

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİ KLİNİK İZOLATLARINDA RİFAMPİSİN VE İZONİAZİD DİRENCİNİN HIZLI TESPİTİNDE “GENOTYPE MTBDR” TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF THE GENOTYPE MTBDR ASSAY FOR RAPID DETECTION OF RIFAMPIN AND ISONIAZID RESISTANCE IN CLINICAL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CLINICAL ISOLATES

Gönül ASLAN¹, Seda TEZCAN¹, Gürol EMEKDAŞ¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İçel. (drgaslan@gmail.com)

ÖZET

Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarının hızlı tespiti, erken ve uygun tedavinin planlanmasında en önemli basamaktır. Genotype MTBDR (Hain Lifescience, Nehren, Almanya), klinik izolatlarda *rpoB* ve *katG* gen mutasyonlarının hızlı tespiti için tasarlanan ve ticari olarak temin edilen bir DNA strip testidir. Bu çalışmada, fenotipik ilaç duyarlılık testi ile izoniazid (INH) direnci saptanan 15, rifampisin (RIF) direnci saptanan bir ve INH + RIF direnci saptanan 10 olmak üzere toplam 26 *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatının INH ve RIF direnci ile ilişkili mutasyon tiplerinin Genotype MTBDR (G-MTBDR) testi ile belirlenmesi ve testin tanısal performansının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, 25 INH dirençli izolatın 16 (%64)'sı ve 11 RIF dirençli izolatın 9 (%81.8)'u G-MTBDR testi ile mutasyon probunda hibridizasyonun varlığı ile veya en az bir “wild” tip probunda hibridizasyonun gözlenmemesi ile doğru olarak tespit edilmiştir. RIF'a dirençli olarak belirlenen izolatların sadece 5'inde mutasyon probunda hibridizasyon gözlenmiştir. Bu izolatların 4 (%36.3) tanesinde *rpoB* MUT3 (S531L, Ser→Leu) mutasyonu, 1 (%9.1) tanesinde ise *rpoB* MUT1 (D516V) mutasyonu saptanmıştır. INH'ye dirençli olarak belirlenen 16 izolatın sadece 14 (%56)'ünde *katG* mutasyon probunda *katG* T1 (S315T1) hibridizasyon paterni gözlenmiştir. Çalışmada, G-MTBDR testi ile RIF'a dirençli olarak belirlenemeyen 2 (%18.2) izolatın birinde DNA dizi analizi ile kodon 531'de (TCG→GCG), diğerinde ise muhtemelen dirençle ilişkili olmayan kodon 545'te (CTG→ATG) mutasyon olduğu belirlenmiştir. Yine INH direnci belirlenemeyen 8 (%32) izolatın 4'ünde DNA dizi analizi ile mutasyonların en yaygın gözleendiği alanın dışında birbirinden farklı mutasyon paternlerine sahip oldukları gösterilmiştir. Bunlar bir izolatla *katG* geninde kodon 293'te (GCT→ACT), bir izolatla ikili mutasyon şeklinde *katG* geninde kodon 279'da (GGC→ACC) ve *inhA* gen bölgesinde 15. C→T şeklinde, bir izolatla *inhA* gen bölgesinde 15. C→T şeklinde ve bir izolatla *katG* geninde kodon 279'da (GGC→ACC) şeklindedir. Çalışmamızda DNA membran strip testinin, dirençli *M. tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında en yaygın görülen mutasyonların hızlı tespitinde faydalı olabileceği ve uygun tedaviye başlamada zaman kazandıracağı kanısına varılmıştır. Ancak bu testin sık görülme-

yen mutasyonları belirlemedeki kısıtlılığın dolayısıyla rutin klinik laboratuvarlarda geleneksel duyarlılık testleri ile beraber kullanılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, genotype MTBDR testi, direnç, rifampisin, isoniazid.

