



# *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında kültüre dayalı ve moleküler yöntemlerle ilaç duyarlılığının belirlenmesi

Halil Pir<sup>1\*</sup> , Hakan Yardımcı<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Tüberküloz, Paratberkloz ve Ruam Teşhis Laboratuvarı, Etlık, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Dışkapı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 08.04.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 10.11.2022

**zet:** Tüberküloz, tüm dünyada hala insan sağlığına en ciddi tehditlerden biridir. İlaç direncinin günden güne artması da bu durumun başlıca nedenlerindedir. İlaça dirençli Tüberküloz olgularının hızlı saptanması, dirençli suşların bulaşını önlemek ve etkili tedavi rejimine başlanması açısından önemlidir. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks türleri arasında birbiri ile çok yakın ilişki bulunan ve insan tüberkülozuna sebep olan türler arasında *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* ve *Mycobacterium africanum* yer almaktadır. *M.tuberculosis*'in aksine, *M.bovis* başta sığırılar olmak üzere çok geniş memeli hayvan yelpazesini etkileyebilir ve bu yüzden *M.bovis* zoonotik özelliğe sahiptir. Bu nedenle hastalıkla mücadelede ve antibiyotik direnç oluşum mekanizmalarını anlamada konuya tek sağlık penceresinden bakmak büyük önem arz etmektedir. Yapılan bu derlemede *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında ilaç duyarlılıklarının belirleme yöntemleri ile ilgili bilgiler verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, ila direnci, sağlık

## Determination of drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by culture based and molecular methods

**Abstract:** Tuberculosis is still one of the most serious threats to human health around the world. Increasing of the drug resistance is one of the main cause of this state. Early diagnosis of drug-resistant Tuberculosis cases is urgently needed to prevent the transmission of resistant strains and to optimize treatment regimens. *Mycobacterium tuberculosis* complex includes closely related species among which *M. tuberculosis*, *M. bovis*, and *M.africanum* are the most frequently associated with human disease. Unlike *M. tuberculosis*, *M. bovis* can infect a broad range of mammals, especially cattle and, therefore, *M. bovis* has zoonotic properties. For this reason, it is of great importance to look at the issue from a single health perspective in the fight against the disease and in understanding the mechanisms of antibiotic resistance formation. In this review, information about the methods of determining drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates is given.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, drug resistance, health

## Giriş

Tüberküloz (TB), tüm dünyada yıllık 1,2 milyon insanın ölümü ile sonuçlanan ve yaklaşık 1,7 milyon insanı etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur (WHO, 2019). *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MT-BK)'e bağlı gelişen Tüberküloz (TB) hastalığı, insanlık tarihi boyunca ve günümüzde hala enfeksiyöz hastalıklar içinde önemli bir yere sahiptir (Luo ve ark., 2011). Bakteriyolojik bazı benzer özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbirine yakın ilişkili türler "kompleks" başlığı altında toplanmaktadır. "*M.tuberculosis* kompleks" *M.tuberculosis* (insan), *M.bovis* (sığır), *M.microti* (kemirici hayvanlar), *M.africanum* (insan) türlerinden oluşmaktadır (Hlavsa ve ark., 2008).

Bovine Tüberküloz (BTB), *Mycobacterium bovis* tarafından endemik bölgelerde direkt veya indirekt

ekonomik kayıplara sebep olan kronik bir hastalıktır. *Mycobacterium bovis*'in sebep olduğu tüberküloz hastalığı dünya çapında çok geniş alanlara yayılmış zoonoz bir hastalıktır. Bu hastalık ilk olarak sığırılarda görülmesine rağmen yeterince ısılı işlem görmemiş, ham, pastörize olmamış süt ürünlerinin tüketimi ile insanlara da bulaşmaktadır. Böylelikle HIV/AIDS enfeksiyonuna sahip immunsupresif insanlar arasında aerosol enfeksiyon şeklinde solunum yolu ile bulaşma meydana gelebilmektedir (Hlavsa ve ark., 2008).

İnsanlardaki tüberküloz vakalarının yaklaşık % 1-2'sini BTB oluştururken, gelişmekte olan ülkelerde *M.bovis*'in sebep olduğu BTB'nin yaklaşık % 10-20'sini oluşturur (Mueller ve ark., 2013). Sığırılar *M.tuberculosis*'e ev sahipliği yapmadığı halde, birkaç rapora göre insan basili olan bu etkenin Hindistan

bölgesinde sığırları enfekte edebileceği gösterilmiştir (Ocepak ve ark., 2005). BTB için çok ciddi kontrol mekanizmaları olmasına rağmen, Avrupa ülkelerinde yaygınlığı artmıştır (Schiller ve ark., 2011).

