

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARINDA DİRENCİN BELİRLENMESİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLER/ SON GELİŞMELER

Rıza DURMAZ

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MALATYA
rizadurmaz@ymail.com

ÖZET

Dünyanın pek çok yerinde ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* insidansındaki artış, tüberkülozun tanısı ve ilaç direncinin kısa sürede gösterilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla çok sayıda yeni yöntem denenmektedir. Mevcut yöntemlerin birçoğu çoğul ilaç direnci için marker antibiyotik olarak kabul edilen rifampisin direncini saptamaya yöneliktir. Doğrudan klinik örnek veya kültürde üretilmiş olan basillerdeki rifampisin direncini saptamak için kullanılmakta olan bu moleküler yöntemlerde özgüllük ve duyarlılık oldukça yüksektir. Ancak, uygulanmakta olan yöntemler kompleks, yoğun laboratuvar işlemleri, eğitimli personel ve donanımlı alt yapı gerektirmektedir. Ayrıca bu testlerle sonuç alınabilmesi için klinik örneklerin kabulünden itibaren saatler ve hatta 1-2 gün süren işlem gerekmektedir. Süreyi kısaltan ve kolay uygulanabilen moleküler test geliştirme çabaları devam etmiş ve çok yakın geçmişte yeni bir sistem geliştirilebilmiştir. Geliştirilmiş olan "Xpert MTB/Rif" sistemi, doğrudan hasta materyaline uygulanabilen semi kantitatif, gerçek zamanlı bir nested polimeraz zincir reaksiyon yöntemidir. Bu sistemle *M.tuberculosis* kompleks ve rifampisin direnci tek bir testle, 2 saatten kısa bir sürede saptanabilmektedir. Klinik örnekler üzerindeki sonuçları henüz yeni yayınlanmaya başlamış olan sistem hakkında kesin yargıya varmak için erkendir. Ancak, mevcut bulgular, sistemin tüberkülozun tanı ve rifampisin direncinin belirlenmesinde arzu edileni verecek gibi görülmektedir.

Anahtar sözcükler: ilaç direnci, moleküler metot, *Mycobacterium tuberculosis*, rifampisin direnci

SUMMARY

Molecular Methods for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Strains: Current Developments

An increase in the incidence of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in several parts of the world has created a critical need for rapid diagnosis of tuberculosis and identification of drug-resistant cases. Many new approaches have been applied for these purposes. Most of the current methods have focussed to detect rifampicin resistance as a surrogate for multi-drug resistance. The sensitivity and specificity of these methods for detection rifampicin resistance in direct clinical specimens and tubercle bacilli growing in culture are considerable high. However, current methods are complex, labor-intensive and require trained personals and infrastructure. Furthermore, these methods required time ranged from hours to 1 to 2 days from receiving the clinical specimens to getting results. Attempts for reducing time and developing a simple-to-use system have developed and in near past a new method could be developed. The new developed Xpert MTB/Rif system is a semi-quantitative, nested real-time polymerase chain reaction that can be used in direct clinical specimens. *M.tuberculosis* complex and rifampicin resistance can be detected in 2 hours by this method. The results of this method on clinical specimens have currently been published yet. It is too early to make exact decision on the method. However, the present data shows that this system will provide desirable results for tuberculosis diagnosis and identification of rifampicin resistance.

Keywords: drug resistance, molecular methods, *Mycobacterium tuberculosis*, rifampicin resistance

Uygun olmayan ilaç tedavisi, doğal olarak oldukça düşük oranlarda (10^{-6} - 10^{-8}) bulunan dirençli basil popülasyonunda artışa ve sonuçta tedavi dozundan etkilenmeyen dirençli bakterilerin popülasyona hâkim duruma gelmesine yol açmaktadır⁽⁴⁰⁾. Çoğul ilaca dirençli suşlar yanın-

da yaygın ilaca dirençli (extensively drug resistant=XDR) *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının da giderek artması tüberkülozun kontrolünü daha da problemli hale getirmektedir. Kromozomal spontane mutasyonla oluşan dirençli basil sayısının artmasını engellemek,