ABSTRACT

Rapid identification of resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates is quite important for the establishment of early and appropriate therapy. The Genotype MTBDR (Hain Lifescience, Nehren, Germany) is a commercially available DNA strip assay designed for the rapid detection of *rpoB* and *katG* gene mutations in clinical isolates. This study was conducted to determine the mutation types of phenotypically drug resistant 26 *M.tuberculosis* complex clinical isolates [15 isoniazid (INH), 1 rifampin (RMP) and 10 INH and RMP resistant] by Genotype MTBDR (G-MTBDR) DNA strip assay and to compare the diagnostic performance of this test. Sixteen of 25 (64%) INH-resistant and 9 of 11 (81.8%) RMP-resistant clinical isolates were correctly identified with the presence of hybridization in mutation probe or lack of hybridization at least by one of the wild type probes, by G-MTBDR assay. Hybridization with mutation probes was detected in only 5 of the RMP resistant isolates. We observed *rpoB* MUT3 (S531L, Ser→Leu) mutation in 4 and *rpoB* MUT1 (D516V) in one of these isolates. In 56% (14/25) of the INH-resistant isolates, *katG* T1 (S315T1) hybridization pattern was observed at *katG* mutation probe. G-MTBDR assay couldn't identify two of the 11 (18.2%) RMP-resistant isolates and one of these isolates was shown to have a mutation at codon 531 (TCG→GCG) and the other at codon 545 (CTG→ATG), possibly not associated with resistance, by sequence analysis. In four of the eight (8/25; 32%) INH-resistant isolates not identified by G-MTBDR assay, DNA cycle sequencing revealed different nucleotide changes outside the most common mutation zone. One of these were at codon 293 (GCT→ACT) in *katG*, one with dual mutation at 279 (GGC→ACC) in *katG* and at 15th C→T in *inhA* gene, one at 15th C→T in *inhA* gene and one at 279 (GGC→ACC) in *katG* gene region. DNA membrane strip assay can be a useful tool for the rapid detection of resistant *M.tuberculosis* complex isolates and therefore accelerate the initiation of the appropriate treatment. However, due to its restrictions in the determination of relatively rare mutations, this rapid screening test should be used together with conventional susceptibility tests in routine laboratory practices.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, genotype MTBDR assay, resistance, rifampin, isoniazid.

GİRİŞ

Rifampisin (RIF) ve isoniazid (INH) tüberkülozun tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçların içinde yer almaktadır¹. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında ilaç direnci, ilacın hedefi veya ilacı aktive eden enzimleri kodlayan önemli genlerdeki rastgele genetik mutasyonlar ve bireysel mutasyonların dereceli olarak birikmesi nedeniyle gelişmektedir^{2,3}. Bu durum çoklu ilaç dirençli tüberküloz ile sonuçlanmaktadır³. RIF, *rpoB* geninin (kodon 507-533) iyi tanımlanmış bir bölgesi tarafından kodlanan RNA polimerazın beta-alt ünitesini inhibe etmektedir^{1,4-8}. En yaygın aminoasit değişikliği Ser531Leu (%42) ve His526Tyr (%23) olarak bildirilmektedir⁵. Tersine INH direnci bir ya da daha fazla geni etkileyen birçok farklı mutasyon ile ilişkilidir. Bunların başında *katG* (catalase-peroxidase) ve *inhA* (enoyl-acyl carrier protein reductase) gen lokusları gelmekle birlikte, diğerleri *ahpC* (alkyl hydroperoxide reductase) ve *kasA* (β -ketoacyl acyl carrier protein synthase) gibi gen bölgeleridir⁴. INH direnci özellikle suşların yaklaşık %70'inde saptanan *katG* geninde Ser315Thr aminoasit değişikliği ile suşların %15-35'inde saptanan *inhA* regülatör gen bölgesi 15. pozisyonundaki sitozin (C)'in timin (T)'e dönüşmesi (15. C→T) ile ilişkilidir¹.

M.tuberculosis yavaş üreyen bir mikroorganizma olup izolasyon ve geleneksel ilaç duyarlılık testleri en az 3 hafta içinde sonuçlanabilmektedir. Bu sebeple son yıllarda mikobakterilerin tür tanımlamasının ve ilaç duyarlılıklarının hızlı tespiti için birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir^{9,10}. Moleküler teknikler bir iş günü içinde *M.tuberculosis* klinik izolatlarında ilaç direncinin tahmin edilmesini sağlamaktadır². *M.tuberculosis*'in ilaç direncinin moleküler temeli, yeni hızlı tanısal testlerin ortaya çıkarılmasını olanaklı hale getirmiştir. "Genotype MTBDR" DNA strip testi, ticari olarak temin edilen (Hain Lifescience, Nehren, Germany) ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na dayanan hızlı testlerden biri olup, "wild" tipler ile özgül mutasyona uğramış suşların ayırımını yapan bir ters hibridizasyon yöntemidir. Bu test *M.tuberculosis* izolatlarında RIF direncine sebep olan mutasyonların çoğunun ve INH direncine sebep olan mutasyonların büyük bir kısmının tespit edilmesini sağlamaktadır^{2,11}.

