

İsoniazide Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarında Minimal İnhibitör Konsantrasyonun ve Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi

Defining of Gene Mutations and Minimal Inhibitory Concentrations in Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates

Esra YILDIRIM¹, Meltem UZUN¹

¹ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 21970).

Geliş Tarihi (Received): 14.04.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.08.2017

ÖZ

Tüberküloz gelişmiş tanı ve tedavi rejimlerine rağmen, tüm dünyada halen çok önemli bir sağlık sorunudur. Özellikle son yıllarda artış gösteren dirençli tüberküloz, küresel bir problemdir ve tüberküloz ile yapılan mücadele çalışmalarını engellemektedir. Bu nedenle tedavide etkenin erken tanısı ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi önemlidir. İzolatların direnç profilleri ve direnç neden olan gen mutasyonları ile ilgili çalışmalar epidemiyolojik amaçla yapılmakta ve izolatların ülkeler bazında mutasyon bölgeleri araştırılmaktadır. Bu çalışmada izoniazid (INH)'in minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK)'nin belirlenmesi ve direnç genlerindeki mutasyonlarla MİK değerleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ülkemizde yapılan bu ilk çalışmada klinik örneklerden BACTEC 460 TB ile izole edilen ve duyarlılığı yapılan 25 monorezistan, 25 çok ilaca dirençli (ÇİD) toplam 50 *Mycobacterium tuberculosis* izolatında, GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience GMBH, Nehren, Almanya) ve antibiyotik gradiyent test (E-test AB BIODISK, Solna, İsveç) yöntemleri ile INH direncine neden olan gen mutasyonları ve bu mutasyonların MİK ile ilişkisi araştırılmıştır. GenoType MTBDRplus'ın uygulanan standart duyarlılık ile uyumu yalnız INH'ye dirençli olan izolatlarda %88, ÇİD izolatlarda %80 ve tüm izolatlarda %84 olarak bulunmuştur. Tek başına INH'ye dirençli olan izolatlarda mutasyon en sık (12 izolat, %54.5) *inhA* C15T promotör bölgede belirlenmiş ancak INH için MİK > 256 µg/ml olan farklı iki izolatta mutasyon *katG* S315T kodonunda saptanmıştır. ÇİD izolatlarda; mutasyon en sık (14 izolat, %56)

İletişim (Correspondence): MSc. Bio. Esra Yıldırım, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa 34093, İstanbul, Türkiye
Tel (Phone): +90 555 572 3194, **E-posta (E-mail):** eyildirim88@hotmail.com

katG S315T kodonunda belirlenmiş, 10 izolatta INH için MİK değeri > 256 µg/ml olarak saptanmış ve MİK ile mutasyon bölgesi arasındaki ilişki incelendiğinde, izolatların 5 (%50)'ünde *katG* S315T kodonunda, 3 (%30)'ünde *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotör bölgede, 2 (%20)'sinde *inhA* C15T promotör bölgede mutasyon görülmüştür. Tüm izolatlar incelendiğinde en sık mutasyon (24 izolat, %48) *katG* S315T kodonunda bulunmuş, 12 (%24) izolatta INH için MİK > 256 µg/ml olarak belirlenmiş ve INH için yüksek MİK değerine sahip olan bu izolatlar da en sık mutasyon *katG* S315T kodonunda görülmüştür. Çalışmanın sonucu değerlendirildiğinde *katG* S315T mutasyonu olan izolatlarda INH için MİK değerinin yüksek olduğu kanısına varılmış ve bu düşüncüyü desteklemek için ülkemizde çok sayıda çalışma yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium*; Genotype MTBDRplus; E-test, izoniazid; direnç.

