

MANİSA'DA İZOLE EDİLEN RİFAMPİSİNE DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KÖKENLERİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ*

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF RIFAMPICIN-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES FROM MANISA, TURKEY

Nuri ÖZKÜTÜK¹, Süheyla SÜRÜCÜOĞLU¹, Can BİÇMEN², Hörü GAZİ¹, Semra KURUTEPE¹, Kenan DEĞERLİ¹, Talat ECEMİŞ¹

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

² İzmir Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı İzmir

Anahtar Sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, rifampisin, *rpoB*, mutasyon, sekans analizi

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, rifampicin, *rpoB*, mutation, sequence analysis

* Bu araştırma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Geliş: 01 Ağustos 2007

Kabul: 15 Ekim 2007

ÖZET

İlaça dirençli tüberküloz tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Bu araştırmanın amacı, Manisa Bölgesi'nde izole edilen rifampisine dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinin moleküler epidemiyolojisini incelemektir. Otomatize DNA dizi analizi yöntemi ile 43 kökenin *rpoB* geninin 481-589. kodonlarında yer alan 329 baz çifti dizisi mutasyon yönünden değerlendirilmiştir. Kökenlerin %93'ünde mutasyon saptanırken, üç kökende mutasyon bulunmamıştır. En sık (%63) Ser531Leu mutasyonu izlenmiştir. Araştırmada toplam olarak 12 kodonu ilgilendiren 15 farklı mutasyon ve 13 allel saptanmıştır. Bu mutasyonlardan bir tanesi (Ile572Leu) daha önce bildirilmemiş olup RRDR gen bölgesi dışında tanımlanmıştır. En sık 531 (%67), 516 (%9) ve 526 (%5) kodonlarda mutasyona rastlanmıştır. Sonuç olarak, araştırmadan elde edilen verilerin bölgemizde izole edilen ilaca dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesine yardımcı olacağı düşünülmüştür.

SUMMARY

Drug-resistant tuberculosis is a serious health problem throughout the world. The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Manisa, Western Turkey. We evaluated the mutations in a 329 base pairs located in 481-589 codons of the *rpoB* gene by automated sequencing of 43 strains. In 43 rifampicin resistant strains, mutations were identified in 93% strains. No mutation was detected in the 3 resistant strains. The most common mutation (63%) was Ser531Leu. Overall, 15 different mutations and 13 alleles affecting 12 codons were identified. One new mutation (Ile572Leu), which was localized outside the RRDR was identified. The codon numbers of the most frequently encountered mutations were 531 (67%), 516 (9%), and 526 (5%). It was concluded that the results from this study can serve as a basis for monitoring molecular epidemiology of drug resistant *M. tuberculosis* strains isolated in our region.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002 raporuna göre, Türkiye nüfusu 66.668.000'dir ve

tanı konulan hasta sayısı 18.038, TB insidansı yüz binde 27'dir (1). Son yıllarda ilaca dirençli olguların artması, TB kontrol programlarının başarısını önemli ölçüde engellemektedir. Manisa'da 1997-2003 yılları arasında kayıtlı

olgularda primer çoklu ilaç direnci (ÇİD) %4.4, kazanılmış ÇİD ise %22.4 olarak bildirilmiştir (2). Bu oranlar bölgemizde özellikle kazanılmış ÇİD-TB olgularının önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir.