BTB sadece insan ve hayvan sağlığı üzerine etkisi yoktur, aynı zamanda geçim kaynağı hayvancılık olan ve dünya çapında kırsal kesimde yaşayan insanların yaklaşık % 70'ini de etkilemektedir (WHO, 2017). *M.bovis* öncelikli olarak sığırları etkilemektedir fakat zoonotik karakterde olmasından dolayı insanları da enfekte edebildiği gibi, çoklu ve yaygın ilaç direncine de sebep olabilmektedir (Sagasti ve ark., 2016). İnsanlar da *M.bovis*'e ev sahipliği yapabilir ve insanlarda BTB, *M.tuberculosis*'in sebep olduğu tüberküloz hastalığı kadar ciddi seyredebilir hatta daha ölümcül olabilir (Rodwell ve ark., 2008; Bilal ve ark., 2010). *M.bovis* enfeksiyonu insanlarda endişe vericidir, çünkü *M.tuberculosis*'in sebep olduğu insanlardaki tüberküloz hastalığı ile kronik klinik süreci arasında ayırt edilmesi çok güçtür (Cardoso ve ark., 2009). BTB için ayrıca etkili bir aşı mevcut değildir (Hope, 2008). Antitüberküloz ilaçlarla tedavi teşebbüsleri tartışmalı sonuçlar ortaya çıkarmıştır (Cousins, 2001).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler antitüberküloz ilaçları olarak da adlandırılmaktadır. Başlıca iki grupta incelenebilir. Primer ilaçlar; izoniazid (INH), rifampisin (RIF), pirazinamid (PZA), etambutol (ETM), streptomisin (STR)'dir. Rifabutin, rifapentin, sikloserin, etiyonamid, amikasin, kanamisin, kapreomisin, para-aminosalisilik asit, levofloksasin ve moksifloksasin gibi daha toksik ve zor tolere edilebilen ilaçlar ise sekonder ilaçlar grubunda yer alır (Durmaz, 2005). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tüberkülozun başlangıç tedavisinde primer ilaçların kombine kullanımı önerilmektedir.

Bununla birlikte antitüberküloz ilaç direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Primer antitüberküloz ilaçlardan INH ve RIF' e birlikte direncin oluşması, çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD) olarak tanımlanmaktadır (Öz ve ark., 2012). İlaç dirençli soyların ortaya çıkması, özellikle çoklu ve yaygın ilaç direncinin ortaya çıkmasının hastaya uygulanacak tedavi protokolü üzerine endişe verici etkileri vardır (Vazquez-Chacon ve ark., 2014).

İlaç direnci öncelikli olarak bakterinin genomunda meydana gelen genetik değişikliklerden kaynaklanır fakat fenotipik ilaç direnci gibi birkaç istisna da vardır (Kester ve ark., 2014). İnsanlarda, tüberküloza karşı küresel ilaç direnci ortaya çıkması büyük bir endişe oluşturmuş ve tüberkülozda çoklu

ilaç direnci yaygınlığı % 26'ya kadar yükseldiği bildirilmiştir. Ulusal tüberküloz araştırma enstitüsünde Chennai'de yürütülen klinik ilaç çalışmalarındaki ilaç direnci kontrol edilmiş; izoniazid, streptomisin, rifampisine ilaç dirençleri sırasıyla % 10-16, % 8-3 ve % 1 olarak görülmüştür (Paramasivan ve ark., 2004).

Hayvanlarda oluşan ilaç direnci ile ilgili olarak ise hasta olan hayvanlar tedavi edilmeyip kesime gittiği için ilaç direnci bilgisi bulunamamaktadır. Bu yüzden bir takım çalışmalar yapılarak endemik bölgelerde *M.tuberculosis* kompleks'in klinik suşlarında ilaç direnci belirlenmektedir (Anne ve ark., 2017).

İlaça dirençli suşlar ise; hastalığın kontrolünde başarısızlığa, etkisiz tedavi rejimlerine ve dirençli suşların yayılması gibi problemlere neden olmaktadır (Andrews ve ark., 2008; Li ve ark., 2007). Konvansiyonel fenotipik ilaç duyarlılık testleri, üremeleri oldukça yavaş olan MTBK suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde gecikme olmasına neden olmaktadır. MTBK suşlarının ilaç duyarlılıklarının hızlı tanısı, etkili antitüberküloz tedavisine erken dönemde başlanması ve dirençli suşların yayılmasının önlenmesi açısından gereklidir. MTBK suşları ilaç dirençlerini, spontan gerçekleşen nokta mutasyonlar sonucu kromozomal DNA'nın değişikliğe uğramasıyla kazanmaktadırlar (Zhang ve ark., 1992; Banerjee ve ark., 1994). Antitüberküloz ilaçların pek çoğunda dirence neden olan bu spesifik genlerdeki mutasyon bölgeleri tanımlanmıştır (Luo ve ark., 2010). İlaç direncine neden olan mutasyonların bilinmesi, ilaca dirençli TB tanısında moleküler yöntemlerin gelişmesine ışık tutmuş, böylelikle dirençli suşların tanısı erken konulmaya başlanmıştır (Palamino, 2009).

Bu derlemede *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) izolatlarında ilaca dirençli suşları belirleyen metotlar hakkında bilgiler verilmiştir.