ABSTRACT

Tuberculosis is a very important disease all over the world despite the advanced diagnostic and treatment regimens. Resistant tuberculosis, which has increased in recent years in particular, is a global problem and prevents the fight against tuberculosis. For this reason, it is important to determine the etiologic agent early and its sensitivity against antituberculosis drugs. Resistance profiles of the isolates and the gene mutations causing resistance are determined for epidemiological purposes and mutation regions of the isolates are being investigated on the basis of countries. The aim of our study was to determine the minimal inhibitor concentration (MIC) of isoniazid (INH) and to investigate the relationship between mutations in resistance genes and MIC values. For this purpose, 25 isoniazid (INH) monoresistant and 25 multidrug resistant (MDR), in total 50 clinical isolates were used and gene mutations causing INH resistance and the relationship of these mutations with minimal inhibitor concentrations (MICs) were searched by GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience GMBH, Nehren, Germany) and antibiotic gradient test (E-test, AB BIODISK, Solna, Sweden) methods. The concordance of GenoType MTBDRplus and antibiotic gradient test methods for INH sensitivity, was 88% in INH monoresistant isolates, 80% in MDR isolates and 84% in all isolates. The most frequent mutation zone in INH monoresistant isolates was *inhA* C15T promotör zone (12 isolates, 54.5%) however, MIC of INH was > 256 µg/ml in two isolates and mutation in *katG* S315T was observed in both of these isolates. The most frequent mutation zone in MDR isolates was *katG* S315T (14 isolates, 56%) codon. MIC of INH was > 256 µg/ml in 10 isolates and mutation was observed in *katG* S315T codon in 5 (50%) isolates, in *katG* S315T codon and *inhA* C15T promotör zone in 3 (30%) isolates and in *inhA* promotör zone in 2 (20%) isolates, respectively. When all the isolates were analyzed, the most frequent mutation was found in *katG* S315T codon (24 isolates, 48%), MIC of INH was > 256 µg/ml among 12 isolates and the most frequent mutation zone in these isolates which have high MIC for INH was *katG* S315T codon. In conclusion, the results of this study have shown that the value of MICs for INH is high in isolates with *katG* S315T mutation, nevertheless, further investigations are needed to support this result.

Keywords: *Mycobacterium*; Genotype MTBDRplus; E-test, izoniazid; resistance.

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2016 yılı raporuna göre; 2015 yılında, 10.4 milyon yeni tüberküloz olgusu saptanmış ve 1.4 milyon insan tüberkülozdan dolayı hayatını kaybetmiştir. Tüberküloz insidansı ve mortalitesi, önceki yıllarda yayınlanmış oranlarla benzerlik göstermekle birlikte, 2000-2015 yılları arasında insidansın yılda %2 oranında, mortalitenin ise aynı dönemde yılda %3.3 oranında düştüğü görülmüştür. Küresel olguların %61'i Asya Bölgesi, %26'sı Afrika Bölgesi, %7'si Doğu Akdeniz Bölgesi, %3'ü Avrupa Bölgesi ve %3'ü Amerika Bölgesinde görülmüştür. Olgu sayısı en fazla olan ülkeler; Hindistan, Endonezya, Çin, Nijerya, Pakistan ve Güney Afrika olarak bildirilmiştir¹.

Dünya genelinde birçok ülkede tüberkülozun yeniden artışında, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) olgularında meydana gelen artış, çok ilaca dirençli (ÇİD) ve 2005 yılında Afrika'da yaygın ilaca dirençli izolatların ortaya çıkması, tedavideki uyumsuzluklar, hasta yönetimindeki hatalar, gözetimsiz tedavi, sınırlı ya da kesintili ilaç temini, standardın altındaki ilaçların kullanımı ve kötü tüberküloz kontrol programları rol oynamıştır^{2,3}.

Tüberkülozun dünya genelinde önemli bir sorun olarak devam etmesi, beraberinde tedavide yer alan hızlı tanı, etkili tedavi, temas etmiş kişilerin taramasının yapılması, bulaşın önlenmesi gibi anahtar faktörlerin de önemini artırmıştır. Son 20 yılda geliştirilen moleküler yöntemlerle başta rifampin (RIF) olmak üzere çeşitli antitüberküloz ilaçlara karşı direnç çok kısa sürede saptanmakta ve kısa sürede tedaviye başlanmaktadır. Aynı zamanda bu yöntemler sayesinde birçok ülkede hangi gen mutasyonlarının baskın olduğu araştırılarak epidemiyolojik veriler elde edilmektedir^{4,5}. Bu çalışmada, izoniazid (INH) monorezistan ve ÇİD izolatlarda INH'nin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK)'nun belirlenmesi ve direnç genlerindeki mutasyonlarla MİK değerleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı (No: 2118/2011) alındı.

Bakteri İzolatları

Çalışmada kullanılan izolatlar Ocak 2001-Aralık 2011 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden BACTEC 460 TB sistemi ile izole edildi ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı yine bu sistemle araştırılarak INH'ye dirençli olduğu belirlendi. Yirmi beşi sadece INH'ye dirençli, 25'i ÇİD olmak üzere toplam 50 *Mycobacterium tuberculosis* izolatı ve 35822 ATCC standart suşu çalışma kapsamına alındı.

İlaç Direncinin Moleküler Yöntemle Saptanması

INH direncine neden olan mutasyonlar GenoType MTBDR_{plus} (Hain Lifescience GMBH, Nehren, Almanya) kiti ile araştırıldı. DNA izolasyonu, amplifikasyonu, hibridizasyonu ve sonuçların yorumlanması üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı⁶.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi için Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde üremiş olan ortalama iki haftalık taze kültür kullanıldı. INH için MİK değerleri %10 oleik asit dekstroz katalaz (OADC) ilaveli Middlebrook 7H11 agarda antibiyotik gradiyent test (E-test AB BIODISK, Solna, İsveç) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ortalama 5-10 günlük inkübasyon sonrası üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin, E-test şeridini kestiği nokta MİK değeri olarak saptandı ve sınır değer > 0.2 µg/ml olarak kabul edildi⁷.

