ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Mycobacterium tuberculosis complex Suşlarında Pirazinamid Direncinin Genetik Mekanizması ve Bedakulin Direnci Arasındaki İlişkinin Moleküler Yöntemlerle Sorgulanması

Hamdi GÖKAHMETOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Haziran, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

Mycobacterium tuberculosis complex Suşlarında Pirazinamid Direncinin Genetik Mekanizması ve Bedakulin Direnci Arasındaki İlişkinin Moleküler Yöntemlerle Sorgulanması

Hamdi GÖKAHMETOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Doktora Tezi 11/06/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Işıl VAR (Danışman) ……

: Prof. Dr. Burhan ARIKAN ……

: Prof. Dr. İsmail HANTA ……

: Prof. Dr. M.Sami SERİN ……

: Prof. Dr. Nizami DURAN ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2022-15058

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VI
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1. Tüberkülozun tarihi 5
2.2. Genel özellikleri 5
2.2.1. *Mycobacterium tuberculosis* complex 5
2.2.2. Basilin özelliği 5
2.2.3. Zar yapısı ve hücre duvarı 6
2.2.4. *Mycobacterium tuberculosis*'s genomu 6
2.2.5. Protein salgılama sistemleri 7
2.2.6. Patogenezi 8
2.3. Tanı ve teşhis 8
2.4. Tedavi 9
2.5. TB tedavisinde kullanılan ilaçlardan Pirazinamid ve Bedakulin 10
2.5.1. Pirazinamid 10
2.5.2. Bedakulin 11
3. MATERYAL VE METOT 13
3.1. Çalışmanın etik onayı 13
3.2. *Mycobacterium tuberculosis* complex örneklerinin seçilmesi 13
3.3. Kullanılan kitler 13
3.4. Kullanılan cihazlar 13
3.5. İlaç duyarlılık testi 13
3.5.1. Bakteri kültürünün seyreltilmesi 14
3.5.2. İlaç solüsyonlarının oluşturulması 14
3.5.3. İDT'de kullanılacak yeni MGİT besiyerlerinin hazırlanması: 14
3.5.4. Hazırlanan ilaçlarının tüplere dağıtılması 14
3.5.5. Seyreltilen bakteri süspansiyonunun ekimi 14
3.5.6. Örneklerin cihaza yüklenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi 14
3.6. DNA ekstraksiyonu 15
3.7. *M.tuberculosis* ve *M.bovis'* in moleküler yöntemlerle ayırt edilmesi 15

3.7.1. PCR 16
3.7.2. Elektroforez 17
3.8. PanD, PncA, HadC , Rv0678 genleri için PCR ve Elektroforez 17
3.9. Sanger sekans dizi analizi 19
3.9.1. ExoSAP ile amplikonların temizlenmesi 20
3.9.2. Cycle sequence PCR aşaması 20
3.9.3. Sephadex ile saflaştırma 20
3.9.4. Amplikonların Sanger dizi analizi cihazına yüklenmesi 21
3.10. RealTime qPCR Analizi 21
3.10.1. RNA izolasyonu 21
3.10.2. cDNA Sentezi 21
3.10.3. RT qPCR aşaması 22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 25
4.1. Bulgular 25
4.1.1. Duyarlılık testi 25
4.1.2. *M. Tuberculosis ve M. bovis* ayrımı 26
4.1.3. PanD, PncA, HadC, Rv0678 genlerinin PCR ve sekans analizi 28
4.1.4. RealTime qPCR Analizi 33
4.1.5. Bütün örneklerin türü, antibiyotik duyarlılıkları, mutasyon analizi 36
4.2. Tartışma 38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 57

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Mycobacterium tuberculosis complex Suşlarında Pirazinamid Direncinin Genetik Mekanizması ve Bedakulin Direnci Arasındaki İlişkinin Moleküler Yöntemlerle Sorgulanması

Hamdi GÖKAHMETOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Işıl VAR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Tüberküloz (TB), bilinen en eski hastalıklardan birisidir. Günümüzde özellikle çoklu ilaca dirençli (MDR- ÇİD) ve yaygın ilaca dirençli (XDR – YİD) Tüberküloz basilleriyle enfekte olmuş hasta sayısının artması, hastalığın kontrolündeki en büyük problemdir. Ancak ileri moleküler metotlarla direncin moleküler mekanizması tespit edilerek uygun tedavi rejimleri kısa sürede belirlenebilmektedir. Son yıllarda onaylanan ilaçlardan olan Bedakulinin (BDQ) Pirazinamid (PZA)ile birlikte kullanılması tedavi sürecinin etkili olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı, tüberküloz şüphelilerinin klinik örneklerinden izole edilen MDR ve tamamen ilaca duyarlı *M. tuberculosis* suşları arasında PZA ve BDQ direnci ile ilgili olduğu düşünülen genlerdeki mutasyonları değerlendirmek ve aralarındaki ilişkiyi sorgulamaktır.

Türkiyenin 7 farklı ilinden tüberküloz ön tanısı ile Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarında gelen klinik materyalden izole edilen 41 MDR ve 30 tamamen duyarlı toplam 71 MTB örneğin fenotipik ve genotipik yöntemlerle 1'inin (%1.4) *M.bovis* 70'inin (%98.6) *M. tuberculosis* olduğu, ilaç duyarlılık testi (IDT) sonucunda 41 MDR susun 30'unun(%73)PZA dirençli, 11'nin (%27) PZA duyarlı olduğu , %76 'sının izoniazid-rifampisine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Sanger sekans dizi analizi ile 27 pncA, 14 panD mutasyonu bulunurken hadC ve Rv0678 genlerinde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir.

Anahtar Kelimeler: *M.tuberculosis*, Pirazinamid, Bedakulin

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

PhD THESIS

Investigation of the Relationship between the Genetic Mechanism of Pyrazinamide Resistance and Bedaquiline Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex Strains by Molecular Methods

Hamdi GÖKAHMETOĞLU

Advisor: Prof. Dr. Işıl VAR

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the oldest known diseases. Today, the increasing number of patients infected with tuberculosis bacilli, especially multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR), is the biggest problem in controlling the disease. However, by detecting the molecular mechanism of resistance with advanced molecular methods, appropriate treatment regimens can be determined in a short time. The use of Bedaquiline (BDQ), one of the drugs approved in recent years, together with Pyrazinamide (PZA) suggests that the treatment process is effective.

