

MYCOBACTERİUM TUBERCULOSİS'DE MOLEKÜLER ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Y. Doç. Dr. Cengiz Çavuşoğlu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

TÜBERKÜLOZ: KÜRESELLEŞEN DÜNYADA KÜRESEL BİR SAĞLIK SORUNU

İnsanoğlunun toplayıcılık ve avcılık yaptığı, yerleşik hayat yaşamadığı paleolitik dönemde, muhtemelen diğer infeksiyon hastalıkları gibi tüberküloz (TB) da sporadik olarak görülmekteydi. Milattan önce yaklaşık 8000 yıllarında ilkel tarım tekniklerini ve hayvanları evcilleştirmeyi öğrenen insanoğlu yerleşik hayata geçti. Bu çağlarda TB daha sık olarak görülmekle birlikte yine de seyrekti. Aradan binlerce yıl geçti, insanlar daha kalabalık topluluklar halinde yaşamaya başladılar; çevresel koşullardaki değişimler insan ve tüberküloz basili arasındaki nazik dengeyi de etkiledi. Nüfus yoğunluğunun artmasıyla birlikte epidemik yayılım başladı. Bin yedi yüz ve 1800'lerde yaklaşık 75 yıl süreyle TB Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) en yüksek düzeyine ulaştı. O yıllarda TB en önemli ölüm nedeniydi. Yaşam koşullarında belirgin bir düzelme

olmamasına karşın sonraki yıllarda TB olgularının sayısında yavaş da olsa bir azalma gözlemlendi. Bu durum "genetik olarak gelişen toplumsal bağışıklık" teorisiyle açıklanmaktadır. Daha sonraki yıllarda TB Batı Avrupalı göçmenler tarafından önce Doğu Avrupa'ya, sonra Asya, Güney Amerika ve Afrika'ya yayıldı. Yirminci yüzyılda TB yeni yayıldığı bölgelerde sorun olmaya başlarken yaşam koşullarının da düzelmesiyle Batı Avrupa ve ABD'nde TB prevalansı hızla düşmeye başladı. Bin dokuz kırk dokuz yılında streptomisin (STR), 1952 yılında izoniazidin (INH) kullanıma girmesiyle TB tedavisinde kemoterapi dönemi başladı. Antibiyotik tedavisinin klinik kullanıma girmesinden sonra TB prevalansı özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada sürekli bir düşme eğilimi gösterdi. Bu eğilim 1980'lerin ortasından itibaren değişti. Tüberküloz ve çoğul ilaç direnci gösteren TB olgularının sayısı artmaya başladı. Halk Sağlığı ile ilgili çalışmalarda yetersizlikler, AIDS'li olguların sayısındaki artış ve

özellikle gelişmekte olan ülkelerde bozulan sosyoekonomik yapı bu hızlı artışın başlıca nedenleri olarak öne sürüldü.

Tüberküloz bugün dünyada en sık görülen infeksiyon hastalıklarından biridir. Dünyada her yıl 8 milyon yeni TB olgusu görülmekte ve yaklaşık 2-3 milyon insan TB nedeniyle ölmektedir. Yıllık yeni görülen olgu sayısının 2005 yılında 12 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Tüberküloz olgularının %95'inden fazlası gelişmekte olan ülkelerde görülmekte ve küresel ölçekte bakıldığında infeksiyon kaynaklı önlenabilir erişkin ölümlerinin %26'sına yol açmaktadır. Özellikle çoğul ilaç direnci gösteren olguların sayısındaki artış antibiyotiklerin TB tedavisinde kullanılmaya başlamasından yaklaşık 50 yıl sonra insanlığı yeniden yolun başına dönme tehlikesiyle karşı karşıya bırakmıştır. Bu olumsuz gelişmeleri dikkate alan Dünya Sağlık Örgütü 1993 yılında TB'yi küresel sağlık sorunu olarak ilan etmiştir.

Hastalığın erken tanısı ve primer antitüberküloz ilaç direncinin hızlı bir şekilde saptanması çoğul dirençli kökenlerin kontrolünde ve etkili tedavide yaşamsal bir rol oynamaktadır. Bu derlemede antitüberküloz ilaç direncinin genetik temelleri ve antitüberküloz ilaç direncini saptamada kullanılan moleküler yöntemleri gözden geçirilmiştir.

İLAÇ DİRENCİ: İNSANOĞLUNUN YARATTIĞI BİR SORUN

Bir çok bakteride görülenin aksine *Mycobacterium tuberculosis*'de plazmid veya transpozonlar aracılığı ile oluşan

horizontal gen transferine bağlı direnç görülmemektedir. *Mycobacterium tuberculosis*'de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Örneğin, rifampin (RİF)'e dirençli mutantların ilaçsız ortamda prevalansı 10^{-8} , INH'a dirençli mutantların ise 10^{-6} 'dır. Akciğer TB'sinde bir kavite büyüklüğüne göre ortalama 10^7 - 10^9 basil içermektedir. Bu durumda teorik olarak kaviter lezyonların içinde çok az sayıda da olsa genetik olarak ilaç direnci olan kökenler bulunabilmektedir. Fakat ilaca dirençli bu mutantlar duyarlı mikroorganizmalar arasında dilüe olmaktadır. Buna karşın özellikle büyük kaviter lezyonları olan hastalarda tedavide tek bir antibiyotik kullanılması ya da düzensiz antibiyotik kullanımı ile duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve ilaca dirençli kökenler seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmektedirler. Başka bir deyişle normal şartlarda doğada var olan bir fenomen insanoğlu tarafından amplifiye edilmektedir. Tedavi sırasında gelişen bu dirence kazanılmış direnç ya da sekonder direnç, oluşan dirençli kökenlerin başka bir hastaya bulaştırılması ile ortaya çıkan dirence ise primer ilaç direnci denilmektedir. Bir kavitenin içerebileceği en fazla basil sayısının 10^9 , bir basilde hem INH hem de RİF direncinin bir arada olma olasılığının 10^{-14} ($10^{-6} \times 10^{-8}$) olduğu gözönünde bulundurulursa teorik olarak duyarlı bir bakteri topluluğunda spontan mutasyonlarla çoğul ilaç direnci gelişme olasılığının olmadığını söylemek yanlış olmaz. Çoğul direnç hemen daima belli bir

antibiyotiğe dirençli topluluktaki basillerde yeni mutasyonlarla oluşan mutant kökenlerin antibiyotik baskısıyla seçilip topluluk içinde baskın duruma geçmesi sonucunda gelişmektedir.

İLAÇ DİRENCİNİN GENETİK TEMELLERİ RİFAMPİN VE DİĞER RİFAMİSİNLERE DİRENÇ

Rifampin semi-sentetik bir rifamisin türevidir. Rifampin bakterinin RNA polimeraz enziminin β -altünitesine bağlanarak transkripsiyonun başlamasını engellemektedir. Rifampine dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin %95'inden fazlasında RNA polimeraz enziminin β -altünitesini kodlayan *rpoB* genin 507-533. kodonları arasındaki 81 baz çifti (bç) uzunluğundaki *rifampin resistance determining region* (RRDR) veya *hot spot* adı verilen bölgede *missense* mutasyonların, küçük delesyon veya insersiyonların olduğu gösterilmiştir. Buna karşın RİF'e dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin yaklaşık %4'ünde RRDR bölgesinde genetik değişiklik saptanamamıştır. Bu kökenlerin bir bölümünde *rpoB* genin RRDR bölgesinin dışında kalan 146, 490, 505, 535, 541, 553 ve 572. kodonlarda mutasyonların olduğu gösterilirken çok küçük bir bölümünde ise direncin mekanizması açıklanamamaktadır. Dirençli kökenlerde mutasyonlar tek bir kodonda bir nükleotidin değişmesi şeklinde olabileceği gibi bir kodonda birden fazla nükleotidin değişmesiyle ya da birden fazla kodonu kapsayan ikili, üçlü hatta dörtlü kodon mutasyonları şeklinde de olabilmektedir.