Bu çalışmada, fenotipik ilaç duyarlılık testi ile INH ve RIF direnci belirlenen *M.tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında, direnç ile ilişkili mutasyon tiplerinin "Genotype MTBDR (G-MTBDR)" testi ile belirlenmesi ve testin tanısal performansının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik İzolatlar

Çalışmaya, mikobakteri laboratuvarımızda 2003-2006 yılları arasında tanımlanan ve INH direnci saptanan 15, RIF direnci saptanan 1 ve INH + RIF direnci saptanan 10 olmak üzere toplam 26 *M.tuberculosis* kompleksi klinik izolatı dahil edildi. Suşlar, Löwenstein-Jensen (L-J) ve BACTEC 460 TB sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak izole edildi ve tanımlandı. İzolatların RIF, INH, streptomisin ve etambutole karşı in vitro duyarlılıkları BACTEC 460 TB sistemi ile üretici firmanın önerdiği standart prosedüre göre gerçekleştirildi. Ayrıca, RIF ve INH duyarlılık testleri, agar proporsiyon yöntemi ile RIF için 1.0 µg/ml, INH için 0.2 µg/ml ve 1.0 µg/ml kritik son ilaç konsantrasyonlarında standart prosedürlere göre gerçekleştirilerek doğrulandı.

DNA İzolasyonu

L-J besiyerinde üreyen *M.tuberculosis* kolonilerine hızlı DNA izolasyon yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi. Bir öze dolusu koloni, 1 ml steril distile su içinde süspanse edildikten sonra kaynatılarak bakteriler inaktive edildi¹². Bakteri hücreleri 12.000x g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı; pellet, 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su ile karıştırıldı. Karışım 12.000x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant PCR'de kalıp olarak kullanıldı.

G-MTBDR Testi

Test, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. RIF ve INH direncinden sorumlu gen bölgesi PCR ile amplifiye edildi ve reaksiyon tamamlandıktan sonra ürünler özgül oligonükleotidlerle kaplı membran striplerle ters hibridizasyona tabi tutuldu.

Her bir örnek için amplifikasyon reaksiyonu 50 µl'lik PCR hacminde gerçekleştirildi. Karışım; primer-nükleotid karışımından (kit içinde yer alan) 35 µl, 25 mM MgCl₂'den 3 µl, 10x PCR tamponundan 5 µl, 500 U TaqGold polimerazdan (Applied Biosystem, ABD) 0.2 µl ve 5 µl örnek DNA'sından oluşmakta idi. Örnekler "thermal cycler" da (Eppendorf, Mastercycler, Almanya), 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 10 döngü; 95°C'de 30 saniye ve 58°C'de 2 dakika ve ardından 20 ek döngü ile; 95°C'de 25 saniye, 53°C'de 40 saniye ve 70°C'de 40 saniye ve son olarak 70°C'de 8 dakika tutularak amplifikasyon tamamlandı.

Hibridizasyon ve yıkama manuel olarak "Twincubator" hibridizasyon cihazı (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Stripler yıkama plağına yerleştirilmeden önce her bir örneğin PCR ürünü 20 µl denatürasyon solüsyonu (kit ile birlikte temin edildi) ile karıştırılarak plastik plağın kuyucuklarında 5 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 1 ml daha önceden ısıtılmış hibridizasyon tamponu eklendikten sonra membran stripler yerleştirildi. "Twincubator"de 45°C'de 30 dakika bekletilerek hibridizasyon gerçekleştirildi ve sonrasında stripler iki kez yıkandı. Hibridize amplikonların kolorimetrik olarak belirlenmesi için streptavidin-alkalen fosfataz konjugatı ve substrat tamponu eklendi. Son yıkama basamağından sonra stripler kurutuldu ve kağıtlara sabitlendi. Stripler üretici firmanın önerileri doğrultusunda RIF ve INH duyarlılığı veya dirençliliği yönünden değerlendirildi.

