

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİ KLİNİK İZOLATLARINDA İZONIAZİD VE RIFAMPİSİN DİRENCİNİN HIZLI TANISI İÇİN 'REVERSE BLOT HYBRIDIZATION ASSAY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE' YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF 'REVERSE BLOT HYBRIDIZATION ASSAY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE' METHOD FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF ISONIAZID AND RIFAMPICIN RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CLINICAL ISOLATES

Tuba ÖZTÜRK¹, Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN², Emel SESLİ ÇETİN²

¹ Isparta Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü

² Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Cite this article as: Öztürk T, Cicioğlu Arıdoğan B, Sesli Çetin E. Investigation of The Effectiveness of 'Reverse Blot Hybridization Assay Mycobacterium Tuberculosis Drug Resistance' Method For The Rapid Diagnosis Of Isoniazid And Rifampicin Resistance In Mycobacterium Tuberculosis Complex Clinical Isolates. Med J SDU 2019; 26(4): 444-451.

Öz

Amaç

İsoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarının hızlı tespiti, erken ve uygun tedavinin planlanmasında en önemli basamaktır. 'Reverse blot hybridization assay Mycobacterium tuberculosis drug resistance' (REBA MTB-MDR), klinik izolatlarda *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* gen mutasyonlarının hızlı tespiti için tasarlanan ve ticari olarak temin edilen reverse blot hibridizasyon esaslı bir DNA şerit testidir. Bu çalışmanın amacı *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında INH ve RIF direnci ile ilişkili mutasyon tiplerinin REBA MTB-MDR testi ile belirlenmesi ve testin tanısal performansının BACTEC MGIT 960 ile karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, 2008-2013 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 55 *M. tu-*

berculosis kompleks suşu ile yapıldı. Suşların primer anti tüberküloz ilaç duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 sistemiyle belirlendikten sonra INH ve RIF direnci gen mutasyonları REBA MTB-MDR testi ile araştırıldı.

Bulgular

Çalışılan 55 izolatın MGIT 960 sistemiyle 41'i (%74.5) primer anti tüberküloz ilaçlara duyarlı, 14'ü (%25.5) dirençli bulundu. REBA MTB-MDR, MGIT 960 ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde RIF direncini saptamada duyarlılık %25 (CI 4.55-69.94), özgüllük %100 (CI 92.13-100) olarak, INH direncini saptamada ise duyarlılık %22.2 (CI 6.32-54.74), özgüllük %97.5 (CI 87.12-99.56) olarak belirlendi.

Sonuç

REBA MTB-MDR testinin, dirençli *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında en yaygın görülen mutasyonların hızlı tespitinde ve uygun tedaviye başlamada hız kazandırması açısından faydalı olduğu görülmüştür. Ancak bu testin sık görülmeyen mutas-

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: dr.tubaozturk1@gmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 03.03.2019 • Kabul tarihi/Accepted Date: 06.05.2019

Available online at <http://dergipark.gov.tr/sdutfd>

Makaleye <http://dergipark.gov.tr/sdutfd> web sayfasından ulaşılabilir.

yonları belirlemedeki kısıtlılığı ve ilaç direncine neden olabilecek başka mekanizmaların varlığı nedeni ile rutin klinik laboratuvar uygulamalarında tek başına değil, geleneksel duyarlılık testleri ile birlikte kullanımının daha doğru olacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, ilaç direnci, *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*.

Abstract

Objective

Rapid diagnosis of isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates is the most important step in planning of early and appropriate treatment. 'Reverse blot hybridization assay *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance' (REBA MTB-MDR) is a commercially available reverse blot hybridization-based DNA strip test designed for the rapid detection of *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* gene mutations in clinical isolates. The aim of this study was to determine the mutation types associated with INH and RIF resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis* complex by REBA MTB-MDR test and compare the diagnostic performance of the test with BACTEC MGIT 960.

Materials and Methods

The study was performed with 55 *M. tuberculosis* complex strains isolated from various clinical samples in the microbiology laboratory of Suleyman Demirel University Medical Faculty between 2008-2013. The

primary anti-tuberculosis drug susceptibilities of the strains were determined by the BACTEC MGIT 960 system and then INH and RIF resistance gene mutations were investigated by REBA MTB-MDR test.