Tüberküloz sağaltımında en güçlü antitüberküloz ilaç rifampisinidir. Rifampisine dirençli kökenlerin %90'dan fazlası aynı zamanda izoniyazit direnci de taşımaktadır (3). Bu nedenle rifampisin direncinin gösterilmesi ÇİD-TB olgularının tanısı için belirleyici olmaktadır. Rifampisin, *rpoB* gen ürünü olan RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesine bağlanarak bakteride transkripsiyonu engeller (4). Rifampisin direnci temel olarak *rpoB* geninin 432-458 kodonları arasındaki 81 baz çiftini (bp) içeren küçük bir bölümde ortaya çıkan nokta mutasyonlar sonucu gelişmektedir (4-7). Bu alan 27 amino-asidin kodlanmasından sorumlu olan bir gen bölgesidir. Rifampisin direncini belirleyici bölge (RRDR; rifampicin resistance-determining region) olarak tanımlanan bu bölge *Escherichia coli* numaralandırma sistemine göre 507-533. kodonlara karşılık gelmektedir (6, 8). Moleküler yöntemler ile rifampisine dirençli kökenlerin %95'inde bu alanda çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır (9, 10). Kültüre dayalı olan fenotipik ilaç duyarlılık testlerinin sonuçları en erken 4-14 günde sonuçlanırken, moleküler yöntemler ile dirençten sorumlu olan bu mutasyonlar birkaç gün içinde güvenilir olarak gösterilebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda TB basillerinde rifampisin direncinin belirlenmesinde moleküler yöntemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaya başlamıştır. DNA dizi analizi bu amaçla kullanılan en güvenilir yöntemlerden biridir (11). *rpoB* sekans verileri aynı zamanda allellerin yayılımı ile ilgili epidemiyolojik bilgiler sağlamak ve hastalığın kontrolüne ilişkin önlemlere ışık tutmaktadır (12).

Bu araştırmanın amacı, bölgemizde izole edilen rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerin ilaç direnç profillerini araştırmak ve *rpoB* gen mutasyonlarını DNA dizi analizi yöntemi ile tanımlamaktır. Elde edilen verilerin bölgemizdeki dirençli kökenlerin moleküler epidemiyolojisine katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

GEREÇ VE YÖNTEM

***Mycobacterium tuberculosis* kökenleri:** Araştırmada fenotipik olarak rifampisine dirençli olduğu saptanan 43 *M. tuberculosis* kökeni ile rifampisine duyarlı bulunan yedi klinik köken olmak üzere toplam 50 köken incelenmiştir. Bakteriler 2003-2005 yılları arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı ve İzmir Göğüs Hastalıkları Hastanesi Tüberküloz

Laboratuvarı'nda Manisa ve çevresinde yaşayan 50 farklı hastanın solunum yollarından izole edilmiştir. Aynı hastadan birkaç kez izole edilen TB basillerinden sadece ilk izole edilen köken araştırmaya alınmıştır.

İlaç duyarlılık testi: Birinci kuşak ilaçlar olan rifampisin (RIF), izoniyazit (INH), streptomisin (SM) ve etambutol (EMB)'e direncin belirlenmesinde BACTEC 460TB sisteminde modifiye proporsiyon yöntemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, ABD). Kullanılan kritik ilaç konsantrasyonları INH için 0.1 µg/ml, RIF ve SM için 2 µg/ml ve EMB için 2.5 µg/ml'dir. Rifampisine dirençli kökenler genetik inceleme için çalışılıncaya kadar Löwenstein-Jensen besiyerinde ve +4⁰ C'de korunmuştur.

DNA eldesi: Her bir kökenden Eppendorf tübünde 1.5 ml yoğun bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve 80⁰ C'de bir saat ısı ile inaktive edilmiştir. Bakterilerden DNA eldesi RTP Spin Mycobacteria DNA kiti (Invitex, GmbH, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Kontrol için rifampisine duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H₃₇Rv standart kökeni ile çalışılmıştır. Elde edilen template DNA'lar PCR ve dizi analizi çalışılıncaya kadar -20⁰ C'de saklanmıştır.

Standart PCR ve DNA dizi analizi: Mutasyonların incelenmesi için *rpoB* geninin en sık mutasyonların görüldüğü 81 bp (RRDR) bölümünü kapsayan bir bölgesi seçilerek çoğaltılmıştır (13, 14). Bu alan *Escherichia coli* numaralandırma sistemine göre 481-589. kodonlar arasındaki 329 baz çiftini içermektedir (nükleotid dizisi için GenBank kod: [L27989](#)).

