisi olmayan mutasyonlar yer almaktadır. Çalışmada bulunan mutasyonların tümü katalogda RR ile ilişkili olarak tanımlı mutasyonlar arasındadır. S531L, H526Y, H526D, D516Y, L511P ve L533P mutasyonları katalogda Grup 1'de tanımlanmıştır ve RR ile ilişkilidirler [58]. Bu mutasyonlar ÇİD-TB hastalarının çoğunda en yaygın bulunan mutasyonlardır [10]. Araştırmada bulunan M515I mutasyonu ise başlangıçta direnç ile ilişkisi belirsiz kabul edilmiş iken, güncel katalogda Grup 2'de yer almıştır. Bu suş RR, RFB'ye ise duyarlı

bulunmuştur. Tablo 5.1.'de çalışmada bulunan mutasyonların DSÖ kataloğunda yer alan RR ile ilişkili mutasyon sınıflandırmasındaki güvenilirlik derecelendirmeleri gösterilmiştir.

Tablo 5.1. DSÖ kataloğuna göre çalışmada bulunan mutasyonların güvenilirlik derecelendirmesi

Varyant	Varyant E. coli numaralandırması	Güvenilirlik derecelendirmesi	Ek kriter	Grup
rpoB_S450L	S531L	Dirence eşlik eder		1
rpoB_H445D	H526D	Dirence eşlik eder		1
rpoB_H445Y	H526Y	Dirence eşlik eder		1
rpoB_D435Y	D516Y	Dirence eşlik eder	Sınırdaki direnç	1
rpoB_L452P	L533P	Dirence eşlik eder	Sınırdaki direnç	1
rpoB_L430P	L511P	Dirence eşlik eder	Sınırdaki direnç	1
rpoB_M434I	M515I	Dirence eşlik eder-geçici		2

Çalışmada RR/RFB duyarlı suşlarda bulunan D516Y, L533P ve L511P mutasyonları ise katalogda sınırdaki RR ile ilişkili mutasyonlar arasındadır. Bu mutasyonlara sahip suşların sıklıkla kritik konsantrasyon değerine yakın bir minimum inhibitör konsantrasyona (MİK) sahip oldukları düşünülmektedir [59,60]. Sınırdaki dirence sahip suşların katı ve sıvı besiyerinde yapılan ilaç duyarlılık testlerinde uyumsuz sonuçlar alındığı bildirilmiştir [61,62]. Sınırdaki dirence sahip suşların katı ve sıvı besiyerinde yapılan ilaç duyarlılık testlerinde uyumsuz sonuçlar alındığı bildirilmiştir [10,63]. Bu mutasyonlar, DSÖ'nün yedi ülkeden elde edilen izleme verilerine göre RR'nin %12'sinden sorumludur, ancak bazı bölgelerde daha sık görülebilmektedir [55]. Bu mutasyonlara sahip RR suşların, belirli amino asitlerin yer değiştirmeleri ile in vitro RFB'ye duyarlı kalabildikleri ve klinik olarak RFB tedavisine yanıt verebildikleri bildirilmiştir [10]. Çalışmada R'ye sınırdaki dirence yol açan tartışmalı mutasyonlara sahip suşların RFB'ye duyarlı bulunması bu görüşü desteklemektedir. Çalışmada tartışmalı mutasyon sıklığı %9 (4/43) olarak saptanmıştır. Çalışılan suş sayısı az olmakla birlikte bu oran DSÖ tarafından bildirilen direnç oranına yakındır. Tartışmalı mutasyonların kötü klinik sonuçlarla ilişkili

olabildiği bildirilmiştir [60,61]. Lin ve ark.larının çalışmasında [62] tartışmalı *rpoB* mutasyonları olan olguların %88'inin RFB içeren ikinci seçenek ilaçlar ile tedavi edildiği ve sadece %12'sinin birinci seçenek ilaçlara cevap verdiği gösterilmiştir. Tablo 5.2.'de DSÖ'nün teknik raporunda yer alan R ve RFB'nin MİK değerlerine göre belirlenen mutasyonlar, kritik konsantrasyon değeri temel alınarak verilmiştir.