Results

Of the 55 isolates tested with MGIT 960 system, 41 (74.5%) were determined as susceptible to primary anti-tuberculosis drugs and 14 (25.5%) were determined as resistant to primary anti-tuberculosis drugs. When the REBA MTB-MDR was compared with the MGIT 960, the sensitivity to detect RIF resistance was 25% (CI 4.55-69.94), specificity was 100% (CI 92.13-100), sensitivity to detect INH resistance was 22.2% (CI 6.32-54.74), while specificity was 97.5% (CI 87.12-99.56) for REBA MTB-MDR.

Conclusions

REBA MTB-MDR test was found to be useful in terms of rapid detection of the most common mutations in the resistant *M. tuberculosis* complex clinical isolates and accelerating the initiation of appropriate treatment. However, due to the limitations of this test in identifying uncommon mutations and the presence of other mechanisms that may cause drug resistance, it was concluded that it would be more appropriate to use this test with conventional susceptibility tests in routine clinical laboratory practice.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, drug resistance, *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*.

Giriş

Tüberküloz (TB), modern tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir (1). *M. tuberculosis* basilinin saptanmasının ve kültürde üretilmesinin ardından öncelikle tedavide ilk seçenek olan primer ilaçlara karşı duyarlılık testi yapılmalıdır (2). INH ve RIF en az yan etkiye sahip, en etkili anti tüberküloz ilaçlardır. INH ve RIF' e birlikte direncin olması çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olarak tanımlanır. ÇİD-TB'nin tedavisi oldukça zordur. Bu nedenle tedavinin doğru yönlendirilmesi ve yönetimi, dirençli suşlarla bulaşma zincirinin kırılması ve direnç yayılımının önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir (3). Ancak, geleneksel yöntemlerle yapılan ilaç duyarlılık testlerinin sonuçlanması için 4-8 haftalık zamana gereksinim vardır. Kullanılan geleneksel yöntemlerden birisi sıvı bazlı ilaç duyarlılık sistemi BACTEC MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*) 960'dır (4). Uzun dönemde yapılan karşılaştırmalı çalışmalar-

da MGIT sistemi ile alınan sonuçlar referans yöntemlerle alınan sonuçlar ile uyumlu bulunmuş, bu sistem Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından fenotipik anti tüberküloz ilaç duyarlılık testleri için önerilen testler arasında bildirilmiştir (5-7). Dünya Sağlık Örgütü, özellikle ilaç direnci olma ihtimali yüksek olan olgularda moleküler hızlı ilaç duyarlılık testlerini önermektedir (5). Bu sebeple son yıllarda mikobakterilerin tür tanımlaması ve ilaç duyarlılıklarının hızlı tespiti için birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir. Moleküler teknikler 1-2 gün içinde *M. tuberculosis* kompleks suşlarının tanısını ve ilaç direncinin tahmin edilmesini sağlamaktadır (5,8).

Kullanım kolaylığı nedeniyle en çok tercih edilen moleküler yöntemlerden katı faz hibridizasyon yöntemi olan DNA şerit testlerinden birisi REBA MTB-MDR (YD Diagnostics, Korea) ticari kitidir. Bu test, *rpoB*, *katG*, *inhA* promotor bölgesine ek *ahpC* intergenik bölge analizine imkan vermekte, *rpoB* geninin 81 bp'lik "hot spot" bölgesindeki 531, 533, 516 üç farklı mutasyonu ve *katG* gen bölgesindeki en sık rastlanan

kodon 315'deki bir mutasyonu, inhA promotor bölge-
sindeki iki mutasyonu tespit edebilmektedir. Diğer şerit testlerinden farklı olarak bu test, 526. kodondaki iki mutasyon yerine 533. kodondaki mutasyon probunu içermektedir. Çünkü 526. kodon oldukça polimorfizm göstermektedir ve 533. kodondaki mutasyon genellikle fenotipik duyarlılık testleri ile kaçırılan klinik olarak önemli düşük düzey RIF direnci ile ilişkilidir (9,10).

Bu çalışmada, laboratuvarımızda BACTEC MGIT 960 sistemi ile ilaç duyarlılık testi yapılan *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında hızlı moleküler tanı yöntemlerinden olan REBA MTB-MDR testi ile INH ve RIF direnci ile ilişkili mutasyon tiplerinin belirlenmesi ve REBA MTB-MDR yönteminin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, 2008-2013 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarında TB ön tanılı hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 55 *M. tuberculosis* kompleks suşu ile yapıldı.