Yapılan çok sayıda çalışmada RİF'e dirençli kökenlerin yaklaşık %34-57'sinde *rpoB* geninin 531. kodonunda TCG→TTG mutasyonu (Ser531Leu) saptanmıştır. Bunu 526. kodondaki mutasyonlar izlemektedir. Bazı istisnalar olmasına karşın genellikle belli kodonlardaki amino asit değişiklikleri ile RİF için MİK değerleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Kodon 531, 526 ve 513'deki mutasyonlar yüksek düzey RİF direncine (MİK $\geq 64\mu\text{g/ml}$) neden olurken 514 veya 533. kodonlarda görülen mutasyonlar genellikle düşük düzey RİF direncine yol açmaktadır.

Rifampine dirençli kökenlerde rifabutin, rifapentin ve KRM-1648 gibi diğer rifamisinlere karşı duyarlılıklar da araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda RİF için MİK değerleri ile diğer rifamisinler için MİK değerleri arasında kuvvetli bir korelasyon saptanmıştır. Rifampine dirençli kökenlerin tümünde rifapentine de çapraz direnç görülmekte ve her iki antibiyotik için de aynı MİK değerleri saptanmaktadır. Buna karşın RİF'e dirençli kökenlerin rifabutin ve KRM-1648'ye duyarlı olabildiği bilinmektedir. Örneğin, *rpoB* geninde Leu511Pro, Asp516Tyr, Asp516Val, Ser522Leu ve Leu533Pro mutasyonu olan RİF'e dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin rifabutine duyarlı (MİK $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$) oldukları saptanmıştır.

İZONİAZİD VE ETİONAMİD DİRENCİ

Mycobacterium tuberculosis kompleks dışında kalan tüm diğer mikobakteriler ve prokaryotlar INH'a dirençli olduğundan bu ilaç asıl olarak TB tedavisinde

kullanılmaktadır. Tüberküloz tedavisinde ve profilaksisinde uzun yıllardan bu yana kullanılmasına karşın ilacın bakteriyel hedefleri ve aktivasyon şekli tam olarak anlaşılamamıştır. *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinde INH direnci ile katalaz-peroksidaz aktivitesinin kaybı arasında ilişki olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Katalaz-peroksidazın ilacı aktif şekline dönüştürerek etikili olduğu düşünülmektedir. Yüksek düzey INH direnci (MİK >50µg/ml) olan klinik *M.tuberculosis* izolatlarında katalaz-peroksidaz aktivitesinde rol oynayan *katG* geninde *missense* mutasyonlar, küçük delesyonlar ve insersiyonlar saptanmaktadır. Klinik izolatlarda *katG* geninin tümünün delesyonu çok seyrek saptanan bir durumdur. İzoniazide dirençli kökenlerde *katG* geninde en sık saptanan değişiklik 315. kodonda Ser315Thr mutasyonudur. İzoniazide dirençli kökenlerin bir bölümünde *katG* geninin 463. kodonunda tek başına başına katalaz-peroksidaz aktivitesini değiştirmeyen Arg463Leu mutasyonu saptanmaktadır. Bu mutasyonun direncin nedeni olmaktan çok göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Etionamid TB tedavisinde ikinci seçenek ilaç olarak kullanılmaktadır. Etionamidin mikolik asit sentezini inhibe ederek etkili olduğu düşünülmektedir. Bitişik *open reading frame*lerden oluşan iki genlik *mabA-inhA* operonun kodladığı ürünler hem INH hem de etionamid direncine yol açmaktadır. MabA proteininin 3-ketoasil-ACP redüktaz, InhA proteininin enoil-ACP redüktaz enzimlerini kodladığı

düşünülmektedir. Bu enzimler mikolik asit biyosentezinde rol oynamaktadırlar. InhA proteininin NADH bağlayan bölgesinde oluşan amino asit değişiklikleri mikolik asit biyosentezinin inhibisyonunu önleyerek INH direncine yol açmaktadır. İzoniazide dirençli kökenlerde *mabA* geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Operonun (*mabA-inhA* operonu) yukarısında bulunan bölgedeki mutasyonlar hedefin düzeyini artırarak titrasyon mekanizması ile dirence neden olmaktadır. İzoniazide dirençli dirençli izolatların %10-15'inde *InhA* ve *katG* geninde mutasyon saptanamamaktadır.

Mikolik asit sentezinde rol oynayan β -ketoasil ACP sentetaz enzimini kodlayan *kasA* geni INH için hedef olduğu yeni anlaşılmış bir gen bölgesidir. İzoniazide dirençli kökenlerin yanısıra INH'a duyarlı kökenlerde de *kasA* mutasyonları saptanmaktadır. İzoniazide dirençli kökenlerde *kasA* mutasyonunun yanında çoğu kez *katG* ve *inhA* mutasyonları da bulunmaktadır. Bu nedenle *kasA* mutasyonlarının biyolojik öneminin daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. *oxyR* *M.tuberculosis*'de bulunan bir psödogendir. Bir çok katalaz negatif izolatta *ahpC* bölgesinin promoter bölgesinde mutasyon saptanmaktadır; *ahpC* genindeki mutasyonların INH tedavisi sırasında seçilen ve katalaz-peroksidaz aktivitesi azalmış *katG* mutantlarında daha sonra kompensatuvar olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle *ahpC* genindeki mutasyonlar direkt olarak INH direncinden sorumlu gibi görünmemektedir.

Sonuç olarak çok sayıda farklı gen INH direnci ile ilişkilidir. *KatG* ve *inhA*'nın INH direncinde rol oynadığını gösteren kanıtlar vardır. Isoniazide dirençli kökenlerde *katG*, *inhA* ve *ahpC* gen bölgelerinde mutasyonlarının yanı sıra *katG-inhA*, *katG-ahpC* mutasyonları da saptanmaktadır. Bütün bilinenlere karşın bir kısım INH'a dirençli kökende direncin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır.

PIRAZİNAMİD DİRENCİ

Pirazinamid (PZA) nikotinamidin yapısal analogudur. Pirazinamid asidik koşullarda semi-dorman durumdaki tüberküloz basillerine etkilidir. Pirazinamidin fagolizozomların asidik ortamında tüberküloz basilinin ürettiği pirazinamidaz ile aktif şekli olan pirazinoik aside dönüşerek etkili olduğu düşünülmektedir. Pirazinamide dirençli *M.tuberculosis* izolatlarında pirazinamidaz aktivitesinin olmaması da bu hipotezi desteklemektedir. Pirazinamide dirençli kökenlerin %72-97'sinde pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* geninde çeşitli tipte mutasyonların olduğu bilinmektedir. Mutasyonlarının çok fazla değişkenlik göstermesi ve gen boyunca dağılmış olması *pncA* dışındaki direnç genlerinde görülmeyen bir durumdur. Buna karşın *pncA* geninin üç bölgesinde (3 ile 17, 61 ile 85 ve 132 ile 142. kodonlar arasında) belli bir kümeleşme görülmektedir. Bu bölgede *missense* mutasyonların yanı sıra delesyon, insersiyon ve terminasyon mutasyonlarının da olabileceği bilinmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*'de kazanılmış PZA direncinde çok sayıda farklı mutasyon saptanmasına

karşın PZA'ya doğal olarak dirençli olan *Mycobacterium bovis* ve *M.bovis* BCG kökenlerinde *pncA* geninin 169. kodonunda *M.tuberculosis* kökenlerindeki histidin yerine aspartik asit bulunmaktadır.