### İlaç Duyarlılığının Belirlenmesi

MTBK suşlarının neden olduğu enfeksiyonların etkili tedavisinin yapılabilmesi için, tedavide kullanılan antitüberküloz ilaçların duyarlılıklarının belirlenmiş olmasının önemi büyüktür. *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M24-A2 kodu ile yayınladığı dokümanında MTBK duyarlılık testleri için standartlar belirlenmiştir (CLSI, 2011). Buna göre orantı yöntemi PZA hariç bütün antitüberküloz ilaçların duyarlılıklarının çalışılmasında standart metot olarak kabul edilmiştir. Orantı yöntemi PZA duyarlılığı için kanıtlanmış doğru bir yöntem değildir. Çünkü PZA duyarlılığının çalışılabilmesi için asit pH'ya ayarlanmış agarda mikobakteriler üreme safhasında ölebilmektedir veya üremeleri durabilmektedir. Bu

nedenle PZA duyarlılığı çalışılmasında radyometrik yöntem olan Bactec 460 TB sistemi referans yöntem olarak önerilmektedir (CLSI, 2011).

PZA duyarlılığı çalışmak için radyometrik olmayan ticari hızlı sıvı kültür duyarlılık sistemleri geliştirilmiştir. MGIT 960 da bunlardan biridir. Bu sistemlerin performanslarının radyometrik sisteme eşit olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (CLSI, 2011; Scarpora ve ark., 2004).

Antimikobakteriyel duyarlılık belirlenmesinde kullanılan yöntemler, kültüre dayalı yöntemler ve moleküler yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

## Kültüre Dayalı Yöntemler

Kültüre dayalı yöntemler, klasik ve hızlı kültür yöntemleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

### 1- Klasik Kültür Yöntemleri

Duyarlılık testleri, doğrudan veya dolaylı olarak uygulanabilmektedir. Doğrudan testte, ARB pozitif klinik örnek işlendikten sonra, ilaçlı ve ilaçsız besi yerine ekilmektedir. Dolaylı testte ise, besi yerinde saf olarak üretilmiş basillerden hazırlanan süspansiyondan, ilaçlı ve ilaçsız besi yerine ekim yapılır (CLSI, 2011).

### Orantı Yöntemi

Bu yöntemde MTBK suşları kültürde üredikten sonra 0.5-1 McFarland hazırlanıp  $10^{-2}$  ve  $10^{-4}$  dilüsyonları basillerden ayarlanan inokulumun birkaç dilüsyonu eşit miktarlarda ilaç içeren ve ilaç içermeyen agar temelli besi yerlerine ekilip 3 hafta inkübe edilir. Burada kullanılan besi yerleri Middlebrook 7H10 veya 7H11'dir. İnkübasyon sonunda ilaç içeren besi yerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen besi yerindeki koloni sayısına oranı dirençli basillerin oranını gösterir. Test edilen suşlarda hesaplanan direnç yüzdesi % 1'den daha fazla ise o suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edilir (CLSI, 2011). Sonuçlar genellikle, 21 günlük inkübasyon sonrasında elde edilir (Beckton, 2010).

### 2- Hızlı Kültür Yöntemler

CLSI tarafından önerilen sistem olan Bactec 460 ile MGIT 960 sistemleri yaygın olarak kullanılan sistemlerdir (CLSI, 2011).

### BACTEC 460 Sistemiyle Belirleme

BACTEC TB 460 sistemi klasik yöntemlerle aynı temele dayanır. Farkı sıvı besi yeri (Middlebrook 7H12;12B) kullanılması ve 3 hafta sonra koloni sa-

ylması yerine, üremenin radyometrik olarak takip edilmesi ve sonuçların 4-5 gün içerisinde verilebilmesidir. Bu yöntemle özellikle ilk sıra antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık test edilebilmektedir. Dirençli basillerin oranının belirlenememesi ve radyoaktif madde kullanımı gibi dezavantajlara sahipse de, hızlı, güvenilir bir yöntem olması ve agar orantı metodu ile % 90 uyumlu olması nedeniyle birçok merkez tarafından kullanılmaktadır.

Bu yöntemde duyarlılığı saptanacak her suş için dört antibiyotikli (STR, INH, RIF, EMB) ve bir antibiyotiksiz olmak üzere beş adet 12B besi yeri kullanılır. Besi yerlerine her ilaçtan 0,1 ml ve 12B besi yerinde üreme indeksi (Growth Index=GI) 500-800 arasında olan denenecek suştan 0.1 ml eklenir. Kontrol şişesinin hazırlanması için, orijinal suş Bactec dilüsyon sıvısı ile % 1 direnci saptamak için 1/100 oranında sulandırılır. 37 °C'de inkübe edilen besi yerleri Bactec cihazında her gün aynı saatlerde okutularak, 4-12 gün boyunca GI'ları takip edilir (Beckton, 2010).

### BACTEC MGIT 960 SIRE Yöntemiyle Belirleme

Kültürdeki MTBK suşlarının STR, INH, RIF ve EMB'ye karşı duyarlılığını test etmek üzere MGIT 960 cihazında uygulanan hızlı ve kalitatif bir yöntemdir. Bactec MGIT 960 SIRE Kit MTBK'nın antimikobakteriyel duyarlılık testi için tasarlanmıştır. Direnç, ilaç içeren koloni ortamında en az % 1'lik üreme olduğu zaman gelişmektedir. Kültür ortamlarındaki ilaç konsantrasyonları; INH, 0.2 µg/ml; RIF, 1 µg/ml; STR, 2 µg/ml; EMB, 5 µg/ml ve PZA, 100 µg/ml olarak belirlenerek Bactec MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company, Spark, MD, USA) cihazı kullanılarak ilaç duyarlılıkları belirlenmektedir (WHO, 2018).