Kültür: Steril olmayan klinik örnekler N-Asetil-L-Sistein-Sodyum hidroksit yöntemi ile homojenizasyon-dekontaminasyon işlemi uygulandı. Dekontamine edilen örneklerin Löwenstein-Jensen (LJ) katı besiyerine (Becton Dickinson, USA) ve MGIT 960 sıvı besiyerine (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, NV, ABD) üreticilerin önerileri doğrultusunda ekimleri yapıldı. Üremesi durumunda ise *M. tuberculosis* kompleks tanımlanması için MPT 64 antijenini saptayan immüno-kromatografik yöntem TBc ID testi (BD MGIT TBc Identification Test) kullanıldı. Suşların streptomisin (SM), INH, RIF, etambutol (ETB) için duyarlılık testleri MGIT 960 sistemi ile yapılarak değerlendirildi.

İlaç Direncinin Moleküler Yöntemle Saptanması: Klinik örneklerden kültür ile izole edilen *M. tuberculosis* kompleksi suşlarında REBA MTB-MDR testi ile INH ve RIF direnci araştırıldı. REBA MTB-MDR testi üreticinin tanımladığı şekilde çalışıldı. Testin aşamaları; kültür ortamında elde edilen ve direnç geni araştırılacak her izolat için PCR ile çoğaltma işlemi gerçekleştirildi. Takiben dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri nitrosellülöz şeritler üzerinde bulunan dirençten sorumlu gen bölgesine ait vahşi ve mutant dizileri içeren proplar ile hibridizasyona bırakıldı (Tablo 1). Hibridizasyon sonrası mutant dizilere bağlanma durumu (bant oluşumu) direnç varlığı olarak yorumlandı (11). Çalışılan testlerin kalite kontrolü *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) standart suşu yapıldı.

REBA MTB-MDR yönteminin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) parametreleri hesaplandı. OpenEpi programı kullanılarak analiz sonuçlarına ilişkin % 95 güven aralığında (% 95 CI: Confidence Interval) alt ve üst sınır değerler hesaplanmıştır (12).

Bulgular

55 klinik izolatın MGIT 960 yöntemi ile ilaç direnç dağılımını değerlendirdiğimizde 7 suşta tek ilaca karşı, 4 suşta iki ilaca, 3 suşta ise üç ilaca direnç tespit edilmiştir. (Tablo 2)

Suşların 41'i (%74.5) primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı bulunmuştur. Her bir ilacın toplam direnç oranları; SM için %10.9 (6 suş), INH için %18.2 (10 suş), RIF için %7.3 (4 suş), ETB için %7.3 (4 suş) olarak tespit edilmiştir. ÇİD-TB oranı %5.5 (3/55) olarak belirlenmiştir.

REBA MTB-MDR yöntemi ile 6 suşta (MGIT 960 yöntemi bu suşların 1'i sadece INH dirençli, 5'i INH ve RIF duyarlı bulunmuştur) bazı propların renklerinde belirsiz solmalar saptanmış ve bu suşlar REBA MTB-MDR yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılmamıştır. MGIT 960 ile RIF dirençli bulunan 4 izolatın sadece birinde REBA MTB-MDR yöntemi ile rpoB bölgesinde WT3'de negatif hibridizasyon sinyali alınmış, ancak mutasyon tespit edilmemiştir. INH dirençli 9 izolatın birisinde katG mutasyonu birinde de inhA WT1 probunda negatif hibridizasyon sinyali alınmıştır. INH duyarlı bir suşta ise inhA WT1 probunda negatif hibridizasyon sinyali alınmıştır. 49 suşta INH ve RIF direncini saptamada kullandığımız iki yöntemi birbiriyle karşılaştırdığımızda MGIT 960 yöntemi ile RIF direnci tespit edilen 4 örneğin 3'ünde REBA MTB-MDR ile direnç saptanmazken bir suşta ise her iki yöntemle de direnç saptanmıştır. MGIT 960 ile INH direnci tespit edilen 9 suşun 7'sinde REBA MTB-MDR ile direnç saptanmazken 2 suşta her iki yöntemle de direnç saptanmıştır (Tablo 3).