PCR için kullanılan primerler aşağıdadır:

rpo95-Forward primer;

5'- CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCG-3'

rpo397-Reverse primer;

5'- CGTTTCGATGAACCCGAACGGGTTGAC-3'

PCR için toplam hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki karışım hazırlanmıştır:

Distile su	14.375 µl
Buffer	2.5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTP (10 mmol)	0.5 µl
<i>rpoB95</i> primer (50 pmol)	0.25 µl
<i>rpoB397</i> primer (50 pmol)	0.25 µl
AmpliTaQ Gold DNA polimeraz (Roche)	0.125 µl
DNA template	5 µl

Polimeraz zincir reaksiyonu için Gen Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Ca, ABD), ısı döngü cihazı kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonundan önce enzim aktivasyonunu sağlamak için 95⁰ C'de 10 dakikalık preinkübasyon aşaması ayarlanmıştır. Daha sonra 35'er döngü 95⁰ C'de bir dakika, 55⁰ C'de bir dakika, 72⁰ C'de iki dakika ve son olarak bir döngü 72⁰C'de sekiz dakika olmak üzere denatürasyon, annealing ve uzama aşamaları ayarlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü jel elektroforezinde (%2 agaroz-Sigma) 30 dakika süre ile 100 V uygulanarak ayrıştırılmış ve DNA bantları etidiyum bromit ile görünür hale getirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ürününün saflaştırılması için jel filtasyonu (Sepadex G50 medium, Sigma) kullanılmıştır.

DNA dizi analizi otomatize ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Ca, ABD) sekans cihazında yapılmıştır. Sekans reaksiyonu için Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Ca, ABD) ve primer olarak standart PCR'da kullanılan *rpoB*95 primeri kullanılmıştır. Bunun için 2 µl saflaştırılmış PCR ürünü, 3 µl big dye ve 2 µl (3.2 pmol/ul) primer, toplam hacim 10 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Elde edilen karışıma ısı döngü cihazında aynı çalışma protokolü ile yeniden PCR işlemi uygulanmış ve elde edilen ürün jel filtrasyonu ile saflaştırılmıştır. Daha sonra ürüne formamit eklenip, 95⁰ C'de beş dakika denatürasyon sağlandıktan sonra hemen buz üzerine alınmış, iki dakika beklendikten sonra yükleme yapılarak sekans cihazı çalıştırılmıştır. DNA dizilerinin karşılaştırılmasında Blast 2 Sequences Computer Program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılmıştır.

BULGULAR

Mycobacterium tuberculosis kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara dirençleri

Araştırmada incelenen 50 klinik kökenin yedisi BACTEC 460TB sistemi ile rifampisine duyarlıdır. Bu kökenlerden beşi diğer üç birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara da duyarlı iken, bir köken izoniyazide monorezistan, bir köken ise hem izoniyazit, hem de streptomisine dirençli bulunmuştur. Rifampisine dirençli olan 43 kökenin 28'i (%65,1) aynı zamanda izoniyazide de dirençli olduğu saptanmış ve ÇİD-TB kökenleri olarak gruplandırılmışlardır. Rifampisin monorezistan köken sayısı 14 (%32.5), rifampisin ve etambutol dirençli köken sayısı ise 1 (%2.3), test edilen tüm ilaçlara dirençli köken sayısı ise 4

(%9.3)'dür. Rifampisine dirençli kökenlerin direnç paternleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinin direnç paternleri

Köken sayısı	RIF	INH	SM	EMB
16	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı
14	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
8	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
4	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
1	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli
Toplam direnç	43	28	4	13