The aim of this study is to evaluate mutations in genes thought to be related to PZA and BDQ resistance among MDR and fully drug-sensitive *M. tuberculosis* strains isolated from clinical samples of tuberculosis suspects and to question the relationship between them.

For a total of 71 MTB samples, 41 MDR and 30 fully sensitive, isolated from clinical material arriving at Adana Regional Tuberculosis Laboratory with a preliminary diagnosis of tuberculosis from 7 different provinces of Turkey, 1 (1.4%) was determined to be *M.bovis* and 70 (98.6%) were *M. tuberculosis*, and as a result of the drug sensitivity test (IDT), 30 (73%) of 41 MDR strains were found to be PZA resistant, 11 (27%) were PZA sensitive, and 76% were resistant to isoniazid-rifampicin.

While 27 pncA and 14 panD mutations were found by Sanger sequence analysis, no mutations were detected in the hadC and Rv0678 genes.

Keywords: *M. tuberculosis*, Pyrazinamide, Bedaquiline

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi süresince beni sürekli destekleyen sevgili anneme, babama, kardeşlerime ve değerli eşime tüm kalbimle şükranlarımı sunuyorum. Sizler olmasaydınız bu çalışmada olmazdı. Sizleri çok seviyorum.

Benim çabalarım dışında bu çalışmanın yapılarak bitirilmesinde yönlendirmeleri, sorunlara çözüm bulmamda yardımcı olmaları ve en önemlisi teşvikleriyle bana emeği geçen kişilere teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Her şeyden önce, engin bilgisi ve deneyimi, anlayışı, sabrı ve her sıkıntımızda yanımızda olduğunu hissettiren son senemde emekli olan danışmanım Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a minnettarım.

Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygula Merkezinde geçirdiğim 4.5 sene boyunca yardımları, destekleri için tüm personele ve tüm öğrenci arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Rna ekstraksiyonlarını yapmamda yardımları ile bana destek olan Adana Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda çalışan Gökhan KARAOĞLAN ve Murat YİĞENOĞLU'na,

İstatistiksel analizlerde yardımcı olan Doç. Dr. İlker ÜNAL'a ve

Son olarak danışmanım emekli olduktan sonra danışmanlığı ile bana yol gösteren deneyimlerini benimle paylaşan Prof.Dr. Işıl VAR hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. *M.tuberculosis* ve *M.bovis* primerleri 16
Çizelge 3.2. *M.tuberculosis* ve *bovis* reaksiyon karışımı 16
Çizelge 3.3. *M.tuberculosis* ve *bovis* ayrımı PCR Programı 16
Çizelge 3.4. Primer dizileri 17
Çizelge 3.5. PCR reaksiyon karışımları 18
Çizelge 3.6. PanD PCR döngüsü 18
Çizelge 3.7. PncA PCR döngüsü 18
Çizelge 3.8. HadC PCR döngüsü 19
Çizelge 3.9. Rv0678 PCR döngüsü 19
Çizelge 3.10. Cycle sequence reaksiyon karışımı 20
Çizelge 3.11. Cycle sequence döngüsü 20
Çizelge 3.12. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı 22
Çizelge 3.13. RT qPCR Gen ve Primerleri 22
Çizelge 3.14. RT qPCR reaksiyon karışımı 23
Çizelge 3.15. RT qPCR döngüsü 23
Çizelge 4.1. MDR örneklerin pirazinamid direnç profili 26
Çizelge 4.2. *M.tuberculosis* ve *M. bovis* karşılaştırma sonucu 28
Çizelge 4.3. panD gen bölgesinde tespit edilen mutasyonlar 30
Çizelge 4.4. *pncA gen bölgesinde tespit edilen mutasyonlar* 31
Çizelge 4.5. mmpS5 ve mmpL5 genlerinin ekspresyon seviyelerinin SPSS analizi sonuçları 34
Çizelge 4.6. MDR-TB klinik izolatlarında Bedakulin direnci ile ilişkili efflux pompası genlerinin ekspresyon seviyeleri 35
Çizelge 4.7. Bütün örneklerin türü, antibiyotik duyarlılıkları, mutasyon analizi 36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. MDR suşların ilaç direnç profili 25
Şekil 4.2. *M.tuberculosis* ve *M. bovis* ayrımı jel görüntüsü 27
Şekil 4.3. PanD geninin jel görüntüsü 29
Şekil 4.4. pncA geninin jel görüntüsü 30
Şekil 4.5. F1 ve F2 primerlerinin jel görüntüsü 32
Şekil 4.6. MDR ve Duyarlı örneklerin jel görüntüsü 32
Şekil 4.7. Rv0678 geninin jel görüntüsü 33
Şekil 4.8. mmpL5 ve mmpS5 genlerinin kontrole göre relative kat farkı 34

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	:	Adenin
BDQ	:	Bedakulin
C	:	Sitozin
ÇİD	:	Çoklu ilaç dirençli
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	:	Dünya sağlık örgütü
EMB	:	Etambutol
G	:	Guanin
INHA	:	Izoniazid
LJ	:	Lowenstein jensen
MDR-TB	:	Çoklu ilaç dirençli tüberküloz (ÇİD-TB)
MGIT	:	Mikobakteri büyüme indikatör tüpü
MTB	:	*Mycobacterium tuberculosis*
MTBK	:	*Mycobacterium tuberculosis* kompleks
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PZA	:	Pirazinamid
RIF	:	Rifampisin
TB	:	Tüberküloz
TBE	:	Tris Borikasit Edta
TE	:	Tris-EDTA
T	:	Timin
µg	:	Mikrogram
ML	:	Mililitre
YİD	:	Yaygın ilaç direnci
WHO	:	Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ

