

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKSİNDE İZONİAZİD VE RİFAMPİSİN DİRENCİNİN REAL-TIME PCR İLE HIZLI TANISI*

Meryem ÇETİN* , Murat GÜNAYDIN** , Ahmet SANİÇ**

*Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTAKYA-HATAY

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

ÖZET

Otuz isoniazide dirençli, 30 rifampisine dirençli, 21 hem isoniazid hem de rifampisine dirençli ve kontrol grubu olarak her iki ilaca duyarlı 30 *Mycobacterium tuberculosis* suşu radyometrik BACTEC metodu kullanılarak belirlenmiştir. KatG and rpoB sensor problemleri kullanılarak, *M.tuberculosis* mutasyonlarının varlığı real-time PCR metodu ile incelenmiştir. Isoniazid için 17 izolatta prob Tm aralığı 66.98-67.70°C ve 6 izolatta prob Tm aralığı 68.19-68.90°C olarak belirlenmiştir. Toplam 23 izolatta dirence sebep olan mutasyonlar saptanmıştır. Rifampisin için, 9 izolatta prob Tm aralığı 65.3-66.70°C, 22 izolatta prob Tm aralığı 57.70-58.40°C ve 4 suşta bu Tm aralıklarının her ikisi gösterilmiştir. Toplam 27 suşta dirence sebep olan mutasyonlar belirlenmiştir.

Real-time PCR metodu isoniazid direncini % 76.7 olarak belirlemiştir. BACTEC ve real-time PCR metodları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.005$). Real-time PCR ile rifampisin direnci % 90.0 olarak belirlenmiş, BACTEC ve real-time PCR arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.076$).

Bu sonuçlar real-time PCR metodunun rutin laboratuvarında *M.tuberculosis* komplekste ilaç direncini belirlemede hızlı, basit ve güvenilir bir metod olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: isoniazid, real-time PCR, rifampisin, tüberkülozda direnç

SUMMARY

Rapid Detection of Isoniazid and Rifampicin Resistance Associated Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Real-Time PCR

Susceptibilities of 30 isoniazid-resistant, 30 rifampicin-resistant and 21 isoniazid and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates as well as 30 isolates susceptible to the both drugs used as control group were determined by radiometric BACTEC method. Using katG and rpoB sensor probes, presence of mutations was investigated in *M.tuberculosis* by real-time PCR method. For isoniazid, prob Tm range of 66.98-67.70°C in 17 isolates and prob Tm range of 68.19-68.90°C in 6 isolates were found. Resistance-causing mutations were detected in a total of 23 isolates. For rifampicin, prob Tm range of 65.3-66.70°C in 9 isolates, prob Tm range of 57.70-58.40°C in 22 isolates and both of these Tm ranges in 4 isolates were determined. Mutations causing resistance were detected in a total of 27 isolates.

By real-time PCR method isoniazid mutations were detected as 76.7 %. There was a statistically significant difference between BACTEC and real-time PCR methods ($p=0.005$). On the other hand, 90.0 % of rifampicin resistance were detected by real-time PCR, which indicated a statistically insignificant difference between BACTEC and real-time PCR ($p=0.076$).

All these results showed that real-time PCR method is a fast, simple and accurate method for determining the drug resistance in *M.tuberculosis* complex in routine laboratories.

Keywords: isoniazid, real-time PCR, resistance in tuberculosis, rifampicin

Yazışma adresi: Meryem Çetin. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTAKYA-HATAY

Tel.: (0326) 214 86 61/316, (0536) 292 30 90

e-posta: meryemcetin55@yahoo.com

Alındığı tarih: 14.01.2008, revizyon kabulü: 22.02.2008

*26th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology'de sunulmuştur (26-29 Haziran 2005, İstanbul).

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis suşlarının anti-tüberküloz ilaçlara geliştirdiği dirençte ciddi artışların görülmesi, etkin ve doğru tedavinin yapılabilmesi için tüberküloz tedavisinde önemli bir yere sahip olan ilaçların duyarlılığının güvenilir ve hızlı bir şekilde bilinmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur⁽⁵⁾. İlaç direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesinde genetik analiz içerikli hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Mutasyonların ve böylece antitüberküloz ilaçlara duyarlılığın birkaç gün içerisinde belirlenmesi olanaklı hale gelmiştir. Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada rifampisin (RIF) ve izoniazid (INH) direncinden sorumlu farklı gen bölgeleri saptanmıştır. RIF için aminoasid değişimlerinin sıklıkla 507 ile 533. kodonlar arasında 81-bp'lik *rpoB* kor bölgesinde olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte, RIF'e dirençli mutant *M.tuberculosis* suşlarında, özellikle 526. kodon (His526Tyr) ve 531. kodonda (Ser531Leu) değişimlerin olduğu dikkati çekmiştir^(2,10). INH için aminoasid değişimlerinin sıklıkla *katG* geninde 315. kodonda (315Ser) olduğu bildirilmiştir⁽¹¹⁾.

