T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özlem TANSEL

PİRAZİNAMİDE DİRENÇLİ *MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS* KOMPLEKS KÖKENLERİNDE *PncA* GENİNDEKİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Pelin YÜKSEL

EDİRNE – 2005

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özlem TANSEL

PİRAZİNAMİDE DİRENÇLİ *MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS* KOMPLEKS KÖKENLERİNDE *PncA* GENİNDEKİ MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Pelin YÜKSEL

Destekleyen Kurum: Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı

Tez No : 2002K120500

EDİRNE – 2005

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığımdan bu yana yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Prof.Dr. Murat TUĞRUL'a, her zaman her konuda desteğini benden esirgemeyen, eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Özlem TANSEL'e, değerli bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Metin OTKUN, Prof. Dr. Filiz AKATA, Yard. Doç. Dr. Figen KULOĞLU ve Yard. Doç. Dr. Müşerref OTKUN'a Tezimin moleküler metot kısmının çalışma prensiplerini öğreten Prof. Dr. Ahmet SANİÇ ve Veteriner Hekim İlker URUK'a ve çalışmalarım sırasında yardımlarını aldığım Anabilim dalındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkürederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……..1
GENEL BİLGİLER……...3
KLİNİK……5
TEDAVİ……..6
MİKROBİYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ……...13
GEREÇ VE YÖNTEMLER**……...18**
BACTEC KÜLTÜRÜ……..18
NAP TESTİ İLE İDENTİFİKASYON……...18
KORD OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ……19
İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ……..19
PİRAZİNAMİDAZ TESTİ……...22
PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE
MİKOBAKTERİ TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU……23
DNA DİZİ ANALİZİ……26
BULGULAR……29
TARTIŞMA**……..33**
SONUÇLAR……38
TÜRKÇE ÖZET……..39
İNGİLİZCE ÖZET……...40
KAYNAKLAR……..41
ÖZGEÇMİŞ……48

SİMGE VE KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
EZN	Ehrlich- Ziehl- Neelsen
GI	Üreme İndeksi (Growth Index)
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
MTK	Mycobacterium tuberculosis kompleks
NAP	p-Nitro-α-Acetylamino-β-Hydroxypropionate
PANTA	Polimiksin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Amfoterisin B, Azlosilin
PRA	PCR- RFLP Analizi
PCR	Polymerase Chain Reaction
PZA	Pirazinamid
PZase	Pirazinamidaz enzimi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RE	Restriksiyon Enzimi
Taq	Thermus aquaticus

GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz, bilinen en eski hastalıklardan biri olup, 21. yüzyılın başlarında olmamıza rağmen hala önemini korumaktadır(1). Özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz basiliyle infekte hastaların artması, tanı ve duyarlılık testlerinin çok zaman alması, hastalığın tedavisinde ve kontrolünde sorun olmaktadır. Tüberkülozun etkin tedavisi uygun tedavi rejimlerinin, yeterli süre kullanılmasıdır (2,3). Uygun tedavi rejimlerinin seçimi ise standardize edilmiş, hızlı ve doğru yorumlama özelliklerine sahip duyarlılık yöntemlerine bağlıdır. Günümüzde antitüberküloz ilaçlara karşı meydana gelen direnç mekanizmaları anlaşılmaya başlanmış, dirençten sorumlu genlerin bazıları bulunmuştur (4). Moleküler metodlarla direnç genindeki mutasyonun varlığı tespit edilip, ilacın duyarlılık sonucu çok kısa sürede saptanabilmektedir (5).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlar izoniazid, rifampisin, pirazinamid (PZA), streptomisin ve etambutol'dür. En fazla basil kaviter lezyonlarda bulunur. Bunlar yüksek metabolik aktiviteye ve hızlı çoğalma özelliğine sahiptir. Bu gruba en etkili ilaç öncelikle izoniazid olmak üzere rifampisin ve streptomisindir. Makrofaj içinde ve akut inflamasyonlu dokularda bulunan çok yavaş çoğalan, çok düşük metabolik aktiviteye sahip basillere ise PZA etkilidir. PZA sentetik yapıda bakterisidal etkili bir ilaçtır (3,6,7).

Türkiye gibi primer ilaç direncinin yüksek olduğu ülkelerde tedaviye en az dört ilaçla başlanmalıdır. İlk 2 ay izoniazid, rifampisin, PZA, etambutol daha sonra 4 ay

izoniazid ve rifampisin verilebilir (2,3). Türkiye'de tek başına PZA'e primer direnç %3, sekonder direnç % 13 olarak saptanmıştır. (2)

Mycobacterium tuberculosis kökenlerinin ürettikleri pirazinamidaz enzimi (PZase) PZA'i pirazinoik asit denilen aktif şekline dönüştürür. PZase'ni kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar PZA direncinden % 72-97 oranında sorumlu bulunmuştur. Yüksek minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerli PZA direnci olan ancak *pncA* geninde mutasyon içermeyen kökenlerde başka direnç mekanizmalarının etkili olduğu düşünülmektedir. (8)

Bu çalışmada amacımız; kord oluşumu, p-Nitro-α-Acetylamino-β-Hydroxypropionate (NAP) testi, PCR-RFLP Analizi (PRA) yöntemiyle *Mycobacterium tuberculosis kompleks* (MTK) olduğu gösterilen kökenlerde moleküler metodla PZA direncinden sorumlu *pnc*A geninde saptanan mutasyonları, klasik duyarlılık yöntemleriyle karşılaştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Yaşının 300 milyon olduğu bilinen MTK doğada toprakta, sularda, petrol atıklarında bol miktarda bulunmaktadır (1). Robert Koch'un, 24 Mart 1882'de tüberküloza neden olan bakteriyi tanımlaması tüberküloz tarihinin dönüm noktası olmuştur. O dönemde tüberküloz Avrupa'da her yedi ölümden birinin sebebi olarak bildirilmiştir (2,9). Günümüzde hala dünyanın en önemli sağlık sorunlarından biri olup, 1.86 milyar kişi tüberküloz basiliyle infektedir, bunların % 10'unda aktif infeksiyon gelişmesi ve çoğu genç yetişkinlerden olmak üzere hastaların en az % 23'ünün kaybedilmesi beklenmektedir (10).

Mycobacterium, mycobacteriacea ailesinin tek genusudur. Sporsuz, hareketsiz, aside dirençli, bölünme süreleri 12-18 saat olup yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Mikobakterilerin hücre duvar yapısı alışılagelmiş Gram negatif ve Gram pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, kompleks bir yapıdır. Bu kompleks de en iç tabaka diğer bakterilerde de görülen plazma membranı'dır. Orta tabakanın koru ve duvarının iskeleti peptidoglikan arabinogalaktan'ın mikolik asit esterinden oluşan mycolylarabinogalaktan peptidoglikan oluşturur. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda non kovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır. Ökaryonlu hücreler için biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin bolluğu ve asimetrik dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Hidrofobisite ve düşük permeabilite gibi özellikleri nedeni ile bazı yararlı metabolitlerin kullanabilme güçlüklerine karşılık, hidrofilik antibiyotikler,

metal iyonları ve dezenfektanlar gibi kimyasal toksik ajanlar oksijen radikalleri gibi hücresel toksinlere, asit (pH 5-6) ve alkali ortama, alanin boyalara karşı intrinsik dirence sahiptirler. Bu özellikleri ile kendilerini hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı koruyan mikobakteriler, hücre duvarlarında taşıdıkları bazı yapı elemanları ile konağın immun cevabını da etkileyerek asemptomatik taşıyıcılıktan, kronik granülomatöz, tedaviye cevap vermeyen yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açarlar (10).

Tüberküloz 90'dan fazla antijene ve değişik virülans faktörlerine sahip MTK basili ile konağın mononükleer fagositleri ve T lenfositlerinin ilişkisine bağlı olarak gelişen kronik bir infeksiyon hastalığıdır. Basil solunum, sindirim, deri, genitoüriner sistem, konjunktivadan girebilir. Sıklıkla solunum yoluyla alveole ulaşan basil burada alveoler makrofajlarca fagosite edilir. Basil aktif olmayan makrofajlarda ürer, sonunda bu hücreler infekte olur. Bu dönemde mikobakterilerin yıkılarak yok edilmesi alınan mikobakterilerin virulansı ve konak fagositlerinin intrensek mikrobisidal kapasitelerine bağlıdır. Başlangıçta hücre içi yıkımdan kaçabilen mikobakteriler çoğalıp makrofajların parçalanmasına yol açacaktır. Basiller, hücre debrisi, konak kemotaktik faktörleri ile dolaşımdan monositleri ve lenfositleri bu bölgeye çeker. Bölgeye gelen monositler, makrofajlara dönüşür; bunlar basilleri daha kolay fagosite eder ama tahrip edemez. Bu devrede mikobakteriler logaritmik olarak çoğalır, monositler birikmeye devam eder. Basiller lenf yoluyla komşu lenf bezlerine taşınır; kan akımına karışan basiller kemik iliği, dalak, böbrek, karaciğer, kemik, merkezi sinir sitemine yayılır. Olayın başlangıcından 2-4 hafta sonra kendilerine sunulan antijen ile aktive olan CD4+ T hücreleri bölgeye gelir ve erken lezyonlarda çoğalırlar. Bu yardımcı T hücreleri saldıkları değişik sitokinlerle makrofajları aktive edip basilleri öldürebilme yeteneği kazandırır. Bu devrede basillerin logaritmik çoğalması durur. Bu primer lezyonlardaki merkezi solid nekroz mikobakterilerin hücre dışı üremesini inhibe eder. Sonuçta basiller dormant hale gelir, sonraki dönemlerde immun sistem her hangi bir nedenle zayıflarsa yeniden aktive olur. Özetle basil akciğere ulaştıktan sonra farklı konak mekanizmalarıyla karşılaşır. MTK ile infeksiyonun sonucu, basilin üreme ve öldürülmesi ile doku nekrozu, fibröz ve rejenerasyon arasındaki dengeye bağlıdır (11).

KLİNİK

Primer Tüberküloz (Çocuk Tüberkülozu)

İmmün yanıtı yetersiz konakta primer infeksiyonu izleyen ilk 5 yıl içinde akciğerdeki Ghon odağı ve bu lezyonun drene olduğu lenf bezlerinde (primer kompleks) granulomatöz inflamasyonun genişlemesi ve radyolojik olarak görünür hale gelmesine primer tüberküloz denir (2). Tüberkülozun yaygın olduğu ülkelerde basille ilk karşılaşma erken yaşlarda olduğu için çocuk tüberkülozu olarak da adlandırılır (12). Akciğerlerde gelişen pnömonik lezyon ve hiler adenopati genellikle semptom oluşturmaz. Akciğerdeki primer odaktaki lezyonlar ilerlerse, bronkopnömoni, lober pnömoni, kavitasyon (ilerleyici primer tüberküloz) ve visseral plevradaki primer lezyondaki basiller plevraya dökülürse plevral efüzyon gelişebilir. Büyümüş lenf bezleri bronşa bası yaparak obstrüktif amfizem veya atalektazi gelişimine, mediastinal lenf bezleri perikard ve özafagusu etkileyerek, perikardiyal efüzyon ve trakeo-özofajiyal fistüle neden olabilirler. Lenfo-hematojen yayılımla miliyer-menenjit tüberküloz, disemine tüberküloz, uzak organ yayılımıyla servikal lenfadenopati, kemik, eklem ve böbrek tüberkülozu gelişebilir. (12,13)

Sekonder Tüberküloz (Yetişkin Tüberkülozu)

Primer infeksiyon geçiren ve tüberkülin deri testi pozitifleşen kişilerde, infeksiyondan en az beş yıl sonra, yaşamlarının herhangi bir döneminde gelişen tüberkülozdur (2). En yaygın görülen tüberküloz şekli olup, hastalığın sağlam kişilere bulaşmasındaki rolü nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Endojen reaktivasyon veya ekzojen reinfeksiyonla gelişebilir.

Endojen reaktivasyon, primer infeksiyon sırasında oksijen parsiyel basıncının yüksek olduğu kemik, böbrek, meninksler, akciğer apeksi gibi organlara lenfo-hematojen yolla yerleşen ve dormant halde kalan basillerin konağın hücresel immün yanıtının zayıfladığı durumlarda çoğalmaya başlamasıyla oluşur (2).