Tablo 5.2. *rpoB* mutasyonları ile rifampisin ve rifabutine fenotipik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması*

Varyant	<i>rpoB</i> S531 mutantlar MGIT			<i>rpoB</i> S531 mutantlar MGIT		
	Rifabutin duyarlı	Rifabutin dirençli	N	Rifampisin duyarlı	Rifampisin dirençli	N
S531W	0	7	7	0	21	21
S531F	0	2	2	0	2	2
S531L	2	203	205	3	746	749
S531P	0	1	1	1	1	2
S531C	0	1	1	1	0	1
S531Q	0	1	1	0	1	1
S531M	0	1	1	0	1	1
	<i>rpoB</i> sınırda RRDR mutantlar MGIT			<i>rpoB</i> sınırda RRDR mutantlar MGIT		
	Rifabutin duyarlı	Rifabutin dirençli	N	Rifampisin duyarlı	Rifampisin dirençli	N
L511P	7	1	8	32	8	40
D516Y	9	0	9	44	14	58
H526L	9	2	11	13	15	28
H526N	6	0	6	13	5	18
H526S	3	0	3	6	0	6
L533P	4	1	5	24	7	31
	Diğer <i>rpoB</i> RRDR mutantları MGIT			Diğer <i>rpoB</i> RRDR mutantları MGIT		
	Rifabutin duyarlı	Rifabutin dirençli	N	Rifampisin duyarlı	Rifampisin dirençli	N
Q513E	0	2	2	0	2	2
Q513K	0	5	5	0	13	13
Q513L	2	2	4	0	3	3
Q513P	1	2	3	20	9	29
D516A	0	2	2	1	1	2
D516F	1	0	1	0	2	2
D516S	4	0	4	0	4	4
D516V	74	4	78	15	191	206
N519K	0	1	1	0	1	1
S522L	6	0	6	0	8	8
S522T	0	1	1	1	0	1
H526A	2	1	3	1	2	3
H526C	2	0	2	0	3	3
H526D	0	17	17	0	64	64

H526G	1	0	1	0	1	1
H526P	1	0	1	0	2	2
H526Q	1	0	1	1	0	1
H526R	0	7	7	1	17	18
H526Y	0	16	16	0	46	46
	RRDR dışında kalan <i>rpoB</i> mutantları MGIT			RRDR dışında kalan <i>rpoB</i> mutantları MGIT		
	Rifabutin duyarlı	Rifabutin dirençli	N	Rifampisin duyarlı	Rifampisin dirençli	N
V146F	0	3	3	0	4	4
I572F	1	0	1	10	0	10

*Kaynak 58'den değiştirilerek alınmıştır.

Çalışmada fenotipik duyarlılığın belirlenmesinde kritik konsantrasyon değerleri CLSI'nın önerisine göre R için 1 µg/ml, RFB için 0,5 µg/ml olarak alınmıştır [52]. Dünya Sağlık Örgütü RFB için kritik konsantrasyon değeri bildirmemiştir [58]. Güncellenen teknik raporunda ise araştırma verilerinin kalite ve kantitesine dayanarak R için kritik konsantrasyon değerini MGIT sisteminde 1 µg/ml 'den 0.5 µg/ml'e düşürülmesini önermiştir [58]. Bu değişiklikte araştırmalarda bildirilen ECOFF değerleri dikkate alınmıştır. Kritik konsantrasyon değerinin düşürülmesi, izolatların fenotipik direnç profillerini etkileyebilir. Bu durum yalancı RR'de artışa yol açabilir. Güvenilir sonuçlar almak için daha fazla suş kullanarak, farklı besiyerlerinde MİK değerlerinin belirlenmesi ve RRDR dışındaki gen bölgelerinin de dizi analizi ile incelenmesi gereklidir. Çalışmada suşların MİK değerlerinin incelenmemiş olması araştırmanın kısıtlı yönlerinden biridir. Çalışılan suş sayısının yetersiz olması ve RRDR dışında kalan *rpoB* gen bölgesinin değerlendirilmemiş olması da fenotipik direnç ile mutasyonlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmede kısıtlılık oluşturmuştur.