RIF : Rifampisin, INH: İzoniyazit, SM: Streptomisin, EMB: Etambutol

rpoB Mutasyonlarının dağılımı ve sıklığı

Fenotipik olarak rifampisine duyarlı bulunan yedi klinik köken ve kontrol için kullanılan H37Rv standart kökeninde *rpoB* gen mutasyonu saptanmamıştır. Araştırmada incelenen rifampisine dirençli 43 klinik kökenin 40 tanesinde (%93) *rpoB* geninde mutasyon saptanmıştır. Üç köken (%7) fenotipik olarak rifampisine dirençli olmasına rağmen incelenen gen bölgesinde mutasyon görülmemiştir (vahşi tip). Mutasyon görülen 40 kökenin 37'sinde (%92.5) mutasyonlar RRDR bölgesi olarak tanımlanan 507-533. kodonlar arasında bulunmuştur. Mutasyon saptanan kökenlerin birinde üçlü (%2.5), ikisinde ikili (%5), kalan 37 kökende tekli (%92.5) mutasyon izlenmiştir. Birden fazla mutasyon izlenen bu üç kökenin üçü de ÇİD kökenleridir. Toplam olarak 12 kodonu ilgilendiren 15 farklı mutasyon ve 13 allel saptanmıştır. En sık rastlanan mutasyon 531. kodonda yer alan Ser531Leu (TCG-TTG) mutasyonudur. Bu mutasyon 43 kökenin 27'sinde (%63) bulunmuştur. Saptanan diğer mutasyonlar, görülme sıklıkları ve neden oldukları amino-asit değişiklikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Araştırmada incelenen 28 çoğul ilaca dirençli kökeninin 26'sında (%93) mutasyon bulunurken, iki kökende (%7) mutasyon saptanmamıştır. Çoğul ilaca dirençli kökenlerin birinde üçlü (%10), ikisinde ikili (%7) mutasyon görülmüştür. Çoğul ilaca dirençli kökenlerinde de diğer rifampisin dirençli kökenlerde olduğu gibi en sık izlenen mutasyon (28 kökenin 16'sında; %57) Ser531Leu değişikliğine eşlik eden TCG-TTG mutasyonudur. Çoğul ilaca dirençli kökenlerde görülen mutasyonlar ve görülme sıklıkları Tablo 3'te gösterilmiştir. Çoğul ilaca dirençli kökenlerin birinde saptanan Ile572Leu mutasyonu yeni tanım-

499	500	501....	507	508....	511...	513...	516...	521	522	523...	526...	531	532...	534...	572
GTC	GCC	GCG..	GGC	ACC...	CTG...	CAA...	GAC...	CTG	TCG	GGG...	CAC...	TCG	GCG	GGG	ATC
Val	Ala	Ala...	Gly	Thr ...	Leu...	Gln...	Asp...	Leu	Ser	Gly ...	His...	Ser	Ala...	Gly ...	Ile
	CCG			CCC	ATG	CCA	TAC	ATG		GCC	CAA	TTG	GCC	GGC	CTC
	Pro			Pro	Met	Pro	Tyr	Met		Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Leu
							%7	%2		%2	%2	%63			
	%2			%2	%2	%2	GTC				TGC	TGG	%2	%2	%2
							Val				Cys	Trp			
							%2				%2	%5			

Şekil 1. Rifampisine dirençli 43 *M. tuberculosis* kökeninde görülen *rpoB* gen mutasyonları, görülme sıklığı ve eşlik eden amino-asit değişiklikleri. Kodon numaraları verilmiş olan satırda yer alan nükleotit dizisi vahşi tip kökene aittir. Alt satırlarda verilen kodonlar bu araştırmada rastlanan mutasyonları ve amino-asit değişikliklerini göstermektedir.

lanan bir mutasyondur (GenBank Accession Number: EU500834). Bu araştırmada rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinden elde edilen mutasyonların görüldüğü kodonlar ve mutasyon sıklığı Şekil 1'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinde *rpoB* geni mutasyonları ve görülme sıklığı

Kodon No	Nükleotit değişikliği	Amino-asit değişikliği	Köken sayısı (%) n=43
531	TCG – TTG ^b	Ser531Leu	27 ^b (%63)
	TCG – TGG	Ser531Trp	2 (%5)
516	GAC – TAC ^a	Asp516Tyr	3 ^a (%7)
	GAC – GTC	Asp516Val	1 (%2)
526	CAC – CAA ^b	His526Gln	1 ^b (%2)
	CAC – TGC	His526Cys	1 (%2)
500	GGG – GCC	Ala500Pro	1 (%2)
508	ACC – CCC ^a	Thr508Pro	1 ^a (%2)
511	CTG – ATG ^b	Leu511Met	1 ^b (%2)
513	CAA – CCA	Gln513Pro	1 (%2)
521	CTG – ATG ^b	Leu521Met	1 ^b (%2)
523	GGG – GCC	Gly523Ala	1 (%2)
532	GCG – GCC ^a	Ala532Ala	1 ^a (%2)
534	GGG – GGC	Gly534Gly	1 (%2)
572	ATC – CTC	Ile572Leu	1 (%2)
Mutasyon yok			3 (%7)

^a İşaretli nükleotit değişiklikleri üçlü,

^b İşaretli değişiklikler ikili mutasyon görülen kökenlerde izlenmiştir.