MGIT ile karşılaştırıldığında RIF direncini saptamada REBA MTB-MDR testi için duyarlılık %25 (CI 4.55-69.94), özgüllük %100 (CI 92.13-100), PPD %100 (CI 20.65-100), NPD 93.75 (CI % 83.16-97.85) olarak belirlendi. INH direncini saptamada REBA MTB-MDR için duyarlılık %22.2 (CI 6.32-54.74), özgüllük %97.5 (CI 87.12-99.56), PPD %66.67 (CI 20.77-93.85), NPD 84.78 (CI % 71.78-92.43) olarak belirlendi. Çalışmamızdaki kalite kontrol suşunun, negatif kontrolün ve 5 örneğin REBA MTB-MDR test şeritleri Resim 1, 2'de gösterilmiştir. Tablo 4'de fenotipik ve genotipik test sonuçları karşılaştırılmaktadır.

Tablo 1 Reverse blot hibridizasyon testinde kullanılan proplar (7)

Prob	Sekans (5'-3')	WT ve MT Yerleşimi
Myc	GACGTCGTCGCCACCATCGA	Mikobakteriyel prob
MTB	AAACATGTCGGCGAGCCC	<i>M. tuberculosis</i> prob
<i>rpoB</i> WT1	AGCCAGCTGAGCCAATTC	<i>rpoB</i> kodonları 509-514 WT
<i>rpoB</i> WT2	ATGGACCAGAACAACCCG	<i>rpoB</i> kodonları 515-520 WT
<i>rpoB</i> WT3	CCGCTGTGGGGTTGACC	<i>rpoB</i> kodonları 521-525 WT
<i>rpoB</i> WT4	TTGACCCACAAGCGCCGA	<i>rpoB</i> kodonları 524-529 WT
<i>rpoB</i> WT5	CTGTCGGCGCTGGGGC	<i>rpoB</i> kodonları 530-534 WT
<i>rpoB</i> MT1	CTGTTGGCGCTGGGGC	<i>rpoB</i> kodon 531 (TCG-TTG)
<i>rpoB</i> MT2	AAATGTCGGCGCCGGGGCC	<i>rpoB</i> kodon 533 (CTG-CCG)
<i>rpoB</i> MT3	TTCATGTACCAGAACAACCCG	<i>rpoB</i> kodon 516 (GAC-TAC)
<i>katG</i> 315 WT	CACCAGCGGCATCGAG	<i>katG</i> kodon 315 AGC WT
<i>katG</i> 315 MT	ATCACCACCGGCATCGAG	<i>katG</i> kodon 315 (AGC-ACC)
<i>inhA</i> 15UPS WT	CGCGGCGAGACGATAGG	<i>inhA</i> UPS -15 WT
<i>inhA</i> 15UPS MT	CGCGGCGAGATGATAGG	<i>inhA</i> UPS -15 (CAT)
<i>inhA</i> 8UPS WT	AAAGATAGGTTGTCTGGGGTGACT	<i>inhA</i> UPS -8 WT
<i>inhA</i> 8UPS MT	GACGATAGGCTGTCTGGGG	<i>inhA</i> UPS -8 (T-C)
<i>ahpC</i> WT1	GCCGATAAATATGGTGTGATATCA	<i>ahpC</i> -60, -38 WT
<i>ahpC</i> WT2	CCTTTGCCTGACAGCGACTT	<i>ahpC</i> -38, -18 WT
<i>ahpC</i> WT3	CACGGCACGATGGAATGTC	<i>ahpC</i> -17, +2 WT
<i>ahpC</i> WT4	GCAACCAAATGCATTGTCCGC	<i>ahpC</i> +3, +23 WT
<i>ahpC</i> WT5	TTTGATGATGAGGAGATCATGC	<i>ahpC</i> +24, +44 WT

*UPS: Upstream promotor sekans; MT: Mutasyon; WT: Vahşi (Wild) tip

Tablo 2 İzole edilen 55 suşun MGIT 960 yöntemi ile primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları

	İlaçlar	Sayı	Yüzde(%)
Tek ilaca direnç	SM	1	1.8
	INH	3	5.5
	RIF	1	1.8
	ETB	2	3.6
	Toplam tek ilaca direnç	7	12.7
İki ilaca direnç	INH+RIF	1	1.8
	INH+ETB	1	1.8
	INH+SM	2	3.6
	Toplam iki ilaca direnç	4	7.3
Üç ilaca direnç	SM+INH+ETB	1	1.8
	SM+INH+RIF	2	3.6
	Toplam üç ilaca direnç	3	5.5
Toplam dirençli suş		14	25.5

SM: Streptomisin, INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin, ETB: Etambutol.