ETAMBUTOL DİRENCİ

Etambutolün (EMB) bir arabinoz analogu olduğu düşünülmektedir. EMB arabinozil transferazın özgül hedefidir. İlaç arabinozun arabinogalaktan ve lipoarabinomannana polimerize olmasına aracılık eden arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalaktan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellemektedir. Arabinogalaktan mikobakteriyel hücre duvarının en önemli polisakkarididir. Arabinozil transferaz enzimini kodlayan üç gen *embC*, *embA* ve *embB* genleri 10 kbp'lik bir operon (*embCAB*) oluşturacak şekilde organize olmuştur. *EmbCAB*'ın sekonder yapısal analizi ile bu proteinin 12 adet transmembran domaini içeren bir integral transmembran proteini olduğu gösterilmiştir. *EmbB* proteininin sitoplazmik lupunda *EMB-resistance determining region* (ERDR)'nin yer aldığı ve bu bölgenin farklı mikobakteri türlerinde bulunan ve iyi korunan bir bölge olduğu öne sürülmektedir. Muhtemelen EMB bir arabinoz analogu *EmbB* ise bir arabinozil transferazdır. Etambutole dirençli *M.tuberculosis* kökenlerinin önemli bir bölümünün *EmbB* proteininde duyarlı kökenlerde olmayan amino asit değişiklikleri bulunmaktadır. *EmbB* proteininde saptanan çok sayıda amino asit değişikliğinin EMB direncine yola açtığı göz önünde bulundurulursa, *embB* genindeki

mutasyonların ilaç direncini gösteren bir gösterge olmanın ötesinde direnç gelişiminde direkt olarak rol oynadığı söylenebilir. Etambutole dirençli kökenlerde *embB* geninde en sık rastlanan mutasyonlar 306. kodondaki *missense* mutasyonlardır. Yine Phe285Leu, Phe330Val ve Thr630Ile diğer sık görülen mutasyonlardır. Met306Leu, Met306Val, Phe330Val ve Thr630Ile mutasyonlarında EMB için MİK değerleri (MİK $\geq$ 40 µg/ml) genellikle daha yüksektir.

Sonuç olarak, *M.tuberculosis*'deki EMB direncinin %47-65'inden *embB* genindeki mutasyonlar sorumludur. Etambutol direnci muhtemelen ilacın *embCAB* operonunun ürünlerinin değişen etkileşimlerine bağlıdır. EmbB proteininin ERDR bölgesinde mutasyon saptanamayan EMB'ye dirençli mikroorganizmalarda ise EMB direncinin nedeni bilinmemektedir.

STREPTOMİSİN VE DİĞER AMİNOGLİKOZİDLERE DİRENÇ

Streptomisin 16S rRNA'ya bağlanarak translasyonun başlamasını inhibe etmektedir. *Mycobacterium tuberculosis*'de 16S rRNA geni (*rrs*) ve ribozomal S12 proteinin kodlayan *rpsL* genindeki mutasyonların STR direncine yol açtığı gösterilmiştir. Streptomisinin etkisini ribozomal proteinlere bağlanıp translasyonu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir. Çok sayıda rRNA geni içeren diğer bakterilerin tersine, *M.tuberculosis* kompleks üyelerinde yalnız bir adet rRNA kopyası bulunmaktadır. Bu nedenle tek bir nükleotid değişikliği bile direnç gelişimine yol açabilmektedir. Streptomisin direncinin

önemli bir bölümünden *rpsL* genindeki nokta mutasyonları sorumludur. Lys43Arg STR'ye dirençli kökenlerde en sık saptanan mutasyondur. 16S rRNA'yı kodlayan *rrs* genindeki nokta mutasyonları ise genellikle 530 ve 915. nükleotidlerin çevresindeki bölgelerde kümelenmişlerdir. RpsL proteinindeki amino asit değişiklikleri yüksek düzey (MİK>500 µg/ml) STR direncine neden olurken *rrs* genindeki mutasyonlar orta düzey (MİK<250 µg/ml) STR direncine yol açmaktadırlar. Düşük düzey STR direnci (MİK<50 µg/ml) olan kökenlerde ise *rpsL* ve *rrs* genlerinde mutasyon saptanamamaktadır.

Sonuç olarak STR'ye dirençli organizmaların %65-75'inde *spsL* veya *rrs* geninde mutasyon saptanabilmektedir. Dirençli izolatların %25-30'unda bu genlerde herhangi bir mutasyon saptanamaması STR direncinden sorumlu başka mekanizmaların da olduğunu kanıtlamaktadır. Geçirgenlik bariyerinin düşük düzey dirençle ilişkili olduğuna ilişkin hipotezler daha ileri araştırmaya değer niteliktedir. Bazı bakterilerde asetilasyon yoluyla inaktivasyonun aminoglikozit antibiyotiklere karşı dirence yol açtığı bilinmesine karşın *M.tuberculosis*'de bu mekanizmanın varlığı kanıtlanamamıştır. Streptomisinle amikasin veya kanamisin arasında çapraz direnç yoktur. Buna karşın amikasin ile kanamisin arasında çapraz direnç bildirilmiştir. Yüksek düzey amikasin ve kanamisin direncinden *rrs* geninin 1400. kodonundaki mutasyonlar sorumludur.

FLOROKİNOLON DİRENCİ

Tüberküloz tedavisinde ikinci seçenek ya da alternatif ilaç olarak kullanılan siprofloksasin ve ofloksasin sentetik nalidiksik asit türevleridir. Florokinolonların hedefi DNA'nın negatif süpersarmal oluşturmasını katalizleyen ve bir ATP-bağımlı tip II DNA topoizomeraz olan DNA giraz enzimidir. DNA giraz *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan iki adet A ve iki adet B altünitesinden oluşan heterotetramer yapıda bir proteindir. Florokinolonlar giraz enzimine bağlanarak süpersarmal oluşumunu önlemekte böylece DNA'daki topolojik değişikliklere bağlı olarak hücrenin parçalanmasına neden olmaktadır. Florokinolonlar arasında çapraz direnç sıklıktır. Yine, florokinolonlar çoğu kez ilaca dirençli TB'nin tedavisinde kullanıldığından kazanılmış florokinolon direnci çoğu kez RİF ve diğer ilk kuşak ilaçlara dirençle

birliktedir. Yüksek düzey florokinolon direnci saptanan kökenlerde *GyrA* proteininin 40 amino asitlik kısa bir bölümündeki *quinolone resistance determining region* (QRDR) olarak adlandırılan bölgeyi kodlayan gen bölgesinde mutasyonlar bulunmaktadır. Ayrıca, spesifik *gyrA* allelleri ile kinolon direncinin düzeyi arasında ilişki olduğu bilinmektedir.

Sonuç olarak *M.tuberculosis* kökenlerinde kazanılmış florokinolon direncinin %75-94'ünden QRDR bölgesindeki *gyrA* mutasyonlarının sorumlu olduğu gösterilmiştir. İlaça geçirgenliğin azalması ve aktif ilaç pompalanması florokinolon direncine yol açabilen diğer direnç mekanizmalarıdır. *Mycobacterium tuberculosis*'de ilaç direncine yol açan mutasyonlar ve ilaçların etki mekanizmaları Tablo1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *Mycobacterium tuberculosis*'de ilaç direncinin mekanizmaları

İlaç	Etki mekanizması	Direnç geni	Görevi	Mutasyonun sıklığı (%)
RİF	Transkripsiyonun inhibisyonu	<i>rpoB</i>	İlacın hedefi	96-100
İNH	Mikolik asit sentezinin inhibisyonu.	<i>katG</i>	İlaç aktivasyonu	42-58
	DNA, lipid, karbonhidrat ve NAD metabolizmasını etkiler	<i>inhA</i>	İlacın hedefi	21-34
		<i>kasA</i>	İlacın hedefi	-
		<i>ahpC</i>	Direnç göstergesi	10-15
PZA	Sitoplazmanın asidifikasyonu	<i>pncA</i>	İlaç aktivasyonu	72-97
EMB	Arabinogalaktan sentezinin inhib.	<i>embCAB</i>	İlacın hedefi	47-65
STR	Protein sentezinin inhibisyonu	<i>rpsL</i>	İlacın hedefi	52-59
		<i>rrs</i>	İlacın hedefi	8-21
AMİ/KAN	Protein sentezinin inhibisyonu	<i>rrs</i>	İlacın hedefi	76
FQ	DNA girazın inhibisyonu	<i>gyrA</i>	İlacın hedefi	75-94
		<i>gyrB</i>	?	-