BULGULAR

İzolatlarda INH direncine neden olan mutasyon bölgelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan GenoType MTBDR_{plus} (HAIN Lifescience GmbH, Almanya) ile; yalnız INH'ye dirençli 25 izolatın 22 (%88)'sinde mutasyon saptanmış, 3 (%12) izolatta mutasyon saptanamamıştır. Yirmi iki izolatın 12 (%54.5)'sinde direncin *inhA* C15T promotor bölgede, 9 (%40.9)'unda *katG* S315T1 kodonunda, 1 (%4.5)'inde *katG* S315T2 kodonunda meydana geldiği görülmüştür. Çalışmada her iki gen bölgesinde (*katG* + *inhA*) aynı anda meydana gelen mutasyondan kaynaklanan direnç saptanamamıştır (Tablo I).

ÇİD izolatlar değerlendirildiğinde 25 izolatın 20 (%80)'si GenoType MTBDR_{plus} ile de ÇİD olarak saptanmış, ancak 5 (%20) izolat ÇİD profili vermemiştir. Bu izolatların sadece INH için mutasyon bölgeleri gözönüne alındığında 25 izolatın 14 (%56)'ünde *katG* S315T1 kodonunda, 3 (%12)'ünde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon saptanmıştır. ÇİD-tüberküloz profili vermeyen beş izolatın ise 1 (%4)'inde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon belirlenirken, 4 (%16)'ünde mutasyon görülmemiştir (Tablo II).

Tüm izolatlarda *katG* ve *inhA* genlerinin dirençten sorumlu olma durumları incelendiğinde; 50 izolatın 24 (%48)'ünde dirençten *katG* S315T kodonundaki, 16 (%32)'sında *inhA* C15T promotor bölgedeki, 3 (%6)'ünde *inhA* C15T promotor bölge ve *katG* S315T kodonundaki mutasyonların sorumlu olduğu belirlenmiş ve izolatların 7 (%14)'sinde *inhA* ve *katG* genlerinde mutasyon saptanamamıştır (Tablo I,II).

E-test yöntemi ile yapılan değerlendirmede sınır değer (MİK > 0.2 µg/ml) dikkate alındığında 50 izolatın 47 (%94)'sinin INH'ye dirençli, 3 (%6)'ünün duyarlı olduğu saptanmıştır. Dirençli izolatlarda INH için MİK 0.25-64 µg/ml aralığında ve > 256 µg/ml olarak belirlenmiştir. İzolatlar tek tek değerlendirildiğinde 12 (%24) izolatta INH için MİK değeri > 256 µg/ml, 3 (%6) izolatta 64 µg/ml, 4 (%8) izolatta 32 µg/ml, 1 (%2) izolatta 16 µg/ml, 2 (%4) izolatta 12 µg/ml, 1 (%2) izolatta 6 µg/ml, 3 (%6) izolatta 4 µg/ml, 1 (%2) izolatta 3 µg/ml, 1 (%2) izolatta 2 µg/ml, 1 (%2) izolatta 1.5 µg/ml, 5 (%10) izolatta 1 µg/ml, 3 (%6) izolatta 0.75 µg/ml, 7 (%14) izolatta 0.50 µg/ml ve 3 (%6) izolatta 0.25 µg/ml olarak saptanmıştır. E-test yöntemiyle duyarlı bulunan 3 (%6) izolatın ikisinde INH için MİK değeri < 0.016 µg/ml ve birinde 0.125 µg/ml bulunmuştur (Tablo I,II).

Belirlenen mutasyonlarla MİK değerleri arasındaki ilişki incelendiğinde, yalnız INH'ye dirençli olan izolatlar arasında INH için MİK değeri 0.25-2.0 µg/ml arasında olan 13 izolatın sekizinde mutasyon *inhA* C15T, ikisinde *katG* S315T kodonunda belirlenmiş ve üç izolatta mutasyon bulunamamıştır. INH için MİK değeri 3.0-24 µg/ml arasında olan dört izolatın ikisinde mutasyon *katG* S315T ve ikisinde *inhA* C15T promotor bölgede, 32 - >256 µg/ml olan beş izolatta ise sadece *katG* S315T kodonunda mutasyon saptanmıştır. Antibiyotik gradiyent test yöntemi ile duyarlı olduğu belirlenen üç izolatın ikisinde (MİK < 0.016 µg/ml) *inhA* C15T promotor bölgede ve birinde (MİK= 0.125 µg/ml) *katG* S315T kodonunda mutasyon belirlenmiştir (Tablo I,II).