Ekzojen reinfeksiyon, tüberküloz basiliyle yeniden karşılaşan kişide, mevcut hücresel immünitenin basillerin akciğer apekslerinde çoğalmasını önleyememesi sonucu meydana gelir (2).

Hücresel immünitenin yetersiz oluşu nedeniyle, basillerin üremesi için uygun bir ortam olan kaviter lezyonlar meydana gelir. İştahsızlık, yorgunluk, öğleden sonra çıkan ateş, gece terlemesi gibi sinsi semptomlarla başlar. Kaviteden bronşa boşalan materyal nedeniyle öksürük, mukopürülan veya kanlı balgam, parietal plevra tutulumu sonucu göğüs ağrısı, bazen pnömoni, yaygın parankim tutulumu nedeniyle dispne, çomak parmak görülebilir (2,12).

Erken dönemde hiponatremi, plörezi, ampiyem, pnömotoraks, larenjit, sindirim sistemine hastalığın yayılması, geç dönemde ise hava akımı obstrüksiyonu, bronşektazi, ağır akciğer hasarı, aspergilloma, masif hemoraji, amiloid, akciğer karsinomu, akut sıkıntılı solunum sendromu gibi komplikasyonlar çıkabilir (12).

TEDAVİ

Tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlar; izoniazid, rifampisin, PZA, streptomisin, etambutol olup, etambutol dışındaki bütün ilaçlar bakterisidal etkiye sahiptir. Toksisiteleri çok azdır, kombine şekilde kullanıldıklarında etkilidirler (2,12).

İkinci seçenek ilaçlar; sikloserin, etionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin, PAS (para amino salisilik asit), kinolonlar, amikasin, rifabutin, klofazimin, beta-laktam inhibitörleri olup, daha az etkili, daha çok toksik, daha az tolere edilebilen, genellikle dirençli tüberküloza sahip hastalarda kullanılan ilaçlardır (2,12).

Primer direnç, daha önce hiçbir tüberküloz ilacı kullanmamış bir hastada, bir veya daha fazla ilaca karşı direnç varlığı olarak tanımlanır. Bu kişinin infeksiyonu, ilaçlara dirençli basillere sahip bir hastadan aldığını gösterir (2,14).

Kazanılmış (Sekonder) direnç, hatalı tedavi kullanılması veya tedaviye uyumsuzluk nedeniyle tedavi sırasında gelişen dirençtir. Bu hastalar tedavi edilemezse yaydıkları basillerle primer dirençli hastaların sayısının artmasına yol açacaklardır (2,14).

Başlangıç direnci, daha önce herhangi bir tüberküloz ilacı kullanıp kullanmadığı belirlenemeyen hastalarda saptanan dirence denir. Başlangıç direncinin düzeyinin saptanması, bir toplumdaki tüberküloz basilinin özelliklerinin tanımlanmasında, tedavi rejimlerinin düzenlenmesinde ve rutin duyarlılık testi gereksinimi konusunda karar vermede yardımcı olur (2).

Herhangi bir ilaçla karşılaşmamış MTK'lerden 10^{5-8} basilden birinde tüberküloz ilaçlarından birine karşı doğal olarak direnç vardır, buna mutasyonel direnç denir (2). Tedavide tek bir ilaç kullanılması durumunda, 3-6 haftada kullanılan ilaca duyarlı basiller yok edilir ancak ilaca dirençli basiller hızla çoğalır ve tedavi başarısız olur. En az iki ilaç kullanımı durumunda tüberkülozda direnç gelişimi önlenebilir (2,14).

En fazla basil kaviter lezyonlarda bulunur, bunlar yüksek metabolik aktiviteye ve hızlı çoğalma özelliğine sahiptir. Bu gruba en etkili ilaç öncelikle izoniazid olmak üzere rifampisin ve streptomisindir. Solid kazeöz odaklarda aralıklı olarak ve çok kısa süre metabolik aktivite gösteren (yarı dormant, persister) basiller bulunur, bunlara rifampisin etkilidir. Makrofaj içinde ve akut inflamasyonlu dokularda bulunan çok yavaş çoğalan, çok düşük metabolik aktiviteye sahip basillere ise PZA etkilidir. İyileşmiş fibröz lezyonlar, kalsifiye odaklarda hiçbir metabolik aktivite göstermeyen, dormant basiller bulunur, bu gruba ise etkili ilaç yoktur (2,14).

Başlangıç yoğun tedavi veya erken bakterisidal evrede, 1-3 ay, 3-5 bakterisidal ilaç kombinasyonu günlük olarak kullanılır. Bu dönemde özellikle hızlı metabolik aktivite gösteren basiller yok edilir, hasta bulaşıcı olmaktan çıkarılır, direnç gelişme riski azaltılır. Sürdürülen tedaviyle yani yavaş sterilize edici evrede, kalan az sayıdaki basil, 2-3 ilaçla 4-6 ayda yok edilerek, hastalığın nüksü önlenir (2). Türkiye gibi primer ilaç direncinin yüksek olduğu ülkelerde tedaviye en az 4 ilaçla başlanmalıdır. Streptomisine primer direncin yüksek olması nedeniyle dördüncü ilaç olarak etambutol tercih edilmelidir. İlk iki ay izoniazid, rifampisin, PZA, etambutol daha sonra 4 ay izoniazid, rifampisin verilebilir. Türkiye'de 1990-1994 yılları arasında tüberküloz ilaçlarına karşı direnç sonuçları Tablo 1'de görülmektedir (2).

Tedavinin gidişi en iyi şekilde ikinci, dördüncü ve altıncı aylarda yapılan balgam yayma ve kültürleriyle izlenir (2). Daha önce tüberküloz tedavisi gören (en az bir ay), dirençli tüberküloza sahip bir hastayla temas öyküsü bulunan, üç aylık bir tedaviden sonra yayma pozitifliği devam eden, yüksek ilaç direnci bulunan (primer isoniazid direnci % 4'den fazla) bölgelerden gelen, HIV ile infekte olup kaviter lezyonları bulunan, düşük sosyoekonomik koşullarda yaşayan hastalarda tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç testleri yapılmalıdır (2). Bu hastalarda uygulanacak yeni tedavi rejiminin başarısızlığı, sadece hastanın yaşamını tehdit etmekle kalmaz, uzun süreli ve tekrarlayan hastane tedavilerini de gerektireceğinden ekonomik yük oluşturur, daha da önemlisi tedavisi güç basillerin yayılmasına neden olur (2).

Geleneksel kültür yöntemleriyle 21 günde sonuç alınabildiği düşünülürse hızlı direnç saptama metodlarıyla sonuçların alınması tedaviye olumlu katkı sağlayacaktır.

İki veya daha fazla tüberküloz ilacına karşı direnç oluştuğunda çok ilaca dirençli tüberküloz olarak tanımlanır (2). Çok ilaca dirençli hastalarda 4-7 ilaçlı yeni tedavi rejimleri oluşturulur, bu amaçla ikinci seçenek ilaçlar kullanılır (Tablo 2) (2,15).

Tablo1. Türkiye'de 1990-1994 yılları arasında tüberküloz ilaçlarına karşı direnç sonuçları(2)

Direnç	%
1-Primer Direnç	
A) Bir ve daha fazla ilaca direnç	14-27
B)Tek ilaca karşı toplam direnç	7-16
İzoniazid	5-12
Rifampisin	5-15
Streptomisin	7-21
Etambutol	1-5
Pirazinamid	3
C)İki ve daha fazla ilaca direnç	7-10
D)İzoniazid + Rifampisine direnç	1-7
2-Sekonder Direnç	
A) Bir ve daha fazla ilaca direnç	37-66
B)Tek ilaca karşı toplam direnç	10-26
İzoniazid	27-48
Rifampisin	15-58
Streptomisin	12-32
Etambutol	2-27
Pirazinamid	13
C)İki ve daha fazla ilaca direnç	27-56
D)İzoniazid + Rifampisine direnç	8-42

.

Tablo 2. Çok ilaca dirençli tüberkülozlu hastalar için önerilen tedavi rejimleri (2,15)

Direnç Kalıbı	ÖnerilenTedavi	Süre	Cerrahi Tedavi
INH ve/ veya SM	RİF+PZA+EMB+AK	6-9 ay	Gereksiz
INH+EMB ve/veya SM	RİF+PZA+CİP+AK	6-12 ay	Gereksiz
INH+RİF ve/veya SM	PZA+EMB+CİP+AK	18-24 ay	Düşünülebilir
INH+RİF+EMB ve/veya SM	PZA+CİP+AK+2 ilaç	Kültür negatifliğinden sonra 24 ay	Düşünülebilir
INH+RİF+PZA ve/veya SM	EMB+CİP+AK+2 ilaç	Kültür negatifliğinden sonra 24 ay	Düşünülebilir
INH+RİF+PZA+EMB ve/veya SM	CİP+AK+3 ilaç	Kültür negatifliğinden sonra 24 ay	Mümkünse evet

RİF:rifampisin, INH:izoniazid, PZA:pirazinamid, EMB:etambutol, SM:streptomisin, CİP:siprofloksasin veya ofloksasin, AK:amikasin, diğer ilaçlar:etionamid, sikloserin, PAS

İzoniazid

İzoniazid, sentetik yapıda ve çoğalan basiller üzerine bakterisid etkili bir ilaçtır (6). İzoniazid bir ön ilaçtır, katalaz-peroksidaz enzimiyle aktive olur. Katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan *katG* genindeki mutasyonlar % 60-70 oranında izoniazide karşı yüksek MİK değerli dirençten sorumludur (16). Bu gende en sık görülen Ser 315 Thr mutasyonudur (% 40) (16). *KatG* geninde sıklıkla saptanan Arg 463 Leu mutasyonunun polimorfizm olduğu Çin, Rusya ve bazı Asya ülkelerinde izoniazide duyarlı izolatlarda da bulunduğu gösterilmiştir (17).

Mikolik asit biyosentezinde rol alan iki genden enoyl-ACP (acyl carrier protein) reduktaz enzimini kodlayan *inhA* geni (< %10) ve yağ asidi uzamasında önemli olan beta ketoaçil ACP sentaz enzimini kodlayan *kasA* genindeki mutasyonlar da izoniazid direncinden sorumlu tutulmuştur (16,18). Ancak *kasA* geninde mutasyon saptanan

izolatlarda aynı zamanda *katG* veya *inhA* genlerinde de mutasyon bulunduğundan bu genin izoniazid direnciyle ilişkisi şüphelidir (18).

Oksidatif strese karşı hücresel cevaptan sorumlu alkil-hidroperoksid reduktaz enzimini kodlayan *ahpC* genindeki mutasyonların da (~ %10) dirençten sorumlu olduğu düşünülmüş ancak bu mutasyona da *katG* genindeki mutasyonların eşlik edebildiği görülmüştür (16,17,18).

Rifampisin

Rifampisin yarısentetik, bakterisidal etkili bir ilaçtır (6). Bu ilaç DNA'ya bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesine bağlanıp RNA sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Yaklaşık 500 rifampisine dirençli MTK kökenlerinin % 96'sında rifampisin direncinden, RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 81 bp'lik bölgesindeki (27 kodon, 507- 533) mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir (17). En sık görülen ve yüksek MİK değerli dirençten sorumlu mutasyonlar 526 ve 531. kodonlarındadır (% 65- 86) (18). Düşük MİK değerli rifampisin direnci 511, 516, 518 ve 522. kodonlardaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur (18). En sık Ser 531 Leu (% 42) ve His 526 Tyr (% 23) mutasyonları saptanmıştır (17).

Etambutol

Etambutol, sentetik yapıda, bakteriostatik etkili bir ilaçtır (17). Etambutol arabinogalaktan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinozil transferaz enzimiyle etkileşerek MTK' in hücre duvarı sentezini bozar. Arabinozil transferaz enzimini kodlayan *embCAB* geninde meydana gelen mutasyonlar % 70 oranında etambutol direncinden sorumludur (16,17). Özellikle en sık görülen mutasyonlar % 60 oranında *embB* geninin 306. kodonundaki Met aminoasidindeki değişikliğe bağlıdır (16,17). Yüksek MİK değerli etambutol direnciyle Met 306 Ile mutasyonundan ziyade Met 306 Leu, Met 306 Val mutasyonları ilişkili bulunmuştur (16).