G-MTBDR testinde, her bir strip; test prosedürünün doğruluğunu kanıtlayan 5 amplifikasyon ve hibridizasyon kontrolü, 5 *rpoB* "wild" tip (WT) ve 4 mutant probu, 1 *katG* WT ve 2 mutant probundan oluşan toplam 17 prob (reaksiyon zonu) içermektedir. Konjugat kontrol (CC) çizgisi, konjugat bağlanma ve substrat reaksiyonunun etkinliğini göstermektedir. Universal Kontrol (UC) çizgisi, bilinen mikobakterileri ve yüksek G + C içeriğine sahip gram-pozitif bakteri grup üyelerini tespit etmektedir. *M.tuberculosis* kompleksi (TUB) çizgisi, bütün *M.tuberculosis* kompleks üyelerinde oluşan amplikonlar ile hibridize olmaktadır. *rpoB* Uni probu, *rpoB*'ye özgül gen bölgesini ve 5 farklı *rpoB* WT probunu (*rpoB* WT 1-5); 4 *rpoB* mutasyon probu, RIF direncine aracılık eden sırasıyla, D516V, H526Y, H526D ve S531L mutasyonlarını; *katG* Uni probu, *katG*'ye özgül gen bölgesini; *katG* WT probu kodon 315 pozisyonunda INH direnç bölgesini ve iki *katG* mutasyon probu *katG* geninin INH direncinden sorumlu en yaygın mutasyonlarını tespit etmektedir. Bu testte, mutasyonların varlığı, en az bir WT probunda hibridizasyonun olmasıyla ve/veya mutasyon dizilerine komplementer oligonükleotidler ile hibridizasyonun olması ile belirlenir (Resim 1).

Mutasyonların Genotipik Analizi

Çalışmaya dahil edilen bütün örneklerin genotipik karakterizasyonu için, *M.tuberculosis*'in ilaç direncinde etkili olan önemli gen bölgelerine "cycle sequencing" yöntemi ile dizi analizi yapıldı. İlgili hedef gen bölgelerine özgül primerler, Sajduda ve arkadaşlarının¹² çalışmasından seçildi. Dizi reaksiyonu, "thermal cycler" sistemi ile gümüş boyama protokolünün birleşiminden oluşan ve sekans jelinde DNA bantlarını belirlemeye yarayan "Silver Sequence™ DNA Sequencing System (Promega, Q4130)"in kullanılması ile

gerçekleştirildi. Elektroforeze dayanan bu metotta, DNA zincirindeki her bir bazın pozisyonu tek tek belirlendi.

BULGULAR

Çalışmamızda, G-MTBDR testi ile INH'ye dirençli 25 izolatın 16 (%64)'sü doğru olarak tespit edilmiş; INH'ye dirençli izolatlardan birinde hibridizasyon paterni belirlenememiştir (Resim 1, kolon 10). G-MTBDR testi, RIF'a dirençli 11 izolatın 9 (%81.8)'unu doğru olarak tanımlamıştır (Tablo I).

Çalışmada, *rpoB* ve *katG* gen bölgelerindeki mutasyonlar ile ilgili 9 farklı hibridizasyon paterni elde edilmiştir (Tablo II ve Resim 1). G-MTBDR testi ile RIF'a dirençli olarak belirlenen 9 izolat, WT problemlerin en az bir tanesinde hibridizasyon sinyalinin olmaması ile tespit edilmiştir. RIF'a dirençli sadece 5 izolatta mutasyon probunda hibridizasyon gözlenmiş; bunların 4'ünde *rpoB* MUT3 (S531L) ve birinde *rpoB* MUT1 (D516V) mutasyonu gözlenmiştir (Tablo II).

G-MTBDR testi ile INH'ye dirençli bulunan 16 izolatın hiçbirisinde WT probunda hibridizasyona rastlanmamış; bunların 14'ünde *katG* mutasyon probunda *katG* T1 (S315T1) hibridizasyon paterni gözlenmiştir (Tablo II).