Tablo 3 Direnç saptamada kullanılan iki yöntemin ilaçlara göre dağılımı

	MGIT +		MGIT -	
	REBA +	REBA -	REBA +	REBA -
RIF	1	3	-	45
INH	2	7	1	39

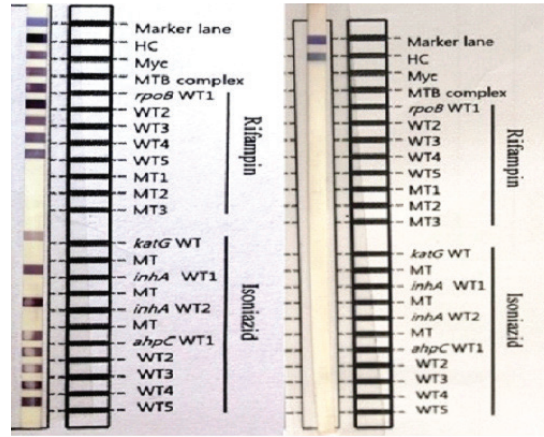
RIF: Rifampisin, INH: İzoniazid

Tablo 4

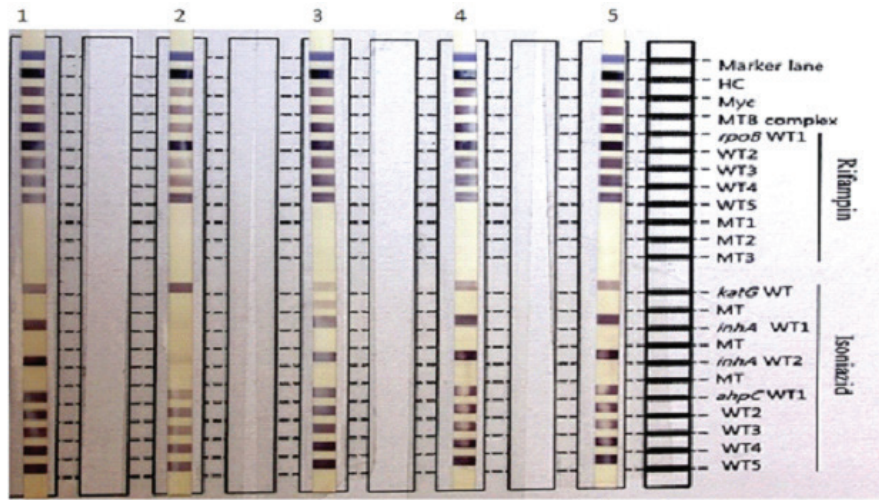
Çalışılan tüm *M. tuberculosis* izolatlarının REBA MTB-MDR ile hibridizasyon paternleri ve fenotipik dirençleri

MGIT		RIF ^R INH ^R	RIF ^S INH ^S	RIF ^S INH ^R	RIF ^R INH ^S	RIF ^R INH ^R	RIF ^S INH ^R	RIF ^S INH ^S
İzolat sayısı		1	1	1	1	2	5	38
<i>rpoB</i>	WT1	+	+	+	+	+	+	+
	WT2	+	+	+	+	+	+	+
	WT3	+	+	+	-	+	+	+
	WT4	+	+	+	+	+	+	+
	WT5	+	+	+	+	+	+	+
	MT1	-	-	-	-	-	-	-
	MT2	-	-	-	-	-	-	-
	MT3	-	-	-	-	-	-	-
<i>katG</i>	WT	+	+	+	+	+	+	+
	MT	+	-	+	-	-	-	-
<i>inhA 15 UPS</i>	WT1	+	-	+	+	+	+	+
	MT1	-	-	-	-	-	-	-
<i>inhA 8UPS</i>	WT2	+	+	+	+	+	+	+
	MT2	-	-	-	-	-	-	-
<i>ahpC</i>	WT1	+	+	+	+	+	+	+
	WT2	+	+	+	+	+	+	+
	WT3	+	+	+	+	+	+	+
	WT4	+	+	+	+	+	+	+
	WT5	+	+	+	+	+	+	+
Mutasyon Yerleşimi		<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>rpoB</i>	Mutasyon yok	Mutasyon yok	Mutasyon yok

