



MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS SUŞLARINDA İLAÇ DİRENCİNİN REAL-TIME PCR İLE HIZLI TESPİTİ İÇİN ANYPLEX™ II MTB/MDR/XDR KİTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF THE ANYPLEX™ II MTB/MDR/XDR KIT FOR RAPID DETECTION OF DRUG RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX STRAINS BY REAL-TIME PCR

Emel EKER ¹, Toğrul NAĞIYEV ¹

¹ Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana, Türkiye

ÖZET

Amaç: Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTBK) suşlarının, ikinci seçenek anti-tüberküloz (anti-TB) ilaçlara direnç geliştirmesiyle yaygın ilaç dirençli (YİD) suşların ortaya çıkışı en önemli insan sağlığı tehditlerinden birini oluşturmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda, doğrudan klinik örnekler üzerinde uygulanabilen ve eş zamanlı olarak MTBK ve mutasyonları belirleyen multipleks gerçek zamanlı PCR testinin ÇİD ve YİD suşlarının hızlı tanısındaki performansının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya iki grup dahil edildi: ardışık 44 MDR-MTBC izolatı ve fenotipik olarak birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine dirençli MTBK tanısı koyulan ardışık 50 ARB pozitif balgam örneği. Fenotipik olarak, MTBK'nin tanımlanmasını takiben birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçları için izolatların ilaç duyarlılık testi (DST) sırasıyla BACTEC MGIT 960 sistemi ve Löwenstein-Jensen agar proporsiyon (LJ-AP) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Genotipik olarak ise, multipleks Real-Time PCR yöntemi ile bir Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection kit (Seegene) kullanarak bütün örneklerde aynı anda hem de ÇİD ve YİD yönünden direnç durumu araştırıldı.

Bulgular: Fenotipik ve genotipik incelemelerin sonuçlarının çok uyumlu olduğu, ÇİD tespitinde fenotipik yöntemlere göre real-time PCR yönteminin duyarlılığının %80, özgüllüğünün de % 100 olduğu görüldü. Hem fenotipik hem de genotipik yöntemle 44 ÇİD-MTBK izolatından ikisi (%4.5) ön-YİD-MTBK olarak tanımlandı. Bu iki ön-YİD suştan birinin ARB(-) olması dikkat çekiciydi. Ayrıca, ÇİD-MTBK izolatlarından 18'i (%40.9)'i ARB(-) idi.

Sonuç: Sonuç olarak, Anyplex™ II MTB/MDR/XDR tespit kitini kullanan multipleks real-time PCR testinin, rutin olarak kullanılan zaman alıcı fenotipik yöntemlere kıyasla birkaç saat içinde MTBC, MDR ve XDR'nin tespiti için kullanışlı ve güvenilir bir yöntem olduğu kanaatine varıldı. Ancak, ÇİD- ve YİD-MTBK suşları ARB(+) örneklerinden olduğu kadar ARB(-) örneklerinden de izole edilebilir ve tüm klinik örneklerin Multiplex Real-time PCR testi kullanılarak araştırılması çok maliyetlidir. Dolayısıyla MTBK identifikasyonunun uygun maliyetli PCR bazlı özgül bir yöntem kullanılarak yapılmasının ardından MTBK pozitif örneklerde, çalışmamızda kullanılan multipleks real-time PCR tespit kiti ile MTBK doğrulanması ve ilaç direncinin saptanması daha uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Agar Proporsiyon Duyarlılık Yöntemi, Çoklu İlaç Direnci (ÇİD), M. Tuberculosis Kompleks (MTBK), Real-Time PCR, Yaygın İlaç Direnci (YİD).

ABSTRACT

Objective: The occurrence of the extensively drug-resistant (XDR) strains by improving resistance to second-line anti-tuberculosis (anti-TB) drugs of multidrug-resistant (MDR) Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) strains brings about one of the most important human health threats. For this reason, our study aimed to investigate the performance of the multiplex real-time PCR assay, which can be directly performed on clinical samples and simultaneously determines MTBC and the mutations in rapid diagnosis of MDR and XDR strains.

Methods: The study enrolled two groups: the consecutive 44 MDR-MTBC isolates and the consecutive 50 ARB-positive sputum samples phenotypically diagnosed as MTBC resistant to at least one first-line anti-TB drug. Phenotypically, after the identification of MTBC, the drug susceptibility testing (DST) of the isolates for the first- and second-line anti-TB drugs was performed using the BACTEC MGIT 960 system and Löwenstein-Jensen agar proportion (LJ-AP) method, respectively. Genotypically, MTBC positivity and MDR and XDR status were simultaneously investigated by multiplex real-time PCR assay using the Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection kit (Seegene).

Results: The results of the phenotypic and genotypic investigations were very consistent. The sensitivity and specificity of the real-time PCR assay in MDR detection were 80% and 100%, respectively, compared with phenotypic methods. Two (4.5%) of the 44 MDR-MTBC isolates were identified as pre-XDR-MTBK by both phenotypic and genotypic methods. It was striking that one of these two pre-XDR strains was ARB negative. Moreover, 18 (40.9%) of the MDR-MTBC isolates were ARB(-).

Conclusion: In conclusion, multiplex Real-Time PCR assay using the Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection kit was suggested to be a usable and reliable method for the detection of MTBC, MDR and XDR in several hours compared with routinely used time-consuming phenotypic methods. However, MDR- and XDR-MTBC strains can be isolated from ARB(+) as well as ARB(-) samples, and investigation of all clinical samples using multiplex real-time PCR assay is very costly. Therefore, following the MTBC identification using a specific cost-effective PCR-based method, confirmation of MTBC and detection of drug resistance with the multiplex real-time PCR detection kit used in our study will be more convenient in the MTBC-positive samples.

Keywords: Agar Proportion Susceptibility Method, Extensively Drug Resistance (XDR), Multidrug Resistance (MDR), M. Tuberculosis Complex (MTBC), Real-Time PCR.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Toğrul NAĞIYEV, Dr.Öğr.Üyesi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye. **E-mail:** tnagiye@cu.edu.tr

Bu makaleye atf yapmak için / Cite this article: Eker, E., & Nağiyev, T. (2023). Mycobacterium Tuberculosis Kompleks Suşlarında İlaç Direncinin Real-Time PCR İle Hızlı Tespiti İçin Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Kitinin Değerlendirilmesi. *Gevher Nesibe Journal of Medical & Health Sciences*, 8 (4), 1148-1162. <http://doi.org/10.5281/zenodo.10049082>

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis kompleksi (MTBK) üyesi bakterilerin yol açtığı tüberküloz (TB) en eski hastalıklardan biri olarak kabul edilen bulaşıcı, nekrotizan, ölümcül bir hastalıktır. Etkin tedavi seçeneklerinin bulunmasına, üstelik aşıyla korunulabilir bir hastalık olmasına karşın, morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek olan bu hastalık dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birini enfekte etmekte ve halk sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2022 Raporu'na göre 2021 yılında 10.6 milyona yakın kişinin aktif hastalığa yakalandığı, yaklaşık 1.4 milyon kişinin ise bu hastalıktan öldüğü tahmin ediliyor. Ayrıca, COVID-19 salgınının tüberküloz tanısına erişim, tedavi ve tüberküloz hastalığının yükü üzerinde zararlı bir etkisi olduğu görülmektedir. TB ile mücadelede 2019'a kadar olan yıllarda kaydedilen ilerleme yavaşladı, durdu veya tersine döndü ve küresel TB hedefleri yolundan saptı. Hem 2020 hem de 2021'de rapor edilen yeni TB tanısı alan kişi sayısında 2019 ile karşılaştırıldığında önemli bir azalma olması; aslında teşhis edilmemiş, dolayısıyla da tedavi edilmemiş TB hastalarının sayısında bir artış olduğunun göstergesidir. Ayrıca, TB'den ölen tahmini insan sayısındaki artış yakın gelecekte bu hastalığın bir kez daha dünya çapında tek bir bulaşıcı ajandan kaynaklanan ölümlerin önde gelen nedeni olacağını ve COVID-19'un yerini alacağını düşündürmektedir. Temel TB hizmetlerine yönelik fonların artırılmasıyla desteklenen yoğunlaştırılmış çabaların yanı sıra, COVID-19 salgınının TB üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak ve tersine çevirmek için acilen araştırma yapılması gerekmektedir (World Health Organization [WHO], 2022).

Birçok ülkede "Acid-Resistant Bacilli" (ARB) terimi olarak da karşımıza çıkmakta olan boyama TB teşhisinde ilk aşama olarak kullanılmaya devam etmektedir. MTBK tanısı için kültür ortamında izolasyon yöntemleri altın standart kabul edilmektedir. ARB/kültür pozitif olarak belirlenen hastaların tedavilerinde ise Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) önerdiği standart protokole göre ilk 6 ay süren kombine ilaç tedavisinde rifampisin (RIF), izoniazid (INH), pirazinamid (PZA), streptomisin (STR) ve etambutol (EMB) birinci seçenek anti-tüberküloz (anti-TB) ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Ancak rifampisin ve izoniazidin her ikisine birden gelişen direnç Çoklu İlaç Direnci (ÇİD - MDR, multidrug-resistant) olarak değerlendirilmektedir. ÇİD-TB hastalarda ikinci seçenek olarak tercih edilen florokinolon (siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve b.) ile enjektabl (parenteral) olarak kullanılan aminoglikozid (amikasin, kanamisin, kapreomisin) grubu ilaçlara da direnç geliştikçe bedaquilin ve linezolid gibi A grubu ilaçlar kullanıma sokuldu. Önceleri ÇİD'e ek olarak en az bir florokinolon ve en az bir aminoglikozid direnci olanlar için yaygın ilaç direnci (YİD - XDR, extensively drug-resistant) tanımı kullanılırken, 2021 yılında DSÖ bu tanımı değiştirdi, ayrıca ön-YİD tanımını ekledi. Artık ön-YİD-TB; rifampisin direncine ek olarak ikinci seçenek anti-TB ilaçları içinde yer alan herhangi bir florokinolon ilaca karşı direnç geliştiğini ifade etmekte, YİD-TB ise; rifampisin direncine ve herhangi bir florokinolon ilaca dirence ek olarak bedaquilin ve linezolidten en az birine karşı olan direnç geliştirmiş TB'yi tanımlamaktadır. ÇİD-TB ve ön-YİD-TB için yeni tamamen oral rejimler tedavi süresini 20 aydan 6 aya düşürebilmektedir (WHO, 2022).