Tablo 1. Yalnız INH'ye Dirençli Olan İzolatların Yöntemlere Göre Direnç Profilleri

İzolatlar (n= 25)	GenoType MTBDRplus			Antibiyotik gradiyent test		
	BACTEC 460 TB	Duyarlı/ Dirençli	Mutasyon bandı	MİK değeri (µg/ml)	S*	R*
1. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	64	-	+
2. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	0.50	-	+
3. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	0.50	-	+
4. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	1	-	+
5. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	> 256	-	+
6. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	0.125	+	-
7. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1 inhA C15T	4	-	+
8. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T2	64	-	+
9. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	0.75	-	+
10. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	0.50	-	+
11. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	0.50	-	+
12. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	1	-	+
13. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	< 0.016	+	-

İzolatlar (n= 25)	GenoType MTBDRplus			Antibiyotik gradiyent test		
	BACTEC 460 TB	Duyarlı/ Dirençli	Mutasyon bandı	MİK değeri (µg/ml)	S*	R*
14. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	0.75	-	+
15. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	12	-	+
16. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	0.50	-	+
17. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	1	-	+
18. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	3	-	+
19. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	> 256	-	+
20. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	4	-	+
21. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	64	-	+
22. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	0.75	-	+
23. izolat	Dirençli	Dirençli	inhA C15T	< 0.016	+	-
24. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	0.50	-	+
25. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1-	> 256	-	+

* R: Dirençli, S: Duyarlı.

Tablo II. ÇİD İzolatların Yöntemlere Göre Direnç Profilleri												
İzolatlar (n= 25)	GenoType MTBDRplus				Antibiyotik gradiyent test				R*			
	BACTEC 460 TB	Duyarlı/ Dirençli	Mutasyon bandı	MIK değeri (µg/ml)	S*	R*	BACTEC 460 TB	Duyarlı/ Dirençli		Mutasyon bandı	MIK değeri (µg/ml)	S*
1. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>inhA</i> C15T	> 256	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1 <i>inhA</i> C15T	> 256	-	+
2. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	> 256	-	+	Dirençli	Duyarlı	-	1	-	+
3. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	0.25	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+
4. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	4	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	> 256	-	+
5. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	12	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>inhA</i> C15T	6	-	+
6. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	16	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+
7. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1 <i>inhA</i> C15T	> 256	-	+	Dirençli	Duyarlı	-	1.5	-	+
8. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	0.50	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	0.25	-	+
9. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	> 256	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+
10. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>inhA</i> C15T	> 256	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1 <i>inhA</i> C15T	> 256	-	+
11. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	> 256	-	+	Dirençli	Duyarlı	-	1	-	+
12. izolat	Dirençli	Dirençli	-	0.25	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+
13. izolat	Dirençli	Duyarlı	-	4	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	> 256	-	+
14. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	12	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>inhA</i> C15T	6	-	+
15. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	16	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+
16. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1 <i>inhA</i> C15T	> 256	-	+	Dirençli	Duyarlı	-	1.5	-	+
17. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	0.50	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	0.25	-	+
18. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	> 256	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+
19. izolat	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	> 256	-	+	Dirençli	Dirençli	<i>katG</i> S315T1	32	-	+

Tablo II. ÇİD İzolatların Yöntemlere Göre Direnç Profilleri (Devamı)

İzolatlar (n= 25)	GenoType MTBDRplus			Antibiyotik gradiyent test			GenoType MTBDRplus	Antibiyotik gradiyent test				
	BACTEC 460 TB	Duyarlı/ Dirençli	Mutasyon bandı	MİK değeri (µg/ml)	S*	R*		BACTEC 460 TB	Duyarlı/ Dirençli	Mutasyon bandı	MİK değeri (µg/ml)	S*
20. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	2	-	+	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	> 256	-	+
21. izolat	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	> 256	-	+	Dirençli	Dirençli	katG inhA C15T	> 256	-	+
22. izolat	Dirençli	Dirençli	Dirençli	0.25	-	+	Dirençli	Dirençli	katG S315T1	> 256	-	+

* R: Dirençli, S: Duyarlı.

Çizolatlar arasında, INH için MİK değeri 0.25-2.0 µg/ml arasında olan yedi izolatin üçünde *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon saptanmamış, birinde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon ve üçünde *katG* S315T kodonunda mutasyon görülmüştür. INH için MİK değeri 3.0-24 µg/ml arasında olan dört izolatin ikisinde *katG* S315T kodonunda, birinde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon saptanmıştır. Bir izolatta ise mutasyon belirlenmemiştir. Geriye kalan 14 izolat için INH'nin MİK değeri 32 - >256 µg/ml arasında saptanmış ve bu izolatların dokuzunda *katG* S315T kodonunda, üçünde *katG* S315T kodonu ve *inhA* C15T promotor bölgede ve ikisinde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon görülmüştür (Tablo I,II).