R: Dirençli, S: Duyarlı, RIF: Rifampisin, INH: İzoniazid, UPS: Upstream Promotor Sekans, WT: Vahşi(Wild) tip, MT: Mutasyon



Resim 1. Kalite kontrol suşunun (*M. tuberculosis H37Rv*) ve negatif kontrolün test şeritleri



Resim 2. Çalışmamızdaki REBA MTB-MDR test şeritleri; 1, 4, 5. şeritler: RIF+ INH direnci yok, 2. şerit: RIF direnci yok + *inhA* WT1 kaybına bağlı INH direnci, 3. şerit: RIF direnci yok + *katG* mutasyonuna bağlı INH direnci

Tartışma

'Türkiye'de Verem Savaşı 2017' raporuna göre; 2015 yılında ilaç duyarlılık testi yapılan hastaların sonuçları incelendiğinde; %21.3 oranında en az bir ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek oranlarda direncin %13.7 ile INH'e karşı geliştiği görülmüştür. ÇİD-TB oranı ise %4,1 olarak saptanmıştır (1). Çalışmamızda test edilen 55 izolatın 41'i (%74.5) primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı, 14'ü (%25.5) en az birine dirençli bulunmuştur. Çalışmamızda en yüksek ilaç direnci INH için belirlenmiştir. Bu çalışmadaki INH direnci (%18.2) ve ÇİD-TB (%5.5) oranı, Verem Savaşı 2015 verilerine

göre Türkiye ortalamalarının üstünde çıkmıştır. Saptanan direnç oranlarındaki fark; bizim çalışmamızın tek bir bölge verisini ortaya koyan az sayıda klinik izolat ile yapılması ve Türkiye genelinde kullanılan çalışma yöntemlerinin farklı olmasının bir sonucu olabilir.

M. tuberculosis'de direnç mekanizmalarının anlaşılmasından sonra, birçok moleküler test direnci belirlemede denenmektedir. Kullanım kolaylığı nedeniyle en çok tercih edilen moleküler yöntemlerden birisi katı faz hibridizasyon yöntemidir. Inno-LiPA RIF TB ve GenoType MTBDR/MTBDRplus DNA şerit testleri ticari olarak temin edilebilmektedir (13). Inno-LiPA RIF TB

testi ile sadece *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonların varlığı değerlendirilebilmektedir. Birinci kuşak GenoType MTBDR testi *rpoB* ve *katG* gen bölgelerindeki nokta mutasyonlarının varlığını tespit ederek RIF ve INH'e karşı direnci aynı anda tespit edebilme avantajına sahiptir. Genotype MTBDR yönteminin bir üst versiyonu olan Genotype MTBDRplus yöntemiyle, RIF direncini belirleyen *rpoB* bantlarının sayısı artırılarak testin RIF direncini belirleme duyarlılığı artırıldığı gibi, INH direncini belirlemek için *inhA* gen bölgesini içeren bant paternleri de DNA şeritlerine yerleştirilmiştir. Bu sayede ikinci kuşak GenoType MTBDRplus tekniği ile düşük ve orta düzey INH direncine neden olan *inhA* gen bölgesindeki mutasyonlar da saptanabilmektedir (13–15). Bizim çalışmamızda kullanılan REBA MTB-MDR ticari kiti, diğer kitlerden farklı olarak *rpoB*, *katG*, *inhA* promotor bölgesine ek *ahpC* intergenik bölge analizine imkan vermektedir (9,10). Bununla birlikte, bu çalışmada REBA MTB-MDR'in klinik örneklerden izole edilen *M. tuberculosis*'de RIF ve INH direncini belirlemede MGIT 960 sistemine göre test sonuçlanma süresinin kısalığı dışında herhangi bir üstünlüğü ortaya konulamamıştır. REBA MTB-MDR ile RIF direncini saptamada %25, INH direncini saptamada ise %22.2 gibi düşük duyarlılık oranları bulunmuş olması nedeniyle yüksek özgüllük oranlarına rağmen (%100, %97.5) bu testin laboratuvarımızda ilaç direnci araştırılmasında tek başına yeterli olamayacağı düşünülmüştür. Diğer taraftan, bizim bu bulgumuzun aksine klinik izolatlarda ilaç direncini göstermede moleküler yöntemlerin etkinliğini değerlendiren çalışmaları irdediğimizde şerit testlerin *M. tuberculosis*'de INH ve RIF direncini belirlemede başarılı bulunduğunu bildiren birçok çalışma bulunmaktadır (9,13,16,17). Ülkemizde yapılmış bir çalışmada; Aslan ve ark., MGIT 460 sistemi ile RIF direnci saptanan 1, INH direnci saptanan 15 ve ÇİD-TB saptanan 10 *M. tuberculosis* suşunda Genotype MTBDR yöntemini test etmişlerdir. Genotype MTBDR testi ile fenotipik duyarlılık testi arasındaki uyum oranı RIF için %81.8, INH için % 64 olarak belirlenmiştir (18). Miotto ve ark., proporsiyon metodu ile 139 ÇİD-TB, 37 bir veya çok ilaca dirençli ve 30 duyarlı izolatta Genotype MTBDR yöntemini test etmiştir. Bu yöntemin duyarlılığı, RIF, INH direnci ve ÇİD-TB suşlar için sırasıyla %91.5, %67.1, %69.8 olarak, özgüllüğü ise, %99.3, %100, %99.3 olarak hesaplanmıştır (13).