Tedavi öncesi TB'nin bakteriyolojik olarak doğrulanmasının ardından etken MTBK suşlarında ilaç direncinin tespiti için kültür yöntemleri, hızlı moleküler testler veya DNA dizileme teknolojilerinin kullanılması gerekir. DSÖ, ayrıca üç aylık tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden ve tedaviye klinik cevap vermeyen bütün hastalardan izole edilen suşlara ilaç duyarlılık testi (İDT) yapılmasını önermektedir. Böylece, duyarlılığın zamanında ve sistematik ortaya konması ile; ilaca dirençli suşların hızlı tespiti, hastaların etkin tedavisi ve ÇİD-TB ve buna bağlı olarak da YİD-TB yayılımının engellenmesi ve ölüm oranının azaltılması gerçekleştirilecektir. Fakat duyarlı yöntemlerin gelişmiş laboratuvar altyapısına gereksinim duyması uygulamayı sınırlamaktadır. ÇİD-TB vakalarının tamamında florokinolon direncinin araştırılması gerekirken DSÖ verilerine göre 2021'de bu testlerin küresel kapsamı çok daha düşük olup, %50'dir (WHO, 2022). Ön-YİD ve YİD tespiti için kullanılan DSÖ tarafından onaylanan tek genotipik test olan GenoType MTBDRsl nisbeten yoğun iş gücüne ihtiyaç duymaktadır ve doğrudan klinik örneklerinde daha az güvenilir sonuç vermektedir. 2021 yılında geliştirilen ve değerlendirme aşamasında olan Xpert MTB/XDR ise ön-YİD/YİD tespiti için umut vadetmektedir (Alagna, 2021; Katamba, 2023; Pillay, 2022). Rifampisin, izoniazid, florokinolon ve aminoglikozid direnç tespiti için tercih edilen bir diğer genotipik test olan Anyplex™ II MTB/MDR/XDR her ne kadar DSÖ tarafından onaylanmasa da, doğrudan klinik örneklerde başarı ile kullanılmıştır (Causse ve ark., 2015; H. Helal ve ark., 2019; Igarashi ve ark., 2017).

Ülkemizde rutinde MTBK tanısı, birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı gelişen direnç durumunun tespiti için hızlı ve güvenilir moleküler yöntemler kullanılmamakla beraber, bunların

uygulanabilirliğini araştıran çalışmalar da yok denecek kadar azdır (Alp ve Sarıbaş, 2019; Tekin ve ark., 2017). Bu sebeple, çalışmamızın amacı; ÇİD-MTBK ve ön-YİD-MTBK suşlarının hızlı tanısında mutasyonları tespit etmeye yönelik amplifikasyon ve spesifik erime eğrisi analizleri (Melting Curve) ile ayırım gücüne sahip multiplex Real-Time PCR yöntemiyle Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection kitinin hem kültür izolatlarında hem de balgam örneklerinde doğrudan etkinliğinin araştırılması, ayrıca elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılması şeklinde belirlendi. Çalışmamızın yapıldığı dönemde Xpert MTB/XDR gibi doğrudan klinik örneklerde başarıyla uygulanabilen diğer genotipik İDT'ler mevcut olmadığından rutin kullanıma oturtulması planlanan real-time PCR yönteminin bu test ile değerlendirilip laboratuvarımızda rutin kullanıma uygunluğu araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (THAUM) ve Bölge Tüberküloz Laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz kesitsel çalışmamızda; Adana ve çevre illerinde (Antakya, Adıyaman, Gaziantep, Mersin, Osmaniye ve Kahramanmaraş) bulunan 13'ü Verem Savaşı Dispanseri, altısı da hastane olmak üzere toplam 19 merkezden gönderilen balgam örnekleri ile bu örneklerden izole edilen ÇİD-MTBK suşları iki grup halinde incelendi.

Çalışmamızın ilk grubunu laboratuvarımızda 2012 Ocak-2014 Mart tarihlerinde izole edilen toplam 44 ÇİD-MTBK suşu oluşturdu. Bu grupta amacımız hem genotipik yöntemin ÇİD-MTBK tespitindeki duyarlılığını ölçmek hem de ikinci seçenek ilaç direnci tespit şansını artırmaktı.

İkinci çalışma grubuna ise laboratuvarımıza 2013 Eylül-2014 Mart tarihlerinde gönderilen ve mikroskopik inceleme sonucu ARB-pozitif bulunan ve BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminde yapılan kültür ve fenotipik İDT sonuçlarına göre birinci seçenek anti-TB ilaçlardan en az birine dirençli MTBK tespit edilen ardışık 50 balgam örneği dahil edildi. Bu grupta amacımız genotipik yöntemin doğrudan dekontaminasyon-homojenizasyon ve konsantrasyon işlemleri (teksif) yapılan balgam örneklerine uygulanabilirliğini ölçmektir. Bu amaçla, bu örnekler fenotipik İDT sonuçları çıkana kadar doğrudan 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alınarak -20°C'de muhafaza edildi.

Fenotipik İncelemeler

Kültür Ortamında İzolasyon ve MTBK İdentifikasyonu

Rutin uygulamalarda yapıldığı üzere balgam örneklerinin tamamına teksif işlemi için N-asetil-L-sistein-%4 NaOH- (NALC-NaOH) yöntemi uygulandı. Örneklerden hazırlanan yayma preparatların mikroskopik incelemesi için ARB boyama karbol fuksin yöntemi (Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN)) ile yapıldı. Mikobakterilerin identifikasyonunda altın standart olarak kabul edilen kültür ortamında izolasyon için hem MGIT 960 otomatize sistemi hem de Lowenstein-Jensen (LJ) agar besiyeri kullanıldı. LJ agara 0.3 ml ekim yapılan örnekler 6-8 hafta (ortalama 42 gün) boyunca 37°C'de inkübe edildi. BACTEC MGIT 960 sisteminde kültür için ise BACTEC MGIT çoğalma destekleyicisi ve BBL MGIT PANTA antibiyotik karışımı ile desteklenmiş 7 mL'lik modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth içeren Mikobakteri çoğalma indikatör tüp (MGIT)'lerine (Becton Dickinson, ABD) 0.5 ml ekim yapılan örnekler 6-8 hafta (ortalama 42 gün) sonra üreme tespit edilene kadar 37°C'de inkübe edildi.

Kültürde izole edildikten sonra, MTBK türleri ile tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) türlerinin ayırımı için ise NAP testi (Para Nitro Benzoik Asit reaktifi (p-NBA)) ve İmmünokromatografik TB Ag MPT64 kart (Becton Dickinson, ABD) testi uygulandı ve sonuçlar Tablo 1'de gösterildiği gibi değerlendirildi.

Tablo 1. NAP ve immünokromatografik TB Ag Mpt64 kart test sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi

NAP Test Sonucu	İmmünokromatografik TB Ag Mpt64 Kart Test Sonucu	
	Tek Çizgi	İki Çizgi
Tek Tüpte Üreme	Geçersiz	MTBK
İki Tüpte Üreme	TDM	Koinfeksiyon (MTBK+TDM)

İlaç Duyarlılık Testleri (İDT)

MTBK izolatlarının birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde MGIT SIRE (Streptomycin, İsoniazid, Rifampicin, Etambutol) kiti (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda test edildi.

Birinci gruptaki izolatların tamamı ile ikinci grupta ÇİD-MTBK olduğu belirlenen izolatların ikinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlılıkları ise LJ agar proporsiyon (LJ-AP) yöntemi ile test edildi. Bunun için florokinolon grubundan siprofloksasin, enjektabl (parantral) ilaçlardan da amikasin kullanıldı. LJ içerikleri eklenmiş son karışım ikisi ilaçlı, ikisi ilaçsız 700'er ml olmak üzere dört kısma ayrıldı. Öncelikle iki kısmı ilaçsız kontroller olarak kullanılmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlandı. Her burğu kapaklı tüpe 6'şar ml olmak üzere dökülüp 80°C'de 1 saat aralıklı kontroller şeklinde pastör fırınında pişirildi ve bu işlem iki gün daha üst üste birer saat olmak koşuluyla tekrarlandı. Bu şekilde kısmen tinalizasyon yöntemi gibi sterilizasyon işlemi yapılmış oldu. Pişirmenin akabinde örneklerin ekilmesinden önce buzdolabına kaldırıldı.

İlaçlı besiyerlerini hazırlamak için, geri kalan iki kısımdan birine amikacin sulfate (AMK) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) son konsantrasyon 4 µg/ml olacak şekilde (700 ml'lik karışım içerisine 50 mg/ml olarak hazırlanmış AMK solüsyonundan 56 µl eklendi), diğerine ise ciprofloksacin (CIP) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde (700 ml içerisine 50 mg/ml olarak hazırlanmış CIP solüsyonundan 28 µl eklendi) eklenerek besiyerinde homojen bir şekilde dağılına kadar karıştırıldı. Bu karışımlar da 6'şar ml olmak üzere dökülüp ilaçsız besiyerindeki gibi sterilize edildikten sonra besiyerleri buzdolabına kaldırıldı.

Antibiyotiksiz LJ besiyerine 1.0 McFarland standard bakteri süspansiyonu 10⁻² ve 10⁻⁴ olacak şekilde sulandırılarak 0.3'er ml şeklinde tüm örneklerin ekimleri yapıldı. 37°C'de kültürden ekim yapıldığı için 2-3 hafta inkübasyona bırakıldı.

Her iki antibiyotikli besiyerlerine 1.0 McFarland standard bakteri süspansiyonları 10⁻² olacak şekilde sulandırılarak 0.3'er ml şeklinde tüm örneklerin ekimleri yapıldı. 37°C'de kültürden ekim yapıldığı için 2-3 hafta inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üremeyi 100 kattan daha fazla engelleyenler duyarlı 100 kattan daha az engelleyenler dirençli olarak yorumlandı (üreme oranı > %1; dirençli) (Satana ve ark., 2010).