Fenotipik testle RIF'a dirençli bulunan 11 izolatın 2 (%18.2)'si ve INH'ye dirençli bulunan 25 izolatın 8 (%32)'i G-MTBDR testi ile bu ilaçlara duyarlı olarak sonuç vermiştir. G-MTBDR testi ile RIF'a duyarlı bulunan 2 izolattan birinde DNA dizi analizi ile kodon 531'de (TCG→GCG) ve daha önceki çalışmalarda bildirilmemiş olan kodon 545'te (CTG→ATG) iki nükleotid değişikliği belirlenmiştir. Diğer izolatla ise direnç ile ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmamıştır. G-MTBDR testi ile INH'ye duyarlı olarak belirlenen 8 izolattan 7'sinde DNA dizi analizi ile *katG* veya *inhA* gen bölgelerinin bir veya her ikisinde ilaç direncine sebep olabilecek nükleotid değişikliklerine rastlanmış, ancak birinde bu bölgelerde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir (Tablo III).

Tablo I. Genotipik ve Fenotipik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

İzolat sayısı (%)	İn vitro duyarlılık testi		G-MTBDR	
	RIF	INH	RIF	INH
9 (34.6)	S	R	S	R
5 (19.2)	S	R	S	S
1 (3.8)	S	R	Değerlendirilemedi	
1 (3.8)	R	S	R	S
5 (19.2)	R	R	R	R
3 (11.5)	R	R	R	S
2 (7.7)	R	R	S	R

RIF: Rifampisin, INH: İzoniazid, S: Duyarlı, R: Dirençli.

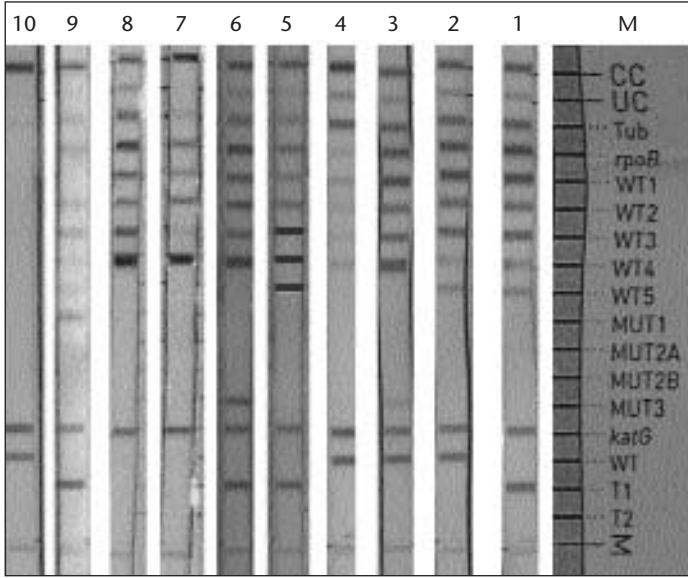
Tablo II. G-MTBDR Test Sonuçları ve *M.tuberculosis* Klinik İzolatlarının Direnç Paterni

İzolat sayısı (%)	MTBDR paterni		Mutasyonların yerleşimi	Direnç	
	Pozitif WT prob	Pozitif Mutant prob		RIF	INH
10 (40)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4,5/ <i>katG</i>	<i>katG</i> T1	S315T1	S	R
5 (20)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4,5/ <i>katG</i> , WT	Yok		S	S
2 (8)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4/ <i>katG</i> , WT	<i>rpoB</i> MUT3	S531L	R	S
2 (8)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4/ <i>katG</i> , WT	Yok		R	S
1 (4)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4/ <i>katG</i>	<i>katG</i> T1	S315T1	R	R
2 (8)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4/ <i>katG</i>	<i>rpoB</i> MUT3/ <i>katG</i> T1	S531L/S315T1	R	R
1 (4)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4,5/ <i>katG</i>	Yok		S	R
1 (4)	<i>rpoB</i> , WT 1,2,3,4/ <i>katG</i>	Yok		R	R
1 (4)	<i>rpoB</i> , WT 2,3,4,5/ <i>katG</i>	<i>rpoB</i> MUT1/ <i>katG</i> T1	D516V/S315T1	R	R

WT: Wild tip, RIF: Rifampisin, INH: İzoniazid, S: Duyarlı, R: Dirençli.