PCR ile nükleik asitlerin çoğaltılması sonucu, tüplerden floresansı ölçebilen aletlerde floresans rezonans enerji transferi (FRET) tekniği mutasyonların belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılan teknik hibridizasyon problemlerinin ayrılma sıcaklığına bağlı olarak elde edilen ürünün erime eğrisi analizini verir⁽¹⁾. Çalışmamızda radyometrik BACTEC ve real-time PCR yöntemleri kullanılarak, *M.tuberculosis*'te INH ve RIF direncine neden olan mutasyonların saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamına RIF ve INH'e dirençli 21 suş, RIF'e dirençli 30 suş, INH'e dirençli 30 suş ve her iki ilaca duyarlı 30 suş (kontrol grubu) alınmıştır. RIF ve INH'e duyarlı American Type Culture Collection (ATCC) 25177 numaralı suşu ve *M.tuberculosis* H37Ra kontrol suşları olarak kullanılmıştır. Dekontaminasyon için sodyum hidroksit N-asetil-L-sistein metodu

kullanılmıştır. Üreme indeksi 0-999 ölçeğinde direkt olarak okunmuştur⁽¹⁷⁾. Tüberküloz kompleksi basillerinin radyometrik 12B BACTEC şişesinden DNA ekstraksiyonunda Chelex-100 (% 5 oranında) kullanılmıştır⁽¹⁸⁾. Daha sonra kullanılmak üzere elde edilen ekstraktlar -70°C'de saklanmıştır.

RIF direnci için *rpoB* geninin 526 ve 531. kodonlarındaki mutasyonları belirlemek üzere *rpo* anchor ve *rpo* sensor problemleri hazırlanmıştır. INH direnci için *katG* geninde 315. kodondaki mutasyonu belirlemek üzere TB sensor ve TB anchor problemleri hazırlanmıştır⁽¹⁶⁾.

INH direncini saptamak için TB86 ve TB87 primerleri, RIF direncini saptamak için ise TR8 ve TR9 primerleri kullanılmıştır^(7,15) (TIB Molbiol, Almanya):

TB86: 5'- GAA ACA GCG GCG CTG TC GT - 3'
TB87: 5'- GTT GTC CCA TTT CGT CGG GG- 3'
TR8: 5'- GTG CAC GTC GCG GAC CTC CA - 3'
TR9: 5'- TCG CCG CGA TCA AGG AGT - 3'
TB sensor: 5'-LC Red705 - TCA CCA GCG GCA TCG AGG TCG T - Fosfat
TB anchor: 5'- CGT ATG GCA CCG GAA CCG GTA AGG ACG C - 3' Floresein
Rpo sensor: 5'-LC Red640 - ACC CAC AAG CGC CGA CTG TCG G - Fosfat
Rpo anchor: 5'- TTC ATG GAC CAG AAC AAC CCG CTG TCG G - 3' Floresein.

Bu primerler ile RIF direncinden sorumlu mutasyonların bulunduğu *rpoB* geninin 158 baz çiftlik bölgesinin (2492-2335 pozisyonu) ve INH direncinden sorumlu mutasyonların bulunduğu *katG* geninin 209 baz çiftlik bölgesinin (2759-2967 pozisyonu) çoğaltılması hedeflenmiştir.