SIRE kiti 20 ml Middlebrook, sığır albümini, katalaz, dekstroz ve oleik asitten oluşan (OADC) zenginleştirici içerir. BBL MGIT 7 ml mikobakteri üreme indikatör tüpü, mikobakterilerin çoğalmasını ve saptanmasını destekleyen modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 sıvı besi yeri içeren bir tüptür. MGIT tüpü, yuvarlak altlı tüpün alt kısmında bulunan silikonla kaplanmış floresan bir bileşim içerir. Floresan bileşik, sıvı besi yerinde çözünen oksijenin varlığına duyarlıdır. Çözünmüş oksijenin başlangıç konsantrasyonu bileşik emisyonunu bastırdığı için çok az floresans tespit edilebilir. Daha sonra, aktif olarak solunum yapan mikroorganizmaların oksijeni tüketmesi bileşimin floresans vermesine neden olur.

Bactec MGIT 960 SIRE kiti 4-13 günlük kalitatif bir testtir (Beckton, 2010). Bu test, MTBK izolatının, ilaç içermeyen tüple karşılaştırıldığında ilaç içeren tüpte üremesine dayanır. Bactec MGIT cihazı, tüpleri artan floresans bakımından izler. Cihaz tarafından

ilaç içeren tüpteki floresans üreme kontrolü tüpündeki floresansla karşılaştırılarak, duyarlılık sonuçları belirlenir. Bactec MGIT cihazı, önceden tanımlanmış (ilaç içeren tüpteki üremeyi, üreme kontrolü tüpündeki üreyle karşılaştıran) algoritmaları kullanarak bu sonuçları otomatik olarak yorumlar ve duyarlı veya dirençli sonuç cihaz tarafından rapor edilir.

Bactec MGIT 960 SIRE testi, duyarlılık sonucunu Bactec 460TB sistemi ile yaklaşık olarak aynı zaman aralığında verir. Ayrıca, bu yöntem radyometrik olmayan bir yöntemdir ve uygun antibiyotik duyarlılığı sonuçlarının çoğu durumda orantı yöntemine göre daha önce raporlanmasına olanak verir (Beckton, 2010).

## Moleküler Yöntemler

MTBK suşlarında ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra direncin erken saptanmasına yönelik moleküler yöntemleri kullanma çalışmaları başlamıştır (Luo ve ark., 2011; Perezosoria ve ark., 2012; Chakravorty ve ark., 2011; Bergval ve ark., 2008; Yang ve ark., 2005). Klasik yöntemlerde haftalar süren duyarlılık testlerinin moleküler yöntemlerle kısa sürede alınabilmesi hedeflenmiştir. Dirençten sorumlu mutasyonları taramak için kullanılan moleküler yöntemler; uygun antibiyotiklerle erkenden tedaviye başlanmasına, tedavinin başarılı olmasına ve tüberkülozun kontrol altına alınmasına büyük katkı sağlayacaktır. Bu yöntemlerden bir kısmında kültüre gerek kalmadan, doğrudan klinik örnek üzerinden yapılan uygulamayla direnç ortaya konulabilmektedir (Saniç, 2004).

Moleküler yöntemlerle en iyi sonuç RIF direncini belirlemede alınmakta; INH ve siprofloksasine dirençli suşların sırasıyla % 10-15 ve % 25 kadarı bu yöntemlerle saptanamamaktadır. Moleküler yöntemlerin dezavantajları ise; yüksek maliyet, klinik olarak dirence yol açan bakteri topluluğu içindeki dirençli suşların duyarlılara oranının kesin olarak belirlenememesi, saptanan mutasyonların (sessiz mutasyonlar) her zaman ilaç direnciyle ilişkili olmamasıdır (Cho, 2007).

Kullanılan moleküler yöntemlerin çoğunda üç ana aşama vardır:

- 1) Klinik örneklerden nükleik asitin ekstraksiyonu,
- 2) Gendeki dirençten sorumlu spesifik bölgenin amplifikasyonu,
- 3) Çoğaltılan gen bölgesi üzerindeki mutasyonların saptanması (Chakravorty ve ark., 2011).

Bu aşamalardaki işlemler kısaltılabildiği ölçüde uygulanan testin sonuç verme süresi erken olabilir-

mektedir. Yöntemlerin çoğunda zaman kaybının, çoğaltılan genlerdeki dirençle ilişkili mutasyonların gösterilmesi aşamasında yaşanmaktadır. Bu aşamada birçok yöntem kullanılmaktadır. Katı faz hibridizasyon testleri (INNO-LiPA RIF TB), GenoType MTBDR, (*microarray*), DNA dizi analizi, PCR tek zincir konformasyon polimorfizmi (*single strand confirmation polymorphism analysis*) (PCR-SSCP), heterodupleks analizi, "pyrosequencing", mutasyona özgü primer ile amplifikasyon, "real-time PCR" ve amplifikasyon ürünün mutasyona özgü restriksiyon enzimle analizi gibi işlemlerle hedef gendeki değişimler saptanabilmektedir (Luo ve ark., 2011; Durmaz, 2010; Zeka ve ark., 2011).