Tüberküloza, tüberküloz hastası kişilerin bakterileri havaya salmasıyla (örneğin öksürme yoluyla) yayılan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) basili neden olmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte birinin tüberküloz (TB) ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir (Houben ve Dodd, 2016). Enfeksiyonu takiben tüberküloz hastalığına yakalanma riski ilk 2 yılda en yüksek seviyededir (yaklaşık %5), sonrasında çok daha düşüktür. Her yıl TB hastalığına yakalanan kişi sayısının yaklaşık %90'ı yetişkin iken erkekler arasındaki vaka sayısı kadınlara göre daha fazladır. Hastalık genellikle akciğerleri etkiler (akciğer tüberkülozu) ancak diğer bölgeleri de etkileyebilmektedir. Tedavi edilmez ise ölüm oranı gayet yüksektir (yaklaşık %50) (Tiemersma ve ark., 2011). Halihazırda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen tedavilerle (4-6 aylık bir anti-TB kürü), tüberkülozlu kişilerin yaklaşık %85'i tedavi edilebilmektedir. TB enfeksiyonunu tedavi etmek için 1-6 aylık rejimler mevcuttur. Enfeksiyona yakalanan ve hastalık geliştiren kişilerin sayısı (ve buna bağlı olarak tüberkülozun neden olduğu ölümlerin sayısı), yoksulluk, yetersiz beslenme, HIV enfeksiyonu, sigara içme ve diyabet gibi tüberkülozun oluşmasında belirleyici olan birçok faktör bunların oluşmasına neden olan sektörlerde çeşitli eylem faliyetleriyle azaltılabilir.

DSÖ küresel tüberküloz programındaki 13 kişilik çekirdek ekip tarafından hazırlanan 2023 Küresel Tüberküloz Raporu'nda, 92 ülke ve bölgeden veriler yer almaktadır. Raporda, 2022'de 7.5 milyon kişiye tüberküloz tanısı konulduğu, bunun, DSÖ'nün 1995'te küresel olarak tüberkülozu izlemeye başlamasından bu yana kaydedilen en yüksek rakam olduğunun altı çizilmiştir.(WHO). TB, önlenebilir ve genellikle tedavi edilebilir bir hastalıktır. Ancak 2022'de tüberküloz, koronavirüs hastalığından (COVID-19) sonra dünyada tek bir bulaşıcı ajandan kaynaklanan ölümlerde 2. Sırayı almıştır. HIV/AIDS'in neredeyse iki katı ölüme neden olmaktadır.

Her yıl 10 milyondan fazla insan tüberküloza yakalanmaya devam etmektedir. Birleşmiş Milletler (BM) ve DSÖ'nün tüm Üye Devletleri tarafından benimsenen bir hedef olan, küresel tüberküloz salgınının 2030 yılına kadar sona erdirilmesi için acil eyleme geçilmesi gerekmektedir.(WHO)

Dünya genelinde TB insidansının ve mortalitesinin en yüksek olduğu bölgeler Afrika ve Güney Doğu Asya'dır. Türkiye, DSÖ Avrupa Bölgesinde yer almaktadır. Küresel TB 2020 ve 2021 Raporlarında Türkiye'nin 2019 yılı tahmini insidans hızı yüz binde 16, 2020 yılı yüz binde 15 ve tahmini mortalite hızı 2019 yılı için yüz binde 0,39, 2020 yılı için 0,55 olarak verilmiştir.

Türkiye çoklu ilaç direncine sahip tüberküloz (ÇİD-TB) açısından yüksek hastalık yüküne sahip 30 ülke arasında değildir**.** Küresel TB 2020 Raporunda Türkiye'de tahmini RD/ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2.4, önceden tedavi görmüş olgularda ise %9.7 olarak verilmiştir. 2021 Raporunda ise bu tahmini değerlere yer verilmemiştir. İDT çalışılan tüm olgularda 2019 yılı için tek ilaç olarak en sık izoniazid (INH)(%5,4) ve streptomisin (STR) (%4.8) direnci, ikili ilaç olarak INH-STR

(%2.4) direnci, üçlü ilaç olarak INH-Rifamsin(R)-STR (%0.7) direnci saptanmıştır. İDT çalışılan olgularda toplam direnç oranı %16,7 olarak gerçekleşmiştir. İDT çalışılan olgularda 2020 yılı için tek ilaç olarak en sık INH (%5.0) ve STR (%4.5) direnci, ikili ilaç olarak INH-STR (%2.0) direnci, üçlü ilaç olarak INH-RIF-STR (%0.6) direnci saptanmıştır. İDT çalışılan olgularda toplam direnç oranı %163 olarak gerçekleşmiştir

Dünya genelinde yapılan TB epidemiyolojisi çalışmalarında tedavi sonucu "tedavi başlangıcından 12 ay sonraki durum" olarak kabul edildiğinden ülkemizde de tedavi sonuçları aynı şekilde toplanmakta ve değerlendirilmektedir.

Türkiye'de 2019 yılında kaydedilen toplam 11.401 TB olgusundan 8.938'ine (%78,4) HIV testi yapılmıştır. Yeni ve nüks olgulardan test yapılan hasta sayısı ise 8.814'dür (%77,3). 2020 yılında ise kaydedilen toplam 8.925 olgudan 7.142'sine (%80,0) HIV testi yapılmıştır. Yeni ve nüks olgulardan test yapılan hasta sayısı ise 7.062'dir (%79,1). Türkiye'nin 2018 yılı yeni ve nüks olgularında tedavi başarısı %85, 2019 yılı için %83 ve önceden tedavi görmüş olgularında 2018 yılı için %60, 2019 yılı için %54'dür. (Türkiyede verem savaş raporu, 2021).