Sonuç olarak çalışmada R'ye fenotipik olarak dirençli suşların %9'u RFB'ye duyarlı bulunmuştur. Rifampisine dirençli suşlarda en sık S531L, H526Y ve H526D mutasyonları gösterilmiştir. Bu mutasyonlar literatürde yüksek düzeyde RR'den sorumlu mutasyonlar arasındadır. Çalışmada bu mutasyonlara sahip suşlar aynı zamanda RFB'ye de dirençli bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün kataloğunda R'ye sınırda dirence eşlik ettiği belirtilen mutasyonlardan olan D516Y, L533P ve L511P içeren suşlar ise fenotipik olarak RFB'ye duyarlı bulunmuştur. Bu olguların tedavisinde R yerine RFB eklenmesi başarı şansını artırabileceği gibi, ikinci seçenek ilaçlara karşı hızla gelişen direncin önlenmesine de katkı sağlayabilir. Rifabutin duyarlılığına eşlik eden mutasyonların belirlenmesi için MİK değerlerini de içeren

daha fazla suş ile yapılan in vitro çalışmaya ve RFB içeren tedavi rejimlerine ilişkin daha fazla klinik veriye gereksinim vardır. Bu mutasyonların hızlı tanı testleri ile saptanması klinisyenlerin erken dönemde, etkin tedavi rejimlerini düzenlemesine katkı sağlayacaktır.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada R'ye fenotipik olarak dirençli suşların %9'u RFB'ye duyarlı bulunmuştur. Rifampisine dirençli suşlarda en sık S531L, H526Y ve H526D mutasyonları gösterilmiştir. Bu mutasyonlar literatürde yüksek düzeyde RR'den sorumlu mutasyonlar arasındadır. Çalışmada bu mutasyonlara sahip suşlar aynı zamanda RFB'ye de dirençli bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün kataloğunda R'ye sınırda dirence eşlik ettiği belirtilen mutasyonlardan olan D516Y, L533P ve L511P içeren suşlar ise fenotipik olarak RFB'ye duyarlı bulunmuştur. Bu olguların tedavisinde R yerine RFB eklenmesi başarı şansını artırabileceği gibi, ikinci seçenek ilaçlara karşı hızla gelişen direncin önlenmesine de katkı sağlayabilir. Rifabutin duyarlılığına eşlik eden mutasyonların belirlenmesi için MİK değerlerini de içeren daha fazla suş ile yapılan in vitro çalışmaya ve RFB içeren tedavi rejimlerine ilişkin daha fazla klinik veriye gereksinim vardır. Bu mutasyonların hızlı tanı testleri ile saptanması klinisyenlerin erken dönemde, etkin tedavi rejimlerini düzenlemesine katkı sağlayacaktır.