ANTİBİYOTİK DİRENCİ İLE İLİŞKİLİ MUTASYONLARIN SAPTANMASINDA KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Mycobacterium tuberculosis'de ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra hızlı ilaç direnci saptamaya yönelik moleküler uygulamalar geliştirilmiştir. Moleküler direnç göstergelerinin saptanması için minimal bir üreme yeterlidir. Bu nedenle konvansiyonel ilaç duyarlılık yöntemleriyle karşılaştırıldığında testlerin sonuçlanması için geçen süre haftalardan saatlere inmiştir. Yine bu teknikler otomasyona izin vermekte ve laboratuvar tehlikelerini en aza indirmektedir. Birden fazla gen bölgesinin dirençten sorumlu olduğu durumlarda her bir direnç geni için ayrı işlem yapılmasını gerektirmesi dirence yol açmayan sessiz mutasyonların da saptanması bu tekniklerin önemli dezavantajlarıdır. Pratik uygulamalarda moleküler teknikler çoğu kez RİF direncinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Çünkü, RİF en potent antitüberküloz ilaçlardan biridir. Bu nedenle RİF direnci özellikle beraberinde diğer antitüberküloz ilaçlara da direnç olması durumunda yüksek oranda klinik relapslara yol açmaktadır. Ayrıca, RİF'e dirençli izolatların yaklaşık %90'ında INH direnci de bulunmaktadır; dolayısıyla RİF direnci aynı zamanda INH direncinin de bir göstergesidir. Dahası RİF direncinin tamamına yakın bir bölümünden *rpoB* geninin 81 bp'lik bölgesindeki mutasyonlar sorumludur. Bu da *rpoB* genini moleküler

tenknikler için uygun bir hedef haline getirmektedir.

İlaç direncinin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin bir çoğu üç basamaktan oluşmaktadır: (i) DNA eldesi. Mekanik parçalama ve kaynatma gibi basit teknikler bile genomik DNA'nın eldesi için yeterli olmaktadır. (ii) Hedef DNA'nın amplifikasyonu. Bu amaçla çoğu kez polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır. (iii) Mutasyonların saptanması. Uygun primerle amplifiye edilen hedef DNA'daki mutasyonlar aşağıda anlatılan yöntemlerinden biri kullanılarak saptanmaktadır.

DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizi mutasyonları saptamak için en dolaysız ve güvenilir yöntemdir; önceden bilinen ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasına izin verir. Buna karşın INH direncinde olduğu gibi mutasyonların dağınık ve büyük segmentler halinde olduğu durumlarda her izolat için birden fazla sayıda dizi analizi gerekebileceğinden kolay uygulanabilir bir yöntem değildir. Buna karşın *rpoB* gibi yoğun ve çok kısa segmentte sınırlı olan direnç genlerinin saptanmasında DNA dizi analizi uygun bir tekniktir.

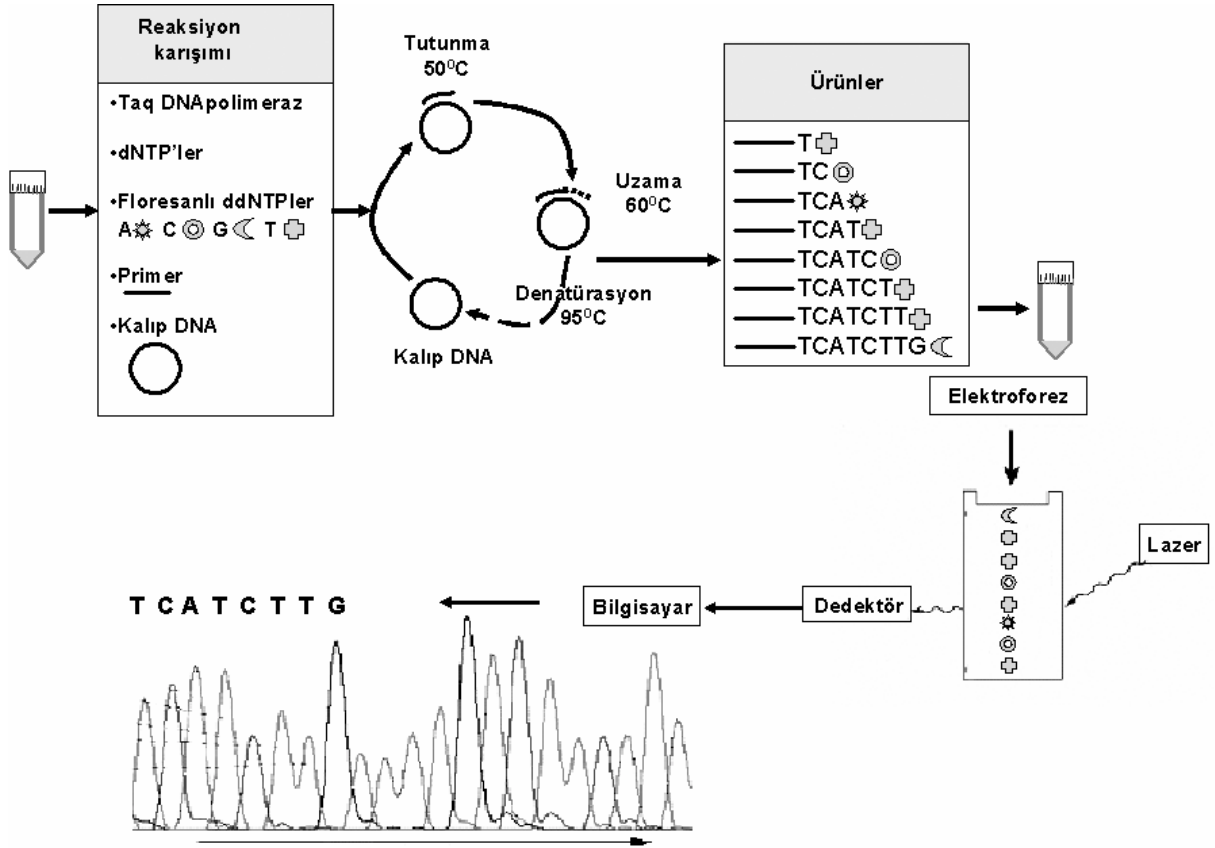
Günümüzde DNA dizi analizi amacıyla Sanger'in zincir sonlandırma temeline dayanan dideoksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. Zincir sonlandırma yöntemi manuel ve otomatize sistem olarak kullanılabilir. Son yıllarda otomatize sistemlerin kullanıma girmesi DNA dizi

analizinin çok geniş çaplı kullanım alanı bulmasına olanak sağlamıştır. Otomatize DNA dizi analizi şu aşamalardan oluşmaktadır: (i) Özgül oligonükleotid primerin nükleotid dizisi belirlenmek istenen DNA kalıbına tutunması (ii) Taq DNA polimeraz, floresan boyalı ddNTP ve dNTP'lerin karışıma ilave edilerek yeni DNA zincirinin sentezi (iii) Yeni sentezlenen DNA'nın sekans-spesifik olarak sonlanması (iv) Oluşan ürünlerin kapiller elktroforezde yürütülmesi.

Zincir sonlandırma yöntemine dayanan otomatize DNA dizi analizinde PCR ile çoğaltılan hedef DNA ve bu DNA kalıbına tutunacak yaklaşık 20 bp'lik bir primer kullanılmaktadır. DNA polimeraz enzimi bu karışıma eklendiğinde primerin tutunduğu kalıp deoksinükleotid trifosfat (dNTP) varlığında sentez reaksiyonunu başlatır. Reaksiyon tüpünde ayrıca herbiri farklı

floresan boyalarla işaretlenmiş 2'-3'-dideoksinükleotid trifosfatlar (ddATP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP) bulunmaktadır. Yapısal olarak dNTP'lere benzeyen ddNTP'lerin 3' hidroksil grupları bulunmamaktadır. Dideoksinükleotid trifosfatlar DNA polimeraz etkisiyle uzayan DNA zincirine katılırlar fakat 3' uçlarında hidroksil grubu bulunmadığından kendilerinden sonra 5'-3' fosfat bağlanmasını engelleyerek zinciri sonlandırırlar. Böylece DNA zincirinin daha fazla uzamasına izin vermezler. Sekans-spesifik olarak sonlandırılan DNA dizileri kapiller elektroforez ile yürütülür. Bu işlem sırasında sonlanan her bir dizide bulunan ddNTP'lerin yaydığı farklı dalga boyundaki floresanslar sistemde bulunan saptayıcı tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrilir. Otomatize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları Şekil 1'de şematize edilmiştir.