Tablo III. INH'ye Genotipik Olarak Duyarlı, Fenotipik Olarak Dirençli Bulunan İzolatların DNA Dizi Analizi Sonuçları

İzolatlar	Fenotik direnç paterni		G-MTBDR paterni		DNA dizi analizi sonuçları	
	RIF	INH	RIF	INH	<i>katG</i>	<i>inhA</i>
HC-I	S	R	S WT1.2.3.4.5	S WT	293-GCT→ACT	-
NEA-I	S	R	S WT1.2.3.4.5	S WT	315-AGC→ACC	-
EA-I	S	R	S WT1.2.3.4.5.	S WT	279-GGC→ACC	15-C→T
MOS-I	S	R	S WT1.2.3.4.5.	S WT	-	15-C→T
MOK-I	S	R	S WT1.2.3.4.5.	S WT	315-AGC→ACA	-
MSY-RI	R	R	R WT1.2.3.4	S WT	315-AGC→ATC	-
TD-RI	R	R	R WT1.2.3.4.	S WT	279-GGC→ACC	-
AO-RI	R	R	R WT1.2.3.4 MUT3	S WT	-	-



Resim 1. G-MTBDR testi ile saptanan tipik test sonuçları. Kolon M: Hibridizasyon paterni listesi; Kolon 1: WT 1,2,3,4,5/ katG, T1 (INH direnci); Kolon 2: *rpoB*, WT 1,2,3,4,5/katG, WT (RIF ve INH duyarlılığı); Kolon 3: *rpoB*, WT 1,2,3,4, *rpoB* MUT3/katG, WT (RIF direnci); Kolon 4: *rpoB*, WT 1,2,3,4/katG, WT (RIF direnci); Kolon 5: *rpoB*, WT 1,2,3,4/katG, T1 (RIF ve INH direnci); Kolon 6: *rpoB*, WT 1,2,3,4, MUT3/katG, T1 (RIF ve INH direnci); Kolon 7: *rpoB*, WT 1,2,3,4,5/katG (INH direnci); Kolon 8: *rpoB*, WT 1,2,3,4/katG (RIF ve INH direnci); Kolon 9: *rpoB*, WT 2,3,4,5 MUT1/katG, T1 (RIF ve INH direnci); Kolon 10: değerlendirilemeyen strip.

TARTIŞMA

G-MTBDR testi, *rpoB* ve *katG* gen bölgelerindeki nokta mutasyonlarının varlığını tespit edebilen ve multipleks PCR ile bu reaksiyon ürünlerinin özgül DNA dizileri ile kaplı membran stripleri ile ters hibridizasyonuna dayanan hızlı bir moleküler testtir. Bu test *rpoB* geninin 81 baz çift (bp)'lik "hot spot" bölgesinde en sık ortaya çıkan dört farklı mutasyonu (D516V, H526Y, H526D ve S531L) ve *katG* gen bölgesindeki kodon 315'teki iki farklı mutasyonu (S315T1/2) tespit edebilmektedir¹³. Bu test dışında, PCR ve ters hibridizasyon temeline dayanan bir diğer DNA membran strip testi olan "INNO-LiPA Rif. TB" yöntemi de son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır⁸⁻¹⁸. Ancak bu testte sadece *rpoB* gen bölgesindeki mutasyonların varlığı değerlendirilebilmektedir. Bu sebeple G-MTBDR testi, RIF ve INH'ye karşı direnci aynı anda tespit edebilme avantajına sahiptir.

Çalışmamızda, DNA membran strip testi ile RIF'a dirençli 11 izolatta 4 farklı RIF direnç paterni ve INH'ye dirençli 25 izolatta 3 farklı INH direnç paterni tespit edilmiştir (Tablo II). RIF'a dirençli 11 izolattın 5 (%45.4)'ünün mutasyon probunda hibridizasyon taşıdığı, bunlardan 4 (%36.3) tanesinin *rpoB* MUT3 (S531L) mutasyonu ve 1 (%9.1) tanesinin *rpoB* MUT1 (D516V) mutasyonuna sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, 4 (%36.4) izolatta WT hibridizasyon probunda hibridizasyonun gözlenmesi ile ortaya çıkarılan mutasyonlar da mevcut olup, böylece G-MTBDR testi ile izolatların %81.8'i RIF'a dirençli olarak bulunmuştur (Tablo I). INH yönünden ise 25 dirençli izolattın 16 (%64)'sın-