## DNA Dizi Analizi

Bu yöntemle bilinen mutasyonlar yanında, önceden bilinmeyen mutasyonlar da saptanabilmektedir. Genelde özgüllük ve duyarlılığı tam olarak bulunmadır (Aktaş ve ark 2005). Ancak, geleneksel DNA sekanslama işleminin 1-2 gün içerisinde sonuç vermesi ve fazla manipülasyon işlemlerinin olması nedeniyle rutin uygulanan bir yöntem değildir (Cho, 2007).

## Katı Faz Hibridizasyon Testleri

Katı faz hibridizasyon yöntemleri temel moleküler çalışmaların uygulandığı alt yapı olanakları sınırlı laboratuvarlarda bile kolayca uygulanabilen duyarlı ve özgül yöntemlerdir. Önemli dezavantajları bilinen mutasyonlar için tasarlandıklarından yeni mutasyonları saptayamamaları ve ayrıca amplifikasyondan sonraki aşamalarda yoğun iş yükü ve zaman kaybının olmasıdır. Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan yöntemin Inno-Line Probe Assay (InnoLiPA Rif TB) ve GenoType MTBDR/MTBDR plus olmak üzere iki ticari kiti bulunmaktadır. InnoLiPA MTBK suşlarında RIF direncini saptayabiliyorken, MTBDR plus RIF ve INH direncini saptayabilmektedir (Durmaz, 2010).

## DNA Mikroçip Analizleri

Katı faz hibridizasyon esaslı diğer bir yöntem DNA mikroçipleridir. Mikobakterilerin tanımlanmasına ve çok sayıda farklı mutasyonların saptanmasına olanak sağlamaktadır. DNA mikroçip ile yapılan çalışmalarda *katG*, *inhA*, *rpoB*, *rpsL* ve *gyrA* genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Yöntemin en önemli avantajı klinik örnekten bakterinin saptanması, tür tayini, ilaç direncinin araştırılması ve virülans geninin aynı anda belirlenmesine olanak vermesidir (Durmaz, 2010).



## Gerçek Zamanlı PZR ile Mutasyonların Saptanması

Teknolojik gelişmelere paralel olarak TB basillerinde tanı ve direnci belirlemede kullanılan moleküler testlerde de önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. En önemli ilerleme amplifikasyon ve sonuç gözleme işlemlerinin eş zamanlı olarak yapılabilirdiği real time PCR (Gerçek Zamanlı PZR) yöntemlerinin uygulamaya girmesidir. Amplifikasyon ve analiz işlemlerinin kapalı tek tüp içinde yapıldığı bu yöntem, DNA izolasyonunu takiben 1.5-2 saat içerisinde tamamlanmakta, bazı antitüberküloz ilaçlara direnci belirlemede kullanılabilir (Luo ve ark., 2011; Espy ve ark., 2006; De Viedma ve ark., 2002; Bergval ve ark., 2008).

## GeneXpert MTB/RIF Testi

TB tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay olan bu yöntem ile iki saat içerisinde örnekte MTBK varlığı ve aynı zamanda RIF direnci olup olmadığı saptanabilmektedir (Blakemore ve ark., 2010).

## Sonuç

Tüberküloz hastalığının yaygınlığının artmasıyla ve geniş alanlara yayılmasıyla birlikte, birçok ilaca karşı da direnç geliştirmiş ve böylece insan sağlığını tehdit eden durum ortaya çıkmıştır (Galagan, 2014). *M.bovis* pirazinamide karşı doğal dirençlidir, ki bu ilk nesil antitüberküloz ilaç olarak sınıflandırılmıştır (Kanene ve ark., 2014). Pirazinamid tedavisinde ortak yan etkileri; hiperürisemi, hepatotoksisite, dysuria, artralji ve sideroblastik anemidir. Bu yüzden, *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının tür bazında tamamen tanımlanması, hastaya uygun tedavi, halk sağlığı ve epidemiyolojik çalışmalar için gereklidir (Jiang ve ark., 2015).

Tüm dünyada yapılan birkaç çalışmada tüberküloz enfeksiyonuna yakalanmış insanlarda, yabancı hayvanlardan ve sığırlardan elde edilen *M.bovis*, rifampisin ve izoniazide dirençli olduğu saptanmıştır (Bobadilla-Del ve ark., 2015; Sechi ve ark., 2001; Fitzgerald ve ark., 2011).

Tarih boyunca, *M.bovis*'in sebep olduğu insan tüberkülozu oranı ile aynı bölge içindeki sığır tüberkülozu arasında çok yakın bir ilişki bulunmuştur (Grange, 2001). Maalesef, gelişmekte olan çoğu ülkede sığır tüberkülozunun kontrolünün hala uygun bir şekilde yapılmadığı ve kontrol programlarının yetersiz olduğu görülmektedir (Cosivi ve ark., 1998; Mueller ve ark., 2013). Birkaç faktörle insanlardaki *M.bovis*'in sebep olduğu tüberküloz vakalarının neden az raporlandığı açıklanabilir. İlki, kontrol program-

larının Acid-resistance bacilli (ARB) boyama yönteminin tüberküloz şüpheli vakalarda öncelikli teşhis metodu olarak görülmesi ve mycobacterial kültürün, ilaç direncinden şüphelenildiği zaman ya da tedavinin başarısız olduğu zaman yapılmasıdır. İkinci olarak, çoğu laboratuvar kültür ortamında gliserol olması ve bu durum *M.bovis*'in izolasyon olasılığını azaltmasına sebep olmaktadır. Son olarak da sadece birkaç laboratuvarın *M.tuberculosis* kompleks'i tür bazında ayırmasını yapmasıdır (De Kantor ve ark., 2008; De Kantor ve ark., 2010).