Şekil 1. Otomatize DNA dizi analizi yönteminin aşamaları



LİNE PROBE ASSAY (SOLID FAZ HİBRİDİZASYON)

Line probe assay (LiPA) hızlı RİF direnci saptamak amacıyla geliştirilmiş bir kittedir. Yöntem reverz hibridizasyon temeline dayanmaktadır. LiPA yönteminde RİF direncinden sorumlu *rpoB* geninin biyotinle işaretlenmiş PCR ürünleri denatüre edilerek nitroselülöz şerit üzerine yerleştirilmiş 10 farklı özgül proba hibridize edilmektedir. Oluşan hibridler alkalen fozfatazla konjuge edilmiş streptoavidin ve kromojen substrat eklenerek saptanmaktadır. LiPA test şeritlerinde duyarlı bakterinin *rpoB* geni için beş, özgül *rpoB* mutasyonları için dört adet proba birlikte *M.tuberculosis* kontrol probu

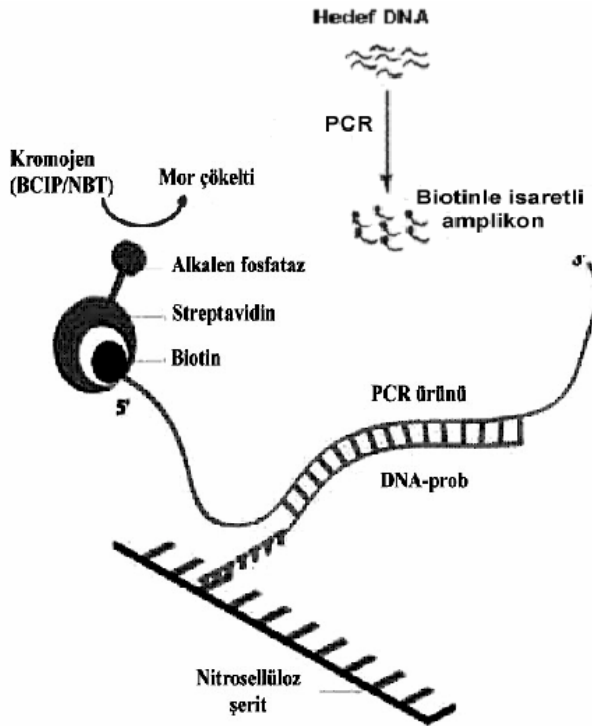
ve konjugat kontrolü bulunmaktadır. Örnekte *M.tuberculosis* kompleks'in varlığı *M.tuberculosis* kompleks-spesifik prob ile saptanmaktadır. Test edilen bakteride RİF direncine yol açan mutasyonun varlığı amplifiye edilmiş ürünün S-tip (S1'den S5'e kadar olan duyarlı probalar) probalarla hibridizasyonu değerlendirilerek saptanmaktadır. S problemlerinin altına yerleştirilmiş dört adet prob (R problemleri) sık rastlanan spesifik direnç mutasyonlarıyla hibridize olacak şekilde tasarlanmıştır: R2 (Asp516Val), R4a (His526Tyr), R4b (His526Asp) ve R5 (Ser531Leu).

Sonuç olarak S problemleri ile pozitif sinyal verip R problemleriyle hibridize olmayan kökenler RİF'e duyarlı olarak değerlendirilir.

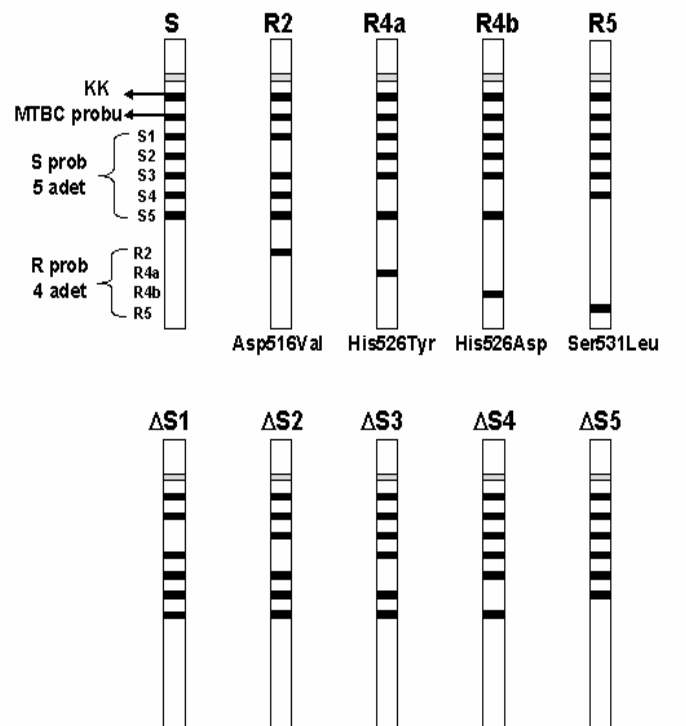
S problemlerinden herhangi birinde sinyal kaybı olmasına karşın R problemleriyle hibridizasyon olmazsa LiPA S paternleri oluşur ($\Delta S1$, $\Delta S2$, $\Delta S3$, $\Delta S4$, $\Delta S5$). Bu durumda test edilen bakteri RİF'e dirençli olarak değerlendirilir. Spesifik mutasyonlardan birini gösteren R problemlerden birinin

sinyal vermesiyle birlikte o proba uyan S probleminin kaybı özgül direnç paterni olarak değerlendirilir (R2, R4a, R4b, R5). LiPA yönteminin aşamaları Şekil 2, LiPA'da saptanan direnç paternleri Şekil 3'de gösterilmiştir.

Şekil 2. LiPA yönteminin aşamaları



Şekil 3. LiPA'da saptanan direnç paternleri



RNA /RNA MISMATCH ANALİZ

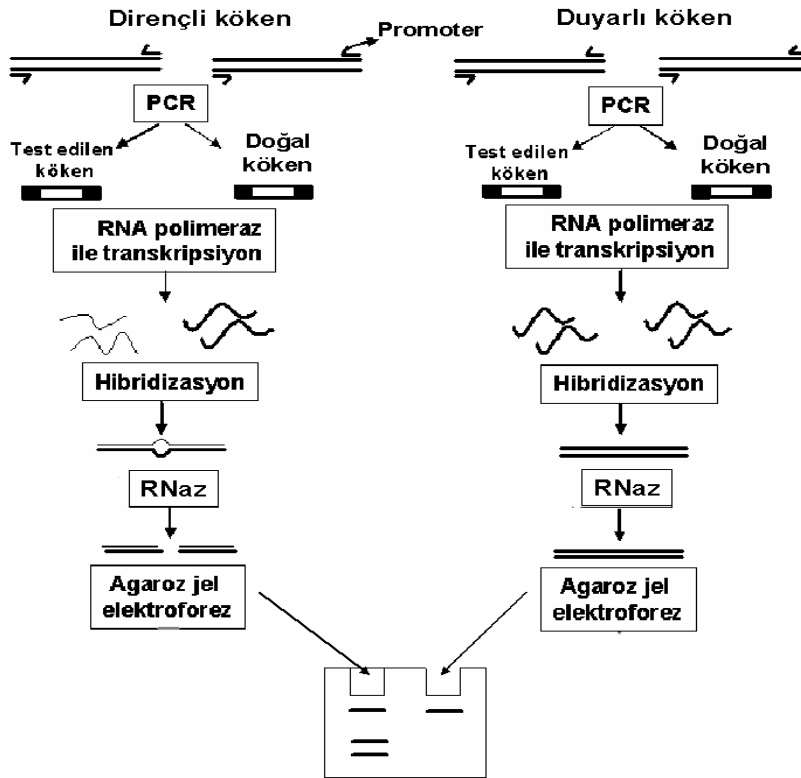
RNA/RNA mismatch analizi çift sarmallı RNA'nın RNazA enziminin yıkıcı etkisine dayanıklı olması temeline dayanmaktadır. Yöntem beş aşamadan oluşmaktadır: (i) Test edilen *M. tuberculosis* kökeni ve ilaca duyarlı *wilde-type* (doğal) referans kökeninin hedef DNA'larının RNA polimeraz enzimi için promoter diziler de içeren özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifikasyonu (ii) Test kökeni ve referans