Pirazinamid (PZA), 1952 yılında keşfedilmiştir. TB'nin küresel kontrolü ve yönetimi, ilaca dirençli hastalık senaryolarının kötüleşmesi gibi bir zorlukla karşı karşıyadır. PZA, TB tedavisinde kullanılan vazgeçilmez bir birinci basamak ilaçtır. TB nüks oranlarının azaltılmasında, hastalık tedavi süresinin 9-12 aydan 6 aya kısaltılmasında ve en azından RIF ve INH'ya dirençli basil suşları ile enfekte hastaların tedavisinde anahtar rol oynar. Ek olarak, duyarlı, çoklu ilaca dirençli ve yaygın olarak ilaca dirençli TB'nin tedavi süresini kısaltmayı amaçlayan tüm yeni rejimlerde sürdürülmesi en muhtemel tek birinci basamak anti-TB ilaçtır. Diğer ilaçların çok iyi etki göstermeyebileceği aktif inflamasyon sırasında *in vitro* veya *in vivo* olarak asit pH'ında düşük metabolizmaya sahip, çoğalmayan kalıcı basillere karşı tercihli bir sterilizasyon aktivitesine sahiptir. PZA, INH ve RIF ile birlikte ilaca duyarlı TB'nin 6 ay içinde tedavi edilmesini sağlayan modern TB tedavisin temel taşını oluşturur. (Njire ve ark., 2016). Şu anda Bedakulin (TMC207), bisiklik nitroimizadol (PA-824) ve moksifloksasin ile kombinasyon halinde gelecekteki rejimlerin bir parçası olarak değerlendirilmektedir ve bunlar şu anda faz 3 denemelerindedir (Deye ve ark., 2012). Bu yeni ilaç kombinasyonlarının, ilaca duyarlı TB'nin yanı sıra MDR ve XDR TB'nin tedavi süresini kısaltması beklenilmektedir. PZA, ÇİD-TB (MDR-TB) tedavisinde hem birinci hem de ikinci basamak rejimlerde benzersiz bir rol oynar. (Pang ve ark., 2017).

PZA'nın benzersiz etkisi göz önüne alındığında, ÇİD-TB arasında PZA'nın saptanması, bu dirençli hastaların tedavi rejimlerinde PZA'nın başlatılmasında önemli bir faktördür (Che ve ark., 2021).

PZA, ilaca duyarlı hem de ilaca dirençli TB için mevcut ve gelecekteki rejimlerde çok önemli bir ilaç olduğundan, moleküler etki ve direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, yeni ilaç hedeflerinin ve direnç mekanizmalarının araştırılmasında gereklidir.

Bedakulin (BDQ), güncellenmiş önerilerde de belirtildiği gibi, artık RIF dirençli tüberküloz tedavisine yönelik yeni standart kombinasyon rejiminde temel ilaç olarak kabul edilmektedir. Bedakulin, rifampisine dirençli tüberkülozun (TB)tedavisi için tüm oral kısa süreli rejimlerde kullanımına ilişkin araştırma bulguları umut verici görünmeye devam ettiğinden, TB kontrol programları tarafından daha sık kullanılacaktır.(Borisov ve ark., 2017; Schnippel ve ark., 2017). Rv0678, MmpS5-MmpL5 akış pompasının üretimini düzenleyen bir gendir (Andries ve ark., 2014). Dünya sağlık örgütü (DSÖ)' nün uzun bir aradan sonra son yıllarda kullanılmasına izin verdiği Bedakulinin araştırılmasının tedavi sürecine katkıları olacaktır. İlaç duyarlılık çalışmaları, özellikle hızlı moleküler yaklaşımlar, doğru tanı ve tedavi için çok önemlidir. İlaca dirençli tüberkülozun tedavi süresini kısaltmak için yeni ilaçlara ve etkili ilaç kombinasyonlarına acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle MDR-TB olan izolatların BDQ ve PZA duyarlılığının araştırılması önemlidir.

İsviçre farelerinin intravenöz enfeksiyonunu kullanan ilk çalışmalar, BDQ ve PZA kombinasyon tedavisinin, standart birinci basamak rejimden daha üstün bakterisidal aktiviteye ve ayrıca sterilizasyon fazı sırasında sinerjistik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Veziris ve ark., 2011; Ibrahim ve ark., 2007).

Daha gerçekçi LDA enfeksiyon modelinin kullanılması, BDQ ve PZA ile tedavinin, 3 ay boyunca tedavi edilen BALB/c farelerinin %100'ünde nüksetmeyi önleyebildiğini gösterdi; bu da, bu son derece güçlü kombinasyonun kayda değer tedavi kısaltma potansiyelini ortaya koymaktadır (Tasneen ve ark., 2011). Önemli sinerjilerine dayanarak, hem BDQ hem de PZA içeren ilaç rejimleri, Global Alliance for TB İlaç Geliştirme tarafından klinik araştırmalarda tedaviyi kısaltan rejimlerin kritik bir bileşeni olarak değerlendirilmektedir (Olaru ve ark., 2015).

Bu çalışmanın amacı Bölge Tüberküloz Laboratuvarı olarakta işlev gören Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne 7 farklı ilden gönderilen tüberküloz şüphelilerinin klinik örneklerinden izole edilen MDR ve ilaca tamamen duyarlı *M. tuberculosis* suşlarında, pirazinamid ve bedakulin dirençleri arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemektir. MDR ve ilaca tamamen duyarlı *M. tuberculosis* suşları arasında pirazinamid direnci ile ilişkili PanD, PncA, HadC genlerindeki mutasyon ile bedakulin direnci ile ilişkili Rv0678 genindeki mutasyonların araştırılması bunun yanında Rv0678'in mmpL5 ve mmpS5 adlı 2 farklı efflux pompasına etkisini ve ekspresyonunu araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tüberkülozun tarihi

Mycobacterium cinsinin 150 milyon yıldan daha önce ortaya çıktığı varsayılmaktadır (Hayman ,1984). Gutierrez ve ark. (2005) *M. tuberculosis'in* erken atasının Doğu Afrika'da 3 milyon yıl kadar erken bir tarihte mevcut olduğu sonucuna vardı ve bunun o dönemde erken hominidleri enfekte etmiş olabileceğini öne sürmektedir. *M. tuberculosis'in* modern suşlarının yaklaşık 20.000-15.000 yıl önce ortak bir atadan köken aldığı belirtilmiştir (Sreevatsan ve ark., 1997).

19. yüzyılın başında Théophile Laennec'in çalışmasıyla başlamış ve 1865 yılında Jean-Antoine Villemin tarafından *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunun bulaşıcılığının gösterilmesi ve tüberküloz basilinin tanımlanmasıyla TB konusundaki çalışmalar farklı yöne evrilmiştir. Etiyolojik ajan 1882 yılında Robert Koch tarafından bulunmuştur. Clemens von Pirquet 1907 yılında tüberkülin deri testini geliştirmiş ve 3 yıl sonra bu testi asemptomatik çocuklarda latent tüberküloz enfeksiyonunu göstermek için kullanmıştır (Daniel, 2016). Calmette ve Guerin 1921 yılında Fransa'da yaptıkları çalışmalarla Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)'i yani ilk TB aşısını bulmuşlardır (Moliva ve ark., 2015).