Bobadilla-Del ve ark. (2015) yapmış olduğu çalışmada kendi laboratuvarlarına gelen insan tüberküloz vakalarının içinde *M.bovis* kaynaklı tüberküloz vakalarının yaygınlığının arttığını ve zamanla yükselme eğiliminde olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu rapor *M.bovis*'in primer antitüberküloz ilaçlarla çalışılmış en büyük çalışmalardan biri olup, *M.bovis*'in primer antitüberküloz ilaçlara karşı büyük oranda direnç gösterdiği ve sekonder antitüberküloz ilaçlara karşı çok sayıda ilaca direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada insan tüberküloz vakalarındaki etkenin *M.bovis* olmasının ve zamanla *M.bovis* kaynaklı insan tüberküloz vakalarının çoğalmasının sebebinin Meksika bölgesi içindeki sığır tüberkülozu vakasının fazla olmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Nitekim o bölgede yapmış oldukları çalışmada bir süt ürünleri tesislerinde çok fazla miktarda sığır tüberkülozu varlığını tespit etmişlerdir. Antibiyotik direnç konusunda ise *M.bovis* ve *M.tuberculosis*'in ilaç dirençleri kıyaslandığında *M.bovis*'in STR daha yüksek direnç gösterdiği *Mycobacterium tuberculosis*'in ÇİD oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. *M.bovis*'in STR'e yüksek oranda dirençli çıkmasının sebebi olarak sığırlara diğer hastalıklar sebebiyle tedavi amacıyla aminoglikozit grubu antibiyotiklerin uygulanması olduğu düşünülmüştür (Economou ve ark., 2015).

Süt sığırcılığı işletmelerinde sığır tüberkülozu survey çalışmasında, sığır tüberkülozlu hayvanların mezbahane kesim aşamasında toplanan numunelerden elde edilen 150 *M.bovis* izolat arasında ilaç direnç oranı en yüksek STR'e direnç (% 15.6), sonra INH (% 9.2) ve RIF (% 3.4) dirençli çıkmıştır. İlaç direnç oranlarında insan izolatları ile hayvan izolatları arasında paralellik olduğu saptanmıştır (Bobadilla-Del ve ark., 2015).

Chan ve ark. (2021) yapmış olduğu çalışmada 202 insan *M.bovis* izolatlarından % 100'ünün PZA'ya dirençli olduğu; 52 (% 25.7)'sinin INH'ye dirençli olduğu; 5 (% 2.5)'inin INH ve STR'ye dirençli olduğu; 3 (% 1.5)'ünün INH ve RIF'e dirençli olduğu ve 1 (% 0.5)'inin ise INH, RIF ve EMB'ye dirençli olduğunu

belirtmişlerdir. Dört *M.bovis* izolatının da ÇİD (INH ve RIF) olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada hayvanlardan elde ettikleri 22 *M.bovis* izolatından % 100'ünün RIF'e duyarlı olduğu ve PZA'ya dirençli olduğunu, 5 (% 22.7) izolatın ise INH'ye dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada insanlardan elde ettikleri *M.bovis* izolatları ile hayvanlardan elde ettikleri *M.bovis*'in % 22.7 (5/22) izolatlarının eşzamanlı olarak PZA ve INH'ye dirençli oldukları görülmüştür.

Hindistan'da Sweetline Anne ve ark. (2019) yapmış oldukları bir çalışmada, sığırlardan elde ettikleri sekiz *M.bovis* izolatlarının % 25'i INH'ye dirençli olduğu, % 12.5'inin ise RIF'e dirençli olduğu görülmüştür.

Monika Krajewska ve ark. (2017) Polonya'da yapmış oldukları çalışmalarda sığırlardan elde edilen toplam 134 MTBK izolat insanlarda TB tedavisinde kullanılan primer antitüberküloz ilaçlarla fenotipik ilaç duyarlılıkları test edilmiştir. MTBK izolatlarının tür bazında ilaç dirençlilik test sonuçlarına göre *M.bovis* olarak sınıflandırılan türün 4 antitüberküloz ilaca karşı duyarlı olduğu; izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (ETM) ve streptomisine (STR) ve pirazinamide (PZA) karşı dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar şunu göstermiştir; Mikobakterilerin fenotipik yapısında çok fazla değişimler olmasına rağmen, sığırlardan elde edilen MTBK izolatlarında herhangi bir çevresel direnç görülmemiştir.

*M.bovis*'in sebep olduğu insan tüberkülozu vakalarında eğer *M.bovis*'in pirazinamide doğal dirençli olduğu ve INH ya da RIF'e karşı bir direnç geliştirme olasılığı göz ardı edilirse, ÇİD gelişimi meydana gelir. Bu yüzden ÇİD'e sahip *M.bovis*'in sebep olduğu TB vakalarını sekonder antitüberküloz ilaçlarla tedavi etmek çok zordur. (McLaughlin ve ark.,2012; Kurbatova ve ark.,2013).