kökeninin PCR ürünlerinden tek sarmallı RNA transkriptlerinin elde edilmesi (iii) Test kökeni ile referans kökenin RNA'larının hibridizasyonu, (iv) RNA/RNA dubleksinin eşleşmenin olmadığı *mismatch* noktasından RNazA ile kesilmesi, (v) RNazA'nın etkisinin nusieve 3:1 agaroz jel elektroforez ile incelenmesi. Duyarlı kökenlerde, test ve referans kökenlerinden elde edilen RNA transkriptlerinin oluşturduğu hibridlerde yanlış eşleşme olmamaktadır. Bu nedenle oluşan hibridler RNazA ile kesilmediğinden

elektroforez sonucunda eşleşen hibridlerin oluşturduğu tek bantlı patern saptanmaktadır. Dirençli kökenlerde, test ve referans kökenlerinden elde edilen transkriptlerin oluşturduğu hibridlerde yanlış eşleşme olmaktadır. Bu hibridler yanlış eşleşmenin olduğu noktadan RNazA ile kesilerek iki parçaya ayrılmaktadır. Hibridizasyon sırasında duyarlı ve dirençli

kökenlerin RNA transkriptlerinin bir kısmı yine duyarlı ve dirençli komplementer RNA transkriptleriyle hibridize olduğundan hibridizasyon sırasında yanlış eşleşmeyen hibridler de oluşmaktadır. Sonuç olarak dirençli kökenlerde üç bantlı patern saptanmaktadır. RNA/RNA Mismatch yönteminin aşamaları Şekil 1'de gösterilmiştir.

Şekil 4. RNA/RNA Mismatch yönteminin aşamaları



PCR-SSCP

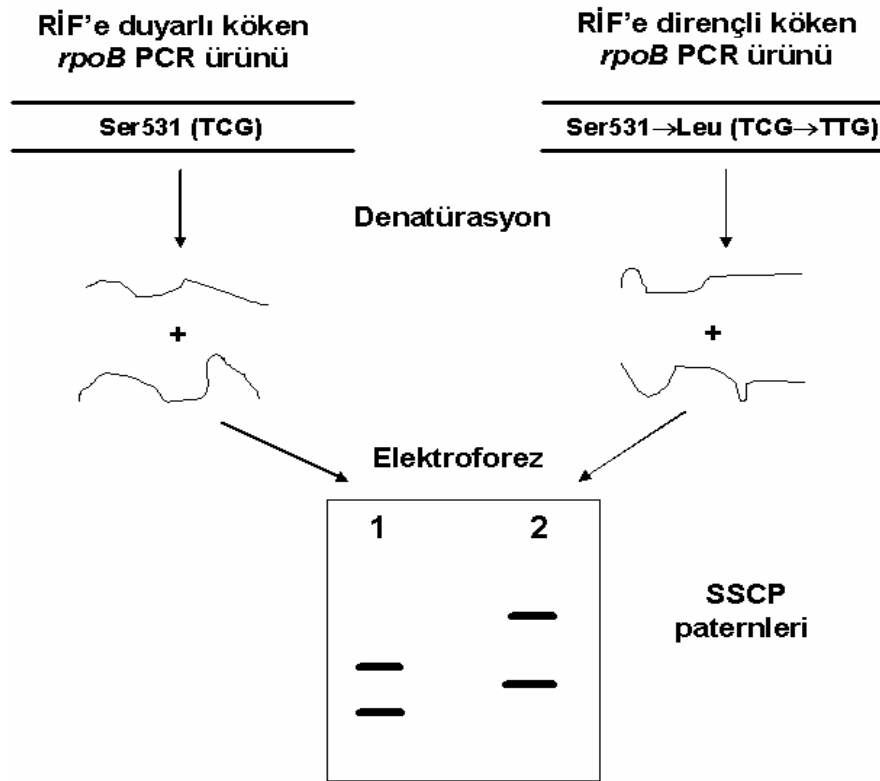
Single strand conformation polymorphism (SSCP) yöntemi yüksek rezolüsyonlu denatüre olmayan poliakrilamid jelde mutant ve doğal tip tek sarmallı DNA'nın farklı hareketlilik göstermesi temeline dayanmaktadır. Tek

sarmallı DNA'nın katlanma özellikleri nükleotid dizilişiyle ilişkilidir. Farklı nükleotid dizilerine sahip tek sarmallı DNA fragmanlarının katlanmaları farklı noktalardan olmaktadır. Katlanma yerlerinin değişmesi tek sarmallı DNA'nın tersiyer yapısını değiştirerek jel üzerindeki mobilitasını etkilemektedir. PCR-SSCP

yönteminde ilk aşamada doğal tip referans köken ile mutant olduğu düşünülen kökenin PCR ile amplifiye edilen hedef DNA'ları denatüre edilerek tek sarmallı hale getirilir. Daha sonra referans kökenden elde edilen tek sarmallı DNA'lar ile mutant olduğu düşünülen DNA'ların jeldeki mobiliteleri karşılaştırılır. Mutant kökenlerin tek sarmallı

DNA'ları poliakrilamid jel elektroforezde referans kökenin tek sarmallı DNA'larından farklı mobiliteler göstermeleri ile ayrılabilirler. PCR-SSCP manuel ve otomatize sistem olarak kullanılabilir. PCR-SSCP yönteminin aşamaları Şekil 4'de gösterilmiştir.