Hastalık etkeni bilinmesine rağmen verem mikrobunu öldüren ilk ilaç olan STR 1944 yılında Amerika'da bulunarak tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Ardından 1952'de INH, 1954'de PZA, 1962'de EMB, 1966'da RIF'in keşfi ile 1970 yılına kadar bulunan tüberküloz tedavi ilaçları için üç veya dört ilaçtan oluşan kombinasyonlarla tedavi rejimleri oluşturulmuştur. Halen, günümüzde verem hastalarının tedavisinde kullanılan ve çok etkili olan tedavi rejimi 1974 yılından itibaren kullanılmaktadır.

2.2. Genel özellikleri

2.2.1. *Mycobacterium tuberculosis* complex

TB'ye, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBK) türünün üyeleri neden olur, bu üyeler; insanlarda TB'nin etiyolojik ajanı olan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB); Afrika'nın yalnızca belirli bölgelerinde insanlarda tüberküloza neden olan *M. africanum*; yabani ve evcilleştirilmiş memelilerde tüberküloza neden olan *M. bovis*, *M. caprae* ve *M. pinnipedii ve* tarla farelerinde tüberküloza neden olan *M. microti'dir* (Delogu ve ark., 2013).

2.2.2. Basilin özelliği

Tuberculosis Gram pozitif 1-4 µm uzunluğunda 0.3-0.6 µm eninde, ince ve bazen hafifçe kıvrık, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz çomak şeklinde ve zorunlu aerobik bir bakteridir. Tüberküloz basilinin bazı karakteristik özellikleri vardır. Bunlar yavaş büyüme, dormansi, karmaşık hücre membranı hücre içi patogenezi ve genetik homojenliktir (Cole ve ark., 1998).

2.2.3. Zar yapısı ve hücre duvarı

Basil MTB optimal koşullar altında 12-24 saatte ikiye ayrılma süresine sahip, yavaş büyüyen bir mikobakteridir. MTB'nin önemli bir özelliği , zararlı bileşiklere ve ilaçlara karşı son derece güçlü, geçirimsiz bir bariyer sağlayan ve virülansta temel bir rol oynayan kendine özgü hücre duvarı yapısıdır. Mikobakteriyel hücre duvarı yapısının klasik görünümü, numunenin dehidrasyonunu önleyerek hücre duvarı organizasyonunu koruyan yeni bir elektron mikroskobu tekniği olan vitreus bölümünde kriyo-elektron tomografisinin kullanılmaya başlanması sayesinde revize edilmiştir (Zuber ve ark., 2008; Hoffmann ve ark., 2008). Bu gelişmeler sayesinde mikobakterilerin işlevsel olarak gram negatif bakterilerde görülene benzer, iç yaprakçıktaki uzun yağ asitlerinden (mikolik asitler), dış katmandaki musu bileşenlerden ve glikolipitlerden oluşan asimetrik bir lipit çift katmanından oluşan bir dış zara sahip olduğu gösterilmiştir. Dış ve iç zar, en iç tarafta arabinogalaktan ve lipoarabinomannana kovalent olarak bağlanan ince bir peptidoglikan tabakasının varlığıyla periplazmik bir boşluk oluşturur ve bunlar da mikolik asitlere bağlanır. En etkili TB karşıtı ilaçlardan ikisi olan INH ve EMB, sırasıyla mikolik asitlerin ve arabinogalaktan sentezini hedefleyerek mikobakteriyel hücre duvarının MTB biyolojisindeki önemini vurgulamaktadır.

2.2.4. *Mycobacterium tuberculosis*'s genomu

Mycobacterium tuberculosis'in genomu 1999 yılında çözülmüştür. M. *tuberculosis* genomu çeyrek asırdır klinik ve halk sağlığı alanında önemli gelişmelere öncülük etmiştir. Mikobakteriyel DNA'nın manipülasyonunu sağlayan hayati teknoloji olan gen transferinin yanı sıra, bu keşifler birçok modern *M. tuberculosis* çalışmasının temelini oluşturmaktadır (Vilchese ve Jacops, 2007).

M.tuberculosis genomu, 4,411,529 baz çifti, 4 bin gen ve yaklaşık %65,6 G-C içeriğine sahiptir. Kromozom halkasal yapıda ve *Escherichia coli* genomuyla yaklaşık aynı büyüklüktedir. *M. tuberculosis*'in genomu yaklaşık 7 milyon bp'lik kromozomu olan *M. smegmatis* gibi hızlı üreyen çevresel mikobakteri türlerinden daha kısadır. Bu durum hücre içi ortamdaki genetik izolasyona ve hücre içi ortamda gereksiz olan genlerin kaybına bağlanmaktadır. Genomundaki yüksek G-C içeriğini yansıtacak şekilde *M. tuberculosis* glisin, alanin, prolin ve arjininden zengin proteinler içerirken, A-T'den zengin kodonların kodladığı lizin ve asparajin amino asitleri düşük oranlarda bulunmaktadır. Yüksek G-C içeriği bakterinin aerobik yaşam şekliyle ilişkilidir. Buna karşın, *M. tuberculosis* anaerobik ortamlara da uyum sağlayabilecek metabolik potansiyele sahiptir (Brosch ve ark., 2000).

İlk *M. tuberculosis* genom dizisinin oluşturulmasından kısa bir süre sonra, yapılan ilave çalışmalar *M. tuberculosis* genotiplerinin küresel çeşitliliğini ortaya çıkardı. IS6110-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), spoligotipleme (CRISPR dizi ayırıcıları kullanıldığı kabul edilen ayırıcı oligonükleotit tiplemesi) ve MIRU-VNTR (mikobakteriyel serpiştirilmiş

tekrarlayan birim değişken numaralı tandem tekrarı) dahil olmak üzere *M. tuberculosis* suşlarının tiplendirilmesine yönelik önceki yöntemler tiplendirme, tekrarlayan genomik elemanların değişken sayılarını veya konumlarını kullanarak bir miktar başarı elde etmişti, ancak bunlar bu belirteçlerin düşük bolluğu ve ara sıra benzersiz olmaması nedeniyle sınırlıdır (Goyal ve ark., 1997; Gutacker ve ark., 2002).