da INH direnci doğru olarak tespit edilmiş olup, bu izolatların 14 (%56)'ünün *katG* T1 mutasyon probunda S315T1 mutasyon tipini taşıdığı saptanmıştır (Tablo II). Bu doğrultuda G-MTBDR testinin, ilerideki laboratuvar çalışmalarımızda, *rpoB* veya *katG* gibi gen bölgelerindeki direnç varlığının kolaylıkla belirlenmesinde kullanışlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak bu testin nadir görülen mutasyon tiplerinin saptanmasında yetersiz kalabileceği göz önünde tutulmaktadır.

Çalışmamızda G-MTBDR testi, RIF'a dirençli izolatların %18.2 (2/11)'sini ve INH'ye dirençli izolatların %32 (8/25)'sini doğru olarak belirleyememiştir. G-MTBDR testi ile RIF'a duyarlı bulunan izolatlardan biri kodon 531'de (TCG→GCG), diğeri ise muhtemelen dirençle ilişkili olmayan kodon 545'te (CTG→ATG) mutasyona sahiptir. Bununla birlikte, kodon 545 mutasyonu daha önceki çalışmalarda belirtilmemiş bir nükleotid değişikliği olup, bu kodon RIF direnci ile ilişkili "hot spot" bölgenin dışında yer almaktadır⁵. Diğer taraftan G-MTBDR testi INH direnci ile ilişkili olarak sadece *rpoB* ve *katG* gen bölgelerindeki en yaygın bazı mutasyonları tespit edebildiğinden, izolatlarımızdaki direncin çalışmada analiz edilen genomik bölgenin dışında başka mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmüştür. G-MTBDR testi ile INH'ye duyarlı bulunan 8 izolatın 4 (%50)'ünde DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyonların en yaygın gözleendiği alanın dışında nükleotid değişikliği belirlenerek bunların birbirinden farklı mutasyon paternine sahip oldukları gösterilmiştir. Bunlardan bir izolatta *katG* geninde kodon 293 (GCT→ACT)'te, bir izolatta ikili mutasyon şeklinde *katG* geninde kodon 279 (GGC→ACC)'da ve *inhA* gen bölgesinde 15. C→T şeklinde, bir izolatta *inhA* gen bölgesinde 15. C→T şeklinde ve bir izolatta *katG* geninde kodon 279 (GGC→ACC)'da bulunduğu gösterilmiştir. DNA dizi analizi yöntemiyle diğer izolatlardan üç tanesinin *katG* geninde kodon 315'te mutasyona (AGC→ACC, AGC→ACA, AGC→ATC) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu üç izolatta G-MTBDR ile kodon 315'te mutasyon tespit edilememesinin, test sırasında amplifikasyon veya hibridizasyon basamaklarındaki sorunlara bağlı olarak ortaya çıkan yalancı negatiflikten kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca diğer bir izolatta, *katG* veya *inhA* gen bölgelerinde dirençle ilişkili herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmamıştır (Tablo III).

Değişik ülkelerde yapılan araştırmalarda, G-MTBDR testi geleneksel ilaç duyarlılık testleriyle karşılaştırıldığında RIF ve INH için uyum oranı sırasıyla, Almanya'da² %99 ve %88; Finlandiya ve Rusya'da¹⁶ %92.3 ve %90.4; İtalya'da¹³ %91.5 ve %67.1; Fransa'da¹ %100 ve %67 ve ülkemizde¹⁹ %95.1 ve %73 olarak bildirilmiştir. Buna karşın çalışmamızda uyum oranı RIF için %81.8 ve INH için %64 olarak tespit edilmiştir (Tablo I). Bu sonuçlara göre çalışmadaki klasik ilaç duyarlılık testi ile G-MTBDR testi arasındaki uyum oranı, İtalya'dan bildirilen test sonuçlarına yakınlık göstermekle birlikte, diğer araştırmacıların sonuçlarından oldukça düşüktür. Bunun nedeninin, incelenen izolat sayısının az olmasından ve sorun yaşadığımız izolatlarla ilgili çalışmanın tekrarlanamamış olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmanın sonuçları bölgemizde, RIF'a dirençli izolatların %45.4 (5/11)'ünde *rpoB* gen bölgesinde mutasyona uğrayan kodon 531 ve kodon 516'nın; INH'a dirençli izolatların ise %56 (14/25)'sında *katG* gen bölgesinde mutasyona uğrayan kodon 315'in di-