Streptomisin

Streptomisin, bakterisidal etkili bir aminoglikozittir (6). Streptomisin bakteri ribozomuna bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Ribozomal protein S12'yi

kodlayan *rpsL* genindeki mutasyonlar (% 60) ve 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlar (< %10) streptomisin direncinden sorumludur (16). En sık görülen *rpsL* genindeki Lys 43 Arg mutasyonu olup daha nadiren Lys 43 Thr mutasyonu da görülmektedir (16,17). Bu gende ayrıca Lys 88 Arg veya Lys 88 Gln mutasyonları da saptanmıştır. Bu gendeki mutasyonlar yüksek MİK değerli streptomisin direncinden sorumlu bulunmuştur (17). Streptomisin direncinden sorumlu diğer mutasyonlar *rrs* geninin 530 halkası ve 915 bölgesinde bulunmaktadır. 530 halkasında C 491 T, C 512 T, C 516 T, A 513 C, A 513 T nükleotid değişiklikleri görülmüştür. 915 bölgesinde ise C 903 A, C 903 G, A 904 G nükleotid değişiklikleri sıktır (17). Streptomisine karşı düşük değerli MİK direncinin, hücre zarında oluşan değişiklikler sonucu ilacın hücre içine girişinin azalmasıyla olabileceği düşünülmektedir (17).

Kanamisin, Amikasin, Kapreomisin

Kanamisin, amikasin ve kapreomisin protein sentezini inhibe ederek etkilerini gösteren aminoglikozitlerdir. Streptomisin ile kanamisin veya amikasin arasında çapraz direnç bulunmazken, kanamisin ve kapreomisin arasındaki çapraz direnç değişkendir. Kanamisin ve amikasine karşı yüksek MİK değerli dirençten *rrs* geninde A 1400 G nükleotid değişikliğinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (17).

Florokinolonlar

Florokinolonların bakterideki hedefi DNA giraz (Topoizomeraz II) enzimidir. Bu enzim kromozomal çift sarmallı bakteri DNA'sında reversibl kesme, tekrar bağlama fonksiyonuyla negatif kıvrılmalar yaparak, DNA'yı hücre içine sığdırır (16,17). DNA giraz enzimi *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt ve *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B alt birimden oluşur. MTK'in *gyrA* genindeki küçük bir bölgesinde oluşan mutasyonlar yüksek MİK değerli kinolon direncinden sorumlu bulunmuştur (> % 90) (16,17). *GyrA* genindeki Ser 95 Thr mutasyonu polimorfizm olarak değerlendirilmiştir, duyarlı izolatlarda da vardır. Bununla birlikte *gyrB* genindeki mutasyonlar nadirdir, düşük MİK değerli dirençten sorumludur ve fenotipe her zaman direnç olarak yansımamaktadır.

Rifabutin

Rifampisin, rifamisin-B'nin yarı sentetik türevidir, rifabutin ise rifamisinin spiropiperidil derivesidir (17,19). Etki mekanizması rifampisinle aynıdır. Rifampisin ve rifabutin arasında çapraz direnç oranı yüksektir.

Ethionamid

Ethionamid, izoniazidin yapısal analoğu olup, MTK 'de mikolik asit biyosentezini inhibe eder. Ethionamid direncinden *inhA* genindeki mutasyonların sorumlu olduğu düşünülmektedir (6,17).

Pirazinamid

Nikotinamidin sentetik analogudur. İzoniazid derecesinde olamasa bile oldukça güçlü tüberkülosid etkisi vardır. Bu etkisini hem çoğalma halindeki hem de yarı dormant duruma geçmiş mikobakteriler üzerinde gösterir. Monositler ve makrofajlar içindeki yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili tüberkülosiddir. Kazeöz lezyonlardaki mikobakterilere rifampisin kadar, fakat izoniazid'den daha fazla etkilidir. PZA tüberküloz tedavisini kısaltmada çok önemli bir rol oynar çünkü pirazinamid diğer tüberküloz ilaçları tarafından öldürülmeyen asidik ortamlardaki yarı dormant basil popülasyonunu öldürür. PZA 'in aktivitesini göstermesi için neden asidik bir ortama gereksinim duyduğu bilinmemektedir. Tüberkülosid etkisinin mekanizması belli değildir. Günümüzde tedavi programlarında birinci sıra ilaç şeklinde izoniazid ve rifampisine ek olarak kullanılmaktadır. Mide-barsak kanalından iyi absorbe edilir. Vücutta tüm dokulara ve vücut sıvılarına kolayca dağılır. Esas olarak böbreklerden atılarak elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 10-16 saattir (7).

PZA'e dirençli kökenler pirazinoik aside duyarlıdır ancak pirazinoik asit farmakokinetik özelliklerinden dolayı in vivo etkisizdir. PZA direncinin, %72- 97 kadar olguda, pirazinamidazı kodlayan *pncA* geninde ortaya çıkan mutasyonlara bağlı olduğu belirlenmiştir. Direnç enziminin işlevinin bozulmasına bağlı olduğu için mutasyonlar *pncA* geninde çok çeşitli ve değişik bölgelerde görülmektedir (8,20). Buna karşın *pncA* geninin üç bölgesinde (3 ile 17, 61 ile 85 ve 132 ile 142. kodonlar

arasında) belli bir kümeleşme görülmektedir. Bu bölgede missense mutasyonların yanısıra delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonlarının olabileceği bilinmektedir (8).

MİKROBİYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

Klasik Yöntemlerle Kültür, İdentifikasyon ve Antibiyogram

A) Geleneksel kültür yöntemleri olarak en sık yumurtalı besiyerleri (Löwenstein-Jensen, Petragnani, Ogawa) ve agarlı besiyerleri (Middlebrook 7H10, 7H11) kullanılır (2,21,22). Ekim yapılan besi yerleri 35-37 °C'de 6-8 hafta inkübe edilir (2,22). Bu besiyerlerinde minimal inhibitör konsantrasyon, direnç-oran metodu ve orantılama (proportion) metodları kullanılarak antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testleri de yapılmaktadır. Direnç tayininde sıklıkla orantılama metodu kullanılır. İlaçsız ve test edilecek ilacı içeren iki ayrı besiyerine ekim yapılır. Ekimden dört hafta sonra ilaçlı besiyerindeki koloni sayısı, ilaçsız besiyerindeki koloni saysının % 1'inden fazla ise, basilin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir (2).

B) BACTEC radyometrik sisteminde kültür şişelerinde 14 C ile işaretlenmiş palmitik asit içeren 7H12 veya BACTEC 12B adıyla bilinen besiyeri bulunur. Mikobakteri bu yağ asidini metabolize ederek $14CO_2$ oluşturur. Şişe içindeki işaretli CO_2'deki radyoaktivite ölçülerek üreme miktarı belirlenir (2,21). Pozitif BACTEC 12B şişelerinden hazırlanan ve Ehrlich- Ziehl- Neelsen (EZN) yöntemiyle boyanan preparatlar x 1000 büyütmede incelendiğinde, preparatta görülen aside dirençli bakterilerin gelişi güzel, düzensiz bir araya gelmiş bakteri yığınları şeklinde değil de kordonlar oluşturacak şekilde ve her bir kordonu oluşturan yüzlerce hatta binlerce basilin her birinin uzun ekseninin kordonun uzun eksenine paralel olması, böylelikle kordonun iç yapısının son derece düzenli gözükmesi durumunda, bir mikobakteri kökeninin kord oluşturma özelliğine sahip olduğundan söz edilir. Bu şekilde uzun kordonlar oluşturabilme özelliği MTK türlerinin hücre duvarında varolan trehaloz-6',6'-dimikolat maddesinin varlığına bağlanmıştır. Bu sebeple kord oluşturma özelliği temel olarak MTK'e ait bir özellik olarak kabul edilir.

Yayma yapılıp aside dirençli boyalarla basil olduğu gösterilen balgam örnekleri, geleneksel kültürde 18 günde, BACTEC sisteminde ise ortalama 8 günde

üreme göstermektedir. Yayma negatif örnekler ise, geleneksel besiyerlerinde ortalama 26 günde, BACTEC sisteminde ise 14 günde üremektedir (2). NAP varlığında MTK kökenlerinin üremeyip, diğer mikobakterilerin üreme özelliğinden yararlanılarak bu sistemle 5 günde identifikasyon da yapılabilmektedir (2,21). Ayrıca geleneksel yöntemlerle 21 günde sonuç alınırken BACTEC sisteminde 5-7 günde ilaç duyarlılık testi yapılabilmektedir (2). Bu yöntemin pahalı oluşu ve radyoizotoplar gerektirmesi özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın kullanımını kısıtlamıştır.

C) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) metodu radyometrik sistemden daha ucuz olup, radyoaktif madde gerektirmez. Middlebrook 7H9 besi yeri ve % 0.25 gliserol içeren tüpün dibinde silikona iyice yerleştirilmiş oksijene duyarlı indikatör bulunur (23,24). Üreyen mikobakteri besiyerinde çözünmüş bulunan oksijeni tüketir, böylece indikatör açığa çıkar, floresanı 365 nm ultraviyole ışığında görülebilir. Üreme ortalama 10 günde saptanabilir. Bu metodla birinci seçenek ilaçlara karşı MTK' in direnci test edilebilmektedir. Test 5-6 gün sürmektedir (23,24).

D) Kolorimetrik yöntem (Alamar Blue), lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi, biyoluminesans (hücresel ATP ölçümü) yöntem, flow sitometri ve E test gibi metodlar denenmekte ve geliştirilmeye çalışılmaktadır (23).

Materyalden MTK Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

A) Polymerase Chain Reaction (PCR): Materyalden bazı organik çözücüler ve etanolle çöktürme yöntemi kullanılarak MTK DNA'sı ekstrakte edilir (25). MTK için özgül DNA sırasına (IS6110, hsp65 geni veya 16S rRNA geni) göre hazırlanan 15-30 bazdan oluşan oligonükleotidler 'primer' olarak kullanılır. Bir tüpe DNA örneği, özgül primerler, Thermus aquaticus (*Taq*) polimeraz enzimi, DNA replikasyonu için gerekli maddeler, nükleotidler konularak Thermocycler cihazına yerleştirilir. Denatürasyon, bağlanma (annealing), uzama (extension) basamaklarından oluşan 30-40 siklus sonrasında, çok sayıda DNA zinciri elde edilir (25,26). Denatürasyon basamağında 92-94 °C ısıda DNA molekülünün iki zinciri birbirlerinden ayrılır. Bağlanma basamağında ısı 37-65 °C'ye indirilerek, ortamdaki primerlerin ayrışmış nükleik asit zincirindeki uygun bölgesine bağlanması, uzama basamağında ısı 72 °C'ye yükseltilerek Taq polimeraz enziminin ortamdaki nükleotidleri kullanarak, bağlanan primerlerden itibaren zincir sentezini yapması sağlanır (25,26). Her siklusta yeni

oluşan DNA zincirleri ikiye ayrılarak yeniden replike olur (26). Etidyum bromid içeren agaroz jelde yatay elektroforez yapılıp, UV ışığında PCR ürünleri gösterilebilir. PCR ile materyaldeki 10 kadar basilin bile saptanması mümkündür. İşlemin yapılması sırasında bakteri veya eski PCR ürünlerinin bulaşması yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir (2,25). Yöntemin güvenirliliği için örneklerle birlikte mutlaka bir negatif ve bir pozitif kontrol kullanılmalıdır (25). Materyaldeki MTK varlığı bu yöntemle bir kaç saatte tespit edilebilmesine rağmen kontaminasyon, inhibisyon ve duyarlık problemleri nedeniyle tanıda rutin kullanılamamaktadır (2).

B) PCR yanında diğer gen amplifikasyon yöntemleri de MTK saptanmasında uygulanmaktadır. Bu yöntemler: ligase chain reaction (LCR), strand displacement amplification (SDA), transkripsiyona dayanan amplifikasyon yöntemleridir (25).