Genotipik İnceleme

Genotipik inceleme için spesifik erime eğrisi (melting curve) ile direnç analizi yapan CFX96 Real-Time PCR cihazında (Bio-Rad, California, USA) Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection Kit (Seegene, SOUTH KOREA) kullanıldı. Bu testle adından da görüldüğü gibi, örneklerde hem MTBK varlığı hem de ÇİD'i araştırmak için rifampicin ve isoniazidin her ikisine birden olan direnç durumuna ek olarak YİD tespiti için de folorokinolon ve enjektabl ilaçların kendi grupları içerisindeki öncelikli önem arz eden ortak nokta mutasyon (SNP) bölgeleri araştırıldı.

Real-Time PCR cihazında MTB/MDR/XDR kiti ÇİD için 18 rifampicin ve 7 isoniazid ilaç direnç bölgesi tespit ederken, YİD için ise florokinolon grubundaki ilaçlara karşı 7, enjektabl ilaçlara karşı da 6 direnç bölgesi tespit edebilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Multipleks Real-Time PCR ile ÇİD ve YİD MTBK tespitinde kullanılan mutasyonlar.

Direnç Durumu	İlaç	İlgili Gen	Mutasyon
ÇİD	Rifampisin (18 mutasyon)	<i>rpoB</i>	L511P (CTG→CCG), Q513K (CAA→AAA), Q513L (CAA→CTA), Q513P (CAA→CCA), 513-516 3 a.a eksikliği, D516V (GAC→GTC), D516Y (GAC→TAC), S522L (TCG→TTG), S522Q (TCG→CAG), H526C (CAC→TGC), H526D (CAC→GAC), H526L (CAC→CTC), H526N (CAC→AAC), H526R (CAC→CGC), H526Y (CAC→TAC), S531L, (TCG→TTG), S531W (TCG→TGG), L533P (CTG→CCG)
		<i>katG</i>	S315I (AGC→ATC), S315N (AGC→AAC), S315T (AGC→ACC), S315T (AGC→ACA)
	İsoniazid (7 mutasyon)	<i>InhA</i>	-15 (CT), -8 (TA), -8 (TC)
YİD	Florokinolon Grubu İlaçlar (7 mutasyon)	<i>gyrA</i>	A90V (GCG→GTG), D94G (GAC→GGC), D94N (GAC→AAC), S91P (TCG→CCG), D94H (GAC→CAC), D94Y (GAC→TAC), D94A (GAC→GCC)

Enjektabl İlaçlar (6 mutasyon)	<i>rrs</i>	1401 (AG), 1402 (CT), 1484 (GT)
	<i>eis</i>	-37 (GT), -14 (CT), -10 (GA)

DNA Ekstrasyonu

Genotipik inceleme birinci grupta ÇİD-MTBK izolatlarına uygulandığından DNA ekstraksiyonu kültür ortamında elde edilen bakteri kolonilerinden Mickle cihazı (The Mickle Laboratory Engineering CO. LTD., Gomshall Surrey, UK) yardımıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda mekanik olarak gerçekleştirildi.

İkinci grupta ise genotipik inceleme doğrudan teksif edilmiş balgam örneklerine uygulandığından bu örneklerden DNA ekstraksiyon işlemi çalışmada kullandığımız Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection Kit ambalajında bulunan ekstraksiyon solüsyonları yardımı ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı.

Real-Time PCR Amplifikasyonu

Real-Time PCR yöntemiyle MTB/MDR/XDR (MTBK/ÇİD/YİD) testinin protokolüne göre her örnek için iki ayrı mütipleks reaksiyon gerçekleştirildi. Birinci reaksiyonlara ÇİD-MTBK tespiti için MTB/MDR primerleri eklenirken, ikinci reaksiyonlara YİD-MTBK tespiti için MTB/XDR primerleri eklendi. Amplifikasyon aşamaları üretici firmanın talimatları doğrultusunda 95°C'de 15 dakika ilk denaturasyonu takiben 95°C'de 0.5 dakika denaturasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma (annealing) ve 72°C'de 0.5 dakika uzama (extension)'dan ibaret 50 döngü şeklinde uygulandı. En son 55°C'de 0.5 dakika tutulduktan sonra 85°C'ye kadar her 5 saniyede bir 0.5°C artırıldı.

Birinci ve ikinci gruptaki örneklerin tamamı Real-Time PCR cihazı analiz sisteminde (Seegene Viewer, South Korea) ÇİD ve YİD açısından irdelenerek yorumlandı.

İstatistiksel Analiz

Fenotipik ve genotipik inceleme bulguları gruplar da dikkate alınarak karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için Fisher Exact Ki Kare testi kullanıldı ve karşılaştırmalarda istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı (SPSS 21.0 versiyonu, IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

Etik Yönü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Karar No: 8 ve Tarih: 11.10. 2013).

Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızı sınırlandıran en önemli durumlar bütçe sebebiyle örnek sayısının yüksek olmaması, ve test sonuçlarının başka genotipik İDT testi ile karşılaştırılamaması idi.

BULGULAR

Fenotipik İnceleme Bulgularının Değerlendirilmesi

Birinci gruptaki ÇİD-MTBK izole edilen 44 örnekten 26'sı (%59.1) ARB pozitif bulunmuşken, LJ agar besiyerinde bu örneklerin 21'inde (%47.7), BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi ile de biri dışındaki hepsinde (% 97.7) üreme görüldü. İkinci grupta bu sayılar sırasıyla 16 (%32.0) ve 47 (%94.0) idi (Tablo 3). LJ besiyerindeki üreme oranı ikinci grupta çok düşük görülsede, iki kültür yönteminde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla p=0.142 ve p=0.620, Fisher exact Ki kare testi).

Tablo 3. Fenotipik İnceleme Sonuçlarının Gruplara Dağılımı

Fenotipik İncelemeler *		1. Grup	2. Grup	Toplam		
		Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)		
ARB	Poz **	26 (59.1)	50 (100)	76 (80.9)		
	Neg	18 (40.9)	0	18 (19.1)		
LJ	Poz	21 (47.7)	16 (32.0)	37 (39.4)		
	Neg	23 (52.3)	34 (68.0)	57 (60.6)		
MGIT	Poz	43 (97.7)	47 (94.0)	90 (95.7)		
	Neg	1 (2.3)	3 (6.0)	4 (4.3)		
MGIT SIRE	STR	R	27 (61.4)	11 (22.9)	38 (41.3)	
		S	17 (38.6)	37 (77.1)	54 (58.7)	
	INH	R	44 (100)	11 (22.9)	55 (59.8)	
		S	0	37 (77.1)	37 (40.2)	
	RIF	R	44 (100)	6 (12.5)	50 (54.3)	
		S	0	42 (87.5)	42 (45.7)	
	EMB	R	12 (27.3)	4 (8.3)	16 (17.4)	
		S	32 (72.7)	44 (91.7)	76 (82.6)	
	LJ Agar Proporsiyon	CIP	R	2 (4.5)	0	2 (4.0)
			S	42 (95.5)	6 (100)	48 (96.0)
		AMK	R	1 (2.3)	0	1 (2.0)
			S	43 (97.7)	6 (100)	49 (98.0)

* ARB – Aside dirençli boyama; LJ – Lowenstein-Jensen agar besiyeri; MGIT – Mikobakteri çoğalma indikatör tüp; SIRE – Streptomycin, İsoniazid, Rifampicin, Etambutol; STR – Streptomisin; INH – İsoniazid; RIF – Rifampisin; EMB – Etambutol; CIP – Siprofloksasin; AMK – Amikasin.

** Poz – Pozitif, Neg – Negatif, R – Dirençli, S – Duyarlı.

Birinci grupta ARB pozitif 26 örnekten 12'sinde (% 46.2), ARB negatif 18 örnekten ise 9'unda (% 50.0) LJ besiyerinde üreme tespit edilmişken, BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde ARB(-) bir örnek dışında tamamında üreme görüldü. Böylece, ARB pozitif ve negatif örnekler arasında da LJ ve MGIT pozitifliği açısından fark bulunmadı (sırasıyla p=1.000 ve p=0.409, Fisher exact Ki kare testi) (Tablo 4).

Tablo 4. ÇİD MTBK örneklerinin mikroskopik inceleme ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.

Kültür	ARB(+) - 26 örnek		ARB(-) - 18 örnek		Ki Kare Testi
	Sayı (%)		Sayı (%)		
LJ	Poz	12 (46.2)	9 (50)		p=1.000
	Neg	14 (53.8)	9 (50)		
MGIT	Poz	26 (100)	17 (94.4)		p=0.409
	Neg	0	1		

Kültür sonrası MTBK identifikasyonu için yapılan NAP ve MPT64 testleri sonucunda yalnız ikinci gruptaki bir örnekte TDM izole edildi, yine aynı gruptaki bir başka örnekte ne LJ, ne de MGIT ile üreme görülmedi. MTBK yönünden kültür negatif olan bu iki örnek fenotipik olarak İDT'de değerlendirilemezken, moleküler olarak multipleks Real-Time PCR ile araştırıldı.

BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde SIRE kiti yardımı ile yapılan İDT sonucunda streptomycin, isoniazid, rifampicin ve ethambutol için direnç oranları sırasıyla birinci grupta 27 (% 61.4), 44 (% 100), 44 (% 100) ve 12 (% 27.3), ikinci grupta da 11 (% 22.9), 11 (% 22.9), 6 (% 12.5) ve 4 (% 8.3) olarak bulundu (Tablo 3). Birinci grup ÇİD-MTBK suşlardan oluşturulmuş iken, ikinci gruptaki rifampisine dirençli 6 suşun tamamının izoniazide de dirençli olduğu görüldü ve ÇİD olarak tanımlandı. Ayrıca, bu 6 ÇİD suştan 5'i aynı zamanda streptomisine, 2'si de streptomisin ve etambutola dirençli idi.