Tüm dünya çapında TB karşı yürütülen programlardaki en büyük engelin ilaca dirençli basillerin ortaya çıkması ve sayısının artmasının yanı sıra dirençli basillere karşı yeni ilaçların yokluğudur (Chiu Chang ve ark.,2010). Bu nedenle sahip olduğumuz ilaçlar antibiyotik duyarlılık testleri yapılmadan kullanılmamalıdır. Hastalığın kontrolünde koruyucu hekimliğe önem verilmelidir. Tek tıp tek sağlık konsepti uygulanmalıdır.

## Kaynaklar

Andrews JR, Gandhi NR, Moodley P, Shah NS, Bohlken L, Moll AP ve diğerleri (2008). Exogenous reinfection as a cause of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in rural South Africa. *J Infect Diseases*, 198 (11), 1582-1589. <https://doi.org/10.1086/592991>

- Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z, (2005). Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey. *Microbial drug resistance*, 11 (2), 94-99. DOI: 10.1089/mdr.2005.11.94
- Anne Ns, Ronald Bsm, Kumar Tmas, Kannan P, Thangavelu A, (2017). Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. *Vet Microbiol* 198:81-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.013
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um Ks, Wilson T, Et Al, (1994).InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263 (5144), 227-230. doi: 10.1126/science.8284673
- Bilal S, Iqbal M, Murphy P, Power J, (2010). Human bovine tuberculosis remains in the differential. *J Med Microbiol* 59:1379e82. DOI: 10.1099/jmm.0.020511-0
- Bergval I, Vijzelaar R, Dalla Costa, E, Schurtema- Oskam L, Kritski A, Et Al, (2008). Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46 (2), 689-699. doi: 10.1128/JCM.01821-07
- Beckton Dickinson (2010) BACTEC MGIT 960 SIRE Kiti Kullanım Prosedürü.
- Bobadilla-del Valle M, Torres-González P, Cervera-Hernández ME, Martínez-Gamboa A, Crabtree-Ramírez B, Chávez-Mazari B, Ortiz-Conchi N, Rodríguez-Cruz L, Cervantes-Sánchez A, Gu-diño-Enríquez T, Cinta-Severo C, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A, (2015). Trends of *Mycobacterium bovis* Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance. *Plos Negl Trop Dis*. 2015 Sep 30;9(9):e0004124. doi: 10.1371/journal.pntd.0004124. PMID: 26421930; PMCID: PMC4589280.
- Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens M, Et Al, (2010). Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol* 48 (7), 2495-2501. doi: 10.1128/JCM.00128-10
- Cardoso Ma, Cardoso RF, Hirata Rdc, Hirata Mh, Leite Cqf, Santos Acb, Et Al, (2009). Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoonoses Public Health* 56:465e70. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01199.x
- Cho SN, (2007). Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei Med J*, 48 (3), 347-359. doi: 10.3349/yymj.2007.48.3.347
- CLSI, (2011). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes approved standard CLSI document M24-A2 (2 bs.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cousins DV (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Technol Off Int Epiz* 2001;20:71-85. doi: 10.20506/rst.20.1.1263
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Et Al, (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4: 59-70. PMID: 9452399
- Chakravorty S, Aladegbami B, Thoms K, Lee JS, Lee EG, Rajan V, Et Al, (2011). Rapid detection of fluoroquinolone-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of sloppy molecular beacons and dual melting-temperature codes in a "real-time PCR" assay. *J Clin Microbiol* 49 (3), 932-940 doi: 10.1128/JCM.02271-10
- Chan TH, Huang CS, Tu C, Jou R. Bovine tuberculosis in Taiwan, 2008-2019. *Transbound Emerg Dis*. 2021 Nov 1. doi: 10.1111/tbed.14371. Epub ahead of print. PMID: 34724711.
- Durmaz R, (2010). *Mycobacterium tuberculosis* Suslanında Direncin Belirlenmesinde Moleküler Yöntemler/Son Gelişmeler. *Ankem Derg*, 24(Ek 2), 64-70.
- Durmaz R, (2005). *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç sorunu. *AN-KEM Derg* 19(2): 107-110.
- De Viedma DG, Infantes MDSD, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E, (2002). New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 40 (3), 988-995 doi: 10.1128/JCM.40.3.988-995.2002