etkili antibiyotiklerin en uygun kombinasyonlarının, gereken sürede kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. Uygun antibiyotik seçiminde önemli aşama ilaç direncinin doğru ve kısa sürede saptanmasıdır. Ülkemiz ve tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkelerdeki önemli sorunlardan biri direnç belirleme testlerinin düzenli olarak yapılamaması veya test sonuçlarının uzun sürede alınmasıdır. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ün ön gördüğü koşullar; 1) tedaviye başlamadan önce her hastaya ait ilk *M.tuberculosis* izolatu için, 2) 2-3 aylık tedaviye rağmen kültürü pozitif olan hastalarda veya klinik olarak tedaviye yanıt gözlenemeyenlerde birinci seçenek ilaçlara karşı duyarlılık testi yapılmasıdır. Direncin mümkün olduğunca erkenden saptanması amaçlanmalı, klinik örnek laboratuvara geldiğinden itibaren 15-30 gün içerisinde veya kültür pozitifliğinden itibaren 7-14 gün içerisinde duyarlılık test sonuçları verilmelidir⁽²⁸⁾. Avrupa'daki tüberküloz laboratuvarlarının modernizasyonu ile ilgili çalışmalar kapsamında yapılan öneride ise; kültür pozitifliğini takiben üreyen suşun *M.tuberculosis* kompleks tanımı ve rifampisine direncinin 1-2 gün içerisinde belirlenmesidir. Ayrıca, mikroskopisi pozitif balgam örneklerinin % 90'dan fazlasından moleküler yöntemlerle *M.tuberculosis* tanımının yapılması ve rifampisin (RIF) direncinin belirlenmesi önerilmektedir⁽¹⁵⁾.

Tüberküloz basillerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının saptanmasında direnç oranı, mutlak konsantrasyon ve proporsiyon yöntemleri gibi geleneksel fenotipik yöntemler uzun süreden beri kullanılmaktadır. Bunlardan ilk ikisi standardizasyon zorluğu, emek yoğun işlem gerektirmeleri ve hata oranlarının yüksek olması nedeniyle sınırlı merkezlerde çalışılabilmiştir. Proporsiyon yöntemi; katı ve sıvı besiyerleri için gerekli standardizasyon çalışmaları yapılmış ve güvenilirliği onaylanmış referans bir yöntemdir⁽²⁴⁾. En önemli dezavantajı kültürdeki üremeden sonra otomatize sıvı besiyerlerinde yapılan duyarlılık testlerinin 7-12 gün, Lowenstein-Jensen gibi katı besiyerlerinde yapılan testlerin ise 21-42 gün kadar sürede sonuçlanabilmesidir^(24,32).

Geleneksel duyarlılık testlerinde yaşanan süre sıkıntısını gidermek amacıyla yeni fenoti-

pik yöntemlere yönelme olmuştur. Faj bazlı yöntemler, kolorimetrik yöntemler, nitrat redüktaz testi ve mikroskopik gözleme dayalı ilaç duyarlılık "(microscopic-observation drug-susceptibility=MODS)" deneyi yeni geliştirilmiş, hızlı sonuç verebilen fenotipik yöntemlerdendir^(24,37). Faj-amplifikasyon testi ve lusiferaz raportör mikobakteriyofaj, tüberküloz basillerinde ilaç direncini kısa sürede saptamak amacıyla geliştirilmiş faj-bazlı yöntemlerdir. Genelde faj deneyleri 2-3 günde tamamlanmaktadır^(9,32). Lusiferaz raportör mikobakteriyofaj yöntemiyle BACTEC TB-460 sonuçları arasında major ilaçlara direnci belirlemede % 98'in üzerinde uyum saptanmıştır^(2,3). RIF ve izoniazid (INH) direncini belirlemede ise yöntemin duyarlılığı % 100 olarak bulunmuştur^(9,33). Nitrat redüktaz aktivitesini belirlemeye dayalı kolorimetrik denemeler günümüzde de devam etmektedir. Bu yılın başında yayınlanmış olan bir çalışmada; yöntemin özgüllük ve duyarlılığının oldukça iyi ($\geq$ % 94) olduğu ancak sonuç alınabilmesi için ortalama 14 gün gerektiği belirtilmiştir⁽³⁷⁾.

Direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler

M.tuberculosis'de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra, direncin erken saptanmasına yönelik moleküler yöntemleri kullanma çalışmaları başlamıştır^(8,14,31,38). 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^(4,24,30,33,34). Moleküler yöntemlerle en iyi sonuç RIF direncini belirlemede alınmakta; streptomisin, izoniazid ve siprofloksasine dirençli suşların sırasıyla % 40, % 10-15 ve % 25 kadarı bu yöntemlerle saptanamamaktadır⁽¹¹⁾. Moleküler yöntemlerin majör dezavantajları; yüksek maliyet, klinik olarak dirence yol açan bakteri topluluğu içindeki dirençli suşların duyarlılara oranının kesin ola-

rak belirlenememesi, saptanan mutasyonların (sessiz mutasyonlar) her zaman ilaç direnciyle ilişkili olmamasıdır⁽¹¹⁾.

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⁽³³⁾. Bu aşamalarındaki işlemler kısaltılabildiği ölçüde uygulanan testin sonuç verme süresi erken olabilmektedir. 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, polymerase chain reaction single-strand confirmation polymorphism analysis (PCR-SSCP), heterodupleks analizi, pyrosequencing, mutasyona özgü primer ile amplifikasyon, gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ve amplifikasyon ürününün mutasyona özgü restriksiyon enzimle analizi gibi işlemlerle hedef gendeki değişimler saptanabilmektedir^(9,11,16,22,24,27,35).

DNA dizi analizi referans yöntemdir. Bu yöntemle bilinen mutasyonlar yanında, önceden bilinmeyen mutasyonlar da saptanabilmektedir. Genelde özgüllük ve duyarlılığı tam olarak bulunmaktadır⁽¹⁾. Ancak, geleneksel DNA sekanslama işleminin 1-2 gün içerisinde sonuç vermesi ve fazla manüplasyon işlemlerinin olması nedeniyle rutin uygulanan bir yöntem değildir^(11,33). Çoğunlukla diğer moleküler test sonuçlarını doğrulama ve araştırmalar için kullanılmaktadır. Geleneksel sekanslamada yaşanan sıkıntılar, "pyrosequencing" uygulamasıyla önemli ölçüde giderilmiştir. Real Time-PCR ve "pyrosequencing" yöntemleri kombine olarak kullanıldığı bir sistemde; doğrudan klinik örnekler içerisinde *M.tuberculosis* kompleks varlığı ve *rpoB* geninin 81 bazlık bölgesindeki mutasyonlar 48 saat içerisinde araştırılabilir. Bu sistem kullanılarak yapılmış olan bir araştırmada; kültür altın standart olarak kabul edildiğinde RT-PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 88.5, % 100, % 100 ve % 96.9; aside dirençli bakteri (ARB) pozitif örnekler için % 99.6, % 100,

% 100 ve % 97.7 ve ARB negatif örnekler için % 75.4, % 99.9, % 98 ve % 98.4 olarak kaydedilmiştir. RT-PCR pozitif 148 klinik örnekte *rpoB* geni pyrosequencing yöntemiyle araştırıldığından; yöntemin konvansiyonel test sonuçlarıyla uyumu % 98.6 olarak saptanmıştır⁽²⁰⁾.

Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan yöntemin Inno-Line Probe Assay (Inno-LiPA Rif TB) ve GenoType MTBDR/MTBDR plus olmak üzere iki ticari kiti bulunmaktadır. Mikroskopisi pozitif 536 balgam örneği üzerinde RIF ve INH direncini araştırmada "GenoType MTBDRplus" kitinin performansı geleneksel duyarlılık test yöntemleriyle karşılaştırılmış, MTBDRplus ile örneklerin % 97'sinde 1-2 günde yorumlanabilir sonuçlar alınabilmiştir⁽⁴⁾. Aynı çalışmada; MTBDRplus testinin RIF ve INH dirençli suşları saptamadaki duyarlılığı sırasıyla % 98.9 ve % 94.2; özgüllüğü ise % 99.4 ve % 99.7 olarak bulunmuştur. Çoğul ilaca dirençli (ÇİD) suşlar, % 98.8 duyarlılık ve % 100 özgüllükle saptanabilmiştir. GenoType MTBDR testi ile yapılan çalışmalarda; kültürde üretilmiş *M.tuberculosis* suşlarındaki RIF ve INH direncine yol açan mutasyonları saptamada yöntemin duyarlılığı sırasıyla % 99 ve % 84 olarak bulunmuş, bu sonuçların dizi analizi ile % 100 uyum gösterdiği belirtilmiştir. Yöntemin mikroskopisi pozitif olan klinik örneklerde kullanılabilirliği ile ilgili değerlendirmede; INH dirençli olanların % 84.2'si ve RIF dirençli olanların % 96.2'sinde dirence yol açan mutasyonlar doğru olarak saptanabilmiştir⁽²⁴⁾. Inno-LiPA Rif.TB ile fenotipik duyarlılık test sonuçları arasında % 90.2 oranında uyum saptanmıştır⁽¹²⁾. Kültüründe *M.tuberculosis* üremiş klinik örneklerde Inno-LiPA testinin rifampisin dirençli suşları saptamadaki duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 99.6, pozitif prediktif değeri % 92.7, negatif prediktif değeri % 99.7 ve sonuçlar arasındaki uyum % 99.1 olarak bildirilmiştir⁽¹⁶⁾.

Macroarray yöntemlerinde RIF direncinden sorumlu *rpoB* mutasyonları yanında yüksek düzey INH direncine yol açan *katG* geninin 315. kodondaki mutasyonlar (Ser315Thr) da tanımlanabilmektedir^(6,7,33). Bu yöntemlerin RIF ve INH direncini belirlemede fenotipik yöntemlerle uyum oranları sırasıyla % 95.4 ve % 90.4 olarak bulunmuştur⁽²⁹⁾.

Katı faz hibridizasyon yöntemleri temel moleküler çalışmaların uygulandığı alt yapı olanakları sınırlı laboratuvarlarda bile kolayca uygulanabilen duyarlı ve özgül yöntemlerdir. Önemli dezavantajları bilinen majör mutasyonlar için tasarlandıklarından yeni mutasyonları saptayamamaları ve ayrıca amplifikasyondan sonraki aşamalarda yoğun iş yükü ve zaman kaybının olmasıdır.

Katı faz hibridizasyon esaslı diğer bir yöntem DNA microarray'dir. Çok sayıda farklı mutasyonların incelenmesine olanak sağlamaktadır. DNA microarray ile yapılan çalışmalarda *katG*, *inhA*, *rpoB*, *rpsL* ve *gyrA* genlerindeki mutasyonların belirlenmesinde dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır⁽¹⁶⁾. Bu yöntemle RIF dirençli suşların % 95'i, INH dirençli suşların % 80'den fazlası klinik örnekler ve kültürlerde 12 saat içinde saptanabilmiştir⁽¹⁹⁾. Yöntemin en önemli avantajı klinik örnekten bakterinin saptanması, tür tayini, ilaç direncinin araştırılması ve virülans geninin aynı anda belirlenmesine olanak vermesidir. Dezavantajı ise pahalı ve ilaçların birçoğunun direnciyle ilgili mekanizmaların tam olarak bilinmemesi nedeniyle henüz beklenen düzeyin altında, sınırlı sayıda laboratuvar da uygulama olanağı bulmasıdır^(16,33). Yeni geliştirilmiş olan "CombiChip Mycobacteria Drug Resistance detection DNA chip" yöntemiyle INH ve RIF dirençli suşların doğru olarak belirlenme oranları sırasıyla % 84 ve % 100; özgüllük ise sırasıyla % 100 ve % 95.3 olarak saptanmıştır⁽²³⁾.