Çalışmamızda ÇİD MTBK suşların ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç (minör direnç) durumunun fenotipik incelenmesi için kullandığımız ve rutin tanıda daha standardize edilmemiş olan LJ-AP yöntemi ile florokinolon grubunu temsilen siprofloksasin, enjektabl ilaçları temsilen de amikasin için yapılan İDT sonucunda, birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinin (% 4.5) yalnız siprofloksasine, birinin (% 2.3) de yalnız amikasine dirençli olduğu bulunmuş iken, ikinci gruptaki 6 ÇİD suşun

hiçbirinde minör direnç tespit edilmedi (Tablo 3). Böylece, fenotipik olarak YİD (XDR) bulunamazken, eski tanıma göre üç (%6.8) ÇİD suşumuz, yeni tanıma göre de iki (%4.5) ÇİD suşumuz ön-YİD (pre-XDR) olarak tanımlandı. Göze çarpan bir diğer bulgu da bu 2 ön-YİD suştan birinin ARB negatif olması, üstelik, bu örneğin Eylül 2013 tarihinden sonra gelmiş olması idi. Ayrıca, toplam 44 ÇİD-MTBK izolatından 18'i (%40.9)'i (Eylül 2013 tarihinden itibaren birinci grubumuza eklenen 10 ÇİD suştan 4'ü) ARB negatif idi.

Multipleks Real-Time PCR Bulgularının Değerlendirilmesi

Birinci grubu oluşturan 44 kültür örneğinden Mickle yöntemiyle elde edilen DNA ekstraktlarının tamamında MTBK bulunmuşken, ikinci gruptaki 50 ARB pozitif işlenmiş balgam örneğinden kitteki hazır ekstraksiyon protokolüne göre elde edilen DNA ekstraktlarından 48'inde (% 96.0) MTBK varlığı tespit edildi (Tablo 5).

Aynı kit ile birinci gruptaki kültür örneklerinin 37'sinde (% 84.1) isoniazid, 40'ında (% 90.9) da rifampisin direncinden sorumlu nokta mutasyonu tespit edilmişken, ikinci grupta bu sonuçlar sırasıyla 8 (% 16.0) ve 6 (% 12.0) olarak bulundu. Yine birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinde (% 4.5) florokinolonlara, birinde (% 2.3) de enjektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan nokta mutasyonu bulunmuşken, ikinci gruptaki balgam örneklerinin hiçbirinde ikinci seçenek anti-TB ilaç direnci tespit edilemedi. Böylece, Real-Time PCR yöntemi ile ÇİD olarak tanımladığımız örnek sayısı birinci grupta 35 (% 79.5), ikinci grupta da 5 (% 10) iken, YİD açısından değerlendirmenin ise fenotipik yöntemin sonucu ile tamamen uyumlu olduğu görüldü (Tablo 5 ve 6).

Tablo 5. Fenotipik inceleme ve Real-Time PCR sonuçlarının karşılaştırılması ve gruplara dağılımı.

Real-Time PCR	Grup*	Fenotipik İncelemeler												
		ARB		MTBK		İlaç Duyarlılık Test (İDT)								
		(Toplam 94 örnek: G1- 44, G2- 50)		(Toplam 94 örnek: G1- 44, G2- 50)		Sonuçlarına Göre Direnç Durumu**								
		Poz	Neg	Poz	Neg	INH		RIF		CIP		AMK		
Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	R	S	R	S	R	S	R	S			
MTBK	G1	Poz	26 (100)	18 (100)	44 (100)	0	44 (100)	0	44 (100)	0	2 (100)	42 (100)	1 (100)	43 (100)
		Neg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G2	Poz	48 (96)	0	47 (97.9)	1 (50)	11 (100)	36 (97.3)	6 (100)	41 (97.6)	0	6 (100)	0	6 (100)
Toplam	Poz	74 (97.4)	18 (100)	91 (98.9)	1 (50)	55 (100)	36 (97.3)	50 (100)	41 (97.6)	2 (100)	48 (100)	1 (100)	49 (100)	
	Neg	2 (2.6)	0	1 (1.1)	1 (50)	0	1 (2.7)	0	1 (2.4)	0	0	0	0	
INH	G1	R	20 (76.9)	17 (94.4)	37 (84.1)	0	37 (84.1)	0	37 (84.1)	0	2 (100)	35 (83.3)	1 (100)	36 (83.7)
		S	6 (23.1)	1 (5.6)	7 (15.9)	0	7 (15.9)	0	7 (15.9)	0	0	7 (16.7)	0	7 (16.3)
	G2	R	8 (16)	0	8 (16.7)	0	8 (72.7)	0	5 (83.3)	3 (7.1)	0	5 (83.3)	0	5 (83.3)
Toplam	R	28 (36.8)	17 (94.4)	45 (48.9)	0	45 (81.8)	0	42 (84)	3 (7.1)	2 (100)	40 (83.3)	1 (100)	41 (83.7)	
	S	48 (63.2)	1 (5.6)	47 (51.1)	2 (100)	10 (18.2)	37 (100)	8 (16)	39 (92.9)	0	8 (16.7)	0	8 (16.3)	
RIF	G1	R	22 (84.6)	18 (100)	40 (90.9)	0	40 (90.9)	0	40 (90.9)	0	2 (100)	38 (90.5)	1 (100)	39 (90.7)
		S	4 (15.4)	0	4 (9.1)	0	4 (9.1)	0	4 (9.1)	0	0	4 (9.5)	0	4 (9.3)
	G2	R	6 (12)	0	6 (12.5)	0	6 (54.5)	0	6 (100)	0	0	6 (100)	0	6 (100)
Toplam	R	28 (36.8)	18 (100)	46 (50)	0	46 (83.6)	0	46 (92)	0	2 (100)	44 (91.7)	1 (100)	45 (91.8)	
	S	48 (63.2)	0	46 (50)	2 (100)	9 (16.4)	37 (100)	4 (8)	42 (100)	0	4 (8.3)	0	4 (8.2)	
FQ	G1	R	1 (3.8)	1 (5.6)	2 (4.5)	0	2 (4.5)	0	2 (4.5)	0	2 (100)	0	0	2 (4.7)
		S	25 (96.2)	17 (94.4)	42 (95.5)	0	42 (95.5)	0	42 (95.5)	0	0	42 (100)	1 (100)	41 (95.3)
	G2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	R	1 (1.3)	1 (5.6)	2 (2.2)	0	2 (3.6)	0	2 (4)	0	2 (100)	0	0	2 (4.1)	
	S	75 (98.7)	17 (94.4)	90 (97.8)	2 (100)	53 (96.4)	37 (100)	48 (96)	42 (100)	0	48 (100)	1 (100)	47 (95.9)	
İnjekt. İlaçlar	G1	R	1 (3.8)	0	1 (2.3)	0	1 (2.3)	0	1 (2.3)	0	0	1 (2.4)	1 (100)	0
		S	25 (96.2)	18 (100)	43 (97.7)	0	43 (97.7)	0	43 (97.7)	0	2 (100)	41 (97.6)	0	43 (100)
G2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

	S	50 (100)	0	48 (100)	2 (100)	11 (100)	37 (100)	6 (100)	42 (100)	0	6 (100)	0	6 (100)
Toplam	R	1 (1.3)	0	1 (1.1)	0	1 (1.8)	0	1 (2)	0	0	1 (2.1)	1 (100)	0
	S	75 (98.7)	18 (100)	91 (98.9)	2 (100)	54 (98.2)	37 (100)	49 (98)	42 (100)	2 (100)	47 (97.9)	0	49 (100)
G1	Poz	18 (69.2)	17 (94.4)	35 (79.5)	0	35 (79.5)	0	35 (79.5)	0	2 (100)	33 (78.6)	1 (100)	34 (79.1)
	Neg	8 (30.8)	1 (5.6)	9 (20.5)	0	9 (20.5)	0	9 (20.5)	0	0	9 (21.4)	0	9 (20.9)
G2	Poz	5 (10)	0	5 (10.4)	0	5 (45.5)	0	5 (83.3)	0	0	5 (83.3)	0	5 (83.3)
	Neg	45 (90)	0	43 (89.6)	2 (100)	6 (54.5)	37 (100)	1 (16.7)	42 (100)	0	1 (16.7)	0	1 (16.7)
Toplam	Poz	23 (30.3)	17 (94.4)	40 (43.5)	0	40 (72.7)	0	40 (80)	0	2 (100)	38 (79.2)	1 (100)	39 (79.6)
	Neg	53 (69.7)	1 (5.6)	52 (56.5)	2 (100)	15 (27.3)	37 (100)	10 (20)	42 (100)	0	10 (20.8)	0	10 (20.4)

* G1 – Birinci grup; G2 – İkinci grup.

** Poz – Pozitif; Neg – Negatif; R – Dirençli; S – Duyarlı; ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnci tespit etmek için fenotipik İDT’de florokinolonları temsilen ciprofloxacın, enjektabl ilaçları temsilen de amikacin kullanıldı; INH – Isoniazid; RIF – Rifampisin; CIP – Siprofloksasin; AMK – Amikasin; FQ – Florokinolonlar.

Tablo 6. Fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen suşların Real-Time PCR ile ÇİD MTBK açısından değerlendirilmesi ve gruplara dağılımı.

Real-Time PCR Sonucu	Fenotipik İnceleme Sonucu tespit edilen ÇİD MTBK suşlar		
	Grup 1 Sayı (%)	Grup 2 Sayı (%)	Toplam
Pozitif	35 (79.5)	5 (83.3)	40 (80)
Negatif	9 (20.5)	1 (16.7)	10 (20)
Toplam	44	6	50

Fenotipik İnceleme ve Real-Time PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

ÇİD-MTBK izolatlarının değerlendirildiği birinci grupta multipleks Real-Time PCR ile bütün örneklerde MTBK varlığı tespit edildi. Kültür ortamında izolasyon altın standart kabul edildiğinden, seçtiğimiz moleküler yöntemin duyarlılığı bu grup için % 100 iken, her iki yöntemle de negatif sonuç çıkmadığı için özgüllüğü hesaplanamadı. DNA ekstraksiyonu için doğrudan işlenmiş balgam örneklerinin kullanıldığı ikinci grupta ise, fenotipik identifikasyon sonucunda TDM tanısı alan tek örnekte moleküler olarak da MTBK varlığı gösterilemezken, kültür negatif olan yine tek örnek Real-Time PCR ile duyarlı MTBK tanısı aldı, kültür pozitif ve tamamen duyarlı örneklerden birinde moleküler olarak MTBK varlığı tespit edilemedi. Böylece, ikinci grup için Real-Time PCR’in duyarlılığı % 97.9, özgüllüğü de % 50 olarak hesaplandı (Tablo 5).