Şekil 5. PCR-SSCP yönteminin aşamaları



HETERODUBLEKS ANALİZ

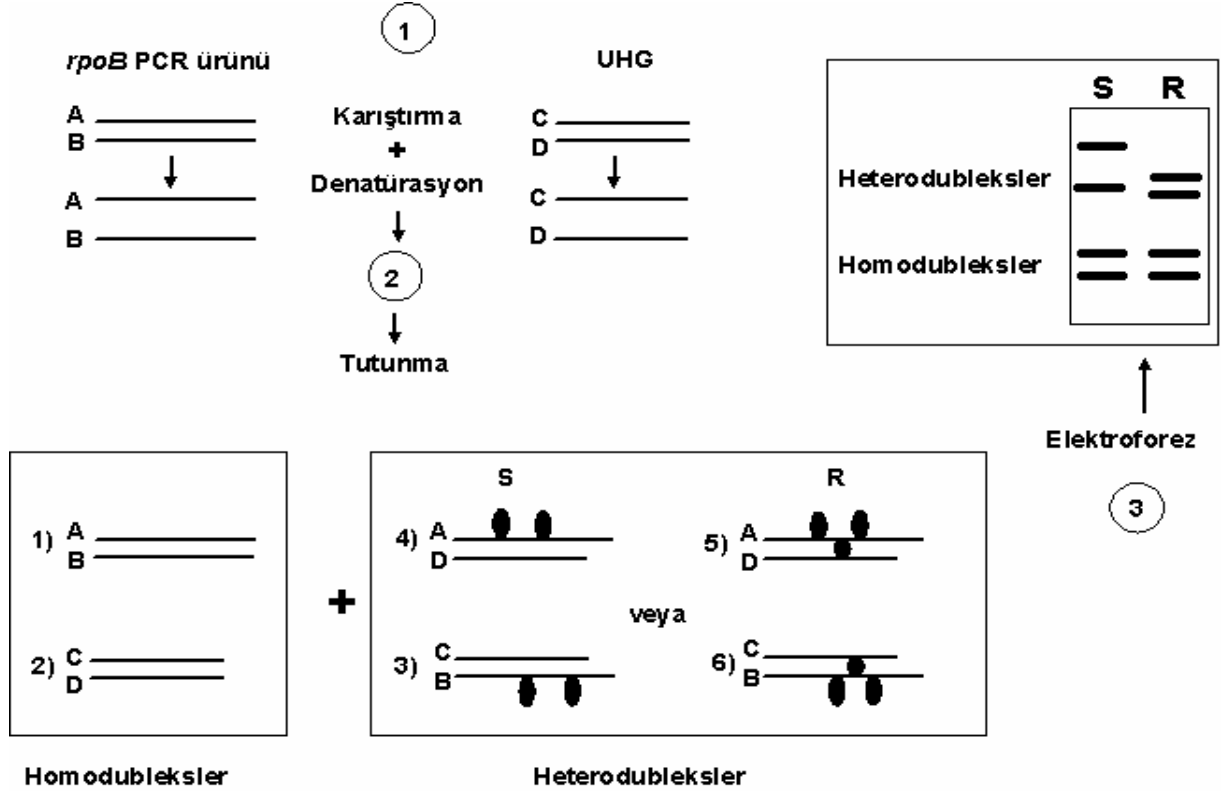
Heterodubleks analiz (HDA) jel temelli bir mutasyon tarama yöntemidir. Yöntem kısa DNA fragmanlarının tam diziliş uygunluğu gösterip göstermeyişlerine göre farklı elektroforetik mobiliteler göstermeleri temeline dayanmaktadır. Heterodubleks analiz yönteminde ilaç duyarlılığı araştırılan izolatin hedef DNA'sı PCR ile amplifiye edilir. Elde edilen ampikonlar *universal*

heteroduplex generator (UHG) kullanılarak saptanır. Sentetik olarak yapılan UHG hedef DNA'da bilinen mutasyon bölgelerine uyan yerlerde bilinen nükleotid değişiklikleri, insersiyon veya delesyonlar bulunduran bir çift sarmallı DNA dizisidir. Heterodubleks analizde UHG ile test edilen kökenin hedef DNA'sı aynı reaksiyon karışımı içinde önce denatüre edilir, daha sonra yeniden tutunmalarına izin verilerek heterodubleks

ve homodublekslerin oluşması sağlanır. Son aşamada oluşan homo ve heterodublekslerin oluşturdukları bant

paternleri elektroforetik olarak incelenir. Heterodubleks analiz yönteminin aşamaları Şekil 6'de şematize edilmiştir.

Şekil 6. Heterodubleks analiz yönteminin aşamaları



REAL-TIME PCR

Real-time PCR amplifikasyon ve saptama işlemlerinin aynı kapalı sistem içinde gerçekleştirildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde PCR sırasında oluşan ürünler özgül proplar veya çift sarmallı DNA'ya bağlanma özelliği gösteren boyalar (SYBERGREEN, etidyum bromür v.b.) yardımıyla saptanmaktadır. *Real-time* PCR'da oluşan ampikonların T_m (erime ısı) değerleri belirlenerek özgül mutasyonlar saptanabilmektedir. Ampikon kontaminasyonun düşük olması, işlemlerin tamamlanması için gerekli olan sürenin çok

daha kısa olması, kalitasyon, kantitasyon işlemlerine, multipleks amplifikasyona ve mutasyon saptanmasına izin vermesi ve çok daha az miktarlardaki ürünün saptanabilmesi *Real-time* PCR'ın klasik PCR'a olan temel üstünlükleridir.

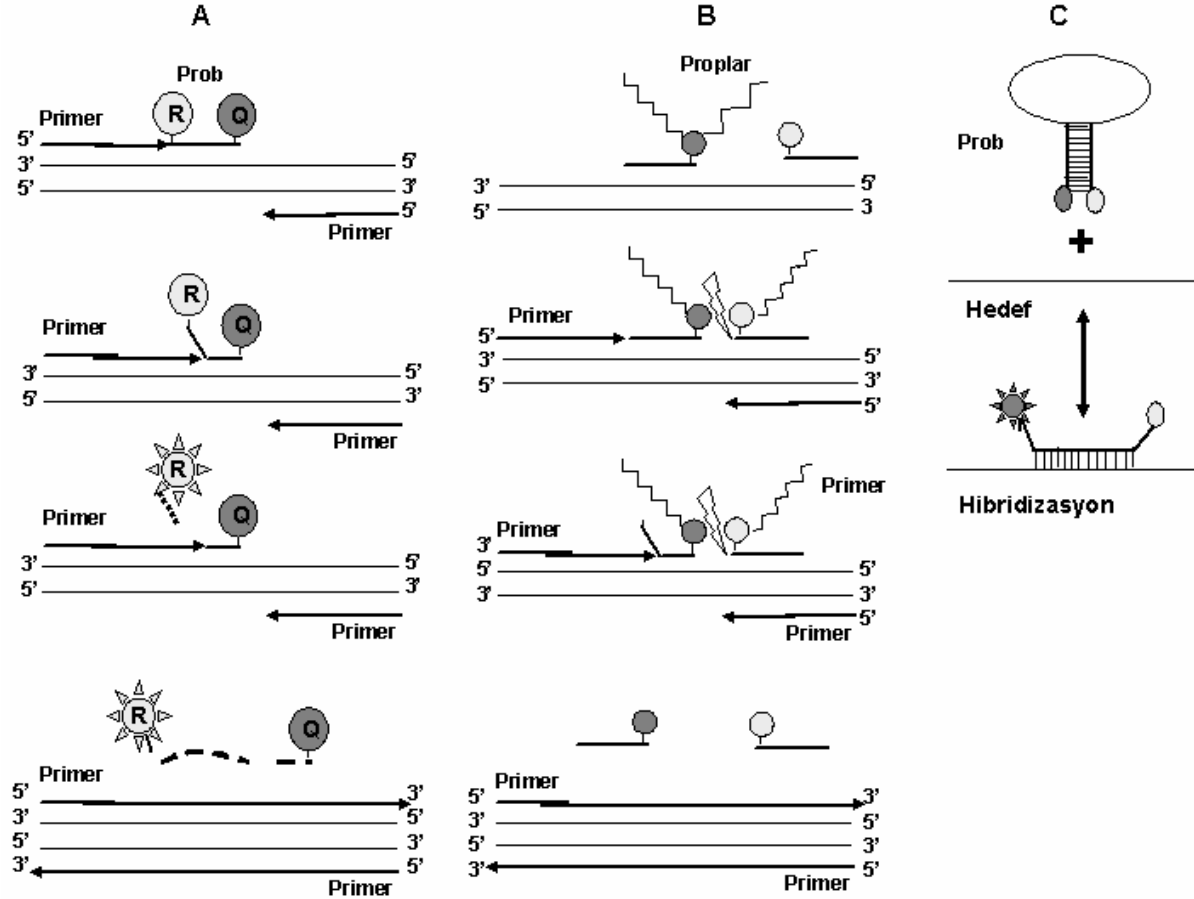
Real-time PCR yönteminde üç farklı formatta hazırlanmış saptama probları kullanılabilmektedir; *TaqMan*, *fluorescent resonance energy transfer* (FRET) ve *molecular beacons*. *TaqMan* sistemi, PCR işlemi sırasında *TaqMan* probunun Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile parçalanması temeline dayanmaktadır.