ÖZET

Rifampisine Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Suşlarında Rifabutine Çapraz Direnç ve Eşlik Eden Mutasyonların DNA Dizi Analizi ile Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı rifampisine dirençli suşlarda rifabutin duyarlılığını fenotipik olarak araştırıp, DNA dizi analizi ile *rpoB* RRDR gen bölgesinde rifabutin duyarlılığına eşlik eden spesifik mutasyonları göstermektir. Çalışmaya 2000-2020 yılları arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarlarında çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan 43 rifampisin dirençli ve kontrol grubu olarak 23 rifampisin duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşu dahil edildi. Fenotipik duyarlılık testi CLSI'nın önerileri doğrultusunda MGIT 960 kültür sistemi kullanılarak yapıldı. Mutasyonlar, *rpoB* gen bölgesinin 81 baz çiftlik RRDR gen bölgesinin Sanger DNA dizi analizi yöntemi ile araştırıldı. Çalışmada rifampisine dirençli 43 suşun 39'u (%91) rifabutine de dirençli, dört tanesi (%9) ise rifabutine duyarlı bulunmuştur. Rifampisine duyarlı 23 suşun tamamı aynı zamanda rifabutine de duyarlıydı. Suşlarda toplam 44 eş anlamlı (sessiz) olmayan mutasyona eşlik eden tek nükleotid polimorfizmi saptandı. Rifampisine duyarlı olan kontrol suşlarında ise mutasyon bulunmadı. Tanımlanan mutasyonlar yedi farklı genetik varyant oluşturdu ve varyantlardan bir tanesinde ikili mutasyon görüldü. Rifampisin dirençli olgularda görülen mutasyonlar sıklık sırasına göre S531L (%76), H526Y (%12), D516Y (%4), H526D (%2), L511P (%2), M515I (%2) ve L533P (%2) olarak bulundu. Bu mutasyonlardan D516Y, L511P, M515I ve L533P'nin, rifabutin duyarlılığı ile ilişkili olduğu belirlendi. Sonuç olarak rifabutin duyarlılığına eşlik eden mutasyonlara sahip suşların erken dönemde hızlı tanı testleri ile saptanarak rifampisin yerine rifabutin içeren tedavi rejimlerinin verilmesi başarı şansını artırabileceği gibi, ikinci seçenek ilaçlara karşı hızla gelişen direncin önlenmesine de katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* complex, rifampisin direnci, rifabutin, *rpoB*, mutasyon, DNA dizi analizi

ABSTRACT

The Evaluation of Cross-Resistance to Rifabutin and Accompanying Mutations by DNA Sequence Analysis in Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains

The aim of this study is to phenotypically investigate rifabutin susceptibility in rifampicin-resistant strains and to identify the specific mutations associated with rifabutin susceptibility in the *rpoB* RRDR gene region through DNA sequence analysis. In this study, 43 rifampicin-resistant strains and 23 rifampicin-susceptible control strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex, isolated from various clinical samples between 2000 and 2020 at the Microbiology Laboratories of the Departments of Medical Microbiology at Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine and Ege University Faculty of Medicine, were included. Phenotypic susceptibility testing was performed using the MGIT 960 culture system in accordance with CLSI recommendations. Mutations were investigated by sequencing the 81-base pair RRDR region of the *rpoB* gene using the Sanger DNA sequencing method. Among the 43 rifampicin-resistant strains, 39 (91%) were also resistant to rifabutin, while four (9%) were susceptible to rifabutin. All of the 23 rifampicin-susceptible strains were also susceptible to rifabutin. A total of 44 non-synonymous mutations were identified in the strains. No mutations were found in the rifampicin-susceptible control strains. The identified mutations resulted in seven different genetic variants, and one variant exhibited a double mutation. The most common mutations found in rifampicin-resistant cases were S531L (76%), H526Y (12%), D516Y (4%), H526D (2%), L511P (2%), M515I (2%), and L533P (2%). Among these, the D516Y, L511P, M515I, and L533P mutations were associated with rifabutin susceptibility. In conclusion, identifying strains with mutations associated with rifabutin susceptibility early through rapid diagnostic tests and initiating rifabutin-containing treatment regimens instead of rifampicin could increase the chances of treatment success and help prevent the rapid development of resistance to second-line drugs.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, rifampicin resistance, rifabutin, *rpoB*, mutations, DNA sequence analysis