Her iki grupta da moleküler olarak dirençli bulunan örneklerin tamamı fenotipik olarak da dirençli idi. Birinci gruptaki 44 ÇİD MTBK suştan 4’ünde rifampisine, 7’sinde de izoniazide karşı dirençten sorumlu tutulan nokta mutasyonları tespit edilemedi. Buna karşılık, ikinci grupta fenotipik olarak ÇİD MTBK tanısı alan 6 örneğin tamamı Real-Time PCR ile rifampicine, 5’i de izoniazide dirençli bulundu (Tablo 5). Diğer taraftan izoniazid direnci ikinci grupta fenotipik olarak 11 örnekte bulunmuşken, moleküler olarak 8 örnekte tespit edildi. Böylece, İDT altın standart olarak kabul edildiğinden, multipleks Real-Time PCR yönteminin izoniazid direnci açısından duyarlılığının ikinci grupta % 72.7, kültür pozitif toplam 92 örnek için ise % 81.8, özgüllüğünün de hem ikinci grup, hem de toplamda % 100 olduğu görüldü. Birinci grupta ne izoniazid, ne de rifampicine duyarlı bir suş olmadığından her iki ilaç açısından özgüllük oranı hesaplanamadı. Kullandığımız moleküler yöntemin rifampicin direnci açısından ikinci gruptaki gerek duyarlılığı gerekse özgüllüğünün % 100, toplamda ise duyarlılığının % 83.6, özgüllüğünün de % 100 olduğu görüldü (Tablo 5). Ayrıca, ikinci grup örneklerinin toplanmaya başlandığı Eylül 2013 tarihinden itibaren gelen ve fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen 6 ARB pozitif örneğin birinci grupta kültür ekstraktlarının, ikinci grupta ise balgam ekstraktlarının değerlendirildiği multipleks Real-Time PCR yöntemi sonuçlarının her iki grupta da tamamen uyumlu çıktığı görüldü.

Bunlara ek olarak, birinci gruptaki örneklerden 3’ünün aynı hastaya ait olduğu ve Haziran 2012, Ekim 2012 ve Şubat 2014 olmak üzere farklı tarihlerde alındığı belirlendi. Bunlardan ilkinin ARB(-), ikincisinin ARB(+), üçüncüsünün ise ARB(++) olduğu, ancak kültür ve fenotipik İDT sonucunda her üçünün de izoniazid ve rifampisine dirençli MTBK olarak tespit edilmesine rağmen, kültür ekstraktları ile yapılan Multipleks Real-Time PCR sonucunda üçünde de rifampicine dirençli MTBK tespit edildiği, izoniazid direncinden sorumlu mutasyon ise tespit edilemediği görüldü. Hastanın üçüncü örneği, Eylül

2013 tarihinden sonra geldiği ve ARB pozitif olduğu için aynı zamanda ikinci grupta da balgam ekstraktı değerlendirildi ve genotipik inceleme sonucunun birinci gruptaki ile aynı olduğu belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7. Aynı hastadan farklı tarihlerde alınan üç örneğin fenotipik ve genotipik inceleme sonuçları.

Örnek	Fenotipik İnceleme Sonuçları		Real-Time PCR Sonuçları	
	ARB	Kültür ve İDT	Grup 1	Grup 2
1	(-)	Isoniazid ve Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK	Yok
2	(+)	Isoniazid ve Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK	Yok
3	(++)	Isoniazid ve Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK	Rifampicine dirençli MTBK

TARTIŞMA

Mikobakteriler fizyolojik ve metabolik özellikleri sebebi ile üretilmesi zor ve zaman alıcı mikroorganizmalardır. Bu özellikleri, diğer bakterilerden farklı olarak kültür bazlı yöntemlerle yapılan tanı ve bağlı olarak identifikasyon, ilaç duyarlılık ve fenotipe dayalı tiplendirilme yöntemlerinin geri dönüşünü geciktirir ve duyarlılığını düşürür. Son yıllarda artan HIV insidansı ile paralel olarak tüberküloz epidemisindeki en önemli sorunlardan biri ÇİD MTBK suşlarının popülasyondaki artış idi. Bu global artışın gelecekteki ilaç dirençliliğinin yoğunluğu konusunda endişe yaratması yanında, özellikle immün sistemi zayıflamış kişilerde çevreden doğrudan bulaş yolu ile veya kolonizasyon sonucu ciddi enfeksiyonlara sebep olabilen TDM suşları da, MTBK'dan ayrımındaki zorluklar sebebi ile yanlış tanı ve tedavilere yol açmaktadırlar. Bu sebeplerle etken mikobakteri ve ilaç direncinin olabildiğince hızlı bir şekilde tanımlanması ve takiben etkili bir anti-TB tedaviye başlanması enfeksiyona bağlı mortalitenin önlenmesinde ve enfeksiyon yayılımının azaltılmasında büyük önem taşımaktadır. CDC tarafından 2009 yılında, moleküler tanı testlerinin tüberküloz şüphesi olan hastalarda en az bir klinik örnekte yayma sonucu beklenmeksizin kullanılması önerilmiş olsa da, bu kararın yerel ihtiyaçlar ve ilgili resmi finansör sağlık kuruluşlarının görüşleri alınarak verilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Bu sebeple, düşük insidanslı gelişmiş ülkelerde moleküler yöntemler mikobakteriyel identifikasyon ve direnç tespitinde rutin kullanılmakta iken, Ülkemiz de dahil yüksek insidansa sahip olan birçok ülkede rutin mikobakteriyel tanı algoritmasında yer alamamaktadır. Kontrol ve engelleme çalışmalarının başarısı için en kritik nokta dirençli suşların toplumdaki hareketlerinin izlenmesi iken, direnç yayılımının engellenmesinde en önemli tehditlerden birisi, çoğu TDM suşunun birinci seçenek anti-TB ilaçlara doğal dirençli olması ve ÇİD/YİD MTBK suşlarının beklenenden daha hızlı yayılmasıdır. (Lange ve ark., 2014; WHO, 2022).

Toplum içerisinde kontrolsüz yayılım gösteren bu mikroorganizmalara karşı yeni ilaç geliştirmenin zorluklarına karşılık anti-TB ilaçların kullanımına bağlı direnç gelişimindeki artış sebebi ile tedavide yaşanan problemler, ilaç dirençliliği altında yatan sebeplerin araştırılması, koruyucu hekimliği yani “Doğrudan Gözetimli Tedavi” (DGT) ile ilaç kullanımının kontrol altına alınması, yeni etkili aşı geliştirilmesi, mevcut kullanılan ilaçların direnç oranlarıyla birlikte ilerde ne gibi dirençler gelişeceğinin izlenmesi ve epidemiyolojik yöntemlerle mikroorganizmanın toplum içerisindeki yayılma hareketlerinin irdelenerek tedbir alınması gibi yeni stratejilerin geliştirilmesine zorlamıştır. Ancak COVID-19 pandemisi TB'yi durdurma ve yok etme programlarının işleyişini ciddi boyutta aksattı. Tedavi başarısı, her ne kadar ÇİD-TB için yeni ilaçlar geliştirilerek tüm oral rejimlerin kullanıldığı ortamlarda yükseltile de, ön-YİD-TB ve YİD-TB hastalarında düşük kalmaktadır. (Drobniowski ve ark., 2007; Lange ve ark., 2014; Saderi ve ark., 2022; Stop TB Partnership and WHO, 2006; WHO, 2022).

Hastaları ilaca duyarlı veya ilaca dirençli olarak sınıflandırmak için küresel olarak en çok tercih edilen temel başlangıç moleküler testler yalnızca rifampisine direncin saptanmasına olanak tanıyan Xpert MTB/RIF ve Xpert MTB/RIF Ultra'dır. Daha kısa ÇİD-TB tedavi rejimleri DSÖ Grup A ilaçlarına dayandığından ve bedaquilin ve linezolid için DSÖ onaylı hızlı testler mevcut olmadığından, izoniazid direnciyle birlikte en azından florokinolonlara karşı direncin hızla tespit edilmesi çok önemlidir. Daha uzun tedavi rejimlerinin kullanılması durumunda, diğer ilaçlara (örn., enjekte edilebilir ilaçlara ve etiyonamide) karşı direncin de hızlı bir şekilde saptanması önemli olabilir. Bu amaçla da başlıca hızlı genotipik testler birinci seçenek (rifampisin ve izoniazid) ve ikinci seçenek (florokinolonlar,

amikasin, kapreomisin ve kanamisin) ilaçlar için DSÖ tarafından onaylanan GenoType MTBDR gibi prob testleri (LPA'lar) ile izoniazid, etiyonamid, florokinolonlar ve aminoglikozidler (amikasin, kapreomisin ve kanamisin) için 2021 yılında geliştirilen ve değerlendirme aşamasında olan Xpert MTB/XDR'dir. Ancak DSÖ'nin yeni YİD-MTBK tanımlaması ile birlikte bu yöntemler de ne yazık ki yetersiz kalmıştır ve geliştirilmeye ihtiyaçları vardır (Alagna ve ark., 2021; WHO, 2022).