Tüm izolatlara için sonuçlar değerlendirildiğinde; INH için çok yüksek MİK değeri veren (12 - >256 µg/ml) altı monorezistan izolatin 4 (%66.6)'ünde *katG* S315T1, 1 w(%16.7)'inde *katG* S315T2 kodonunda ve 1 (%16.7)'inde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon saptanmıştır. ÇİD izolatlar içerisinde INH için 12 - >256 µg/ml arasında MİK değeri belirlenen 16 izolatin 11 (%68.75)'inde *katG* S315T kodonunda, 3 (%18.75)'ünde *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotor bölgede birlikte ve 2 (%12.75)'sinde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon belirlenmiştir. INH için MİK değeri > 256 µg/ml olan toplam 12 izolatin 7 (%58.3)'sinde *katG* S315T kodonunda, 3 (%25)'ünde *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotor bölgede, 2 (%16.6)'sinde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon görülmüştür (Tablo I,II).

TARTIŞMA

INH direncinin moleküler yöntemlerle saptandığı çalışmaların duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %92-100 ve %85-100 arasında değişiklik göstermektedir. Raveendran ve arkadaşları⁸ GenoType MTBDR*plus* yöntemini kullanarak yaptıkları duyarlılık çalışmasında duyarlılık ve özgüllüğü INH için sırasıyla %91.9 ve %98.4 saptarken, Tessema ve arkadaşları⁹ GenoType MTBDR*plus*'ın direnç saptamada duyarlılık ve özgüllüğünü INH için %92 ve %99 olarak bulmuşlardır. Tukvadze ve arkadaşları¹⁰ ise duyarlılık ve özgüllüğü INH için %89.8 ve %99.3 olarak rapor etmişlerdir. ÇİD'in saptanmasında GenoType MTBDR*plus*'ın performansını araştıran Asencios ve arkadaşları¹¹ ÇİD izolatlar için duyarlılık değerini %95.24 olarak saptarken, Tukvadze ve arkadaşları¹⁰ ÇİD izolatlarda duyarlılık ve özgüllüğü %95.6 ve %98.5 olarak belirlemişler, Anek-Vorapong ve arkadaşları¹² GenoType MTBDR*plus* yönteminin ÇİD izolatlarda duyarlılık ve özgüllüğünü %94.4 ve %100 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda BACTEC 460 TB yöntemi ile yalnız INH'ye dirençli olduğu belirlenen 25 izolatin 22 (%88)'si GenoType MTBDR*plus* ile INH'ye dirençli, 3 (%12)'ü INH'ye duyarlı bulunmuştur. Yirmi beş ÇİD-tüberküloz izolatinin ise 20 (%80)'si ÇİD olarak saptanmış ancak 5 (%20) izolat ÇİD profili vermemiştir. Tüm izolatlar incelendiğinde 43 (%86)'ü GenoType MTBDR*plus* ile INH'ye dirençli 7 (%14)'si INH'ye duyarlı bulunmuştur. İki yöntem arasındaki uyum yalnız INH'ye dirençli olan izolatlarda %88, ÇİD izolatlarda %80 ve tüm izolatlarda %84 olarak saptanmıştır. Yöntemler arasındaki uyum diğer

çalışmalara oranla daha düşük bulunmakla birlikte bu çalışmadaki bulgularla uyumlu sonuçlara da rastlanmıştır. Yöntem açısından uyumsuzlukların amplifikasyon aşamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Amplifikasyon aşamasında DNA'nın yeterli miktarda çoğaltılmamasından dolayı duyarlılık da doğru orantılı olarak azalmaktadır. Cauwelaert ve arkadaşlarının¹³ yaptıkları çalışmanın sonuçları bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Buna göre; mutasyon belirlenemeyen izolatlarda direncin GenoType MTBDR_{plus} kiti ile saptanamayan gen bölgeleriyle ilgili olduğu ve yapılacak olan dizi analizi çalışmasıyla bu bölgelerin belirlenebileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda INH direncinin ortaya çıkmasında *katG* genindeki mutasyonların dirençten sorumlu olma oranının diğer gen bölgelerine kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmektedir^{14,15}. Abate ve arkadaşları¹⁶ GenoType MTBDR_{plus} ile yaptıkları çalışmada INH'ye dirençli izolatlarda *katG* S315T kodonunun dirençten %96.6 oranında sorumlu olduğunu bildirirken, Cauwelaert ve arkadaşları¹³ bu oranı %72.7, Causse ve arkadaşları¹⁷ ise %65.7 olarak rapor etmişlerdir.