TARTIŞMA

Tüberkülozun kontrolü için mikrobiyoloji laboratuvarına düşen en önemli görevlerden biri ilaç direncinin hızla ve güvenilir yöntemler ile belirlenmesidir. Tüberküloz basillerinde kültüre dayalı fenotipik duyarlılık yöntemlerinin zaman alıcı ve zahmetli olması moleküler yöntemlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Özellikle rifampisin direncinin genetik olarak saptanmasına ilişkin araştırmalar giderek artmaktadır. Rifampisin direncinden sorumlu gen bölgesinin iyi tanımlanmış olması moleküler yöntemler ile alınan sonuçların güvenilirliğini artırmaktadır (15, 16).

Bu araştırmada rifampisine dirençli olduğu bilinen 43 kökenin 40'ünde (%93) incelenen gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır. Mutasyon bulunan 40 kökenin 37'sinde (%92.5) sıcak nokta olarak bilinen ve mutasyonların en sık görüldüğü *rpoB* geninin RRDR bölgesinde değişim bulunmuştur. Dünyanın farklı coğrafik bölgelerinde yapılan çalışmalarda da benzer şekilde 507-533. kodonlar arasında mutasyonlar daha sık görülmüştür (7, 12, 13, 17-22) Dirençli kökenlerin %95'inden fazlasında bu bölgede çoğunlukla missense mutasyon olmak üzere 50'den fazla mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlar sıklıkla 516 (%10), 526 (%35) ve 531. (%40) kodonlarda görülmektedir (11, 22). RRDR gen bölgesi dışında olan mutasyonların görülme sıklığı yaklaşık %3-5 olarak bildirilmektedir (5, 13, 23). Sıcak nokta dışındaki *rpoB* gen mutasyonları araştıran çalışma sayısı az olmakla birlikte en sık V176F, I497F (5) ve V146F (8, 19) mutasyonları bildirilmiştir. Bu araştırmada 481-589. kodonlar arasındaki nükleotit dizi incelenmiş ve %7 kökende mutasyon görülmemiştir. Bu kökenlerdeki *rpoB* gen mutasyonlarının incelenen bölgenin dışında olduğu düşünülmüştür. Üç kökende ise RRDR bölgesi dışında mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar; Ala500Pro, Gly534Gly ve Ile572Leu mutasyonlarıdır. Ile572Leu mutasyonu ulaşılabilen yayınlarda bildirilmemiş olan yeni bir mutasyondur (GenBank accession number: EU500834). RRDR gen bölgesi dışında yer alan bu mutasyon bir ÇİD kökeninde tanımlanmıştır. Hindistan'da ÇİD-TB kökenleri ile yapılan bir araştırmada da 508 ve 532. kodonlarda; Thr508Ser ve Ala532Ala (GCG-GCA) değişikliği ile saptanan mutasyonlar bildirilmiştir (6). Bölgemizde izole edilen ÇİD-TB kökenlerinde görülen mutasyonlar diğer kökenlerde bulunan mutasyonlara benzerdir (Tablo 2 ve 3). Bu araştırmada birden fazla mutasyon gösteren allel sıklığı düşük olmakla birlikte üç kökende üçlü mutasyon görülmüş ve bu kökenlerin üçünün de ÇİD-TB kökenleri olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3. ÇİD *M. tuberculosis* kökenlerinde *rpoB* geni mutasyonları ve görülme sıklığı