rençten sorumlu olduğunu göstermiştir. Ülkemizde sadece Çavuşoğlu ve arkadaşları¹⁹ tarafından G-MTBDR testi ile mutasyon probuna özgül mutasyon oranı, RIF direncinde %53.7 ve INH direncinde %73 olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlar ülkemizin iki farklı bölgedeki proba özgül mutasyon oranının çok yakın olmadığını göstermektedir.

Dünyada en yaygın olarak görülen mutasyonlar, *rpoB* gen gölgesinde kodon 531'de, ardından kodon 526, 516 ve 511'deki mutasyonlar olarak bildirilmektedir¹⁵. En sık mutasyona uğrayan kodonların oranı Almanya'da Hilleman ve arkadaşları² tarafından kodon 531'de %75.7 ve kodon 526'da %13.6 olarak, İtalya'da Miotto ve arkadaşları¹³ tarafından kodon 531'de %63.3 ve kodon 526'da %14.1 olarak, ülkemizde ise Çavuşoğlu ve arkadaşları¹⁹ tarafından kodon 531'de %56.1 ve kodon 526'da %17.1 olarak bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada da kodon 531'de %36.3 ve kodon 526'da %9.1 oranında mutasyonlar gösterilmiştir. Bununla birlikte önemli mutasyonların sıklığı ve RIF direnci ile ilişkisinin, dünyanın farklı bölgelerindeki çeşitli etnik popülasyonlar ve coğrafik bölgeler arasında önemli bir şekilde değişkenlik gösterebileceği ileri sürülmektedir^{7,13}.

Ülkemizde yapılan öncü çalışmalardan birisi olan bu çalışmamızın sonucunda, G-MTBDR testi ile fenotipik duyarlılık test sonuçları arasındaki uyum oranı RIF için %81, INH için %64 olarak belirlenmiştir. Uyum oranının düşük olmasının nedeni, G-MTBDR testinde sadece bazı yaygın mutasyonların hedeflenmesinden ve çalışılan izolat sayısının kısmen az olmasından kaynaklanmış olabilir. G-MTBDR testinin çoklu ilaç direncine sahip klinik izolatlarda en yaygın görülen mutasyonların hızlı taranmasında faydalı olabileceği ve bu sebeple DNA dizi analizinin yapılamadığı rutin klinik laboratuvarlarda standardize edilerek kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak yine de bu hızlı genotipik testin geleneksel ilaç duyarlılık testlerinin yerine geçemeyeceği ve test sonuçlarının mutlaka fenotipik ilaç duyarlılık test sonuçları ile doğrulanması gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. 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: 3659-64.
2. 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: 3699-703.
3. Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2218-25.
4. Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. Tuber Lung Dis 2000; 80: 47-56.
5. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis 1998; 79: 3-29.
6. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2001; 2: 164-8.
7. Ahmad S, Mustafa AS. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis. Kuwait Med J 2001; 33: 120-126.

8. Ahmad S, Mokaddas E. The occurrence of rare *rpoB* mutations in rifampicin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 205-12.
9. Simon S, Listiawan I. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A molecular perspective. *Madjalah Kedokt Indones* 2003; 4: 26-35.
10. Ozturk CE, Sanic A, Kaya D, Ceyhan I. Molecular analysis of isoniazid, rifampin and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Duzce, Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 309-12.
11. Bang D, Andersen ÅB, Thomsen VØ. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2605-08.
12. Sajduda A, Brzostek A, Poplawska M, et al. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2425-31.
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 tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2485-91.
14. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2093-8.
15. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4435-8.
16. Makinen J, Marttila HJ, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 350-2.
17. Sachan AS, Gupta RK, Katoch VM, Mishra K, Jakhmola P. Detection of rifampicin resistant mutant gene in *Mycobacterium tuberculosis* by line probe assay. *Ind J Tub* 2001; 49: 209-11.
18. Lemus D, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 130-3.
19. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyluer I. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2338-42.