M. tuberculosis ve ilgili mikobakterilerin tam genom dizilimi artık rutin olup, zaman ve mekânda karşılaştırmalara olanak sağlamaktadır. Bu artan yetenek, yerel ve küresel düzeydeki epidemiyolojik çalışmaların TB salgınlarını izlemesine ve bulaşıcılığın arttığını düşündüren özellikleri keşfetmesine olanak sağlamıştır (Black ve ark., 2018; Bryant ve ark., 2013). Benzer şekilde, ÇİD ve yaygını laca dirençli (YİD) suşların teşhisinde, *M. tuberculosis* genom diziliminden elde edilen bilgilerden yoğun şekilde yararlanılır (Cao ve ark., 2021; Cox ve ark., 2021). BDQ, pretomanid ve delamanid dahil olmak üzere yeni antitüberküloz ilaçların son zamanlardaki gelişimi, bakterilerin tedaviye duyarlılığını anlamak için genomiklerin nasıl kullanılabileceğini göstermektedir (Condarie ve ark., 2021; Leung ve ark., 2008).

2.2.5. Protein salgılama sistemleri

Protein salgılama sistemleri patojen bakterilerin ana virülans faktörleridir ve MTB'DE 5 tipte (ESX1-5) 7 salgılama sistemi tanımlanmıştır. Bunların en iyi karakterize edileni, zayıflatılmış *M. bovis* aşı suşu BCG'de eksik olan ESX1'dir (Pym ve ark., 2012; Hsu ve ark., 2003). ESX1, MTB'nin tam virülansı için gereklidir ; MTB bu salgı sistemini fagozomdan enfekte makrofajların sitozolüne transloke etmek için kullanır ve burada korumalı bir ortamda varlığını sürdürebilir. (van der Wel ve ark., 2007; Romagnoli ve ark., 2012). ESX1, birçok antijen arasında, interferon-gamma salınım analizlerinde (IGRA'lar) MTB enfeksiyonunun immünolojik tanısının temelini oluşturan iki küçük, yüksek derecede immünojenik protein olan ESAT-6 ve CFP-10'u salgılar . BCG, ESX1 içermediğinden ve ESAT-6 ile CFP-10'u eksprese etmediğinden, IGRA'lar klasik Mantoux intradermal reaksiyonuyla başka şekilde ayırt edilemeyen, daha önce BCG ile immünize edilmiş kişilerde bile MTB enfeksiyonunu tespit etmek için kullanılabilir . ESX3, MTB'nin demir ve çinko alımında rol oynar ve kültürde de büyüme için gereklidir (Serafini ve ark., 2009). ESX5 *yalnızca* MTBK, *M. marinum* ve *M. ülserans'ta* bulunur ve memelilerinki gibi karmaşık bir bağışıklık sistemiyle etkileşime girecek şekilde özel olarak geliştirilmiş bir salgı sistemini temsil ediyor olabilir.

ESX1 ve ESX5, MTB'nin virülansında rol oynayan farklı proteinler salgılar. ESX1, fagozomal membranın bütünlüğüne müdahale eden antijenleri salgılayarak fagozomal yırtılmaya ve sitozole bakteri emisyonuna yol açar. ESX5'in yalnızca yavaş büyüyen mikobakterilerde (MTB ve *M. marinum* gibi) mevcut olduğu ve immünomodülatör özelliklere sahip proteinlerin (PPE ve PE-PGRS) salgılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. ESX3, Çinko ve Demir

alımında ve homeostazda rol oynar ve bu nedenle büyüme için gereklidir. ESX2 ve ESX4'ün rolü hala bilinmiyor (Delogu ve ark., 2003).

2.2.6. Patogenezi

Tüberküloz basili aerosol damlacıkları halinde solunur, akciğerlere girer ve konağın doğuştan gelen bağışıklık savunması bakterileri yok edemediğinde, MTB alveolar makrofajların içinde çoğalmaya başlar ve daha sonra kan dolaşımı ve lenfatikler yoluyla diğer doku ve organlara yayılır. Hücre aracılı bağışıklık tepkisi devreye girdiğinde, bakteriyel replikasyon genellikle kontrol edilir ve vakaların %90-95'inde hastalığın belirgin olmayan belirtileri veya semptomları ortaya çıkar (Gizli TB). Gizli enfeksiyon sırasında basil ve konakçının bağışıklık tepkileri arasında dinamik bir denge kurulur ve hücre aracılı bağışıklığı zayıflatan herhangi bir olay, aktif bakteri çoğalmasına, doku hasarına ve hastalığın ortaya çıkmasına (aktif TB) yol açabilir.

2.3. Tanı ve teşhis

TB'nin kesin tanısı, biyolojik örnekten MTB'nin mevcut mikrobiyolojik tekniklerden en az biriyle tespit edilmesini gerektirir: mikroskobik analiz, kültürde izolasyon veya moleküler yöntemler. Bu testler TB'nin mikrobiyolojik tanısının temelini oluşturur ve klinisyenler, varsa klinik semptomlara bağlı olarak bir veya daha fazla örnekte MTB'nin tespit edilmesini isteyebilir (Murray ve ark., 2006). Akciğer TB tanısı için balgam, bronkoalveoler lavaj veya indüklenmiş balgam gibi örneklerde MTB'nin tespitinde yüksek duyarlılık ve özgüllük gözlenmiştir (Drouillon ve ark., 2009). MTB'nin tespiti için yeni, son derece hassas, tam otomatik moleküler analizlerin kullanıma sunulması, son onyılların büyük bir başarısı olarak kabul edilmiştir (Evans, 2011). Ancak klinik olarak MTB şüphesi olduğunda moleküler tanının rutin olarak istenmemesi gerektiğini hatırlatmak önemlidir. Uygun örneklerin tanımlanmasındaki zorluklar ve muhtemelen daha düşük bakteri konsantrasyonundan kaynaklanan, akciğer dışı örneklerde mikrobiyolojik testlerin duyarlılığının düşük olması nedeniyle akciğer dışı TB formlarının teşhis edilmesi daha sorunlu olabilir. İdrarda veya dışkıda MTB'nin tespiti, sistemik enfeksiyonları tespit etmek için kullanılabilir ve son zamanlarda idrardaki mikobakteriyel bileşenleri (lipoarabinomannan, LAM) tespit edebilen yeni analizlerin, HIV ile enfekte kişilerde ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda TB'nin teşhisinde yardımcı olduğu gösterilmiştir (Lawn, 2012; Lawn ve ark., 2012).