Real time PCR ve FRET problemleri ile direncin belirlenmesi

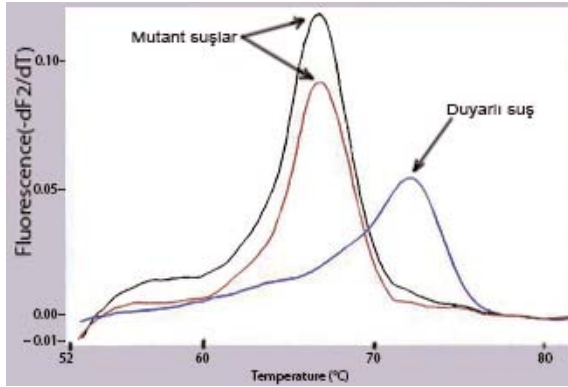
Amplifikasyon reaksiyonunda 10 dakika 95°C'de denatürasyondan sonra, 10 sn 95°C, 5 sn 60°C (*katG* için), 55°C (*rpoB* için) ve 10 sn 72°C'de olmak üzere 45 siklus gerçekleştirilmiştir. Sikluslar tamamlandıktan sonra tüpler bir kez daha 95°C'de 10 sn bekletilip, sonra 50°C'de 20 sn tutulmuştur. Daha sonra 50°C'den 95°C'ye kadar tüpler 0.05°C/sn hızla ısıtılarak erime eğrisi incelemesi yapılmıştır. Hibridizasyon problemlerinin erime davranışına göre erime eğrisi analizi yapılmıştır. *KatG* mutasyonunu belirlerken

Red-705 floresansına duyarlı LightCycler F3 kanalından, *rpoB* mutasyonunu belirlemek için Red-640 floresansına duyarlı LightCycler F2 kanalından okumalar değerlendirilmiştir.

BULGULAR

İzoniazid için duyarlılık sonuçları

Real-time PCR yöntemini ile izoniazide duyarlı olduğu bilinen *M.tuberculosis* H37Ra kontrol suşunun erime eğrisi analizine göre erime sıcaklığı (Tm) değeri 71.85°C olarak bulunmuştur. Duyarlı olan diğer klinik izolatlarda ise bu değer 71.70°C ile 72.50°C arasında değişiklik göstermiştir. Real-time PCR yöntemi, standart kabul ettiğimiz radyometrik BACTEC duyarlılık sistemine göre saptanmış, dirençli suşlarda mutasyon oranı % 76.7 olarak belirlemiştir. İki farklı Tm derecesi gözlenmiştir. Bunlardan birincisi 66.98-67.70°C prob Tm aralığı, diğeri 68.19-68.90°C prob Tm aralığıdır. Buna göre, 17 suş 66.98-67.70°C prob Tm aralığını (Şekil 1), 6 adet suş 68.19-68.90°C prob Tm aralığını göstermiştir.

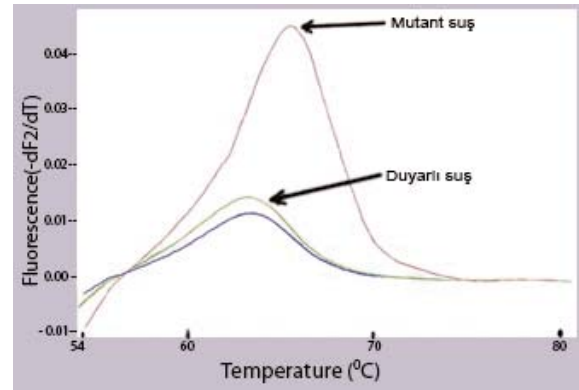


Şekil 1: İzoniazid için Tm aralıkları:
1. mutasyon için Tm değeri: 67.07
Duyarlı suş için Tm değeri: 72.00

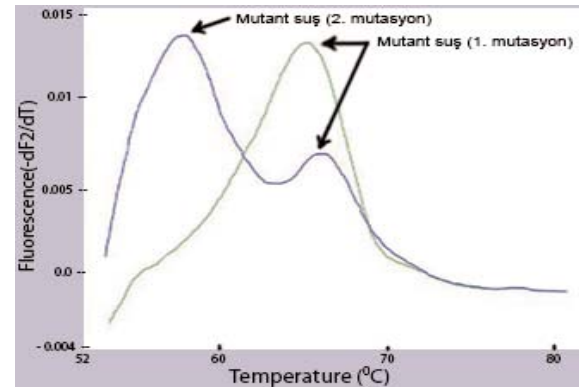
Rifampisin için duyarlılık sonuçları

Real-time PCR yöntemini kullanarak RIF'e duyarlı olduğu bilinen H37Ra kontrol suşunun erime eğrisi analizine göre erime sıcaklığı derecesi (Tm) 63.09°C olarak bulunmuştur. Duyarlı olan klinik izolatlarda ise, bu değer 62.55°C ile 63.47°C arasında değişiklikler gösterdiği sap-