Mikobakterilerin Tür İdentifikasyonunda Kullanılan Moleküler Yöntemler

A) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriksiyon enzimlerinin (RE) keşfi moleküler metodların gelişimini daha da hızlandırmıştır. RE'leri çift zincirli DNA dizisini belli nükleotit dizilerinden (ör. ATGC gibi) tanıyan ve kesen enzimlerdir. RE'leri bakterilerin kendilerini yabancı DNA'lardan korumasını sağlayan enzimlerdir. 1978 yılında RE'lerini ilk tanımlayan Aber W, Smith H ve Nathans D Nobel ödülü kazanmışlardır. Günümüzde yaklaşık 1200 RE tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmada ilk üç harf enzimin kaynağı olan bakteriyi ve rakamda tanımlandıkça 1, 2 ve 3 gibi numarayı ifade eder. Örneğin *Pvu*I enzimi *Proteus vulgaris*'ten elde edilen ilk RE'ni ifade eder. RE'leri genellikle 10 ünite/ml konsantrasyonunda ve % 50 gliserollü tamponda – 20 ^{o}C'de tutulur. Enzimler oldukça pahalı olduğu için steril ortamlarda çalışılmalı ve enzimler buz üzerinde tutulmalıdır. Her enzimin optimum tamponu üretici firma tarafından enzimle birlikte verilmektedir. RE'lerinin DNA analizinde kullanılması ile ayrım gücü oldukça yüksek bir teknik olan RFLP yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin temeli tüm kromozomal DNA veya PCR sonrası elde edilen DNA'nın RE'leri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanarak değerlendirilmesine dayanır. Bu yöntem oldukça özgüldür ve komple DNA analizlerine alternatif olabilir (5). Genomik DNA'nın RE'leri ile kesilmesinde oldukça uzun ve değerlendirmesi zor olan bu yöntem PCR sonrası uygulamalarda nispeten

daha kolay ve kısa sürede uygulanabilir (27). Bu yöntemin avantajı çok az DNA ile çalışılması, kısa sürede sonuç vermesi ve radyoaktif madde kullanılmamasıdır. Yöntemin dezavantajları ise genomda ortaya çıkan doğal mutasyonların kesim bölgelerinin değiştirebilmesi ve bazen kısmi kesimlerin olmasıdır. PCR ürünü, enzim ve tamponu uygun konsantrasyonda karıştırıldıktan sonra enzime uygun sıcaklıkta belirli bir süre (enzime göre değişir) tutulmalıdır. Sonra ise kesilen ürün agaroz jelde yürütülebilir. Günümüzde RFLP tekniği insan genetik çalışmaları (allellerin ayrımı vb.) başta olmak üzere birçok genetik çalışmada kullanılmakta ve her geçen gün yeni RE'leri keşfedilmektedir (5).

B) Mikobakterilerin tür identifikasyonunda; DNA dizi analizi, nükleik asit hibridizasyon yöntemleri de kullanılmaktadır.

Antitüberküloz İlaçlara Karşı Direncin Tespitinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

A) PCR- SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) metodunda ilaç direncinden sorumlu gen PCR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra çift sarmallı DNA ıstılarak zincirlerin ayrılması sağlanır; tek zincir DNA, poliakrilamid jelde yürütülerek nükleotid değişikliklerinin analizi yapılır (2,23,28). Duyarlı ve dirençli fenotip özelliğine sahip suşların ayrılmış DNA zincirinin elektroforetik hareket farklılığı, jel boyanarak karşılaştırılıp, direnç varlığı saptanabilir

B) DNA dizi analizinde yüksek ayırım özelliğine sahip denatüre poliakrilamid jel kullanılarak elektroforez yapılır. Bu jeller tek deoksinükleotid farklılığı olan 500 bp'ye kadar büyüklükteki, tek zincirli oligonükleotidleri ayırabilir. Dizi analizi yapmak istenen bölge için bir grup işaretlenmiş, tek zincirli oligonükleotidler oluşturulur. Bunların herbiri bir sabit uca ve dizideki bir sonraki deoksinükleotidle farklılık gösteren değişken uca sahiptir. Deoksinükleotidlerin sırasını belirlemek için dört farklı enzimatik veya kimyasal reaksiyonla tüm oligonükleotidlerin değişken ucunun adenin (A), timin (T), guanin (G), sitozin (C) ile sonlandırılması sağlanır. Bu dört reaksiyonun oligonükleotid ürünleri daha sonra dizi analizi jelinde yan yana dikey elektroforez yapılır. Mümkün olan bütün oligonükleotidler bu dört sırada temsil edildiğinden DNA dizisi jelden direkt olarak okunabilir (29). DNA dizi analizinde en sık kullanılan metodlardan biri olan dideoksi veya enzimatik (Sanger) metodda DNA polimeraz enzimi orijinal DNA'nın işaretli kopyalarını oluşturmak için kullanılır. Kimyasal (Maxam-Gilbert) metodda ise işaretlenmiş DNA zinciri, bir dizi baza özgü kimyasal

ayıraca maruz bırakılır. Otomatik dizi analizi cihazları, jelin elektroforezi ve DNA dizisinin analizini bilgisayar aracılığıyla yapar. Veri toplama ve analizi için programlar içerir. Son zamanlarda otomatik dizi analizi cihazları floresan veya radyoaktif işaretli ürünler oluşturacak şekilde enzimatik metoda uygun olarak hazırlanmıştır. Ürünlerin floresanla işaretlenmesi 'primerler' veya ddNTP kullanılarak sağlanır (29).

C) Antitüberküloz ilaçlara karşı direncin tespitinde kullanılan diğer moleküler yöntemler; reverse hybridisation, heteroduplex formation ve dideoxy fingerprinting metodlarıdır (28).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada BACTEC (Becton Dickinson Diagnostic Instrument) metoduyla test edilen pirazinamide dirençli 10 ve duyarlı 2 MTK kökeni kullanıldı. Kökenlerin ikisi Gaziantep'ten, üçü İzmir'den, biri Edirne'den, biri Ankara'dan, beşi istanbul'dan geldi.

BACTEC KÜLTÜRÜ

Zenginleştirilmiş Middlebrooke 7H9 sıvı besiyeri içeren BACTEC 12 B şişelerine PANTA (Polimiksin B, Nalidiksik asit, Trimetoprim, Amfoterisin B, Azlosilin) eklendikten sonra, % 4 'lük Sodyum Hidroksit-Sodyum Sitrat solusyonuyla dekontamine edilen materyallerden 0.5 ml eklendi. Löwenstein-Jensen besiyerinde gelen materyaller ise distile suda süspanse edilerek BACTEC 12 B şişesine pasajlandı. Hepsi etüvde 37 °C'de inkübe edildi. İlk üç hafta haftada iki kez, son üç hafta haftada bir kez cihazda okutuldu. GI (Growth Index) $\geq$10 olan şişe pozitif kabul edilip her gün test edildi. Kanlı agara ekim yapılıp, kontaminasyon olmadığı gösterildi (30).

NAP TESTİ İLE İDENTİFİKASYON

NAP, MTK'ni inhibe eder. Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) ise inhibe olmaz. NAP test içinde 5 mcg/ml NAP içeren bir disk vardır. NAP testi aşağıdaki gibi yapıldı.

1-BACTEC 12B şişesinde GI:50-100 olunca 1 ml alıp NAP şişesine aktarıldı.

2-Her iki şişe de 37 $\pm$ 1 °C'de inkübe edilip, 2-6 gün boyunca her gün test edildi.

NAP ve orijinal şişenin günlük GI'ları kaydedildi.

3- Eğer günlük GI:100'den büyükse kültür aşağıdaki gibi sulandırıldı:

GI: 50-100 dilüsyon gerekmez
GI: 101-201 0.8 ml taze BACTEC 12B şişesine
GI: 201-400 0.6 ml taze BACTEC 12B şişesine
GI: 401-600 0.4 ml taze BACTEC 12B şişesine
GI: 601-800 0.3 ml taze BACTEC 12B şişesine
GI: 801-999 0.2ml taze BACTEC 12B şişesine
GI: 999 ve üstü 0.1 ml taze BACTEC 12B şişesine

NAP şişesine 1 ml alınıp, kalan miktar (3.1-3.8 ml) kontrol olarak inkübe edildi.
GI:100 üstünde çıkan ilk BACTEC12B şişesi antibiyogram için okutulmaya devam edildi.

4- NAP şişesinde GI'da belirgin azalma varken kontrol şişesinin GI'da artma olması MTK olduğunu gösterdi. (NAP testinin tamamlanması için ortalama süre 4 gündür) (31-33).

KORD OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ

Pozitif BACTEC 12B (GI: 50-100) şişelerinden hazırlanan ve EZN ile boyanan preparatlar x 1000 büyütmede incelendiğinde, basillerin kordonlar oluşturacak şekilde paralel olmasına kord oluşturma özelliği denir. Kord oluşumu, MTK türlerinin hücre duvarında bulunan trehaloz-6,6'-dimikolat maddesinden dolayıdır, diğer atipik mikobakterilerden ayırt edilmesinde yardımcıdır. (33)

İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ

Direncin kritik oranı bütün antitüberküloz ilaçlar için % 1'dir. Mikobakteri popülasyonunun % 1 veya daha fazlası dirençli ise kültür sonucu dirençli kabul edilir. Direncin % 1 oranını tayin etmek için kontrol şişesinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı şişedekinden 100 defa daha azdır. Bir antitüberküloz ilaç besiyerine eklendiğinde organizma duyarlı ise üreme baskı altına alınır. Bu kontrole kıyasla günlük GI değerinde azalma veya çok küçük artış şeklinde saptanabilir. Organizma dirençliyse çok az veya hiç baskılanma görülmez.

İlaç duyarlılık testleri aşağıdaki gibi yapıldı.

1-Günlük okuma programında BACTEC 12B şişesinin, GI: 500-800 olunca antibiyogram yapıldı.

2- İlaçlar tablo 3'deki konsantrasyonları sağlayacak şekilde sulandırıldı. BACTEC 12 B şişesine 0.1 ml eklendi. Her ilaç için birer şişe ve kontrol için bir şişe kullanıldı.

Tablo 3. İlaç Konsantrasyonları(30,31,34,36)

İlaç	**BACTEC12B (μg/ml)**	**Çözündürülmeleri**
Streptomisin(Becton Dickinson,USA)	2.0	Liyofilize ilaç 15 ml steril distile suda
İzoniazid(Becton Dickinson,USA)	0.1	Liyofilize ilaç 5 ml steril distile suda
Rifampin(Becton Dickinson,USA)	2.0	Liyofilize ilaç 5 ml steril distile suda
Etambutol(Becton Dickinson,USA)	2.5	Liyofilize ilaç 15 ml steril distile suda
Kapreomisin(Sigma,Germany)	1.25	Steril distile suda
Ethionamide(Sigma,Germany)	1.25	etilen glikolde, sonraki dilüsyonlar steril distile suda
Kanamisin(Sigma,Germany)	5.0	Steril distile suda
Amikasin(Fako,Türkiye)	1.0	Steril distile suda
Ofloksasin(Fako,Türkiye)	2.0	0.1 N NaOH solusyonunda, sonraki dilüsyonlar steril distile suda
Rifabutin(PharmaciaUpjohn,USA)	0.5	Methanolde, sonraki dilüsyonlar steril distile suda

3- BACTEC 12B şişelerinin her birine, GI:500-800 olan BACTEC 12B şişesinden karıştırıldıktan sonra 0.1 ml alınıp bakteri ekildi.

4- GI:800'den fazlaysa tamamen karıştırdıktan sonra 1 ml pozitif kültüre 1 ml özel difüzyon sıvısı ekleyerek kültür 1:2 oranında sulandırılıp, duyarlılık testi için kullanıldı. Bütün şişeler 37 ± 1 °C'de inkübe edildi. Her gün aynı saatte, en az 5 gün test edildi. Kontrol şişesi GI:30 ve üstü olduğunda sonuçlar değerlendirildi.

5- Bir önceki güne göre GI değerleri arasındaki fark ΔGI olarak ifade edilip,

ΔGI (Kontrol) > ΔGI (İlaç) : duyarlı

ΔGI (Kontrol) < ΔGI (İlaç) : dirençli

ΔGI (Kontrol) = ΔGI (İlaç): sınırda

kabul edildi. (30,31,34-38)

Pirazinamid (PZA):

BACTEC PZA besiyeri pH:6.0 olan modifiye 7H12 besiyeridir.