Multipleks alel spesifik PZR (MAS-PZR) yönteminde *rpoB* genindeki 516, 526 ve 531. kodonları ve ayrıca *katG* genindeki 315. kodondaki mutasyonlar, alel spesifik primerler yardımıyla araştırılmaktadır^(1,25,26). MAS-PZR *rpoB* geninin 531 ve 516. kodonlarındaki mutasyonları belirlemede dizi analizi ile % 100 uyumlu bulunmuştur^(1,26). Buna karşın 526. kodondaki mutasyonu saptamada yöntemin duyarlılığı düşüktür. *KatG* geninin 315. kodonundaki mutasyonu saptamada dizi analiziyle % 94 uyum gözlenmiştir⁽¹⁾. Diğer bir çalışmada MAS-PZR yöntemiyle INH, RIF ve etambutol (EMB) direncinden sorumlu mutasyonlar araştırılmış; yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü INH için % 81 ve % 97.5, RIF için % 93 ve % 98.9, EMB için

% 54.5 ve % 68 olarak kaydedilmiştir⁽³⁹⁾.

M.tuberculosis genomunun herhangi bir lokasyonundaki genotipe özgü mutasyonlar ve direnç oluşumundan sorumlu mutasyonların aynı anda saptanmasına olanak veren bir "multiplex ligasyon-prob amplifikasyon" (MLPA) yöntemi denenmiştir. Bu yöntemle RIF dirençli suşların % 71'inde, INH dirençli suşların ise % 80'inde dirençle ilgili mutasyonlar doğru olarak saptanabilmiştir⁽⁵⁾.

Yeni geliştirilmiş multiplex "PCR single-strand conformation polymorphism" (PCR-SSCP) yönteminin duyarlılığı INH için % 80, RIF için % 81.8; özgüllük ise sırasıyla % 100 ve % 92 olarak bulunmuş, yöntemin ÇİD suşlarını saptamada maliyet etkin olduğu vurgulanmıştır⁽¹⁰⁾. Bu yılın başında yayınlanmış olan bir çalışmada; RIF direnci ve ÇİD belirlemede "heteroduplex-PCR" yönteminin kültür sonuçlarıyla % 98 uyum gösterdiği belirtilmektedir⁽¹³⁾.

Moleküler yöntemlerde gelinen nokta

Yukarda bahsedilen yöntemlerin hemen hepsinde örnek hazırlama, nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyon ve sonuç gözlemleme işlemleri ayrı birer basamak olarak yapılmaktadır. Bu aşamalar, bir taraftan zaman kaybı diğer taraftan da iş yükünde artış ve bazen de gereksiz maliyet artışına neden olmaktadır. Teknolojik gelişmelere paralel olarak tüberküloz basillerinde tanı ve direnci belirlemede kullanılan moleküler testlerde de önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. En önemli ilerleme amplifikasyon ve sonuç gözleme işlemlerinin eş zamanlı olarak yapılabilirdiği "Gerçek zamanlı (Real-time) polimeraz zincir reaksiyon (PZR)" yöntemlerinin uygulamaya girmesidir. Amplifikasyon ve analiz işlemlerinin kapalı tek tüp içinde yapıldığı bu yöntem, DNA izolasyonunu takiben 1.5-2 saat içerisinde tamamlanmakta, rifampisin veya RIF+INH direncinin araştırılmasında kullanılabilmektedir^(5,17,18,33,36).

Ticari olarak geliştirilmiş olan bir gerçek zamanlı PZR yöntemi (Cepheid GeneXpert® System, Sunnyvale, CA), tüm teknolojik gelişmeleri içerisinde bulundurmaktadır. Yeni geliştirilmiş olan "Xpert MTB/Rif" sisteminde doğrudan hasta materyalinden semi kantitatif nesned gerçek zamanlı-PZR yöntemiyle, *M.tubercu-*