tanmıştır. Real-time PCR yöntemi, standart kabul ettiğimiz radyometrik BACTEC duyarlılık sistemine göre saptanmış, dirençli suşlarda mutasyon oranı % 90.0 olarak belirlenmiştir. İki farklı Tm derecesi gözlenmiştir. Bunlardan birincisi 65.30-66.70°C prob Tm aralığı, diğeri 57.70-58.40°C prob Tm aralığıdır. Buna göre, 9 suş 65.30-66.70°C prob Tm aralığını (Şekil 2), 22 suş 57.70-58.40°C prob Tm aralığını göstermiş, 4 suş ise 65.30-66.70°C ve 57.70-58.40°C prob Tm aralıklarının her ikisini de göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 2: Rifampisin için Tm aralıkları:
1. mutasyon için Tm değeri: 65.57
Duyarlı suş için Tm değeri: 63.47



Şekil 3: Rifampisin için Tm aralıkları:
1. mutasyon için Tm değeri: 66.23; 66.57
2. mutasyon için Tm değeri: 57.99

Her iki yöntemde çalışılan INH ve RIF duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Radyometrik BACTEC ve real-time PCR yöntemlerine göre INH ve RIF duyarlılık sonuçları Z testi ile karşılaştırılmıştır. Test formüle göre INH için Z değeri 2.82 olarak bulunmuştur.

Testin olasılık değeri (p-value) = 0.005 < α = 0.05 olduğundan radyometrik BACTEC ve real-time PCR yöntemlerine göre saptanan oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Standart BACTEC sistemi ile uyumsuz olarak değerlendirilmiştir. Test formülüne göre RIF için Z değeri 1.78 olarak bulunmuştur. Testin olasılık değeri (p-value) = 0.076 < α = 0.05 olduğundan radyometrik BACTEC ve real-time PCR yöntemlerine göre saptanan oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış, iki yöntem birbiri ile uyumlu bulunmuştur.

TARTIŞMA

Bugün dünya nüfusunun yaklaşık olarak 1/3'ü tüberküloz basili ile infektidir. Her yıl yaklaşık 10 milyon yeni olgu saptandığı ve 3 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğü tahmin edilmektedir. Bu bireylerin büyük bir kısmı düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır^(5,12). Enfeksiyonun yayılma riski için en önemli faktör, toplumda balgam yayması pozitif olguların prevalansıdır. Bulaştırıcılığı en yüksek olan olgular; kaviteli, öksürükle basil çıkaran, balgam yaymasında basil pozitif olan olgulardır. Dolayısı ile bu risk sadece erken tanı ve etkili tedavi programlarının uygulanması ile azaltılabilir^(4,8). Antitüberküloz tedavisinde önemli bir yeri olan tüberküloz ilaçlarından izoniazid ve/veya rifampisine dirençte büyük bir artış gözlenmiştir⁽¹⁴⁾. Türkiye'de ortalama % 3.6 oranında primer MDRTB görülmektedir. Çok ilaca dirençli tüberküloz olgularının tedavisi ise oldukça zor ve pahalıdır⁽³⁾.

Mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevi basilin direkt mikrobiyolojik incelenmesi, izolasyonu, tanımlanması ve ilaç duyarlılık testlerinin yapılmasıdır. *M.tuberculosis* izolatlarının ilaç duyarlılığının belirlenmesi hastaya uygulanan tedavi rejimini doğrular veya tedavinin kesilmesi konusunda bilgi verir. Ayrıca direnç gelişen olgularda uygun tedavi rejimlerine geçilmesine ve tedavi programlarının belirlenmesine yardımcı olur⁽⁵⁾. İlaç direncinin hızlı tanısı, toplum için önemli bir tehdit unsuru olan MDRTB'un bulaş zincirinin kırılmasında önemlidir.

İzoniazid direncini tespit etmek oldukça karmaşıktır. Dirençten en sık sorumlu olan gen bölgesi *katG*'nin 315. kodonunda meydana gelen mutasyonlar olup izoniazide dirençli olan mutasyonların üçte ikisinde rastlanmaktadır^(13,19). Çalışmamızda standart kabul ettiğimiz radyometrik BACTEC sistemine göre saptanmış izoniazide dirençli 30 klinik izolatın 23'ü real-time PCR yöntemine göre dirençli ve mutasyon oranı % 76.7 olarak saptanmıştır. Telenti ve ark.⁽¹⁵⁾ izoniazide dirençli suşlarda dizi analizi ile *katG* direncini % 36.8 olarak bulmuşlardır. Kiepiela ve ark.⁽⁷⁾, Güney Afrika'da izole ettikleri örnekler üzerinde *katG* gen bölgesinde 77/79 oranında baz değişiminin olduğunu bildirmişlerdir.