Genotype MTBDR yönteminin RIF direncini belirlemede büyük bir duyarlılığa sahip olduğu ancak INH direncini belirlemede bazı dezavantajları olduğu ve INH direncine neden olan farklı gen bölgelerini de (düşük düzey dirençten sorumlu) içerecek şekilde bir yapılandırmanın, testin duyarlılığını ve güvenilirliğini daha da arttıracakları düşünülmektedir. Nitekim Hilleman ve

ark. yaptığı çalışmada, 75 ÇİD, 50 duyarlı toplam 125 suşta Genotype MTBDR ve Genotype MTBDRplus testleriyle direnç araştırmışlardır. Altın standart olarak bilinen geleneksel testlere göre değerlendirildiğinde, MTBDR testinin duyarlılığı RIF için %97.8, INH için ise %88'dir. MTBDRplus duyarlılığı RIF için %97.8, INH için %92'dir. Her iki testin özgüllüğü INH için %100'dür. Bu çalışmada eklenen problemlerin INH direncini saptama oranını %3 arttırdığını belirlemişlerdir (19). Lacombe ve ark. Bactec 460 sistemiyle Genotype MTBDRplus yöntemini karşılaştırmış, INH ve RIF duyarlılığı sırasıyla %73 ve %91.7 olarak belirlenmiştir. INH'deki yanlış negatifliğin çeşitli izolatlarda direncin *katG* bölgesi dışındaki bir bölgeden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Genotype MTBDRplus yönteminde yeni bantların eklenmesiyle testin RIF direncini belirlemede duyarlılığının %8.4, INH direncini belirlemede de %31.4 oranında artış gösterdiği belirtilmiştir (20).

Bizim çalışmamızda kullanılmış olan REBA MTB-MDR yöntemi ile yapılmış literatürde ulaşabildiğimiz ilk çalışma olan Bang H ve ark.'nın çalışmasında; RIF direncinin %97'si, INH direncinin %81'i bu yöntemle tespit edilmiştir. REBA MTB-MDR testi fenotipik ilaç duyarlılık testi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %79.8, özgüllüğü ise %100 olarak hesaplanmıştır. Testin INH direncinin saptanmasını %5.7 ve ÇİD-TB saptanmasını %6.8 arttırdığı belirtilmiş, artış nedeninin teste *oxyR-ahpC* intergenik bölge probunun eklenmesi olduğu ileri sürülmüştür (9). Ngamlert K, MGIT 960 sistemi ile REBA MTB-MDR'yi karşılaştırmış; RIF, INH direncini ve ÇİD-TB'de duyarlılığını sırasıyla %94.1, %95.5, %93, özgüllüğünü %98.9, %98,1 ve %98 olarak tespit etmiştir (21). Havumaki ve ark. çalışmasının birinci fazında REBA MTB-MDR ve Hain MTBDRplus moleküler yöntemleri MGIT 960 sistemi ile karşılaştırılmıştır. INH direncini saptamada Hain MTBDRplus duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %89, %99.4 ve REBAMTB-MDR'nin %92, %92.6 bulunmuştur. RIF direncini saptamada Hain MTBDRplus duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %90.2, %98.5 ve REBAMTB-MDR'nin ise %72.4, %98 olarak tespit edilmiş, REBA MTB-MDR yönteminin daha fazla klinik çalışmalar ile geliştirilmesi gerektiği belirtilmiştir (22).