losis kompleks ve rifampisin direnci tek bir testle, 2 saatten kısa bir sürede saptanabilmektedir. Xpert MTB/RIF testi içerisinde bulan primerler *rpoB* geni üzerinde bulunan 81 baz çiftlik "core" bölgesini amplifiye etmek, moleküler "beacons" problemleri ise bütün RIF dirençli suşların % 95-98'inde gözlenen mutasyonları saptamak üzere tasarlanmıştır. Problemlerin özel tasarımı (overlapping molecular beacons) sayesinde RIF direncine yol açan 23 farklı mutasyonun araştırılması mümkün olabilmektedir. Sistemde, el değmeden balgamanın işlenmesi ve gerçek zamanlı-PZR sistemi kombine edilmiştir. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve mutasyon saptama işlemlerinin tümü tek bir kartuş içerisinde gerçekleşmektedir. Sistemin analitik limiti 4.5 *M.tuberculosis* DNA genom/reaksiyon veya klinik örneğin ml'sinde 131 CFU/ml'dir. RIF direncinden yaygın olarak sorumlu olan 23 farklı mutasyonun test edildiği çalışmanın sonuçları, mutasyonların % 100 duyarlılıkla saptandığını göstermiştir. Az sayıda (107) klinik örnek üzerinde yapılan çalışmada; ARB pozitif ve kültür pozitif örneklerde duyarlılık % 100 (29/29), ARB negatif, LJ pozitif örneklerde duyarlılık % 84.6 (33/39), ARB negatif, Lowenstein-Jensen ve sıvı besiyeri pozitif örnekler için % 71.7 saptanmıştır. *M.tuberculosis*, kültür negatif 25 örneğin hiçbirinde gösterilmemiştir. Önceden tedavi görmüş kültür ve mikroskopi pozitif 64 tüberküloz hasta örneğinin 63'ü (% 98.4) ve RIF dirençli 9 örneğin hepsi bu yeni yöntemle 2 saatten az bir sürede saptanabilmiş, duyarlı 55 örneğin 54'ünde (% 98.2) RIF direnci kısa sürede elimine edilebilmiştir⁽²¹⁾. Yöntemin kolay, hızlı ve bilinen mutasyonları saptamada yüksek duyarlılığa sahip olduğu vurgulanmıştır. Test için gereken tüm reaktifler kapalı bir kartuşta bulunduğundan örnekler arası çapraz kontaminasyon ihtimali bulunmamaktadır. Sistemde internal kontrol vardır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda pulmoner tüberküloz şüphesi olan anti-tüberküloz tedavisi almamış yeni hastalar, 7 günden az tedavi almış olanlar ve son 2 ay içerisinde tedavi görmemiş hastalar, bu test ile değerlendirilebilmektedir. Bütün bu olumlu yönlerine karşın, klinik örnekler üzerindeki denemeleri gösteren yayınlar henüz yeni ortaya çıkmaya başlanmıştır ve test hakkında kesin

yargıya varmak için erkendir. Ancak ön denemeler, bu yeni sistemin tüberkülozun tanı ve RIF direncinin belirlenmesinde arzu edileni verecek gibi görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z: Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malatya, Turkey, *Microb Drug Resist* 2005;11(2):94-9.
2. Banaiee N, January V, Barthus C et al: Evaluation of a semi-automated reporter phage assay for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in South Africa, *Tuberculosis (Edinb)* 2008;88(1):64-8.
3. Bardarov S Jr, Dou H, Eisenach K et al: Detection and drug-susceptibility testing of *M.tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) system, *Curr Opin Pulm Med* 2006;12(3):172-8.
4. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME: Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high volume public health laboratory in South Africa, *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(7):787-92.
5. Bergval IL, Vijzelaar RN, Dalla Costa ER et al: Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol* 2008;46(2):689-99.
6. 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(12):4435-8.
7. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I: Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2338-42.
8. Chan RC, Hui M, Chan EW et al: Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong, *J Antimicrob Chemother* 2007;59(5):866-73.
9. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY: Molecular diagnostics in tuberculosis, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24(11):711-20.
10. Cheng X, Zhang J, Yang L et al: A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isonia-