ÇİD izolatlar ile yapılan çalışmalarda *katG* geninin dirençten sorumlu olma yüzdesinin benzer oranlarda olduğu görülmüştür. Huyen ve arkadaşlarının¹⁸ ÇİD-tüberküloz izolatlarıyla GenoType MTBDR_{plus}'u kullanarak yaptıkları validasyon çalışmasında 56 ÇİD-tüberküloz izolatının 38 (%76)'inde *katG* S315T kodonunda, 8 (%14.2)'inde *inhA* C15T promotor bölgede, 7 (%12.5)'sinde *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotor bölgede birlikte mutasyon saptanırken, Evans ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında 82 ÇİD-tüberküloz izolatının 44 (%53.6)'ünde *katG* S315T kodonunda, 21 (%25.6)'inde *inhA* C15T promotor bölgede, 10 (%12.1)'unda *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotor bölgede birlikte mutasyon olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda GenoType MTBDR_{plus} ile tek başına INH'ye dirençli olan 25 izolatın 22 (%88)'sinde mutasyon saptanmış, 3 (%12)'ünde mutasyon saptanmamıştır. Yirmi iki izolatın 12 (%54.5)'sinde mutasyonun *inhA* C15T promotor bölgede, 10 (%45.5)'unda *katG* S315T kodonunda meydana geldiği görülmüştür. Çalışmamızda tek başına INH'ye dirençli olan izolatlarda *inhA* geninde *katG*'ye oranla daha fazla mutasyon saptanmıştır. Bunun nedeninin türlerde meydana gelen mutasyonların ülkeler arası farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bazı izolatların konvansiyonel yöntemle ilaca dirençli bulunmasına karşın GenoType MTBDR_{plus} ile duyarlı bulunmasının ise türlerde görülen ve kit ile saptanamayan nadir mutasyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. ÇİD-tüberküloz olduğu bilinen 25 izolatın ise 14 (%56)'ünde *katG* S315T kodonunda, 4 (%16)'ünde *inhA* C15T promotor bölgede, 3 (%12)'ünde *katG* S315T kodonunda ve *inhA* C15T promotor bölgede birlikte mutasyon saptanmış, 4 (%16) izolatta her iki bölgede mutasyon saptanmamıştır. Çalışma sonuçlarımızın diğer çalışma sonuçlarıyla uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Tüm izolatlar incelendiğinde 50 izolatın (25 ÇİD + 25 sadece INH'ye dirençli) 24 (%48)'ünde *katG* S315T kodonunda, 16 (%32)'sında *inhA* C15T promotor bölgede, 3 (%6)'ünde *inhA* C15T promotor bölge ve *katG* S315T kodonunda birlikte mutasyon olduğu belirlenmiş ve izolatların 7 (%14)'sinde *inhA* ve

katG genlerinde mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda *katG* geninin dirençten sorumlu olma oranı diğer çalışma sonuçlarına göre daha düşük bulunmuştur. Bu sonucun çalışmamızda kullanılan izolat sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tolani ve arkadaşlarının²⁰ 89 INH'ye dirençli izolat, Farooqi ve arkadaşlarının²¹ 108 INH'ye dirençli izolat ile yaptıkları çalışmalarda da *katG* geninin dirençten sorumlu olma sıklığı bizim çalışmamızda olduğu gibi, diğer çalışmalara göre daha düşük saptanmıştır. Çalışmamızda ayrıca ÇİD-tüberküloz izolatlarının *katG* genindeki mutasyon görülme sıklığının monorezistan izolatlardakine oranla daha fazla olduğu (ÇİD-tüberküloz izolatlar için oran %68, monorezistan izolatlar için oran %40) görülmüştür. Singhal ve arkadaşlarının²² yaptıkları çalışma da bu sonucu destekler niteliktedir.