KAYNAKLAR

- [1] Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [2] Çavuşoğlu, C. Mycobacterium Tuberculosis’de Moleküler Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, 11-12 Haziran 2003, Samsun.
- [3] Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [4] WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: Treatment- drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [5] Whitfield, M.G., Warren, R.M., Mathys, V., et al. The potential use of rifabutin for treatment of patients diagnosed with rifampicin-resistant tuberculosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018,73(10),2667-2674. doi: 10.1093/jac/dky248.
- [6] Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [7] Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1129, Ankara, 2019.
- [8] Crabol, Y., Catherinot, E., Veziris, N., Jullien, V., Lortholary, O. Rifabutin: where do we stand in 2016. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2016, 1(7):1759-1771, DOI:1010.1093/jac/dkw024.
- [9] Palomino, J.C., Martin, A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. Antibiotics (Basel). 2014,3(3),317-340. Published 2014 Jul 2. doi:10.3390/antibiotics3030317.
- [10] Berrada, Z.L., Lin, S.Y., Rodwell, T.C., et al. Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis complex. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. 2016,85(2),177-181.
- [11] Sürücüoğlu, S., Tüberkülozun Tanısı ve Direncinin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemlerin Kullanımı. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve Epidemiyoloji (Ed.: Rıza Durmaz, Özgen Eser, Barış Otlu), Akademisyen Kitabevi, Ankara, 2022, s. 497-512.
- [12] Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)

moves to the DSMZ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020,70, 5607-5612; DOI: 10.1099/ijsem.0.004332.

- [13] Forbes, B.A., Hall, G.S., Miller, M.B., et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(2):e00038-17. Published 2018 Jan 31. doi:10.1128/CMR.00038-17
- [14] Jacobo-Delgado, Y. M., Rodríguez-Carlos, A.C., Serrano, J., Rivas-Santiago, B. Mycobacterium tuberculosis cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? Frontiers in Immunology. 2023, 14, 1194923, doi: 10.3389/fimmu.2023.1194923.
- [15] Pfyffer, G. E., Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. Manual of Clinical Microbiology (Ed: James Jorgensen, Michael M. Pfaller, Karen C. Carroll, Mary L. Landry), ASM Press, USA, 2009, 11th Edition, 536-69.
- [16] Özkütük, A. Mikobakterilerin mikrobiyolojik özellikleri. Mycobacterium tuberculosis ve Tüberküloz Kitabı'nda. (Ed: Ayşe Yüce, Mustafa Özyurt, Süheyla Sürücüoğlu, Meltem Uzun, Nevin Sarıgözel). Anka Kitapçılık, İstanbul, 1. Baskı, 2016, 48-54.
- [17] Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Sağlık Bakanlığı. Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık; 2014.
- [18] Kılıçaslan, Z. Tüberküloz Epidemiyolojisi ve Dünyada Tüberküloz. Tüberküloz Kitabı'nda. (Ed: Hayati Bilgiç, Mehmet Karadağ). Toraks Kitapları, AVES Yayıncılık, İstanbul, 2010, 25-35.
- [19] Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1229, Ankara, 2022.
- [20] World Health Organization. Use of Targeted Next-Generation Sequencing to Detect Drug-Resistant Tuberculosis: Rapid Communication. July 2023. ISBN 978-92-4-007637-2
- [21] T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye'de Verem Savaşı 2020 Raporu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1205, Ankara, 2021, 134.
- [22] Procop, G.W. Laboratory diagnosis and susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis. Microbiology Spectrum. 2016;4(6): 10.1128/microbiolspec. TNMI7-0022-2016. doi: 10.1128 / microbiolspec .TNMI7-0022-2016.
- [23] WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- [24] Della-Latta, P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, (Ed: Lynne S. Garcia, Henry D. Isenberg). ASM Press, USA 2007, 7.1-7.8.
- [25] Mejia, G.I., Castrillon, L., Trujillo, H., Robledo, J.A. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases. 1999,3(2),138-142.
- [26] Cruciani, M., Scarparo, C., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, C., Mengoli, C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(5), 2321-2325. doi: 10.1128/JCM.42.5.2321-2325.2004.
- [27] Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Erzurum, 2009.
- [28] Doyle, R.M., Burgess, C., Williams, R., et al. Direct Mycobacterium tuberculosis faster than MGIT culture sequencing. Journal of Clinical Microbiology, 2018;56(8):e00666-18. doi:10.1128/JCM.00666-18.
- [29] Abebe, G., Paasch, F., Apers, L., Rigouts, L., Colebunders, R. Tuberculosis drug resistance testing by molecular methods: opportunities and challenges in resource limited settings. Journal of Microbiological Methods. 2011,84(2),155-160. doi:10.1016/j.mimet.2010.11.014.
- [30] Banaei, N., Musser, K.A., Salfinger, M., Somoskovi, A., Zelazny, A.M. Novel assays/applications for patients suspected of mycobacterial diseases. Clinics in Laboratory Medicine. 2020, 40(4), 535-552. doi:10.1016/j.cll.2020.08.010.
- [31] Jagielski, T., Minias, A., van Ingen, J., et al. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews. 2016, 29(2), 239-290. doi:10.1128/CMR.00055-15.
- [32] Sürücüoğlu S. Tüberküloz epidemiyolojisinde moleküler yöntemler. Bölüm 15, sayfa: 149-160. Tüberküloz Kitabı'nda (Ed; Şeref Özkara, Zeki Kılıçaslan), Türk Toraks Derneği yayınları, Sayı: 11, AVES Yayıncılık, İstanbul, 2010
- [33] Durmaz R. Türkiye ve Dünyada tüberkülozun moleküler epidemiyolojisi. V. Tüberküloz Sempozyumu ve VI. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı'nda; 2007; Ankara, 2007: 33-42.
- [34] Tansel Ö. Klasik Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı'nda; Samsun, 2003: 347-351.
- [35] World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [36] Aktaş, E., Özkütük, N., Sürücüoğlu, S., Gazi, H., Çakmak, R., Özbakkaloğlu, B. Mycobacterium tuberculosis'in birinci seçenek