Ülkemizde, Tekin ve ark. (2017) Ankara'da 46 ÇİD TB izolatının florokinolon ve aminoglikozid direnç durumlarını Agar Proporsiyon, BACTEC MGIT 960 SL ve GenoType MTBDRsl testleri ile inceledikleri çalışma sonucunda izolatların altısında amikasin, dokuzunda da ofloksasin direnci tespiti etmiş, bunlardan ikisinin YİD TB olduğunu, izolatların tamamının moksifloksasine duyarlı olduğunu ve her üç testin sonuçlarının uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda farklı olarak, ofloksasin ve moksifloksasin kullanmadık, bunun yerine ciprofloksasin direncini agar proporsiyon yöntemiyle iki ÇİD suşumuzda tespit ettik. Real-Time PCR yöntemiyle de aynı suşlar ön-YİD olarak saptandı. Xpert MTB/XDR testinin etkinliğini 2021–2022 yıllarında inceleyen çalışmaları derleyen Pillay ve ark. (2022) bu testin; belirli genlerde sınırlı sayıda direnç varyantını hedeflediği göz önüne alındığında farklı ortamlarda farklı performans gösterebilmekle birlikte, genel olarak izoniazid ve florokinolon direncinin tespiti için doğru sonuçlar sağlayacağı ve optimize edilmiş bir tedavi rejiminin seçilmesine yardımcı olabileceği kanaatine varmışlardır. Katamba ve ark. (2023)'nin Uganda'da yaptıkları güncel bir araştırma da bu çalışmaları desteklemiştir. Araştırmacılar rifampisine ve/veya izoniazide dirençli tüberküloz hastalarından elde edilen kültür izolatları ve balgam örneklerinde Xpert MTB/XDR testini GenoType MTBDRsl testi ile karşılaştırmış ve bu testin izoniazid ve florokinolonlar için duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Helal ve ark. (2019) Mısır'da yapılan bir çalışmada, MTB izolatlarının ilaç direncini Resazurin mikrotitre testi (REMA) ve Anyplex II MTB/MDR/XDR kit kullanarak tespit etmeye çalışmışlar. 32 ilaç dirençli suşta ve 18 duyarlı suşta; Isoniazid (INH), rifampisin (RIF), ofloksasin (OFX), and kanamisin (KAN) ilaçlarına karşı direnç durumunu bu iki yöntem ile test etmişler. Altın standart olarak bizimde çalışmamızda kullandığımız gibi proporsiyon yöntemini kullanmışlar. Anyplex ile ÇİD-TB oranını %75 olarak tespit etmiş buna karşın REMA yöntemi ile bu oranı %85 oranında bulmuşlar. Sonuç olarak; hızlı fenotipik bir yöntem olan REMA yönteminin ilaç dirençli TB tespit etmede Anyplex testine göre daha tavsiye edilebilir şekilde yorumlamışlar. Japonya'da yapılan bir çalışmada Igarashi ve ark. (2017), Mycobacterium tuberculosis kompleks üyelerinin ve izoniazid, rifampisin, florokinolon ve ikinci seçenek enjektale ilaçlara karşı direnç durumunu tespit etmeyi hedef almışlar. Çalışmada 122 klinik izolat Anyplex II kit ile MTB/MDR, aynı zamanda 68 örnek Anyplex II MTB/XDR varlığı açısından test edilmiş. Anyplex II MTB/MDR ve MTB/XDR testlerinin sırasıyla duyarlılık ve özgüllük oranları; izoniazid dirençliliği için %68.8 ve %100, rifampisin %93.8 ve %100, levofloksasin %82.8 ve %100, kanamisin %75.0 ve %100 ve MTB identifikasyonu için %92.6 ve %100 olarak tespit edilmiş. Çoklu ilaca dirençli TB izolatlarının %61.8'i, yaygın ilaç dirençli TB izolatlarının %64.7'si ve ilaç dirençli MTK'lar yarı otomatik bir sistem ile, üç saat içinde doğrulanmış. Çalışmada, Anyplex II kitlerinin MTB ve ilaç direncini tespit etmede kullanılabilirliği sonucuna varılmış. Causse ve ark. (2015), İspanya'da gerçekleştirilen çalışmada; Anyplex II MTB/ÇİD/YİD kit ile Mycobacterium tuberculosis'i ve birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç durumunu incelemiş ve sonuçları GenoType MTBDRplus ve GenoType MTBDRsl testleri ve fenotipik İDT'lerle karşılaştırmışlar. Sonuç olarak; rifampisin için, Anyplex II MTB/ÇİD/YİD testi ile duyarlılık %97, özgüllük %100 tespit edilirken, MTBDRplus ile duyarlılık %100, özgüllük %100. izoniazid direnci ise MTBDRplus ile duyarlılık %62, özgüllük %98 iken, Anyplex yöntemi ile duyarlılık %61, özgüllük %98 tespit edilmiştir. İkinci seçenek ilaçların bu tekniklere göre kıyasladıklarında ise; kinolon direncinde Anyplex tekniğinin duyarlılığı %95, özgüllüğü %99, MTBDRsl yöntemi ile ise duyarlılığı %100, özgüllüğü %99 olarak tespit edilmiştir. Her iki teknikle aminoglikozid direncinin özgüllüğü %100 iken duyarlılık oranları Anyplex için %100, MTBDRsl yöntemi için ise %88 olarak bulunmuştur. Böylece, araştırmacılar izoniazid direnci hariç diğer direnç tespit durumunda Anyplex II MTB/ÇİD/YİD testinin oldukça kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu bağlamda, bölgemizde izole edilen MTBK suşlarının birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun rutin olarak uygulanan fenotipik testlerle ve Ülkemizde rutin tüberküloz tanı algoritmasında yeri olmayan multiplex Real-Time PCR yöntemi ile belirlenmesini, elde edilen fenotipik ve genotipik sonuçların karşılaştırılmasını hedef alan ve birinci grupta fenotipik olarak ÇİD MTBK bulunan 44 kültür örneği, ikinci grupta ise ARB pozitif 50 balgam örneği olmak üzere toplam

94 örneğin değerlendirildiği bu çalışma gerek yöntem gerekse de grup seçimi açısından orijinal bir çalışmadır.

Çalışmamızda, birinci gruptaki ÇİD MTBK bulunan örneklerde pozitiflik oranları ARB için % 59.1, LJ agar besiyeri için % 47.7, BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi için de % 97.7 idi. ARB pozitif işlenmiş balgam örneklerinden oluşturulan ikinci grupta ise pozitiflik oranları LJ için % 32.0, MGIT için de % 94.0 idi. LJ besiyerindeki üreme oranı ikinci grupta çok düşük görüldü de, gerek LJ gerekse MGIT için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca, ARB pozitif ve negatif örnekler arasında da LJ pozitifliği açısından fark bulunmadı. Kültür sonrası MTBK identifikasyonu için yapılan NAP ve MPT64 testleri sonucunda yalnız ikinci gruptaki bir örnekte TDM izole edildi, yine aynı gruptaki bir başka örnekte ne LJ, ne de MGIT ile üreme görülmedi. MTBK yönünden kültür negatif olan bu iki örnek fenotipik olarak İDT'de değerlendirilemezken, genotipik olarak multipleks Real-Time PCR ile araştırıldı.

Ülkemizde Çetin ve ark. (2012)'nin Isparta şehrinde klinik örneklerden 148'inden konvansiyonel yöntemlerle mikobakteri izole ettikleri bir çalışmada, bu izolatların % 92.6'sını (137/148) MGIT 960 sistemi ile, % 68.2'sini LJ besiyeri ile (101/148), % 31.8'ini (47/148) de yayma örneğinde EZN boyama ile ARB aranması yöntemiyle pozitif bulmuşlardır. Sonuç olarak MGIT 960 sisteminin klinik örneklerden mikobakteri izolasyonunda LJ kültürüne göre daha başarılı olduğunu gösteren araştırmacılar, bununla birlikte, az sayıda da olsa LJ'de üreme gösteren ancak MGIT 960 ile tespit edilemeyen örneklerin de bulunması sebebiyle klinik örneklerde mikobakteri aranmasında en iyi sonuçların her iki yöntemin birlikte kullanılması ile alınacağını bildirmişlerdir. Yine Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada, Börekçi ve ark. (2014) MGIT pozitif 60 klinik örnekte 29 (%48.3)'ünün ARB ile, 44 (%73.3)'ünün de LJ kültür yöntemi ile pozitif sonuç verdiğini; moleküler yöntemler olan Oligo- ve PNA-FISH analizleri ile bir örneğin TDM olarak tiplendirildiğini ve bunun fenotipik olarak doğrulandığını, sonuç olarak da, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında MGIT pozitif kültür örneklerinden mikobakteri türlerinin pahalı yöntemlere gereksinim olmaksızın, hızlı ve doğru tanısı için moleküler Oligo- ve PNA-FISH yöntemlerinin kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Her iki çalışmanın bulgularının çalışmamızla uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Birinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun fenotipik incelenmesi için mikobakteriyolojide rutin uygulanan BACTEC MGIT 960 otomatize sisteminde SIRE kiti yardımı ile ikinci gruptaki rifampicine dirençli 6 suşun tamamı isoniazide de dirençli bulundu ve ÇİD olarak tanımlandı. Çalışmamızda ÇİD MTBK suşların ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı direnç durumunun fenotipik olarak incelenmesi için, rutin tanıda daha standardize edilmemiş olan, yine de diğer İDT'lere göre daha güvenilir olduğu Ülkemizde de yapılan çalışmalarda gösterilmiş olan LJ agarda proporsiyon yöntemi tercih edilmiştir (Aslan ve ark., 2006; Satana ve ark., 2010). Bu yöntemle florokinolon grubunu temsilen ciprofloksacin, enjektabl ilaçları temsilen de amikacin için yapılan İDT sonucunda, birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinin (% 4.5) yalnız ciprofloksacine, birinin (% 2.3) de yalnız amikacine dirençli olduğu bulunmuş iken, ikinci gruptaki 6 ÇİD suşun hiçbirinde direnç tespit edilmedi. Böylece, fenotipik olarak YİD (XDR) bulunamazken, üç ÇİD suşumuz ön-YİD (pre-XDR) olarak tanımlandı. Göze çarpan bir diğer bulgu da bu 3 ön-YİD suştan birinin ARB negatif olması ve daha da önemlisi bu örneğin Eylül 2013 tarihinden sonra gelmiş olması idi. Ayrıca, birinci gruptaki 34 ÇİD suşa çalışmanın başladığı Eylül 2013 tarihinden itibaren eklenen 10 ÇİD suştan 4'ünün ARB negatif, 6'sının da ARB pozitif olduğu görüldü. Bu sonuçlar, ARB negatif balgam örneklerinin de genotipik olarak incelenmesinin, dolayısıyla, CDC'nin de önerdiği gibi, hiperendemik bölgelerde ve/veya şüpheli olgularda ARB sonucu beklenmeksizin en az bir klinik örnekte güvenilir bir moleküler yöntemle erken ve doğru tanı konulmasının ÇİD/YİD MTBK yayılımının önlenmesinde ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ülkemizde ilk YİD-TB vakalarını bildiren Ceyhan ve ark. (2014) Türkiye genelinden 2010-2014 yıllarını kapsayan 5 yıl boyunca toplanan klinik örnekleri fenotipik yöntemlerle inceledikleri bir çalışma sonucunda, 297 ÇİD MTBK suşundan 37'sinde (% 12.5) ön-YİD, 8'inde (%2.7) ise YİD tespit etmişlerdir.