Antibiyotik gradiyent test yönteminin antimikobakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığının saptanmasında kullanımdaki diğer yöntemlerle uyumunun %85 ile %100 arasında olduğu görülmüştür. Karabulut ve arkadaşlarının²³ yaptığı duyarlılık çalışmasında antibiyotik gradiyent test yönteminin diğer yöntemlerle uyumunun %98 olduğu görülmüş, Muralidhar ve arkadaşlarının²⁴ çalışmasında bu oran %87 olarak belirlenmiş, Sanchez ve arkadaşlarının²⁵ çalışmasında ise uyum oranının %90 olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda BACTEC 460 TB yöntemi ile INH'ye dirençli olduğu belirlenen 50 izolatın 47 (%94)'si antibiyotik gradiyent test yöntemiyle de dirençli bulunmuş, 3 (%6) izolat ise antibiyotik gradiyent test yöntemiyle duyarlı olarak saptanmıştır. Bu izolatlarda INH için MİK değerleri sırasıyla < 0.016 µg/ml, < 0.016 µg/ml ve 0.125 µg/ml olarak belirlenmiştir. INH'ye duyarlı bulunan üç izolat GenoType MTBDR*plus* ile incelendiğinde dirençli olarak belirlenmiştir. E-test ile sonucun farklı tespit edilmesinin, izolatta bulunan mikobakteri miktarının azlığından veya E-test ile MİK değerlerinin BACTEC 460 TB'nin sınır değerine yakın olması nedeniyle (0.1 µg/ml) olabileceği düşünülmüştür. Bu varsayım Varma ve arkadaşlarının²⁶ 40 adet *M.tuberculosis* izolatı ile yaptıkları karşılaştırmalı duyarlılık çalışmasıyla da desteklenmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilerin diğer çalışma sonuçlarına yakın olduğu görülmüş ve antibiyotik gradiyent testinin duyarlılık için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda özellikle yüksek seviye INH direncinden *katG* geninin 315. kodonunda meydana gelen değişimlerin sorumlu olduğu belirtilmektedir. Düşük seviye dirençten ise *inhA* promotor bölgedeki mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır^{27,28}.

Kambli ve arkadaşları¹⁴ INH için MİK değeri 0.5-1.0 µg/ml olan 16 izolatta *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon, MİK değeri 3 ya da ≥ 10 µg/ml olan 50 izolatta *katG* S315T kodonunda mutasyon ve 16'sında *inhA* C15T promotor bölge ve *katG* S315T kodonunda birlikte mutasyon saptamıştır. Springer ve arkadaşları²⁹ INH için MİK değeri ≥ 0.1 ve < 4.0 µg/ml olan 13 izolatın 11 (%84.6)'inde *inhA* C15T promotor bölgede mutasyon saptamış, 2 (%15.3)'sinde mutasyon saptamamıştır. MİK değeri ≥ 0.1 µg/ml olan 31 izolatın 5 (%16.1)'inde *inhA* C15T ve 1 (%3.2)'inde *inhA* T8A promotor bölgede, 23 (%74.1)'ünde *katG* S315T kodonunda mutasyon saptamış ve 2 (%6.4)'sinde mutasyon

saptamamıştır. Jagielski ve arkadaşları³⁰ 46 ÇİD-tüberküloz izolatının 43 (%93)'ünde *katG* gen bölgesinde mutasyon saptamıştır. *katG* gen bölgesindeki mutasyonların 34 (%74)'ünün *katG* S315T kodonunda meydana geldiği görülmüş ve izolatlarda MİK değerinin 0.1-100 µg/ml arasında olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda INH'ye dirençli 50 izolatta INH'nin MİK değeri antibiyotik gradiyent test yöntemiyle belirlenmiştir. MİK değeri 0.25-2.0 µg/ml arasında olan 20 izolatın 9 (%45)'unda *inhA* C15T'de, 5 (%25)'inde *katG* S315T'de mutasyon saptanmış, 6 (%30)'sında mutasyon saptanmamıştır. MİK değeri 3.0-24 µg/ml arasında olan sekiz izolatın 4 (%50)'ünde *katG* S315T'de, 3 (%37.5)'ünde *inhA* C15T'de mutasyon saptanmış, 1 (%12.5)'inde mutasyon saptanmamıştır. MİK değeri 32-256 µg/ml olan 19 izolatın ise 14 (%73.6)'ünde *katG* S315T'de, 2 (%10.5)'sinde *inhA* C15T'de ve 3 (%15.7)'ünde *katG* S315T ve *inhA* C15T'de birlikte mutasyon saptanmıştır. Antibiyotik gradiyent test yöntemiyle duyarlı olduğu belirlenen üç izolatın ikisinde (MİK < 0.016 µg/ml) *inhA* C15T promotör bölgede ve birinde (MİK= 0.125 µg/ml) *katG* S315T kodonunda mutasyon belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarımızda elde edilen veriler değerlendirildiğinde diğer çalışma sonuçlarında olduğu gibi yüksek seviye INH direncinden *katG* geninin S315T kodonundaki, düşük seviye INH direncinden ise *inhA* geninin C15T bölgesindeki mutasyonların sorumlu olduğu görülmüştür.