- zid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *J Microbiol Methods* 2007;70(2): 301-5.
11. Cho S-N: Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis, *Yonsei Med J* 2007;48(3):347-59.
 12. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT: Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutation in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City, *J Clin Microbiol* 1997;35(5):1281-3.
 13. Cordova J, Shiloh R, Gilman RH et al: Evaluation of molecular tools for detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in stool specimens from patients with pulmonary tuberculosis, *Clin Microbiol* 2010, Mar 3 [Epub ahead of print].
 14. Douglas J, Steyn L: A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *J Infect Dis* 1993;167:1505-6.
 15. Drobniewski F, Hoffner S, Rüscher-Gerdes S, Skenders G: Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe, *Eur Respir J* 2006;28(5):903-9.
 16. Drobniewski F, Rüscher-Gerdes S, Hoffner S: Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1)-report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), *Clin Microbiol Infect* 2007;13(12):1144-56.
 17. El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, Kramer FR, Alland D: Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons, *J Clin Microbiol* 2001;39(11): 4131-7.
 18. García de Viedma D, del Sol Díaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E: 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* 2002;40(3):988-95.
 19. Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S et al: Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin Microbiol Infect* 2005;11(7):531-9.
 20. Halse TA, Edwards J, Cunningham PL et al: Combined real-time PCR and *rpoB* gene pyrosequencing for the rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and the determination of rifampin resistance directly on clinical specimens, *J Clin Microbiol* 2010, Jan 27 [Epub ahead of print].
 21. Helb D, Jones M, Story E et al: Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology, *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):229-37.
 22. Imboden P, Cole S, Bodmer T, Telenti A: Detection of rifampin resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae*, "Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*" kitabında s. 519-26, ASM Press, Washington (1993).
 23. Kim SY, Park YJ, Song E et al: Evaluation of the CombiChip *Mycobacteria* Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;54(3):203-10.
 24. Martin A, Portaels F: Drug resistance and drug resistance detection. "Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds): *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care*, 1. baskı" kitabında s. 635-87, Bernd Sebastian Kamp and Patricia Bourciller (2007).
 25. Mokrousov I, Otten T, Filipenko M et al: Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting *katG* codon 315 variation, *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2509-12.
 26. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O: Allele-specific *rpoB* PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears, *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(7):2231-5.
 27. Nahid P, Pai M, Hopewell PC: Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis, *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(1):103-10.
 28. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, NCCLS document M24-A, Pennsylvania (2003).
 29. Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, Fedorin I, Drobniewski F: Detection of mutations associated with isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Samara Region, Russian Federation, *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4498-502.
 30. Nusrath Unissa A, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR: Molecular analysis of isoniazid-

- resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India, *Int J Antimicrob Agents* 2008;31(1):71-5.
31. Ramaswamy S, Musser JM: Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuber Lung Dis* 1998; 79(1):3-29.
 32. Pai M, Kalanti S, Dheda K: New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance, *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6(3):423-32.
 33. Palomino JC: Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis, *Curr Opin Pulm Med* 2006;12(3):172-8.
 34. Saniç A: *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç ve patogenezin araştırılmasında moleküler yöntemlerin yeri, "Durmaz R (ed): IV Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı" s.160-75, Malatya (2007).
 35. Saribaş Z, Kocagöz T, Alp A, Günalp A: Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis and determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates, *J Clin Microbiol* 2003;41(2):816-8.
 36. Torres MJ, 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.
 37. Visalakshi P, Meharwal SK, Myneedu VP et al: Evaluation of direct method of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid by nitrate reductase assay in a national reference laboratory, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;66(2):148-52.
 38. Williams DL, Limbers CW, Spring L, Jayachandra S, Gillis T: PCR-heteroduplex detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, "Persing DH (ed): *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases*" kitabında s.122-9, ASM Press Washington (1996).
 39. Yang Z, Durmaz R, Yang D et al: Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutole resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific PCR assay, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(3):201-8.
 40. Zhang Y, Yew WW: Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13(11):1320-30.

Eş Zamanlı Oturum 2 sunularından

MİNİMAL İNVAZİF CERRAHİDE İNFEKSİYON RİSKİ

Yöneten: **Ahmet DİNÇÇAĞ**

- Minimal invazif cerrahide infeksiyon riski
Umut BARBAROS