- De Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Et Al, (2008). Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)* 88: 358–365.
- De Kantor IN, LoBue PA, Thoen CO, (2010). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *Int J Tuberc Lung Dis* 14: 1369–1373. PMID:20937174
- Espy M, Uhl J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, Et Al, (2006). “Real-Time PCR” in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Reviews*, 19 (1), 165-256. doi: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
- Economou V, Gousia P, (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial resistant bacteria. *Infect Drug Resist* 8: 49–61. doi: 10.2147/IDR.S55778 PMID: 25878509
- Fitzgerald SD, Schooley AM, Berry DE, Kaneene JB, (2011). Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium bovis* isolates from Michigan white-tailed deer during the 2009 hunting season. *Vet Med Int* doi: 10.4061/2011/903683
- Galagan JE, (2014). Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet* 15: 307e20 doi: 10.1038/nrg3664
- Grange JM, (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb)* 81: 71–77.
- Hope JC, Villa-Real Ramos B, (2008). Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*2008;31:77-100. doi:10.1016/j.cimid.2007.07.003
- Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Et Al, (2008). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995- 2005. *Clin Infect Dis* 47(2):168e75. doi: 10.1086/589240
- Jiang G, Wang G, Chen S, Yu X, Wang X, Zhao L, Et Al, (2015). Pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in China. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep08538
- Kaneene JB, Miller R, Steele JH, Thoen CO, (2014). Preventing and controlling zoonotic tuberculosis: a One Health approach. *Vet Ital.* Jan-Mar;50(1):7-22. doi: 10.12834/VetIt.1302.08.
- Kester JC, Fortune SM, (2014). Persists and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014; 49:91–101. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.869543> PMID: 24328927
- Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Dalton T, E SC, Cegielski JP, (2013). Epidemiology of pyrazinamide resistant tuberculosis in the United States, 1999–2009. *Clin Infect Dis* 57: 1081–1093. doi: 10.1093/cid/cit452 PMID: 23840002
- Kwok Chiu Chang, Wing Wai Yew, Raphael Chiu Yeung Chan, Rapid assays for fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 65, Issue 8, August 2010, Pages 1551–1561, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq202>
- Luo T, Jiang L, Sun W, Fu G, Mei J, Gao Q, (2011). Multiplex real-time PCR melting curve assay to detect drug-resistant mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 49 (9), 3132–3138. doi: 10.1128/JCM.02046-10
- Li X, Zhang Y, Shen X, Shen G, Gui X, Sun B, Et Al, (2007). Transmission of drug-resistant tuberculosis among treated patients in Shanghai, China. *J Infect Diseases*, 195 (6), 864–869. doi: 10.1086/511985
- Mueller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, Parsons SD, Et Al, (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*:899e908. doi: 10.3201/eid1906.120543
- McLaughlin AM, Gibbons N, Fitzgibbon M, Power JT, Foley SC, Et Al, (2012). Primary isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* disease: a prospect of concern. *Am J Respir Crit Care Med* 186: 110–111. PMID: 22753693
- Ocepek M, Pate M, Zolnirdovc M, Pol JAK, (2005). M. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J Clin Microbiol* 2005;43:3555–7. doi: 10.1128/JCM.43.7.3555-3557.2005
- Öz Y, Aslan M, Akşit F, Durmaz G, Kiraz N, (2012). *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 26(1): 20-24.
- Palomino JC, (2009). Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiol*, 56 (2), 103-111. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00555.x
- Paramasivan CN, Venkataraman P, (2004). Review article on drug resistance in tuberculosis in India. *Indian J Med Res* 2004;120:377–86.
- Perezosorio AC, Boyle DS, Ingham ZK, Ostash A, Gautom RK, Colombel C, Et Al, (2012). Rapid identification of mycobacteria and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of a single multiplex PCR and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 50 (2), 326-336. doi: 10.1128/JCM.05570-11
- Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA, (2008). Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis* 14:909e16 doi: 10.3201/eid1406.071485
- Sagasti S, Millán-Lou MI, Soledad Jiméñez M, Martín C, Samper S, (2016). In-depth analysis of the genome sequence of a clinical, extensively drug-resistant *Mycobacterium bovis* strain. *Tuberculosis*. 2016;100:46-52. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.06.005> PMID: 27553409
- Scarpato C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P, (2004). Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *J Clin Microbiol* 42 (3), 1109-1114.
- Sechi LA, Zanetti S, Sanguinetti M, Mollicotti P, Romano L, Leoni G, Et Al, (2001). Molecular basis of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6):1645e8. doi:10.1128/AAC.45.6.1645-1648.2001
- Schiller I, Waters Wr, Vordermeier Hm, Jemmi T, Welsh M, Keck N, Whelan A, Gormley E, Boschirolu ML, (2011). Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Vet Microbiol* 2011;15:153–9 doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.039
- Sweetline Anne, N., Ronald, B. S. M., Senthil Kumar, T. M. A., & Thangavelu, A., (2019). Conventional and molecular determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* isolates in cattle. *Tuberculosis*, 114, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.005>
- Vazquez-Chacon CA, Martinez-Guarneros A, Campos SB, Herrera JL, Bäcker C, Rossi LMG, Et Al, (2013). Circulation of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. *Am J Infect Dis*. 2014; 10:174.
- World Health Organization, (2017). Roadmap for zoonotic tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259229/9789241513043eng.pdf;jsessionid=B3CE137C7E7ED125A182E6BF1B10819?sequence=1>
- World Health Organization, (2018). Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842eng.pdf?ua=1>
- World Health Organization, (2019). Global tuberculosis report 2019. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2019.
- Yang Z, Durmaz R, Yang D, Gunal S, Zhang L, Foxman B, Et Al, (2005). Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53 (3), 201-208. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.007
- Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C, (2011). Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 49 (12), 4138-4141. doi: 10.1128/JCM.05434-11
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S, (1992). The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358, 591-593 doi: 10.1038/358591a0