Tüberkülozun immünolojik tanısı tarihsel olarak Mantoux testi veya tüberkülin deri testi ve son on yılda periferik dokudaki MTB'ye özgü antijenlere karşı yönlendirilen T hücresi tepkilerini ölçen IGRA'lar kullanılmaya başlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tam kan, MTB enfeksiyonunun tanısında yeni ve değerli bir araç sağlamıştır . TB'nin immünolojik tanısının tartışılması bu derlemenin kapsamı dışındadır, ancak Tüberkülin deri testi ve IGRA'ların MTB enfeksiyonunu tespit etmeyi amaçladığını ancak hastalık belirtisi veya semptomları olmayan LTBI

hastaları ile aktif TB hastaları arasında ayrım yapamadığını belirtmekte fayda vardır (Goletti ve ark., 2008; Andersen ve ark., 2007).

2.4. Tedavi

TB tedavisinde en önemli faktör ilaçlardır. Dinlenme, beslenme ve iklim gibi faktörlerin etkileri önemsizdir (Fox ve Mitchison., 1975). Kür ya da tedavi başarısı sağlayacak bir ilaç kombinasyonuyla tedavi rejimi oluşturulmalıdır. Tedavinin başlangıcında basil sayısı en yüksek düzeyde olduğundan dirençli mutant suşların ortaya çıkma olasılığı en yüksektir. Başlangıçta standart dört ilaç (INH-PZA-EMB-RIF) kullanılmalıdır. İdame döneminde en az iki ilaç kullanılmalıdır. Bu tedavide ilaçların düzenli olarak ve yeterli süre kullanılması çok büyük önem taşımaktadır; aksi halde ilaç direnci, tedavi başarısızlığı ya da nüks ortaya çıkmaktadır.

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanIlan ilaçlar iki grupta incelenir. Birinci seçenek ilaçlar INH, RIF, PZA, EMB ve SM'dir. EMB dışındaki birinci seçenek ilaçlar bakterisiddir. Etkinlikleri sabit bir kan düzeyinden çok en yüksek serum konsantrasyonlarına bağlı olduğundan günde tek doz uygulama tercih edilir. Bu ilaçlar haftada 2-3 kez (intermitan tedavi fleklinde) verilebilir. İkinci seçenek ilaçlar grubuna sikloserin, etionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin, PAS girer. Bu ilaçlar birinci seçenek ilaçlara göre daha toksik ve daha az tolere edilebilen ilaçlardır. Hastanelerde ve deneyimli hekimlerce kullanılmaları uygundur. Genellikle dirençli tüberkülozlu hastalarda kullanılır. PAS dışındakiler intermitan tedavide kullanılamaz. Tiasetazon dışındakiler toksik yan etkilerinin çokluğu nedeniyle 2-3 doza bölünerek verilir. Bunlar dışınnda amikasin, rifabutin, klofazimin, ß-laktamaz inhibitörleri, kinolonlar ve yeni makrolidler gibi bazı ilaçlar da tüberküloz tedavisinde deneme aşamasındadır ve bu grup ilaçların uygulama doz ve süreleri hakkında kesinleşmiş bilgiler yoktur (Otkun, 2001).

İlaca duyarlı tüberküloz vakalarında ve ÇİD-TB vakalarında tedavi süresinin kısaltılması ve tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla tüberküloz tedavisinde yeni ilaçlar ve bilinen ilaçların yeni kombinasyonları denenmektedir. Tüberküloz tedavisine yönelik yeni ilaçların bulunmadığı elli yıldan sonra, BDQ (TMC-207) ve delamanid (OPC-67683), klinik uygulamada kullanılmak üzere ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylandı. Bu iki ilaç temel olarak ÇİD-TB için endikedir. 2009'dan bu yana yapılan klinik çalışmalar, florokinolonların, özellikle de moksifloksasinin diğer antitüberküloz ilaçları RIF-INH-PZA ve rifapentin ile kombinasyon halinde kullanımının, tedavinin sekizinci haftasında *M. tuberculosis* kültürü dönüşüm oranını önemli ölçüde artırdığını, bu da tedavi süresinin kısaltılabileceğini düşündürmektedir. 2016 yılında yayınlanan, florokinolonların etambutol ile karşılaştırıldığı klinik çalışmaların sistematik bir incelemesinde, sonuçlar, kaviter olmayan akciğer tüberkülozu ve pozitif kültürü olan hastalarda aynı etkinliği korurken tedaviyi 4 aya indirmenin mümkün olduğunu gösterdi; ancak klinik uygulamadaki sonuçlar tartışmalıdır (Conde ve ark., 2009; Alipanah ve ark., 2016).

2.5. TB tedavisinde kullanılan ilaçlardan Pirazinamid ve Bedakulin

2.5.1. Pirazinamid

PZA, hem ilaca duyarlı hem de MDR-TB aktiviteleri için benzersiz sterilizasyon sergileyen birinci basamak bir TB ilacıdır (Heifets ve Lindholm, 1992).

Diğer ilaçların o kadar iyi etki göstermeyebileceği makrofajların içindeki asidik ortamlarda varlığını sürdüren yarı uykudaki basilleri engelleme konusunda eşsiz bir yeteneğe sahiptir (Mitchison, 1985). PZA, INH ve RIF ile birlikte ilaca duyarlı TB'nin 6 ay içinde tedavi edilmesini sağlayan modern TB tedavisinin temel taşını oluşturur.

Etki mekanizması

PZA 1952'de keşfedildi ve 1950'lerin başında TB kemoterapisine dahil edildi fakat etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Zhang ve Mitchison, 2003). PZA, nikotinamidinin yapısal bir analoğudur, pirazinamidaz (PZase) enzimi tarafından aktif formu olan pirazinoik asit (POA)'e dönüştürülmesi gereken bir ön ilaçtır (Konno ve ark., 1967). 561-nükleotid uzunluğunda *pncA* geni (*Rv2043c*) tarafından kodlanır (Scorpio ve Zhang, 2018).