Dünya genelindeki bulgularla uyumlu sonuçlar elde edilen bu çalışmada *katG* mutasyonu olan izolatlarda INH için MİK değerinin yüksek olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak bu düşüncüyü desteklemek için çok daha fazla sayıda izolat içeren çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. WHO. Global Tuberculosis Reports, 2016. WHO/HTM/TB/2016.13.
2. WHO. Treatment of tuberculosis guidelines. 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.420.
3. National Tuberculosis Management Guidelines 2014. TB DOTS Strategy Coordination, National Department of Health. Department of Health, Republic of South Africa 2014. Fishwicks PTA.
4. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 836-71.
5. Caws M, Drobniewski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. Ann N Y Acad Sci 2001; 953: 138-45.
6. Hain Lifescience GenoType MTBDR_{plus} Instructions for use IFU-304A-02 (). Şubat, 2012. Erişim 25.06.2012, file:///C:/Users/lenovo/Downloads/MTBDR_{plus}V2_0212_304A-02-02%20(1).pdf
7. AB Biodisk E-test technical guide no.6 Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for research use only. 2007.
8. Raveendran R, Wattal C, Oberoi JK, Goel N, Datta S, Prasad KJ. Utility of GenoType MTBDR_{plus} assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. Indian J Med Microbiol 2012; 30(1): 58-63.
9. Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. BMC Infect Dis 2012; 12: 37.

10. Tukvadze N, Kempker RR, Kalandadze I, et al. Use of molecular diagnostic test in AFB smear positive tuberculosis suspects greatly reduces time to detection of multidrug resistant tuberculosis. *PLoS One* 2012; 7(2): e31563.
11. Asencios L, Galarza M, Quispe N, et al. Molecular test GenoType MTBDRplus, an alternative to rapid detection of multidrug resistance tuberculosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2012; 29(1): 92-8.
12. Anek-vorapong R, Sinthuwattanawibool C, Podewils LJ, et al. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 123.
13. Cauwelaert N, Ramarokoto H, Ravololonandriana P, Richard V, Rasolofo V. DNA extracted from stained sputum smears can be used in the MTBDRplus assay. *J Clin Microbiol* 2011; 49(10): 3600-3.
14. Kambli P, Ajbani K, Sadani M, et al. Defining multidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 82(1): 49-53.
15. Asho A, Hasan Z, McNERney R, et al. Whole genome sequencing based characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *PLoS One* 2015; 10(2): e0117771.
16. Abate D, Tedla Y, Meressa D, Ameni G. Isoniazid and rifampicin resistance mutations and their effect on second-line anti-tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18(8): 946-51.
17. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Zerolo J, Casal M. Evaluation of new GenoType MTBDRplus for detection of resistance in cultures and direct specimens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12(12): 1456-60.
18. Huyen MN, Tiemersma EW, Lan NT, et al. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 149.
19. Evans J, Stead MC, Nicol MP, Segal H. Rapid genotypic assays to identify drug-resistance *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 11-6.
20. Tolani MP, D'souza BT, Mistry NF. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoType MTBDRplus assay and their implication for treatment outcomes in patients from Mumbai, India. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 9.
21. Farooqi JQ, Khan E, Alam SM, Ali A, Hasan Z, Hasan R. Line probe assay for detection of rifampicin and isoniazid resistant tuberculosis in Pakistan. *J Pak Med Assoc* 2012; 62(8): 767-72.
22. Singhal R, Myneedu VP, Arora J, et al. Early detection of multi-drug resistance and common mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Delhi using GenoType MTBDRplus assay. *Indian J Med Microbiol* 2015; 33(S1): 46-52.
23. Karabulut N, Bayraktar B, Bulut Y. Comparison of manual mycobacteria growth indicator tube and epsilon meter test with agar proportion method for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Microbiol* 2014; 32(3): 281-4.
24. Muralidhar S, Srivastava L. Evaluation of three methods to determine the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* 2004; 120(5): 463-7.
25. Sanchez L, Londono D, Arango AI, Mattar S. In vitro activity antituberculous agents against *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Bogota, DC (Colombia) evaluated by the Etest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35(2): 109-12.
26. Varma M, Kumar S, Kumar A, Bose M. Comparison of Etest and agar proportion method of testing drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Ind J Tuberc* 2002; 490: 217-20.
27. Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, et al. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2263-8.
28. Dantes R, Metcalfe J, Kim E, et al. Impact of isoniazid resistance-conferring mutations on the clinical presentation of isoniazid monoresistant tuberculosis. *PLoS One* 2012; 7(5): e37956.
29. Springer B, Calligaris-Maibach RC, Ritter C, Böttger EC. Tuberculosis drug resistance in an area of low endemicity in 2004-2006: semiquantitative drug susceptibility testing and genotyping. *J Clin Microbiol* 2008; 46(12): 4064-7.
30. Jagielski T, Grzeszczuk M, Kaminski M, et al. Identification and analysis of mutations in the *katG* gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Pneumonol Alergol Pol* 2013; 81(4): 298-307.