Suşların direnç durumunun genetik yönden incelenmesi için yeni bir multipleks Real-Time PCR kiti yardımı ile örneklerde hem MTBK varlığı, hem de ÇİD için isoniazid ve rifampicin, YİD için de florokinolonlar ve enjektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan muhtemel nokta mutasyonlarının varlığının araştırıldığı çalışmamızda, birinci grubu oluşturan 44 kültür örneğinden Mickle yöntemiyle elde edilen DNA ekstraktlarının tamamında MTBK bulunmuşken, ikinci gruptaki 50 ARB pozitif işlenmiş balgam örneğinden kitteki hazır ekstraksiyon protokolüne göre elde edilen DNA

ekstraktlarından 48'inde (% 96.0) MTBK varlığı tespit edildi. Aynı kit ile ÇİD olarak tanımladığımız örnek sayısı birinci grupta 35 (% 79.5), ikinci grupta da 5 (% 10) iken, birinci gruptaki ÇİD suşlardan ikisinde (% 4.5) florokinolonlara, birinde (% 2.3) de enjektabl ilaçlara karşı dirençten sorumlu tutulan nokta mutasyonu bulunmuş, ikinci gruptaki balgam örneklerinin ise hiçbirinde ikinci seçenek anti-TB ilaç direnci tespit edilemedi. Multipleks Real-Time PCR yöntemi ile YİD açısından değerlendirmenin ise fenotipik yöntemin sonucu ile tamamen uyumlu olduğu görüldü. Gikalo ve ark. (2012), 70 ÇİD MTBK suşunda single-strand conformation polymorphism (SSCP) ve DNA dizi analizi ile eis promoter ve rrs gen bölgelerindeki nokta mutasyonlarını taradıkları bir çalışmada, genotipik ve fenotipik inceleme bulgularını karşılaştırarak, enjektabl ilaç direncinin moleküler yöntemlerle hızlı tespitinde bu gen bölgelerinin uygun ve güvenilebilir olduğunu bildirmişlerdir. Bizim genotipik incelemede kullandığımız kit de bu 2 gen bölgesindeki muhtemel mutasyonları tespit etmeye yönelik olsa da, Georghiou ve ark. (2012) bunların dışında tlyA ve gidB gen bölgelerindeki muhtemel mutasyonların da enjektabl ilaç direncinden sorumlu olabileceğinden bahsetmişlerdir.

Kültür ortamında izolasyon altın standart kabul edildiğinden, seçtiğimiz moleküler yöntemin duyarlılığı bu grup için % 100 iken, her iki yöntemle de negatif sonuç çıkmadığı için özgüllüğü hesaplanamadı. DNA ekstraksiyonu için doğrudan işlenmiş balgam örneklerinin kullanıldığı ikinci grupta ise, fenotipik identifikasyon sonucunda TDM tanısı alan tek örnekte moleküler olarak da MTBK varlığı gösterilemezken, kültür negatif olan yine tek örnek Real-Time PCR ile duyarlı MTBK tanısı aldı, kültür pozitif ve tamamen duyarlı örneklerden birinde moleküler olarak MTBK varlığı tespit edilemedi. Böylece, ikinci grup için Real-Time PCR'in duyarlılığı % 97,9, özgüllüğü de % 50 olarak hesaplandı. Fenotipik olarak TDM izole edilen, moleküler olarak da gerek MTBK gerekse aradığımız dirençten sorumlu bir mutasyon tespit edilemeyen bu balgam örneğinde Restiriksion Enzim Analiz (REA) yöntemi ile tür düzeyinde genotipik identifikasyon için hsp65 gen bölgesi spesifik TB11 ve TB12 primerleri yardımı ile amflifiye edilerek, BstEII ve HaeIII enzimleriyle kesildi ve M. abscessus grup olarak tanımlandı (yayımlanmamış veri).

Her iki grupta genotipik olarak dirençli bulunan örneklerin tamamı fenotipik olarak da dirençli bulundular. Birinci gruptaki 44 ÇİD MTBK suştan 4'ünde rifampicin, 7'sinde de isoniazid direncinden sorumlu nokta mutasyonu tespit edilemedi. Buna karşılık, ikinci grupta fenotipik olarak ÇİD MTBK tanısı alan 6 örneğin tamamı Real-Time PCR ile rifampicine, 5'i de isoniazide dirençli bulundu. Diğer taraftan isoniazid direnci ikinci grupta fenotipik olarak 11 örnekte bulunmuşken, moleküler olarak 8 örnekte tespit edildi. Böylece, İDT altın standart olarak kabul edildiğinden, multipleks Real-Time PCR yönteminin isoniazid direnci açısından duyarlılığının ikinci grupta % 72.7, kültür pozitif toplam 92 örnek için ise % 81.8, özgüllüğünün de hem ikinci grup, hem de toplamda % 100 olduğu görüldü. Birinci grupta ne isoniazid, ne de rifampicine duyarlı bir suş olmadığından her iki ilaç açısından özgüllük oranı hesaplanamadı. Kullandığımız moleküler yöntemin rifampicin direnci açısından ikinci gruptaki duyarlılık ve özgüllüğün % 100, toplamda ise duyarlılığının % 83.6, özgüllüğünün de % 100 olduğu görüldü. Ayrıca, ikinci grup örneklerinin toplanmaya başlandığı Eylül 2013 tarihinden itibaren gelen ve fenotipik olarak ÇİD MTBK tespit edilen 6 ARB pozitif örneğin birinci grupta kültür ekstraktlarının, ikinci grupta ise balgam ekstraktlarının değerlendirildiği multipleks Real-Time PCR yöntemi sonuçlarının her iki grupta da tamamen uyumlu çıktığı görüldü. Çalışmada kullandığımız kit ile toplam 10 örnekte isoniazid direncinin tespit edilememesi, daha belirlenmemiş olan mutasyonlar, mabA ve ahpC gibi bilinen farklı gen bölgelerindeki nokta mutasyonları, veya genotipik olarak açıklanamayan direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilebilir. Eski kültür örneklerinde gerek isoniazid, gerekse rifampicin direncinden sorumlu tutulan mutasyonların balgam örneklerine nazaran daha çok gözden kaçırılmasına sebep olarak, eski örneklerin pasajlanmaları sırasında popülasyondaki bazı türlerin, özellikle de dirençli suşların canlandırılmamış olma veya çapraz kontaminasyon ihtimalleri düşünülebilir. CDC tarafından da önerildiği gibi, ÇİD MTBK şüpheli olgularda özellikle rifampicin ve isoniazid direncinin moleküler yöntemlerle tespiti için ilk örneklerin (balgam, BAL ve b.) incelenmesi, erken tanının bilinen yararları ile beraber, bahsedilen muhtemel dezavantajların ortadan kalkmasına da yardımcı olabilir (Drobniewski ve ark., 2007; Folkvardsen ve ark., 2013; Lange ve ark., 2014; Lorenzo ve Mousa, 2011; Migliori ve ark., 2012; Rodrigues ve ark., 2013).

Bunlara ek olarak, birinci gruptaki örneklerden 3'ünün aynı hastaya ait olduğu ve Haziran 2012, Ekim 2012 ve Şubat 2014 olmak üzere farklı tarihlerde alındığı belirlendi. Bunlardan ilkinin ARB(-), ikincisinin ARB(+), üçüncüsünün ise ARB(++) olduğu, ancak kültür ve fenotipik İDT sonucunda her üçünün de isoniazid ve rifampicine dirençli MTBK olarak tespit edilmesine rağmen, kültür ekstraktları

ile yapılan Multipleks Real-Time PCR sonucunda üçünde de rifampicine dirençli MTBK tespit edildiği, isoniazid direncinden sorumlu mutasyon ise tespit edilemediği görüldü. Hastanın üçüncü örneği, Eylül 2013 tarihinden sonra geldiği ve ARB pozitif olduğu için aynı zamanda ikinci grupta da balgam ekstraktı değerlendirildi ve genotipik inceleme sonucunun birinci gruptaki ile aynı olduğu belirlendi. Bu bulgular da yine yukarıda bahsedildiği gibi, ARB sonucu beklenmeksizin doğrudan klinik örneğin genotipik yöntemlerle incelenmesinin ne kadar doğru olacağını desteklemektedir.

Birinci gruptaki eski 34 ÇİD MTBK kültür örneğinden birinde fenotipik identifikasyon sonucu MTBK-TDM koinfeksiyonu tespit edilmesi üzerine yeniden pasajlanarak MTBK izole edildi ve çalışmada bu suş kullanıldı. Dolayısıyla, bu suşun fenotipik İDT incelemesi yeniden yapıldı ve pasajı öncesindeki gibi yine streptomycin, isoniazid ve rifampicine dirençli bulundu. Eski örneğin kontamine olma ihtimali de göz önünde bulundurularak, farklı ilaç dirençlerine sahip birden fazla MTBK suşu barındırabileceği ve pasajlama sırasında bu durumun değişebileceği düşünüldü. Bu sebeple, özellikle de YİD ihtimalini gözden kaçırmamak için, agar proporsiyon yöntemi ile ciprofloxacın ve amikacin duyarlılığı gerek eski örnekte gerekse izole edilen ÇİD MTBK suşunda araştırıldı ve örneklerin ikisinde de ikinci seçenek ilaç direnci tespit edilemedi. Kullandığımız multipleks Real-Time PCR kiti örnekte MTBK varlığını ve MTBK suşlarında ÇİD ve YİD'den sorumlu tutulan nokta mutasyonlarını tespit etmeye yönelik olduğundan, buna karşılık TDM ve mutasyonlarını tespit edemediğinden ötürü, her iki örnek de genotipik olarak incelendi ve ikisinde de ÇİD MTBK tespit edildi, ikinci seçenek ilaç direncinden sorumlu mutasyon ise bulunamadı (yayımlanmamış veri). Böylece, fenotipik ve genotipik inceleme sonuçlarının uyumlu olduğu görüldü.