Probun 5' ucunda *reporter* (bildirici) 3' ucunda *quencher* (bastırıcı) floresan boya bulunmaktadır. PCR'in tutunma evresinde *TaqMan* probu tek sarmallı hedef DNA'ya tutunur ve uzama evresinde DNA'nın karşıt zinciri sentezlenirken Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile *reporter* boya yerinden çıkartılır. Böylece *reporter* boya *quencher* boyadan ayrılır ve *reporter* boya floresans vermeye başlar. FRET problemleri iki farklı floresan boya ile işaretli oligonükleotidlerdir. Problemlerden birinin 3' ucunun ise 5' ucu floresan boya ile işaretlidir. Problemler amplifiye olan hedef DNA ile birinin kuyruk kısmı ucunun baş kısmına gelecek şekilde hibridize olurlar. Böylece iki floresan boya birbirine yakın konumda bulunur. İlk probdaki floresan boya sistemin ışık kaynağı ile uyarıldığında belli bir dalga boyunda floresan ışık yayar. Eğer hibridizasyon olmuşsa yani iki floresan boya birbirine yeteri kadar yakınsa (1-5 nükleotid) yayılan enerji ikinci floresan boyayı harekete geçirir ve daha uzun dalga boyunda ikinci bir floresan ışık yayılır. Bu enerji transferi FRET olarak adlandırılır ve

iki probun arasındaki uzaklıkla yakından ilişkilidir. *Molecular beacon* sisteminde saç tokası şeklinde bir prob kullanılmaktadır. Propda *reporter* ve *quencher* boyalar birbirine yakın pozisyonda yerleştiğinden ışımaz. Luptaki prob dizisi hedef DNA ile hibridize olduğunda lüp açılır. Bu yeniden yapılanma *reporter* boyanın *quencher* boyadan ayrılarak floresan ışık yaymasına yol açar.

Real-time PCR'da saptama yayılan ışımanın sistemin optik parçası ile okunması temeline dayanmaktadır. Ölçülen floresans PCR sırasında artan PCR ürününün miktarı ile orantılıdır. Sikluslar sırasında *reporter* boyaların yaydığı floresans sistem tarafından kaydedilerek bilgisayar ortamında değerlendirilir ve kantite edilir. Yapılan çalışmalarda *Real-time* PCR ile aynı reaksiyon tüpünde RİF ve INH direncinden sorumlu *rpoB* ve *katG* mutasyonlarının başarıyla saptandığı bildirilmektedir.

Şekil 7. Real-time PCR'da kullanılan saptama problemleri. A) TaqMan prob sistemi B) FRET prob sistemi C) Molecular beacon prob sistemi

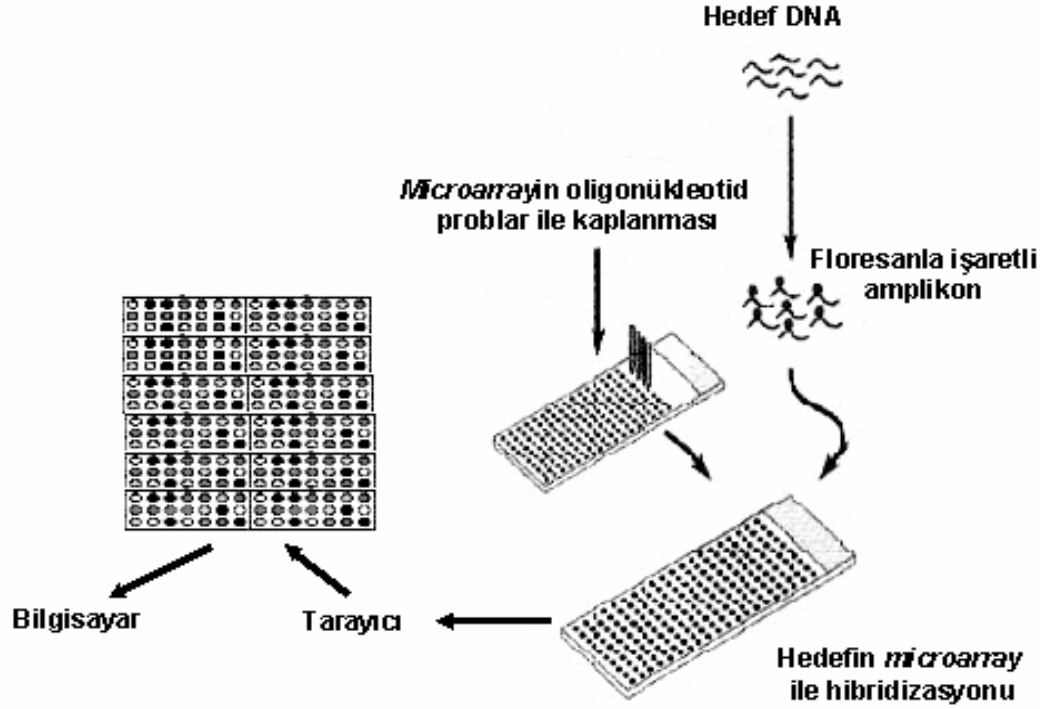


DNA MICROARRAY

Son yıllarda küçük bir alanda çok sayıda oligonükleotid probun yoğun bir şekilde bulunduğu DNA *microarray*ler ile farklı DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan *gen chip* teknolojileri geliştirilmiştir. Yöntem PCR ile elde edilen floresanla işaretli amplikonların çok sayıda farklı oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması temeline dayanmaktadır. Bağlı amplikonların yaydığı floresan sinyaller

daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. RİF'e dirençli *M.tuberculosis* kökenleriyle yapılan DNA *microarray* çalışmalarında DNA dizi analizi ile uyumlu sonuçlar alınmıştır. Farklı ilaç dirençlerini [INH (*katG*, *inhA*), RİF (*rpoB*), STR (*rpsL*) ve FQ (*gyrA*)] birlikte saptamaya uygun problemler içeren DNA *microarray* geliştirilmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Bu yaklaşım *M.tuberculosis*'de ilaç direncinden sorumlu mutasyonların saptanmasında kuvvetli bir potansiyel adaydır.

Şekil 8. DNA *microarray* yönteminin aşamaları



KAYNAKLAR

1. 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: 4435-4438.
2. Cockerill III FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 199-212.
3. Cockerill III FR, Uhl JR. Applications and challenges of real-time PCR for the clinical microbiology laboratory In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill III FR (eds). Rapid
4. Cycle Real-Time PCR Methods and Applications-Microbiology and Food
5. Analysis, 1st ed. Heidelberg: Springer. 2002: 3-30.
6. Daniel TM, Bates JH, Downes KA. History of tuberculosis. In: Bloom BR (ed). Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control. 1st ed. Washington DC: American Society of Microbiology. 1994: 13-24.
7. de Viedma DG, del Sol Diaz 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: 988-995.

8. Dornbiewski F. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. EUCAST Discussion Document, CMI 2001; 8: 1-10
9. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 496-514.
10. Nash K, Gaytan A, Inderlied CB. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by use of a rapid simple and specific RNA/RNA mismatch assay, J Infect Dis. 1997; 176: 533- 536
11. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tubercle and Lung Dis 1998; 79: 3-29.
12. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem. 2001; 47: 809-814.
13. Tait RC. An Introduction to Molecular Biology. 1st ed. Davis: Horizon Scientific Press. 1997.
14. Thomas GA, Williams DL, Soper SA. Capillary electrophoresis-based heteroduplex analysis with a universal heteroduplex generator for detection of point mutations associated with rifampin resistance in tuberculosis. 2001; 47: 1195-1203.
15. Torres MJ, Criado A, Ruiz M, Llanos AC, Palomares JC, Aznar J. Improved real-time PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Diagnostic Microbiol and Infect Dis. 2003; 45: 207-212.
16. Vernet G. DNA-chip technology and infectious diseases. Virus Research. 2002; 82: 65-71.
17. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Dornbiewski F. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1969-1973.
18. Williams DL. Molecular methods to determine drug resistance in pathogenic mycobacteria. Mikrobiyol Bült. 2000; 34: 23-39.
19. Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* In: Hatful GF, Jacobs WR, Jr (eds). Molecular Genetics of Mycobacteria, 1st ed. Washington D.C. : 2000: 235-254.