Sonuç olarak bizim çalışmamızdaki duyarlılık oranları literatürdekilerden oldukça düşük bulunmuştur. Bunun nedeni bu testlerde sadece yaygın mutasyonların hedeflenmesi ve çalışılan izolat sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu çalışma, Isparta yöresinde yapılan TB ilaç direncini saptamaya yönelik ilk moleküler çalışma olmasından dolayı bölgemizde ilaç direncine neden olan mutasyon paternleri bilinmemektedir. Bu testle saptanan gen mutasyonları dışında mutasyonlar veya başka mekanizmalar di-

rence neden olabilir. Türkiye’de ilaç direncine neden olan mutasyonların ve mekanizmaların belirlenmesi için çok merkezli daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. REBA MTB-MDR testi yeni kullanıma giren bir yöntemdir. Bu yöntemle yapılan çalışma sayısı çok kısıtlıdır. Bu testin güvenilirliğini değerlendirecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu’ndan onay alınarak (25 Aralık 2012 tarihli ve 02 sayılı karar) etik kurul kurallarına uygun bir şekilde Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3425-TU1-13 Proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Türkiye’de Verem Savaşı 2017 Raporu [İnternet]. Ankara; 2017. [cited 15 October 2018] Available from: <https://www.saglik.gov.tr>
2. CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
3. Jain A, Dixit P. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? J Biosci. 2008;33(4):605–16.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. Pennsylvania: NCCLS document M24-A; 2003.
5. Durmaz R. Tüberkülozda Hızlı Moleküler Tanı Testleri. ANKEM derg. 2012;26(2):72–81.
6. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol. 2004;42(5):2321–5.
7. Adjers-Koskela K, Katila M-L. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. J Clin Microbiol. 2003;41(3):1235–9.
8. Report of Expert Consultations on Rapid Molecular Testing to Detect Drug-. Page last reviewed Resistant Tuberculosis in the United.[İnternet] Center for Diseases Control. 2011 [cited 15 October 2018]. Available from: <http://www.cdc.gov/tb/topic/laboratory/rapidmoleculartesting/default.htm>.
9. Bang H, Park S, Hwang J, Jin H, Cho E, Kim DY, et al. Improved rapid molecular diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis using a new reverse hybridization assay, REBA MTB-MDR. J Med Microbiol. 2011;60(Pt 10):1447–54.
10. Cho E, Shamputa IC, Kwak H-K, Lee J, Lee M, Hwang S, et al. Utility of the REBA MTB-Rifa® assay for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Infect Dis. 2013;13:478.
11. MolecuTech REBA MTB-MDR, User’s Manuel. Korea: YD Diagnostics; 2012.
12. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version.[İnternet] [cited 2019 Apr 28]. Available from: <http://www.OpenEpi.com>, updated 2013/04/06
13. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, Cirillo DM. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuber-*

culosis clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol. 2006 ;44(7):2485–91.

14. Ramaswamy SV, Reich R, Dou S-J, Jasperse L, Pan X, Wang A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(4):1241–50.
15. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampin and Isoniazid in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with Low- and High-Level Resistance. J Clin Microbiol. 2006;44(10):3659–64.
16. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3699–703.
17. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2006;44(7):2338–42.
18. Aslan G, Tezcan S, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik izolatlarında rifampisin ve isoniazid direncinin hızlı tespitinde “Genotype MTBDR” testinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2009;43: 217–26.
19. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2635–40.
20. Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Rosés S, et al. GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. J Clin Microbiol. 2008;46(11):3660–7.
21. Keerataya Ngamlert, Efficiency of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* detection between Xpert MTB/RIF and Line Probe Assay Using REBA MTB-MDR. J Med Tech Assoc Thailand. 2016;44(1)
22. Havumaki J, Hillemann D, Ismail N, Omar SV, Georgiou SB, Schumacher SG, et al. Comparative accuracy of the REBA MTB MDR and Hain MTBDRplus line probe assays for the detection of multidrug-resistant tuberculosis: A multicenter, non-inferiority study. PLOS ONE. 2017;12(3):e0173804.