Cox ve ark. (2007) tedavi sırasında ortaya çıkan direnç durumunu inceledikleri bir çalışmada, TB teşhisi alan 382 hastadan 62'sinin tedaviye iyi yanıt vermediği ve tekrar test edildiği zaman MTBK pozitif bulunduğunu, tedavi öncesinde ÇİD-TB olmayan hastalardan % 3.5'inde (11/314) tedavi sırasında ÇİD-TB geliştiğini, iyileşmeyen 62 hastadan 19'unda da yeni yada ek ilaç direnci geliştiğini bildirmişlerdir. Farmer ve Kim (1998) ise, kar-zarar analizi yaptıkları bir çalışma sonucunda, tek bir ÇİD-TB vakasının önlenmesinin bile Amerika Birleşik Devletleri (ABD) sağlık sistemini 250000 dolarlık maliyetten kurtardığını öngörmüşlerdir. Bütün bunların yanında tanıdaki gecikmeye bağlı geç ve/veya yanlış TB tedavisi uygulamalarının yol açtığı direnç gelişimi, özellikle de YİD MTBK insidansındaki artış da dikkate alındığında, çalışmamızda kullandığımız, MTBK tanısı ve birinci/ikinci seçenek ilaç direnci tespitini tek bir kit ile, DNA ekstraksiyonu da dahil, 4-5 saatte sonuçlandıran multipleks Real-Time PCR yöntemi gibi hızlı, güvenilir, kolay uygulanabilen moleküler yöntemlerin Ülkemizde rutin TB tanı ve direnç tayini algoritmasında yer almasının ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, toplum sağlığı çıkarları ile birlikte değerlendirildiği zaman, bu yöntemlerin beraberinde getireceği ek maliyetin çok önemsiz kalacağı düşünülmektedir.

SONUÇ

MTBK suşlarının bilinen direnç mutasyonlarını tespiti yönelik dizayn edilmiş, hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan, WHO ve CDC tarafından da rutin tanı algoritması içerisinde olması teklif edilen Multiplex Real-Time PCR testi ile, doğrudan işlenmiş balgam örneğinde ÇİD, ön-YİD ve YİD MTBK tespitinin Ülkemiz için de rasyonel çözüm olabileceği görüldü. Mevcut rutin fenotipik incelemeler ile, identifikasyon ve İDT için geçecek süreleri de eklersek, ancak aylar sonra tanısı mümkün olabilen, böylece geç veya yanlış tedavi uygulamalarına yol açabilen, bütün dünyada ölüm oranlarında ciddi artıştan da sorumlu tutulan bu ÇİD/YİD MTBK infeksiyonlarının gözetimi ve yönetiminde giderek artan güç kaybı düşünüldüğünde, birkaç saatte sonuçlanan bu erken ve doğru moleküler tanının beraberinde getireceği ek maliyetin önemsiz kalacağı kanaatindeyiz. Ayrıca, sadece ARB pozitif balgam örneklerinin incelenmesi, çalışmamız sonuçlarında da görüldüğü üzere, ARB negatif ÇİD MTBK suşlarının gözden kaçması ile sonuçlanacağından, gerek bütün klinik örnekleri inceleyebilmek gerekse maliyeti daha da düşürebilmek amacı ile, yine moleküler bir yöntemle MTBK-TDM identifikasyonu yapıldıktan sonra, MTBK tespit edilen örneklerde bu Real-Time PCR kiti ile direnç tespiti uygun olacaktır.

Çıkar Çatışması

Araştırma ile ilgili yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkıları

Çalışma Çerçevesi, Desen: TN, EE; **Materyal, Metot ve Veri Toplama:** EE, TN; **Analiz Yapma ve Yorumlama:** TN, EE; **Yazma ve Revizyon:** TN, EE.

Finans Desteği

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TF2013YL8 numaralı proje ile desteklenmiş olup Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Alagna, R., Cabibbe, A. M., Miotto, P., Saluzzo, F., Köser, C. U., Niemann, S.,...Cirillo, D. M. (2021). Is the new WHO definition of extensively drug-resistant tuberculosis easy to apply in practice? *Eur Respir J*, 58, 2100959. <https://doi.org/10.1183/13993003.00959-2021>
- Alp, A., Sarıbaş, Z. (2019). Klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* saptanmasında Anyplex Mtb/Ntm testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 53(4), 355-363.
- Aslan, G., Direkel, Ş., Otağ, F., Akdenizli, E., Emekdaş, G. (2006). Mersin Bölgesinde İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Amikasin ve Siprofloksasin Duyarlılığı. *ANKEM Derg*, 20(3), 164-168
- Börekçi, G., Aslan, G., Aydın, E., Fiandaca, M. J., Stender, H., Lee N.M.,...Emekdaş G. (2014). BACTEC MGITTM Pozitif Kültürlerden *Mycobacterium* Türlerinin Oligo-FISH ve PNA-FISH Yöntemleriyle Tanımlanması. *Mikrobiyol Bul*, 48(3), 385-401.
- Causse, M., Ruiz, P., Gutierrez, J. B., Vaquero, M., Casal M. (2015). New Anyplex™ II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in *M. tuberculosis* cultures. *Int J Tuberc Lung Dis*, 19(12), 1542-1546. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0235>
- Ceyhan, I., Simsek, H., Arslanturk, A., Albayrak, N., Sezen, F., Tarhan, G. (2014). Extensively Drug-resistant Tuberculosis Strains in National Tuberculosis Reference Laboratory Between 2005 and 2010, Turkey. *Clin Microbiol*, 3(1). DOI: 10.4172/2327-5073.1000136.
- Cox, H. S., Niemann, S., Ismailov, G., Doshetov, D., Orozco, J. D., Blok, L.,...Kebede, Y. (2007). Risk of acquired drug resistance during short-course directly observed treatment of tuberculosis in an area with high levels of drug resistance. *Clin Infect Dis*, 44(11), 1421-1427.
- Çetin, E. S., Aynali, A., Öztürk, T., Özseven, A. G., Kaya, S. (2012). Mikobakterilerin klinik örneklerden izolasyonunda Löwenstein-Jensen besiyeri kültürü ve Bactec *Mycobacterium* Growth Indicator Tube 960 sisteminin değerlendirilmesi. *S.D.Ü. Tıp Fak Derg*, 19(1), 12-16.
- Drobniewski, F., Rüsche-Gerdes, S., Hoffner, S. (2007). 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). *Clin Microbiol Infect*, 13(12), 1144-1156.
- Folkvardsen, D. B., Svensson, E., Thomsen, V., Rasmussen, E. M., Bang, D., Werngren, J.,...Rigouts, L. (2013). Can Molecular Methods Detect 1% Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*? *J Clin Microbiol*, 51(5), 1596-1599.
- Farmer, P. and Kim, J. Y. (1998). Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: Introducing DOTS-plus. *Brit Med J*, 1998; 317(7159), 671-674.
- Georghiou, S. B., Magana, M., Garfein, R. S., Catanzaro, D. G., Catanzaro, A., Rodwell, T. C. (2012). Evaluation of Genetic Mutations Associated with *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Amikacin, Kanamycin and Capreomycin: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 7(3), e33275. DOI: 10.1371/journal.pone.0033275
- Gikalo, M. B., Nosova, E. Y., Krylova, L.Y., Moroz, A. M. (2012). The role of eis mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. *J Antimicrob Chemother*, 67, 2107-2109.
- H. Helal, Z., G. El Menofy, N., Abdul-Khalek Ibrahim, Z., Seif El-din Ashour, M., K. Abdulal, A. (2019). Comparative Evaluation of Anyplex II MTB/MDR/XDR and Resazurin Microtiter Assay For Detection of Drug Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 8(5), 1150-1155. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.5.1150-1155>
- Igarashi, Y., Chikamatsu, K., Aono, A., Yi, L., Yamada, H., Takaki, A., Mitarai, S. (2017). Laboratory evaluation of the Anyplex™ II MTB/MDR and MTB/XDR tests based on multiplex real-time PCR and melting-temperature analysis to identify *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(4), 276-281. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.016>
- Katamba, A., Ssengooba, W., Sserubiri, J., Semugenze, D., Kasule, G. W., Nyombi, A.,...Joloba, M. L. (2023). Evaluation of Xpert MTB/XDR test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first and second-line drugs in Uganda. *PLoS ONE*, 18(8), e0284545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284545>

- Lange, C., Abubakar, I., Alffenaar, J. W. C., Bothamley, G., Caminero, J. A., Carvalho, A. C. C.,...Cirillo, D. M. (2014). Management of patients with multidrugresistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*, 44(1), 23–63
- Laurenzo, D., Mousa, S. A. (2011). Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Tropica*, 119, 5–10.
- Migliori, G. B., Zellweger, J. P., Abubakar, I., Ibraim, E., Caminero, J. A., De Vries, G.,...Manissero, D. (2012). European Union standards for tuberculosis care. *Eur Respir J*, 39(4), 807–819.
- Pillay, S., Steingart, K. R., Davies, G. R., Chaplin, M., De Vos, M., Schumacher, S. G.,...Theron, G. (2022). Xpert MTB/XDR for detection of pulmonary tuberculosis and resistance to isoniazid, fluoroquinolones, ethionamide, and amikacin. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD014841.pub2>
- Rodrigues, L., Villellas, C., Bailo, R., Viveiros, M., Ainsa, J. A. (2013). Role of the Mmr Efflux Pump in Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(2), 751-757.
- Satana, D., Coban, A. Y., Uzun, M. (2010) Testing Susceptibility of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis to Second-Line Drugs by Use of Blood Agar. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48(11), 4291–4293.
- Stop TB Partnership and World Health Organization. (2006). The Global Plan to Stop TB 2006–2015. Geneva, World Health Organization.
- Tekin, K., Albay, A., Simsek, H., Sig, A. K., Guney, M. (2017). Evaluation of the BACTEC MGIT 960 SL DST Kit and the GenoType MTBDRsl Test for Detecting Extensively Drugresistant Tuberculosis Cases, *Eurasian J Med*, 49, 183-187.
- World Health Organization (2022). Global tuberculosis report 2022. Geneva, Switzerland, World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 20 Temmuz 2023 tarihinde <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729> adresinden erişildi.