PZA duyarlılık testinin safhaları aşagıdaki gibi sıralanmıştır.

1-Lyphilized PZA drug içeren şişenin içine 5 ml özel sulandırma solusyonundan konulup, iyice çözündürüldü.

2-BACTEC PZA Test Medium'a (pH:6.0) bu solusyondan 0.1 ml konulduğunda, PZA konsantrasyonu 100 μg/ml oldu (Stok PZA solusyonu – 20 °C ve –70 °C'de 6 ay saklanabilir).

3-İlaçsız PZA Test Medium kontrol olarak kullanıldı.

4-Kontrol şişesine 0.1 ml özel sulandırma solusyonundan da eklendi. (Bu sıvı üremeyi arttırıcı POES (Polioksietilen Stearat) içerir).

5-BACTEC 12B şişesinde GI:300-499 olan kültürler kullanıldı.

GI:499'dan fazlaysa yeni BACTEC 12B şişesine aşağıdaki gibi dilüsyon yapıldı:

GI 300-499	Dilüsyonsuz
GI 500-599	0.1 ml yeni BACTEC 12B' den eklendi
GI 600-699	1.5 ml yeni BACTEC 12B' den eklendi
GI 700-799	2.0 ml yeni BACTEC 12B' den eklendi
GI 800-899	2.5 ml yeni BACTEC 12B' den eklendi
GI 900-999	3.5 ml yeni BACTEC 12B' den eklendi

GI 999 üstündeyse çalışılmadı.

6- BACTEC 12B şişesi iyice karıştırılarak 0.1 ml alınıp PZA içeren şişeye, yeniden 0.1 ml alınıp kontrol şişesine konuldu.

7- Şişeler 37 ± 1 °C'de inkübe edildi.

8-Kontrol şişesi GI: 200 ve üstü oluncaya kadar hergün test edildi.

İlaç şişesinin GI'sı kontrol şişesinin < % 9 ise duyarlı

İlaç şişesinin GI'sı kontrol şişesinin > % 11 ise dirençli

İlaç şişesinde GI % 9 ile % 11 arasında ise sınırda kabul edildi.

9- Sonuçlar 4-8 günde verildi. (30,35)

PİRAZİNAMİDAZ TESTİ

M. tuberculosis, *M. avium* kompleks, *M.marinum* PZase'ne sahiptir. PZase'i, pirazinamidi hidrolize ederek pirazinoik asid ve amonyağa çevirir. Mikobakteride PZAse yoksa pirazinamide dirençli olacaktır. Besiyerine ferröz amonyum sülfat eklenirse, besiyerinde PZase'nin hidroliziyle oluşan pirazinoik asid iki değerli demirle birleşir, besiyerinin yüzeyinin hemen altında pembe renkli halka şeklinde ferröz-pirazinoik asid kompleksi oluşur (39).

Pirazinamidaz testinin safhaları aşagıdaki gibi sıralanmıştır.

1- 0.65 gr Dubos Tween bazı 100 ml distile suda çözündürüldü

2- Sırayla şunlar eklendi:

Pirazinamid 0.01 gr

Sodyum pirüvat 0.2 gr

Agar 1.5 gr

Isıtılarak çözünmesi sağlanıp, tüplere 15 ml dağıtıldı.

3- 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

4-Tüplerdeki besiyeri katılaşıncaya kadar dik pozisyonda tutuldu

5- Bu besiyeri 2- 8 °C'de 6 ay buzdolabında saklanabilir.

6- Taze olarak %1'lik ferröz amonyum sülfat (0.1 gr ferröz amonyum sülfat 10 ml steril distile su) hazırlandı.

7-Pozitif kontrol olarak: *M intracellulare* ATCC 13950 kullanıldı.

8-Negatif kontrol olarak: *M. kansasii* ATCC 12478 kullanıldı.

9-Her köken ve kontrol kökenleri için iki adet pirazinamidaz agarına birkaç öze dolusu koloni ekildi.

10-Kapakları gevşek bırakılarak besiyerleri 37 °C'de inkübe edildi.

11-Dört gün sonra birer tüpler çıkarılıp, her tüpe % 1'lik ferröz amonyum sülfattan 1 ml eklendi.

12- Oda ısısında 30 dakika bırakıldıktan sonra, agarda pembe bant varsa pozitif kabul edildi.

13-Negatif sonuç veren tüpler dört saat daha buzdolabında bekletilip, pembe bant oluşup oluşmadığına bakıldı.

14-Dört günlük deney negatif sonuçlandığında, bu deneyin yapılışı yedinci gün ikinci tüplerle tekrarlandı (35,39).

PCR ve RFLP YÖNTEMLERİ İLE MİKOBAKTERİ TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU

PCR ve RFLP metodu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında çalışıldı. Çalışmamızın bu kısmı Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı'nın 2002K120500 no'lu "Tüberküloz Basilinde DNA Dizi Analizi ile Major Antitüberküloz İlaçlara Direnç Gelişmesine Neden Olan Mutasyonların Belirlenmesi" adlı projesi tarafından desteklendi.

Gereken Maddeler

EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit),(Sigma, Germany)
Trizma Base (Sigma, Germany)
Borik asit(Sigma, Germany)
Chelex-100(Sigma, Germany)
Standard agaroz(Sigma, Germany)
NuSieve GTG agaroz(FMC BioProduct,USA)
Ethidium bromid(Sigma,Germany)
Taq polimeraz (5 ü/ul)(Fermentas,USA)
dNTP(Fermentas,USA)
Enjeksiyonluk distile su(Eczacıbaşı ilaç,Türkiye)
10x PCR Buffer II (Roche Applied Biosystems,USA)
$MgCl_2$ Solution (25mM, Roche Applied Biosystems,USA)
Ampli *Taq* Gold (250 Units 5u/µl Roche Applied Biosystems,USA)
Primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' 50 nmol TIB MOLBIOL
Primer TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' " "
*BstE*II (Eco 91I) (10 units/µl, 1000 units, MBI Fermentas,USA)
*Hae*III (BsuRI) (10x 1 ml, MBI Fermentas,USA)

Mikobakteri DNA'sının İzole Edilmesi:

1-BACTEC 12B şişesinden Löwenstein-Jensen besiyerine yapılan taze pasajlarda üremiş bir öze dolusu koloni alınıp distile suda süspansiyon yapıldı.
2- Vortekslendikten sonra ürünler 80-84 ^{o}C 'de 1 saat 15 dk. ısı bloğunda bekletildi (5,40,41).

3- NucleoSpin ® Blood (Macherey –Nagel GmbH &Co KG Germany) kiti talimatları kullanılarak DNA saflaştırıldı. Bu amaçla 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl B3 solusyonu ve 25 µl proteinaz K konuldu, 200 µl ürün ilave edilip, vortekslendi. Tüpler 70 ºC'de 10-15 dk. kuru ısıtıcıda bekletildi. Daha sonra üzerlerine 210 µl % 96'lık saf ethanol eklenip vortekslendi. Tüplerin tüm içeriği NucleoSpin® Blood tüplerine aktarılıp 11.000 xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Yeni toplama tüplerine yerleştirilip üzerlerine 500 µl BW solüsyonu konulup 11.000 xg'de 1 dk. santrifüj edildi. Tekrardan yeni toplama tüplerine aktarılıp üzerlerine 600 µl B5 solüsyonu eklenip iki kez 11.000 xg'de 1 dk santrifüj edildi. Son olarak steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konulup üzerlerine 70 ºC'de ısıtılmış BE solüsyonundan 100 µl eklenip oda sıcaklığında 1 dk. bekletilip 11.000 xg'de 1 dk. santrifüj edildi. (42)

Mikobakterilere Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini (hsp65) Bölgesine ait PCR Ürünü Elde Edilmesi (5,27)

1-Kırık buz üzerinde 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde aşağıdaki karışım hazırlandı:

Distile su	13.75	µl
PCR Buffer (10x konsantrasyonda)	2.5	,,
$MgCl_2$ (25 mM)	1.0	,,
dNTP (10 mM)	0.5	,,
Primer 1 (TB11, 10 pmol/ul)	1.25	,,
Primer 2 (TB12, 10 pmol/ul)	1.25	,,
Taq polimeraz (Fementas 5 Ü/ul)	0.125	,,
Örnek DNA	5	,,
Toplam	25	,,

2-Reaksiyon tüpleri “Thermal cycler” (Sanyo DNA Amplifies MIR – D40) aletine yerleştirilerek aşağıdaki siklus programı uygulandı:

95	^{o}C’de	10	dk.	1 siklus
95	,,	1	,,	
55	,,	1	,,	35 siklus
72	,,	2	,,	
72	,,	8	,,	1 siklus

3- Agaroz jel hazırlamak için 120 ml 0.5x TBE buffer (stok 5x TBE buffer: 54 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, 1 litre distile suda eritildi) içine 2.4 gram agaroz eklenip ısıtıldı, 12 µl ethidium bromid (5 mg/ml) konulduktan sonra aparatına döküldü (5,43). Her örnek 8’er µl PCR ürünü 2 µl yükleme solüsyonu (10x Loding bufer: 500 mg Bromophenol blue, 5 ml gliserol, 5 ml distile su) ile karıştırılıp, sırayla agaroz jele yüklendi. Agaroz jel elektroforez sisteminde 80 voltta 55 dakika elektroforez uygulandı, jel UV transilüminatörde incelendi. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) ile karşılaştırıldıktan sonra pozitif kabul edilip, agaroz jelin fotoğrafı çekildi (5,42).

PCR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi (12,20)

*Hae*III ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	1.75	µl
Buffer R^{+}	1.5	,,
*Hae*III (10 ünite/ul, Fermentas)	0.75	,,
PCR ürünü	11.0	,,
Toplam	15.0	,,

_Bst_EII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	1.75	µl
Buffer O^+	1.5	,,
*Bst*EII (10 ünite/ul, Fermentas)	0.75	,,
PCR ürünü	11.0	,,
Toplam	15.0	,,

Bu karışım 37 ^oC'de 24 saat etüvde bekletildi. Restriksiyon enzimleri ile kesilen ürünlerin % 3'lük agarozda elektroforezi yapıldı. Ortaya çıkan bantlar http://www.hospvd.ch:8005 internet adresindeki tablolardan yararlanılarak değerlendirilip, mikobakteri türleri isimlendirildi (12,20). Jellerin fotoğrafı çekildi (27,30,42).

DNA DİZİ ANALİZİ:

Mikobakteri DNA'sının İzole Edilmesi:

PRA yönteminde anlatıldığı şekilde DNA izole edilip, NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel) kiti talimatları kullanılarak saflaştırıldı.

***PncA* genine uygun PCR Ürünü Elde Edilmesi**

Buz üzerine konulmuş 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpünde aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı:

PncA-8 : 5'-GGTTGGGTGGCCGCCGCTCAG-3'

PncA-11: 5'-GCTTGCGGCGAGCGCTCCA-3'

Distile Su	28,75 µl
Buffer	5 µl
$MgCl_2$	5 µl
dNTP	1 µl
Primer PncA 8 (10 pmol/1 µl)	2,5 µl
Primer PncA11 (10 pmol/1 µl)	2,5 µl
Taq	0,25 µl
Toplam	45 µl

Her tüpün üzerine 5 µl DNA ürünü konuldu. Kısa bir vorteks ve santrifüj yapılıp, Thermal cycler (Sanyo DNA Amplifies MIR – D40) aletine yerleştirilerek aşağıdaki siklus programı uygulandı:

95	°C'de	10	dk.	1 siklus
95	,,	1	,,	
55	,,	1	,,	35 siklus
72	,,	2	,,	
72	,,	8	,,	1 siklus

% 2'lik Standart Agarose Jelde Yürütme

Behere 40 ml'lik 0,5 x TBE buffer konulup üzerine standart agardan 0,8 gr tartılarak ilave edildi. Mikro dalga fırında karışım jel kıvamına gelene kadar tutulup, üzerine 4 µl ethidium bromide ilave edildi. Ürün 8 µl + loading buffer 2 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi, 80 voltta10 dk. yürütüldü.

Purifikasyon Aşaması

DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Qiagen) kullanılarak elde edilen PCR ürünü saflaştırıldı.