antitüberkuloz ilaçlara karşı duyarlılığının belirlenmesinde dört farklı yöntemin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 2008,22(1),43-48.

- [37] CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 3rd ed. CLSI standard M24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- [38] Özkütük, N. Antibiyotik Duyarlılık Test Yöntemleri. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Erzurum, 2009, 49-74.
- [39] Rüsch-Gerdes, S., Domehl, C., Nardi, G., Gismondo, M.R., Welscher, H.M., Pfyffer, G.E. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, 37(1), 45-48. doi:10.1128/JCM.37.1.45-48.1999.
- [40] Woods, G.L., Lin, S.Y.G., Desmond, E.P. Susceptibility test methods: Mycobacteria, Nocardia, and other actinomycetes. In: *Manual of Clinical Microbiology*. (Ed: James Jorgensen, Michael M. Pfaller, Karen C. Carroll, Mary L. Landry), 2015, ASM Press, Washington, 1356-1379.
- [41] Angeby, K., Werngren, J., Toro J.C., Hedström G., Petrini, B, Hoffner, S.E. Evaluation of the BacT/ALERT 3D system for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003, 9(11), 1148-1152. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00783.x.
- [42] Tortoli E., Palomino, J. C. New Diagnostic Methods. In: *Tuberculosis 2007, From basic science to patient care* (Ed: Juan Carlos Palomino Sylvia Cardoso Leão Viviana Ritacco), 2007, First Edition, tuberculosistextbook.com, 441-473.
- [43] Dohál, M., Porvazník, I., Pršo, K., Rasmussen, E.M., Solovič, I., Mokřý, J. Whole-genome sequencing and Mycobacterium tuberculosis: Challenges in sample preparation and sequencing data analysis", *Tuberculosis (Edinb)*, 2020, 123, 101946, doi: 10.1016/j.tube.2020.101946.
- [44] Domínguez, J., Boeree M.J., Cambau, E., et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement", *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, 20(1), 24-42, doi: 10.5588/ijtld.15.0221.
- [45] Cirillo, D. M., P. Miotto, P, Tortoli, E. Evolution of Phenotypic and Molecular Drug Susceptibility Testing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017, 1019, 221-246. doi: 10.1007/978-3-319-64371-7_12.
- [46] Nguyen, T. N. A., Anton-Le Berre, V, Bañuls, A.L., Nguyen, T.V.A. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis; A literature review, *Frontiers in Microbiology*. 2019, 16(10), 794. doi: 10.3389/fmicb.2019.00794.
- [47] The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NCSA 3.0 IGO.
- [48] Drobniewski, F., Rüsch-Gerdes, S., Hoffner, S. Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium

- tuberculosis (EUCAST document E.DEF 8.1)--report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clinical Microbiology and Infection*. 2007,13(12),1144-1156. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01813.x.
- [49] Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A. Yeni nesil DNA dizileme. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2011,1(1),11-8.
- [50] Yıldırım, S. Yeni Nesil Analiz Platformlarının Prensipleri. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve Epidemiyoloji* (Ed.: Rıza Durmaz, Özgen Eser, Barış Otlu), Akademisyen Kitabevi, Ankara, 2022, s. 223-232.
- [51] WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [52] CLSI. Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 1st ed. CLSI supplement M62. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018
- [53] Senol, G., Erbaycu, A., Ozsöz, A. Incidence of cross resistance between rifampicin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis strains in Izmir, Turkey, *Journal of Chemotherapy*, 2005, 17(4), 380-384. doi: 10.1179/joc.2005.17.4.380.
- [54] Rukash, I., Said, M.S., Omar, S.V., et al. Correlation of rpoB mutations with minimal inhibitory concentration of rifampin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis in an HIV/AIDS endemic setting, South Africa. *Frontiers in Microbiology* 2016, 7,1947. doi: 10.3389/fmicb.2016.01947.
- [55] Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [56] Jamieson, F.B., Guthrie, J.L., Neemuchwala, A., Lastovetska, O., Melano, R.G., Mehaffy, C. Profiling of rpoB mutations and mics for rifampin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, 52(6), 2157-2162, Haz. 2014, doi: 10.1128/JCM.00691-14.
- [57] Li, M.C., Wang X.Y., Xiao T.Y., et al. rpoB Mutations are associated with variable levels of rifampin and rifabutin resistance in Mycobacterium tuberculosis”, *Infection and Drug Resistance*, 2022, 28(15), 6853-6861, doi: 10.2147/IDR.S386863.
- [58] Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance, second edition. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [59] Mvelase, N. R., Pillay, M., Sibanda, W., Ngozo, J.N., Brust, J.C.M., Mlisana, K.P. rpoB mutations causing discordant rifampicin susceptibility in Mycobacterium tuberculosis: Retrospective analysis of prevalence, phenotypic, genotypic, and treatment outcomes. *Open Forum Infectious Diseases*, 2019, 6(4), ofz065. doi: 10.1093/ofid/ofz065.
- [60] Rigouts L., Gumusboga M., de Rijk W.B., et. Al. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for Mycobacterium tuberculosis

- isolates with specific *rpoB* mutations, *Journal of Clinical Microbiology* 2013, 51(8), 2641-2645. doi: 10.1128/JCM.02741-12.
- [61] Ho, J., Jelfs, P., Sintchenko, V., Phenotypically occult multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: dilemmas in diagnosis and treatment. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 2013, 68(12), 2915-2920. doi: 10.1093/jac/dkt284.
- [62] Lin, W.H., Lee, W.T., Tsai, H.Y., Jou, R. Disputed *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and tuberculosis treatment outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2021, 65(7), e01573-20, doi: 10.1128/AAC.01573-20.
- [63] ElMaraachli W., Slater M, Berrada Z.L., et al. Predicting differential rifamycin resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by specific *rpoB* mutations. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases* 2015, 19(10), 1222-1226. doi: 10.5588/ijtld.14.0936.