Rifampisin direncine sebep olan *rpoB* geninin beta subunit'inin RNA polimeraz bölgesinde sıklıkla çeşitli mutasyonlara rastlanmaktadır⁽¹⁵⁾. Çalışmamızda standart kabul ettiğimiz radyometrik BACTEC sistemine göre saptanmış 30 dirençli suşun 27'si real-time PCR yöntemine göre dirençli saptanmış ve mutasyon oranı % 90.0 olarak belirlenmiştir. Kocagöz ve ark.⁽⁹⁾'nın yaptıkları benzer bir çalışmada rifampisin direnci real-time PCR ile % 92.7 oranında saptanmıştır.

Gonzales ve ark.'nın⁽⁶⁾ İspanya'da izoniazid ve rifampisin direncini belirlemek üzere yapmış oldukları çalışmalarda *katG* direncinden sıklıkla sorumlu olan mutasyonlar % 41.3 oranında Ser315Thr değişiminden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Ayrıca bu gen bölgesinin % 13.7 oranında kısmi delesyon oluşturduğunu da açıklamışlardır.

Real-time PCR yöntemi INH mutasyonunu % 76.7 oranında, RIF mutasyonunu % 90.0 oranında saptamıştır. Z testine göre BACTEC ve real-time PCR yöntemleri arasında INH için istatistiksel anlamda fark gözlenirken (p=0.005), RIF için iki sistem arasında uyum saptanmıştır. Kesin olarak kodonlardaki baz değişimlerinin tespiti için dizi analizinin gerekliliği düşünülmüştür. TB tedavisinde önemi olan birinci seçenek ilaçlardan RIF duyarlılığın saptanmasında, real-time PCR yönteminin hızlı ve güvenilir olması ile rutin laboratuvarında kullanımının faydalı olabileceği belirlenmiştir. INH için dirence neden olan mutasyonların çok farklı gen bölge-

lerinde olmasından dolayı, farklı yöntem ve modifikasyonların gerekliliği uygun görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Bernard PS, Reiser A, Pritham GH: Mutation detection fluorescent hybridization probe melting curves, "Maver S, Wittwer C, Nekagawara K (eds): Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications" kitabında s.11-9, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (2001).
2. Cole ST: Mycobacterium tuberculosis: drug resistance mechanisms, Trends Microbiol 1994;2(10):411-5.
3. Çalışır HC, Şipit T, Öğretensoy M: Tüberküloz: Tanı ve tedavisi, Tüberküloz ve Toraks 1998;146:81-9.
4. Daniel TM: The history of tuberculosis, Respir Med 2006;100(11):1862-70.
5. Drobniewski FA, Wilson SM: The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis-a molecular story, J Med Microbiol 1998;47(3):189-96.
6. Gonzales N, Torres MJ, Anzar J, Palomares JC: Molecular analysis of rifampin and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain, Tuber Lung Dis 1999;79(3):187-90.
7. 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(1):47-56.
8. Kocabaş A: Akciğer tüberkülozu, "Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds): Enfeksiyon Hastalıkları" kitabında s.396-443, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul (1996).
9. Kocagoz T, Saribas Z, Alp A: Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR, J Clin Microbiol 2005;43(12):6015-9.
10. Musser JM: Antimicrobial agent resistance in mycobacteria molecular genetic insights, Clin Microbiol Rev 1995;8(4):496-514.
11. Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD: Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance, J Infect Dis 1996;173(1):196-202.
12. Ramaswamy S, Musser JM: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update, Tuber Lung Dis 1998;79(1):3-29.
13. Sacchetti JC, Blanchard JS: The structure and function of the isoniazid target in M.tuberculosis, Res Microbiol 1996;147(1-2):36-43.
14. Somoskovi A, Parsons L, Salfinger M: The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis, Respir Res 2001;2(3):164-8.
15. Telenti A, Honore N, Bernasconi C et al: Genotypic assesment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level, J Clin Microbiol 1997;35(3):719-23.
16. Torres M, Criado A, Palomares JC, Aznar J: Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis, J Clin Microbiol 2000;38(9):3194-9.
17. Wadsworth Center: Clinical Mycobacteriology Lab. Procedures, New York State Dept. of Health, New York (1996).
18. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, Biotechniques 1991;10(4):506-13.
19. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis, Nature 1992;358(6387):591-3.