Kodon No	Nükleotit değişikliği	Amino-asit değişikliği	Köken sayısı (%) n=28
531	TCG – TTG ^b	Ser531Leu	16 ^b (%57)
	TCG – TGG	Ser531Trp	2 (%7)
516	GAC – TAC ^a	Asp516Tyr	2 ^a (%7)
	GAC – GTC	Asp516Val	1 (%3)
526	CAC – CAA ^b	His526Gln	1 ^b (%3)
	CAC – TGC	His526Cys	1 (%3)
508	ACC – CCC ^a	Thr508Pro	1 ^a (%3)
511	CTG – ATG ^b	Leu511Met	1 ^b (%3)
521	CTG – ATG ^b	Leu521Met	1 ^b (%3)
523	GGG – GCC	Gly523Ala	1 (%3)
532	GCG – GCC ^a	Ala532Ala	1 ^a (%3)
534	GGG – GGC	Gly534Gly	1 (%3)
572 ^c	ATC – CTC	Ile572Leu	1 (%3)
Mutasyon yok			2 (%7)

^aİşaretli nükleotit değişiklikleri üçlü, ^bİşaretli değişiklikler ikili mutasyon görülen kökenlerde izlenmiştir.

Tablo 4. Rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinde DNA dizi analizi ile bildirilen *rpoB* mutasyonları ve görülme sıklıkları*

Ülke	531 (%)	516 (%)	526 (%)	513 (%)	İkili Mutasyon (%)	≥Üçlü Mutasyon (%)	Mutasyon yok (%)
Türkiye, Manisa (Bu çalışma)	67	9	5	2	5	3	7
Ankara, Türkiye ²³	51	14	18	13	13	3	10
İzmir, Türkiye ²⁴	56	7	20	2	2	-	-
Almanya ⁵	68	17	14	3	22	-	4
Hindistan ⁶	65	5	23	2	5	5	2
Polonya ¹³	41	16	9	6	20	-	3
Macaristan ¹⁹	35	46	8	8	4	-	10
İtalya ²⁰	60	8	35	-	3	8	-
Avustralya ²¹	50	9	32	-	-	-	3
Kuveyt ²²	28	-	61	-	-	-	5
Brezilya ²⁵	58	11	24	3	8	1	4
ABD, New York ²⁶	35	6	46	2	-	-	6

*Bildirilen oranlar aynı kodonda görülen farklı mutasyonların toplamıdır.

Araştırmada incelenen rifampisine dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinde toplam olarak 12 kodonu ilgilendiren 15 farklı mutasyon ve 13 allel saptanmıştır. En sık (%63) Ser531Leu (TCG-TTG) mutasyonu izlenmiştir. İkinci sıklıkta (%7) Asp516Tyr (GAC-TAC), üçüncü sıklıkta (%5) ise Ser531Trp mutasyonu görülmüştür. İncelenen kökenlerin %81'inde (n=35) mutasyonlar 531, 516 ve 526. kodonlarda bulunmuştur. Farklı ülkelerden ve Türkiye'den bildirilen mutasyonlar Tablo 4'te özetlenmiştir.

Bölgemizde etken olan TB basillerinde 531. kodonda görülen mutasyon oranı bildirilen en yüksek oranlar arasındadır. Bu kodondaki Ser531Leu mutasyon sıklığının nedenine ilişkin iki olası mekanizmadan söz edilmektedir

(23, 24). İlk olasılık, bu bölgedeki hata oranının diğer kodonlara göre yüksek olması, ikinci olasılık ise diğer mutasyon sıklıklarının da aynı olmasına karşın, mutant beta alt-ünitesini oluşturmada başarısız olmalarıdır. Bu mutasyona sahip olan kökenlerin, diğerlerine oranla canlılıklarını sürdürmede selektif olarak daha avantajlı olduklarına inanılmaktadır.

Diğer mutasyon bölgeleri olan 515, 526 ve 513. kodon değişiklikleri çalışılan kökenlerde daha az sıklıkta görülmüştür. Coğrafik bölgelere göre mutasyon sıklıkları belirgin olarak farklılık göstermektedir. Bu sonuç, çalışmalarda kullanılan köken sayısındaki farklılıklara bağlı olabileceği gibi, ülkelerdeki popülasyonun heterojen olma-