DNA Dizi Analizi İçin PCR Ürünü Elde Edilmesi

1. Ürün sayısı kadar 0,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpleri işaretlendi.
2. PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.

Bigdye	4 µl
Primer (pncA 8 veya pncA 11)	2 µl
Ürün	Jelde görülen bandın kalınlığına göre miktar belirlenir.
Distile su	Final karışım 10 µl tamamlanacak kadar konulur.

Kısa bir vorteks ve santrifüj yapıldı.

3. Tüpler Thermal Cycler'a konulup, sikluslar aşağıdaki gibi programlandı:

96	^{o}C'de	10 sn	}	25 siklus
50	,,	5 sn		
60	,,	6 dk		

4- DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Qiagen) kullanılarak elde edilen PCR ürünü saflaştırıldı.

Ürünlerin ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.) Cihazına Firma Talimatlarına Göre Yüklenmesi

1. Saflaştırılan ürünlerin sayısı kadar 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri işaretlendi.

2. Bu tüplerin her birine 10 µl TSR (Template Suppression Reagent) ilave edildi. Tüplere ürünlerin tamamı konularak 95 ºC'de 3-5 dk. kuru ısıtıcıda ürünler denatüre edildi.

3. Mikrosantrifüj tüpleri kuru ısıtıcıdan çıkarılır çıkarılmaz buz üzerine konulup 1-2 dk bekletildi.

4. Cihazın Cam Enjektörüyle ürünün sayısına göre POP 6 (Performance Optimized Polymer 6) solusyonu çekildi.

5. Ürünlerin baz uzunluğuna uygun kapiller, cihaza takıldı.

6. Cihazın Autosampler kalibrasyonu yapılıp, ürünler Autosampler'a yerleştirilip, cihazın sıcaklığı 50 ºC'ye çıkarıldı. Cihaz çalıştırıldı. Yaklaşık iki saat sonra sonuçlar alındı.

BULGULAR

Bu çalışmaya alınan Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilen 10 PZA dirençli, 2 PZA duyarlı kökenin NAP testi, kord faktör, PRA sonuçları tablo 4'de gösterildi. NAP testine göre 12 köken de MTK olarak saptandı. Bu kökenlerin hepsinin BACTEC 12B şişelerinden yapılan EZN boyalı preparatlarında kord faktör pozitif bulundu. PRA yöntemiyle 12 kökenin hepsinde *BstE* II restriksiyon enzimiyle 240.120.85, *Hae* III restriksiyon enzimiyle de 150.130.70 bant patern numaraları saptanarak, MTK olarak isimlendirildi.

Tablo 4. Kökenlerin NAP testi, kord faktör ve PRA sonuçları

ÖRNEKLER	GÖNDERİLDİĞİ ŞEHİRLER	PRA	NAP	KORD
2T	Gaziantep	P	P	P
3T	Gaziantep	P	P	P
4T	İzmir	P	P	P
5T	İzmir	P	P	P
6T	İzmir	P	P	P
7T	Ankara	P	P	P
8T	İstanbul	P	P	P
10T	İstanbul	P	P	P
11T	İstanbul	P	P	P
12T	Edirne	P	P	P
13T	İstanbul	P	P	P
14T	İstanbul	P	P	P

P:pozitif

Bu çalışmaya alınan 12 kökene primer antitüberküloz ilaçlardan pirazinamid, izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin, sekonder antitüberküloz ilaçlardan amikasin, ofloksasin, rifabutin, kapreomisin, ethionamid, kanamisin için duyarlılık testi yapıldı. Bu antitüberküloz ilaçların duyarlılık sonuçları tablo 5'de gösterildi.

Tablo 5. Kökenlerin antitüberküloz ilaçlara duyarlılık sonuçları

ÖRNEKLER	PZA	İNH	RİF	EMB	SM	AK	OFK	RFT	ETM	KAP	KAN
2T	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
3T	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
4T	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
5T	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
6T	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
7T	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
8T	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
10T	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
11T	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
12T	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
13T	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
14T	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S

S: duyarlı R: dirençli

PZA: pirazinamid SM: streptomisin INH: izoniazid RİF: rifampisin EMB: etambutol AK: amikasin OFK: ofloksasin RFT: rifabutin ETM: ethionamid KAP: kapreomisin

Pirazinamidaz testiyle 12 kökende PZase varlığı araştırıldı. Bu 12 köken Dubos besiyerine ekilip, 37°C'de bekletildi. Dört gün sonra her tüpe % 1'lik ferröz amonyum sülfat eklendi. Oda ısısında 30 dakika bırakıldıktan sonra, 2 PZA duyarlı kökende pembe bant oluştuğu gözlenerek pozitif kabul edildi. Negatif sonuç veren 10 tüp dört saat daha buzdolabında bekletilip, pembe bant oluşmadığı gözlenince tekrar etüve konularak yedinci gün ikinci tüplerle test tekrarlandı ve bu 10 kökende yine pembe bant oluşmadığı gözlenerek negatif kabul edildi.

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer cihazıyla yapılan DNA dizi analizi sonucu saptanan mutasyonlar tablo 6.da verildi. Bu mutasyonların *Pnc A* genindeki (Gen Bankası U59967) yerleri şekil 1'de gösterildi.

Tablo 6. Kökenlerde saptanan mutasyonlar

ÖRNEKLER	MUTASYONLAR
2T	GGC 71 GAC (Gly 71 Asp)
3T	GGC 71 GAC (Gly 71 Asp)
4T	Mutasyon yok
5T	ACA 479 AAA (Thr 479 Lys)
6T	Mutasyon yok
7T	CTG-AAT (102-269) Delesyon
8T	Mutasyon yok
10 T	CTG-AAT (102-269) Delesyon
11T	CTG-AAT (102-269) Delesyon
12T	CAC 152 CCC (His 152 Pro)
13T	Mutasyon yok
14T	Mutasyon yok

atg cgg gcg ttg atc atc gtc gac gtg cag aac gac ttc tgc 42

gag ggt ggc tcg ctg gcg gta acc ggt ggc gcc gcg ctg gcc 84

gac

cgc gcc atc agc gac tac ctg gcc gaa gcg gcg gac tac cat 126

cac gtc gtg gca acc aag gac ttc cac atc gac ccg ggt gac 168

ccc

cac ttc tcc ggc aca ccg gac tat tcc tcg tcg tgg cca ccg 210

cat tgc gtc agc ggt act ccc ggc gcg gac ttc cat ccc agt 252

ctg gac acg tcg gca atc gag gcg gtg ttc tac aag ggt gcc 294

tac acc gga gcg tac agc ggc ttc gaa gga gtc gac gag aac 336

ggc acg cca ctg ctg aat tgg ctg cgg caa cgc ggc gtc gat 378

gag gtc gat gtg gtc ggt att gcc acc gat cat tgt gtg cgc 420

cag acg gcc gag gac gcg gta cgc aat ggc ttg gcc acc agg 462

gtg ctg gtg gac ctg aca gcg ggt gtg tcg gcc gat acc acc 504

aaa

gtc gcc gcg ctg gag gag atg cgc acc gcc agc gtc gag ttg 546

gtt tgc agc tcc tga 561

Şekil 1. *Pnc A* Geni (561 bp) üzerinde saptanan mutasyonlar

TARTIŞMA

Tüberküloz, her toplumda, tüm tarih dönemlerinde, büyük sağlık sorunları yaratıp, çevresel faktörlerin etkisiyle epidemik bir hal almış, önce Avrupa ülkelerine sonra tüm dünyaya yayılmıştır (44). Streptomisinin 1949, izoniazidin 1952 yılında kullanıma girmesiyle tüberküloz tedavisinde kemoterapi dönemi başlamıştır. Antibiyotik tedavisinin klinik kullanıma girmesinden sonra tüberküloz prevalansı özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada sürekli bir düşme eğilimi göstermiştir. Bu eğilim 1980'lerin ortasından itibaren değişmiştir. Çoğul ilaç direnci gösteren tüberküloz olgularının sayısı artmaya başlamıştır. Halk Sağlığı ile ilgili çalışmalardaki yetersizlikler, AIDS'li olguların sayısındaki artış ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde bozulan sosyoekonomik yapı bu hızlı artışın başlıca nedenleri olarak öne sürülmüştür. Bu artış antibiyotiklerin tüberküloz tedavisinde kullanılmaya başlamasından yaklaşık 50 yıl sonra insanlığı yeniden yolun başına dönme tehlikesiyle karşı karşıya bırakmıştır. Bu olumsuz gelişmeleri dikkate alan Dünya Sağlık Örgütü 1993 yılında tüberkülozu küresel sağlık sorunu olarak ilan etmiştir (8).

Hastalığın erken tanısı ve primer antitüberküloz ilaç direncinin hızlı bir şekilde saptanması çoğul dirençli kökenlerin kontrolünde ve etkili tedavide yaşamsal bir rol oynamaktadır. MTK için bilinen bütün direnç mekanizmaları kromozomaldır ve bağımsız bir gende meydana gelen mutasyona bağlıdır. Genetik çalışmalar antitüberküloz ilaçlara direncin; ilacın hedef bölgesini veya aktivasyonunda rol alan enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlarla olduğunu göstermiştir. Primer antitüberküloz ilaçlardan biri olan PZA, monositler ve makrofajlar içinde yavaş çoğalan, düşük metabolik aktiviteye sahip yarı dormant mikobakteriler üzerinde en etkili ilaçtır. PZA'in, fagolizozomların asidik ortamında tüberküloz basilinin ürettiği

pirazinamidaz ile aktif şekli olan pirazinoik aside dönüşerek etkili olduğu düşünülmektedir. PZA'e dirençli MTK kökenlerinde pirazinamidaz aktivitesinin olmaması da bu hipotezi desteklemektedir. PZA'e dirençli MTK kökenlerin % 72-97'sinde PZase kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir (8).

Bu çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen NAP testi, kord oluşumu, PRA yöntemi ile identifikasyonu yapılan, BACTEC yöntemiyle ve pirazinamidaz testiyle duyarlılık sonuçları belirlenen PZA'e dirençli 10, duyarlı 2 MTK kökeninde *pncA* genindeki mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemiyle saptanmıştır.

Mikobakteri tür identifikasyonu için kord oluşumu hızlı, kolay ve ucuz olması dolayısıyla ön tanı deneyi olarak önerilmiştir. Köksalan (32), yaptığı çalışmada negatif prediktif değerin düşük olması nedeniyle ülkemizde kord faktör pozitif bulunan durumlarda MTK üredi şeklinde ön tanı verilebileceğini fakat kord faktörün negatif bulunduğu durumlarda PRA gibi başka bir identifikasyon yönteminin eş zamanlı olarak kullanılması gerektiğini bildirmiştir.

BACTEC NAP deneyi ise MTK kökenlerini MOTT kökenlerinden ayıran ancak MOTT kökenlerinin tür düzeyinde ayrımını vermeyen kısmi bir identifikasyon yöntemidir ve oldukça pahalı bir yöntemdir. Ayrıca testin sonuçlanması ortalama beş gün sürmektedir (27,32).

PRA yönteminin özgüllüğü, hızlılığı, maliyet etkinliği çeşitli yayınlarda bildirilmiştir (45,46,47,48). PRA; bir günde sonuçlanan ve mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu sağlayan standard bir metoddur, hibridizasyon, türe özgül prob, radyoaktivite gerektirmez (27,45,46,49-51).

Bizim çalışmamızda kord oluşumu ve NAP deneyi ile MTK olarak identifiye edilen 12 kökenimiz, PRA metoduyla da %100 uyumlu sonuç vermiştir.

Bu çalışmada kullanılan 10 PZA'e dirençli MTK kökeni hem izoniazid hem de rifampisine de dirençlidir. Hem izoniazid hem de rifampisine dirençli tübekülozun tedavisinde başarı şansı % 54 olup sekonder ilaçlara direnç hızlarının bilinmesi tedavinin planlanmasında büyük önem taşır (2). Halen Türkiye'de sekonder ilaçlar için duyarlılık testlerini rutin uygulamada çalışan bir merkez bulunmamaktadır. Bu çalışmada test edilen 10 dirençli MTK kökeni için en etkili sekonder antitüberküloz ilaçlar sırasıyla amikasin, kapreomisin, kanamisin, ofloksasin, ethionamid, rifabutin olarak saptanmıştır. İstanbul'da 1995-1997 yılları arasında , 32 çok ilaca direçli MTK kökeni için yapılan bir çalışmada en etkili sekonder ilaçlar sırasıyla kanamisin

(% 90.7), kapreomisin (% 87.5), sikloserin (% 81.3), etionamid (% 34.4) olarak saptanmıştır (52).