sından veya çok göç almasından da kaynaklanabilmektedir. Örneğin, bölgemizde %5 sıklıkta görülen 526. kodon değişikliği, New York'ta çalışılan kökenlerde %46 oranında ve en sık görülen mutasyon olarak bildirilmiştir (26). Kuveyt'te de benzer şekilde en sık 526. kodon (%62) değişikliğine rastlanmış, 516. kodonda ise mutasyon görülmemiştir (22). Ülkemizde Ankara (23) ve İzmir'de (24) yapılan iki çalışmada, bu araştırmanın sonuçlarına benzer şekilde en sık Ser531Leu mutasyonu bildirilmiştir. Ancak her iki çalışmada da farklı olarak 526. kodon değişikliği ikinci sıklıkta bildirilmiştir. Aynı ülkede birbirine yakın coğrafik bölgelerde bile kökenlerdeki mutasyon sıklığı farklılıklar göstermektedir.

Sonuç olarak bölgemizde soyutlanan rifampisine dirençli TB kökenlerinin %93'ünde *rpoB* gen mutasyonları tanımlanmıştır.

İzlenen mutasyonların birçoğu dünyada yaygın olarak görülen mutasyonlara benzerdir. En sık Ser531Leu mutasyonu izlenmiştir. Araştırmada toplam olarak 12 kodonu ilgilendiren 15 farklı mutasyon ve 13 allel saptanmıştır. Bu mutasyonlarda bir tanesi daha önce bildirilmemiş olup, RRDR gen bölgesi dışında tanımlanmıştır. Tüberküloz basillerinde rifampisin direncinin DNA dizi analizi ile gösterilmesi güvenilir ve hızlı sonuç vermektedir. Ayrıca bu yöntem ile mutasyonların belirlenmesi direnç epidemiyolojisini belirlemede ve hastalığın kontrolünde önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu bilgiler aynı zamanda yeni moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesinde yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. WHO. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. Communicable Diseases. Geneva: World Health Organization, 2002. WHO/CDC/STB/2001.11.
2. Surucuoglu S, Ozkutuk N, Celik P, et al. Drug resistant pulmonary tuberculosis in western Turkey: prevalence, clinical characteristics and treatment outcome. *Ann Saudi Med* 2005; 25: 313-18.
3. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 1998; 47: 189-96.
4. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1998; 341: 647-50.
5. Heep M, Brandstatter B, Rieger U, et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 107-10.
6. Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2987-90.
7. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Wang H. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2209-12.
8. Ahmad S, Mokaddas E. The occurrence of rare *rpoB* mutations in rifampicin resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 205-12.
9. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
10. Telenti A, Iseman M. Drug-resistant tuberculosis; what do we do now. *Drugs* 2000; 59: 171-9.
11. Victor TC, van Helden PD, Warren R. Prediction of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular mechanisms, tools, and applications. *IUBMB Life* 2002; 53: 231-7.
12. Kapur V, Li LL, Iordanescu S, et al. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1095-8.
13. Sajduda A, Broztek A, Poplawska M, et al. Molecular characterization of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2425-31.
14. Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2218-25.
15. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2: 164-8.
16. Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 349-59.

17. Yu Hwang H, Yu Chang C, Li Chang L, Feng Chang S, Hui Chang Y, Jing Chen Y. Characterization of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Med Microbiol* **2003**; 52: 239-45.
18. Ramaswamy S, Jun Dou S, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* **2004**; 53: 107-13.
19. Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, et al. Molecular characterization of rifampin resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the Line Probe Assay. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3736-9.
20. Pozzi G, Meloni M, Iona E, et al. *rpoB* mutations in multidrug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 1197-9.
21. Yuen LKW, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 3844-50.
22. Ahmad S, Mokaddas E, Fares E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2002**; 44: 245-52.
23. Karahan ZC, Atalay F, Uzun M, Erturan Z, Atasever M, Akar N. Sequence analysis of *rpoB* mutations in rifampin resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Turkey. *Microbial Drug Resistance* **2004**; 10: 325-33.
24. Cavusoglu C, Hilmioğlu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4435-8.
25. Valim ARM, Rossetti MLR, Ribetro MO, Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brasil. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3119-22.
26. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 1281-3.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
45030, Uncubozköy, MANİSA
e-posta: ozkutuk@gmail.com, nozkutuk@hotmail.com