MTK kökenlerinde, amikasin ve kanamisin arasında çapraz direnç olabilirken, bu iki ilaçla streptomisin arasında çapraz direnç yoktur. Kanamisin ile kapreomisin arasındaki çapraz direnç oranları ise değişkendir (17). Bu çalışmada yer alan 10 MTK kökeni için amikasin ve kapreomisin direnç oranları streptomisin direncinden belirgin olarak daha az olup, en etkili sekonder ilaçlar amikasin, kapreomisin ve kanamisin olmuştur. Ülkemizde streptomisine dirençli tüberküloz kökenlerinde diğer aminoglikozitler tedavide seçenek olarak düşünülmelidir.

Pirazinamidaz testi mikobakteride pirazinamidaz enzimi yoksa PZA'e dirençli olduğunu öne sürmektedir (39).

Miller ve ark.'larının (53), 428 MTK kökeninde BACTEC ve pirazinamidaz metodlarını karşılaştırdığı çalışmada, iki metod arasındaki uyum PZA'e duyarlı kökenlerde % 98.2, dirençli izolatlarda % 100 olarak bulunmuştur.

Kew Park ve ark.'larının (54) yaptığı çalışmada ise Löweinstein Jensen besiyeri kullanılarak saptanan 22 PZA dirençli kökenin sadece birinde pirazinamidaz metodu kullanarak PZase varlığı saptanmıştır.

Aona ve ark. (55), BACTEC MGIT 960 yöntemiyle pirazinamid duyarlılığını saptadığı 101 MTK kökenini pirazinamidaz testi sonuçlarıyla karşılaştırdıklarında % 93.1 uyum saptamışlardır.

Bizim çalışmamız da ise; pirazinamidaz testiyle 12 kökende PZase varlığı araştırıldı. Bu 12 kökenden 2 PZA duyarlı kökende pembe bant oluştuğu gözlenerek pirazinamid enzim varlığı gösterilirken, 10 PZA dirençli kökende ise pembe bant oluşmadığından pirazinamid enziminin olmadığı kabul edilmiştir. BACTEC 460 ve pirazinamidaz metodları arasında bu çalışmada % 100 uyum bulunmuştur.

1996 yılında Pzase'ni kodlayan *pncA* geninin klonlanması ve dirençli MTK kökenlerinde *pncA* geninde mutasyonlar saptanması, PZA direncini açıklamada önemli bir adım olmuştur (56). MTK için PZA duyarlılığı genellikle PZA içeren besiyerlerinde geleneksel yöntemlerle 1-6 hafta arasında saptanabilmektedir. Pirazinamidaz metoduyla bakterinin pirazinamidaz aktivitesi 1 haftalık sürede gösterilebilirken, *pncA* geninde DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon saptanması ise en fazla 2 gün sürmektedir.

Bu çalışmada PZA'e dirençli 10, duyarlı 2 MTK kökeninde *pncA* genindeki mutasyonlar araştırıldığında 2 duyarlı ve 3 dirençli kökende mutasyon

saptanmazken, dirençli kökenlerin dördünde nükleotid değişikliği, 3'ünde nükleotid delesyonu bulunmuştur.

Bir PZA dirençli MTK kökeninde saptanan CAC 152 CCC (His 152 Pro) mutasyonu daha önce Portekiz, Japonya, Amerika Birleşik Devletleri, Tayland'dan izole edilen PZA dirençli MTK kökenlerinde de gösterilmiştir (57,58,59,60).

Gaziantep ilimizden izole edilen iki PZA dirençli MTK kökeninde GGC 71 GAC (Gly 71 Asp) ve bir başka dirençli kökenimizde saptanan ACA 479 AAA (Thr 479 Lys) mutasyonları ise literatürde yeni olup, önceki yayınlarda bulunmamaktadır.

Üç PZA dirençli MTK kökeninde saptanan CTG-AAT (102-269) 167 nükleotidlik delesyon da literatürde daha önce yapılan çalışmalarda saptanamamıştır. Delesyon bulduğumuz bu kökenlerin ikisi İstanbul, biri Ankara'dan gönderilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda çeşitli büyüklükte delesyonlar saptanmıştır. Bunlardan sayı olarak nükleotid kayıplarının fazla olduğu bazı çalışmaları alacak olursak, Lee ve ark. (61) 80 nükleotidlik delesyon (151-230), Lemaire ve ark. (62) 68 nükleotidlik delesyon (419. pozisyon), Mestdagh ve ark. (63) ise 68 nükleotidlik delesyon (195-263) saptamışlardır.

Türkiye'den izole edilip laboratuvar çalışmalarının İngiltere'de yapıldığı bir yayında 5 PZA duyarlı, 5 PZA dirençli kökenle çalışılmıştır. Bu çalışma sonucu; 5 duyarlı kökende hiç mutasyon saptanamazken, 5 dirençli kökende ise farklı mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların birincisi; 170A→C, ikincisi; 175T→C, üçüncüsü; 239A→delesyon, dördüncüsü; 442C→A şeklindeyken, beşincisinde ise iki ayrı mutasyon 244c→T, 194C→G gösterilmiştir (64). Bu mutasyonlardan ilki (170A→C) daha sonra 2002 yılında Japonya'da izole edilen bir kökende de gösterilmiştir (58). Türkiye'den izole edilen bu MTK kökenlerinde saptanan mutasyonlar bizim bulduğumuz mutasyonlardan farklıdır.

PZA'e dirençli MTK kökenlerinin % 72-97'sinde pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir (8). Portugal ve ark. (57), Portekiz'de 55 PZA dirençli kökenle yaptığı çalışmada bu oranı %94, Tracevska ve ark. (65), Litvanya'da 28 PZA dirençli kökenle yaptığı çalışmada bu oranı %82, Huang ve ark. (66), Tayvan'da 17 PZA dirençli kökenle yaptığı çalışmada bu oranı % 41, Morlock ve ark. (59), ABD'de 60 PZA dirençli kökenle yaptığı çalışmada bu oranı % 61 olarak saptamışken, bizim çalışmamız 10 PZA dirençli kökende bu oran % 70 olarak bulunmuştur.

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucu PZA duyarlı MTK kökenlerinde *pncA* geninde mutasyon bulunamamıştır. Lee ve ark. (61) 200 PZA duyarlı MTK kökeninde, bizim çalışmamızda ise 2 PZA duyarlı köken de mutasyon bulunamamıştır.

Mutasyon saptayamadığımız 3 köken BACTEC yöntemiyle PZA dirençli olup, pirazinamidaz metoduyla PZase negatif bulunmuştur. PZA dirençli kökenlerde mutasyon saptanamaması üç olası alternatif mekanizmayla açıklanabilir. Birincisi organizmadan bakterisidal pirazinoik asidin atılması, ikincisi organizmanın PZA'yı alımında bozukluk olması, üçüncüsü Pzase'nin ortaya salınımını sağlayan diğer genlerde bozukluklar olmasıdır (61).

DNA dizi analizi, pahalı cihaz gerektiren bir yöntem olmasına rağmen MTK kökenlerinde *pncA* geninde mutasyonların hızlı bir şekilde saptanması, PZA duyarlılık sonucunun tedavinin başında bildirilmesi, tüberküloz hastalarının tedavisinin planlanmasında yararlı olacaktır (61).

PncA mutasyonları bütün gen boyunca rastgele oluştuğundan aynı mutasyonun ilişkisiz izolatlarda bulunması nadirdir (57). Bu büyük farklılık PZA dirençli MTK kökenlerinin yayılması ve salgınlarının izlenmesinde epidemiyolojik olarak yararlı olabilir (57,61,67).

PncA geninde mutasyonların saptanmasına yönelik çalışmalar PZA direnç mekanizmasının anlaşılmasının yanısıra PCR temeline dayalı hızlı PZA direncini saptama yöntemi geliştirilmesine katkıda bulunabilir (67). Türkiye'de *pncA* genindeki mutasyonların profilini saptamaya katkı sağlamak için yaptığımız bu çalışma sonucu daha fazla PZA dirençli MTK kökeniyle çalışılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Türkiye'nin değişik bölgelerinden Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gelen MTK tanısı konmuş, PZA duyarlı 2, PZA dirençli 10 köken çalışmaya alındı.

Bu kökenlerin ilk önce NAP testi, kord oluşumu, PRA yöntemi ile identifikasyonu yapıldı.

İkinci aşamada BACTEC yöntemiyle ve pirazinamidaz testiyle duyarlılık sonuçları belirlenen PZA'e dirençli 10, duyarlı 2 MTK kökenine ayrıca dört primer ve 6 sekonder antitüberküloz ilaçlar denendi.

Üçüncü aşamada *pncA* genindeki mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemiyle saptandı.

Bu aşamalar sonucu 2 PZA duyarlı kökende mutasyon bulunamadı. 10 PZA dirençli kökenin üçünde hiç mutasyon bulunamazken, ikisinde aynı bölgede mutasyon (GGC 71 GAC), ikisinde farklı mutasyonlar (ACA 479 AAA), (CAC 152 CCC) ve üçünde ise aynı bölgede delesyon (CTG-AAT (102-269)) bulundu.

PncA geninde mutasyonların saptanmasına yönelik çalışmalar PZA direnç mekanizmasının anlaşılmasının yanısıra PCR temeline dayalı hızlı PZA direncini saptama yöntemi geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

PncA mutasyonları bütün gen boyunca rastgele oluştuğundan bu farklılık PZA dirençli MTK kökenlerinin yayılması ve salgınlarının izlenmesinde epidemiyolojik olarak yararlı olabilir. Bu nedenle Türkiye'de *pncA* mutasyonlarının profilini saptamaya katkı sağlamak için yaptığımız bu çalışma sonucu daha fazla PZA dirençli MTK kökeniyle çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Tüberküloz hala dünyada mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*'in ilaç direncinden dolayı tüberküloz kontrolü daha zor olmaktadır.

Pirazinamid, tüberküloz tedavisi için kullanılan birinci seçenek ilaçlardan biridir. *Mycobacterium tuberculosis* pirazinamidi, pirazinamidaz enzimini kullanarak aktif hale çevirir. Bu enzim *pncA* geninde kodlanır ve *pncA* genindeki mutasyonlar aktif enzimin yokluğuna ve böylece pirazinamide karşı dirence neden olur.

Bu çalışmada, kord oluşumu, NAP testi PCR-RFLP yöntemi ile kökenlerin *M. tuberculosis* kompleks olduğu gösterilmiştir. BACTEC yöntemiyle ve pirazinamidaz testiyle pirazinamid duyarlılık sonuçları uyumlu bulunan kökenlerde, *pncA* genindeki mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemiyle saptanmıştır.

Amacımız klasik duyarlılık testleriyle saptanan pirazinamid dirençli kökenlerdeki *pncA* gen mutasyonlarını tespit etmek ve literatürdeki mutasyonlarla sonuçlarımızı karşılaştırılmaktır.

İki pirazinamid duyarlı kökende ve 10 pirazinamid dirençli kökenin üçünde mutasyon bulunamadı. Pirazinamid dirençli kökenlerin ikisinde aynı bölgede mutasyon(GGC 71 GAC), ikisinde farklı bölgelerde mutasyonlar (ACA 479 AAA), (CAC 152 CCC) bulundu. Pirazinamid dirençli kökenlerin üçünde ise aynı bölgede delesyon (CTG-AAT (102-269)) bulundu.

Sonuç olarak, çalışmamızda 152. kodondaki mutasyon daha önceki literatürlerde bildirilmişken, iki mutasyon ve bir delesyon daha önceden bildirilmemiştir.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, İlaç direnci, Pirazinamid, PCR-RFLP, *pncA* mutasyonu

SUMMARY

Tuberculosis still remains one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Controlling tuberculosis becomes more difficult because of the drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* .

Pyrazinamide has become one of the first-line drugs for the treatment of tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis* converts pyrazinamide to its active form by using the enzyme pyrazinamidase. This enzyme is coded for on the *pncA* gene, and mutations in the *pncA* gene result in absence of active enzyme, conferring resistance to the drug pyrazinamide.

In the present study, the strains were identified as *M. tuberculosis complex* by cord factor, NAP test and PCR-RFLP. Then, pyrazinamide susceptibility was studied by BACTEC methodology and pyrazinamidase test. The mutations of *pncA* gene have been detected with DNA sequencing.

Our aim was to identify the mutation of *pncA* gene in pyrazinamide resistant isolates detected by the classical susceptibility tests and to compare our results with the mutations in literature reported before.

In two PZA susceptible and in three of 10 pyrazinamide resistant strains, no mutations were determined. Two of the pyrazinamide resistant strains had mutations in the same region (GGC 71 GAC). Two of the pyrazinamide resistant strains had different mutations (ACA 479 AAA), (CAC 152 CCC). Three of the pyrazinamide resistant strains had deletion in the same region (CTG-AAT (102-269)).

As a result, mutation in 152. codon was reported in previous studies; two new mutations and a deletion were determined responsible for pyrazinamide resistance in our study.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, Pyrazinamide, PCR-RFLP, *pncA* mutation

KAYNAKLAR

1. Barış Yİ. Çağlar boyu tüberküloz. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu; Samsun: 2003:1-7.
2. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M(Editörler). İnfeksiyon hastalıkları'nda. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1996: p.396-443.
3. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de tüberküloz kontrolü için başvuru kitabı. Ankara: Verem Savaşı Daire Başkanlığı,2003: 23-32.
4. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar.21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun:2003:173-77
5. Saniç A, Eroğlu C. Tüberküloz tanısında PCR. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun: 2003: 310-23.
6. Wallace RJ. Antimycobacterial agents. In: Mandell G, Bennett JE, Dolin R, (Eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000: p. 436-48.
7. Çilli A. Antitüberküloz ilaçlar ve etki mekanizmaları. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun: 2003: 163-72
8. Çavuşoğlu C. Mycobacterium tuberculosis'de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun: 2003:369-87.
9. Uzun M. Tüberküloz; tanı, direnç, tedavi. Anğ Ö, Uzun M (Editörler). Tüberküloz epidemiyolojisi'nde. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını(26); 1996: p.1-9.

10. Köksal F, Yaman A. Farklı bir bakteri topluluğu mikobakterilerde hücre duvar yapısı. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun: 2003: 33-47.
11. Öztürk R. Tüberkülozda doğal direnç ve risk faktörleri. 21.yüzyılda tüberküloz sempozyumu. II.Tüberküloz Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun: 2003: 58-73.
12. Haas DW, Des Prez RM. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin (Eds.). Principles and practice of infectious diseases. New York: R.Churchill Livingstone;1995. p. 2213-43.
13. Tansel Ö. Ofloksasine dirençli mycobacterium tuberculosis kompleks suşlarında *gyrA* geninde mutasyonların belirlenmesi (tez). Kocaeli: K.Ü. Tıp Fak; 1999.
14. Kocabaş A. Tüberküloz tedavisinin temelleri. Kocabaş A(Ed.). Tüberküloz kliniği ve kontrolu'nde. Adana: Çukurova Üniversitesi Basımevi; 1991. p.273-93.
15. Helvacı S. Tüberküloz tedavisinde yeni yaklaşımlar. İnfek derg 1997; 11(4): 53-6.
16. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. Emerg Infect Dis 1998; 42: 195-207.
17. Ramaswamy S, Musser JM.Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuberc Lung Dis 1998;79:3-29.
18. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. Respir Res 2001; 2: 164-8.
19. Uzun M, Erturan Z, Anğ Ö. Investigation of cross-resistance between rifampin and rifabutin in Mycobacterium tuberculosis complex strains. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6 :164-5.
20. Kocagöz T. Mycobacterium tuberculosis'in ilaçlara karşı direncinden sorumlu mekanizmalar ve moleküler tanı. XXXI.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Özet Kitabı 19-23 Eylül 2004; Aydın.115-8.
21. Nolte F S, Metchock B. Mycobacterium. In; Murray PR. (Ed.). Manual of clinical microbiology .Washington: American Society for Microbiology Press; 1995. p.400-37.
22. Keleşoğlu N. Tüberküloz tanısında bakteriyolojik yöntemler. Kocabaş A(Editör). Tüberküloz kliniği ve kontrolü'nde. Adana: Çukurova Üniversitesi Basımevi,1991; p.211-7.

23. Yüce A. Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. İnf derg 1997; 11(4):47-51.
24. Piersimoni C, Nista D, Bornigia S, De Sio G. Evalution of a new method for rapid drug susceptibility of Mycobacterium avium complex isolates by using the Mycobacteria Growth Indicator Tube. J Clin Microbiol 1998; 36(1):64-7.
25. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. İnf derg 1997; 11(4):29-33.
26. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. 2nd ed . New York:
WH Freeman and Company, 1992: 79-98.
27. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. J Clin Microbiol 1997; 35: 79-5.
28. Telenti A, Persing DH Novel strategies for the detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Res. Microbiol 1996; 147:73-9.
29. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. New York: Jhon Wiley & Sons Inc, 1995:1-25.
30. Siddiqi SH. BACTEC 460 TB System, product and Procedures Manuel. Maryland: Becton Dickinson and Company, 1995: 3.13.1.
31. Isolation and Identification of mycobacterium tuberculosis, A Guide For The Level II Laboratory. ASM, Washington D.C. 1993:103-6.
32. Köksalan K. Kord oluşturma, BACTEC NAP testi ve biyokimyasal identifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması ve İstanbul'da mikobakteri suşlarının türlere göre dağılımı (tez). İstanbul: İÜ Tıp Fak; 1999.
33. Siddiqi H.S. BACTEC NAP Test. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Isenberg HD(Ed). American Society for Microbology. Washington, D.C; 1992. 1: 3.13.-13.4.
34. Master RN. Mycobacteriology. In:Clinical Microbiology Proocedures Handbook. Isenberg HD. (Ed) ASM, Washington D.C. 1993: 3.7.1.
35. Latta PD, Weitzman I.Mycobacteriology. In: Esential Procedures for Microbiology. Isenberg HD (Ed). ASM, Washington D.C. 1993:3.8.1.

36. Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, Gross W, Hotaling J, Kornblum J, Laszlo A, Roberts G, Salfinger M, Wittwer F, Siddiqi S. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. J Clin Microbiol 1999; Oct;37(10):3179-86.
37. Bilgehan H. Mikrobiyolojik morfolojiyi inceleme yöntemleri. Bilgehan H(Editör). Klinik Mikrobiyoloji'de. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları; 1995: p.71-95.
38. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ. In: Weisssfeld AS(Ed.). Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. New York: ASM; 1994:267-75.
39. Wayne, L. G. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1974; 109:147-51.
40. Almeda J, Garcia A, Gonzales J, Quinto L, Ventura PJ, Vidal R "et al". Clinical evaluation of an ın-hause IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 859-67.
41. Pao CC, Yen B, You JB, Maa JS, Fıss EH, Chang CH. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. J Clin Microbiol 1990;28:1877-80.
42. Kunduracılar H. Mikobakteri türlerinin moleküler metotla belirlenmesi (tez) Edirne; TÜ Tıp Fak; 2004.
43. Vincent V, Brown BA, Jost KC, Wallace R Jr. Mycobacterium: Phenotypic and Genotypic Identification.In. "Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken R.H (Eds). Manuel of Clinical Microbiology. 8th ed." , ASM Pres.Washington D.C;.2003: p.560-84.
44. Kıyan M. Mycobacteriaceae Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.'de Ankara. Güven Kitabevi. 1999; p.420-54.
45. TelentiA, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by PCR and restricition enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993;31: 175-8.

46. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR restriction fragment length polimorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithmto differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997; 35: 2969-73.

47. Brunella F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortolli E, Fontana R. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Analysis of the hsp65 Gene. J Clin Microbiol 2001; 39: 2799-806.

48. Wilson RW, Steingrube VA, Brown BA, Wallace R Jr. Clinical application of PCR-restriction enzyme analysis for rapid identification of aerobic Actinomycete isolates J Clin Microbiol 1998;36:148-52.

49. Morris AJ, Reler LB. Reliability of cord formation in BACTEC media for presumptive identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1993; 31: 2533-4.

50. Swanson DS, Pan X, Muser JM. Identification and subspesific differentiation of M.scrofulaceum by automated sequencing of a region of the gene (hsp65) encoding a 65-kilodalton heat shock protein. J Clin Microbiol 1996; 34: 3151-9.

51. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M" et al". PCR amplification and restriction endonuclease analysis of 65- kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1995; 33:(1):149-53.

52. Avkan Oğuz V, Akbal H, Sarıbaş S, Karagöz T, Öztürk R. Edinsel çok ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis suşlarının major ve minör antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı. İnfeks Derg 2000; 14:383-6.

53. Miller AM, Thibert L, Desjardins F, Sıddıqı SH, Dascal A. Growth inhibition of mycobacterium tuberculosis by polyoxyethylene stearate present in the BACTEC pyrazinamide susceptibility test. J Clin Microbiol 1996; 34(1):84-6.

54. Park SK, Lee JY, Chang CL, Lee MK, Son HC, Kim CM, Jang HJ, Park HK, Jeong SH. PncA mutations in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Korea. BMC Infect Dis 2001;1: 4.

55. Aono A, Hirano K, Hamasaki S, Abe C. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide: compored with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. Diagn Microbiol Infect Dis 2002 Dec; 44(4): 347-52.

56. Scorpio, A, and Zhang. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase /nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat. Med 1996; 2: 662-7.
57. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. PncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Portugal. Antimicrob Agents and Chemother 2004; july(7): 2736-8.
58. Suzuki Y, Suzuki A, Tamauru A, Katsukawa C, Oda H. Rapid detection of pyrazinamide- resistant Mycobacterium tuberculosis by a PCR- based in vitro system. J Clin Microbiol 2002; 40(2): 501-7.
59. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, Woodley CL, Cooksey RC. Antimicrob Agents and Chemother 2000; Sept;44(9): 2291-5.
60. Hirano K, Takahashi Y, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in pncA is a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis . Tubercle and Lung Dis 1998; 78(2): 117-22.
61. Lee KW, Lee JM, Jung KS. Characterizations of pnc A mutations of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis in Korea. J Korean Med Sca 2001; Oct; 16(5): 537-43.
62. Lemaitre N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Characterization of new mutations in pyrazinamide- resistant strains of Mycobacterium tuberculosis and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. Antimicrob Agents Chemother 1999; july;43(7): 1761-3.
63. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, de Smet KA, Portaels F, Van E, Eeckhout E. Relationship between pyrazinamide resistance loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the pncA locus in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 1999; Sep;(9): 2317-9.
64. BrownTJ, Tansel Ö, French GL. Simultaneous identification and typing of multi drug- resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by analysis of pnc A and rpo B. J Med Microbiol 2000; 49: 651-6.
65. Tracevska T, Nodieva A, Skenders G. Spectrum of pncA mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates obtained in Lativia. Antimicrob Agents Chemother 2004; Aug;48(8): 3209-10.

66. Huang TS, Lee SS, Tu HZ, Huang WK, Chen YS, Huang CK, Wann SR, Lin HH, Liu YC. Correlation between pyrazinamide activity and pncA mutations in Mycobacterium tuberculosis isolates in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2003; Nov;47(11): 3672-3.
67. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. PncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2004; Mar;44(3): 528-32.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Şanlıurfa.da doğdum. 1991 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler bölümünü kazanıp, 1995 yılında buradan mezun oldum. 1996 yılında aynı üniversitede Mikrobiyoloji AD'da Yüksek Lisansa başladım, 1999 yılında "Periodontal apselerde anaerop bakterilerin önemi" adlı tezle Yüksek Lisansımı bitirdim. 2002 yılında Trakya Üniversitesi Mikrobiyoloji ABD'da Doktora eğitimine başladım. Çeşitli kongrelerde sunulan 21 posterim, 4 yurt içi yayınım vardır. Halen bu bölümde anaerop ve mikobakteriyoloji bölümlerinde rutin çalışmalarımı yürütmekteyim.