PZA'nın etki mekanizmasının, bakteriyel membran enerjilerini bozarak ve dolayısıyla asidik bir enfeksiyon bölgesinde MTB'nin hayatta kalması için gerekli olan enerji üretimine müdahale ederek aktif kısmı olan POA yoluyla olduğu öne sürülmüştür (Zimhony ve ark., 2017).

Bu, PZA'nın düşük membran potansiyeline sahip replike olmayan basillere karşı artan aktivitesi ve bunun asit ortamlarda POA tarafından bozulmasıyla ilişkilidir (Zhang ve ark., 2003).

Direnç mekanizması

1996 yılında, pncA *geninin* MTBK'daki PZA direnciyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Bununla birlikte, pncA mutasyonları olmayan bazı (%3-30) PZA dirençli suşlar rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2014; Alexander ve ark. 2012). Bu, PZA direncinde başka genlerin ve mekanizmaların rol oynadığını göstermektedir.

pncA'ya ek olarak, 30S ribozomal protein S1'i kodlayan rpsA adlı başka bir genin , POA 'ya bağlanması ile etkili protein sentezi için gereken trans-translasyon aktivitesini inhibe ettiğini gösterilerek genin PZA direnci kazandırdığı gösterilmiştir.

MTB panD enziminin aktivitesinin, terapötik olarak ilgili konsantrasyonlarda konsantrasyona bağlı bir şekilde POA tarafından inhibe edildiği, ancak ön ilaç PZA veya kontrol bileşiği nikotinamid tarafından inhibe edilmediği görülmüştür. Bu bulgu, panD mutasyonlarının POA direnci ile yakından ilişkili olduğunu ve PanD proteininin C terminalinin POA bağlanmasında ve özellikle de POA dirençli mutantlarda en çok değişikliğe uğramış olan ve inhibisyonla sonuçlanan M117 kalıntısına dahil olabileceğini düşündürmektedir (Shi ve ark., 2011).

hadC'nin mutasyonu veya delesyonunun, oksijenli mikolik asitlerin biyosentezini etkileyerek üretim seviyelerini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir . Ek olarak, atipik ekstra uzun

mikolik asitlerin kaybına neden olur, bu da hadC'nin mikolik asit biyosentezinin geç uzama aşamalarında rol oynadığını göstermektedir. Bu olayların basillerin morfotipi, kordonlanma kapasitesi ve biyofilm büyümesinin yanı sıra rifampisin gibi ajanlara duyarlılıkları üzerinde de etkisi vardır. Dahası, had C'deki nükleotid delesyonu virülansta dramatik bir kayba yol açmaktadır (Slama ve ark., 2016).

Mikobakteriyel yağ asidi sentaz Tip-II (FAS-II) bileşenleri, yeni antimikobakteriyel ilaçların geliştirilmesinde potansiyel hedefler olarak kullanılan başlıca virülans faktörleridir. FAS-II enzimi 3-hidroksiasil-ACPdehidrataz (HadC), *Mycobacterium tuberculosis* ve diğer mikobakteriyel türlerin biyofilm gelişimi ve patogenezi için önemlidir (Sharma ve ark., 2022) .

Hücre duvarında bulunan Mikolik asit sentezi esas olarak çoğalmakta olan bakterilerde gerçekleşmektedir. PZA'nın dormant haldeki basillere etkili olduğu göz önüne alındığı zaman hadC'nin PZA tarafından inhibisyonu PZA'nın aktivitesi ile ilgili tutarsızlık oluşturmaktadır. Bundan dolayı oluşacak mutasyonların PZA direncindeki rolünün belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Özgür, 2019).

2.5.2. Bedakulin

Bedakulin (TMC207), son 40 yılda tüberküloz tedavisinde kullanımı FDA tarafından onaylanan (Aralık 2012) ilk yeni ilaçtır (Lemos ve Matos., 2013). Faz II çalışması sonucunda piyasaya sunulmuştur. Tüberküloza karşı gelişen çoklu rezistans durumunda kullanılmaktadır.

Bedakuilin, diarilkinolin ilaç sınıfına ait yeni bir anti-mikobakteriyel ajan sınıfıdır. Önemli bakterisidal aktiviteye sahiptir ve mevcut birinci ve ikinci basamak TBC önleyici ilaçlarla çok az çapraz direnç gösterir, bu da hem ilaca dirençli hem de ilaca duyarlı Mycobacterium tuberculosis (MTB) izolatlarına karşı daha güçlü aktiviteye sahip olduğunu gösterir.(Andries ve ar., 2005).

Yapılan Faz III çalışmalarında PZA'nın; Bedakulin, Bisiklik Nitroimizadol ve Moksifloksasin ile kombine kullanımının tedavi rejimlerinin bir parçası olacağı kabul edilmektedir. Bu yeni ilaç kombinasyonlarının, ilaca duyarlı, ÇİD ve YİD TB olgularında tedavi süresini kısaltması beklenmektedir (Njire ve ark., 2016).

Etki mekanizması

BDQ, diarilkinolin yapısındaki bir bileşiktir. Etkisini mikobakterinin adenozin trifosfat (ATP) sentezi için önemli bir enzim olan mikobakteriyel ATP sentazın proton pompasını inhibe etmek suretiyle göstermektedir (Rubenstein ve Keynan., 13).

Direnç mekanizması

MTB Rv0678 genindeki bir mutasyon nedeniyle bedakulin direnci kazanır.. Bedakulin direnci, antimalaryal ilacın alımını önleyen bir akış pompasının yukarı regülasyonu nedeniyle

oluşur. Rv0678 mutasyonları akış pompası ekspresyonunu aktive eder (Andries, Villellas ve ark. 2014).

Rv0678 mutasyonları, MmpS5-MmpL5 akış pompasının ekspresyonunu değiştirebilir. Bazı araştırmacılar, mmpR olarak da bilinen Rv0678'in Mmps2-MmpL2, MmpS4-MmpL4 ve MmpS5-MmpL5 taşıyıcı/taşıyıcı sistemlerini inhibe ettiğine inanmaktadır (Radhakrishnan ve ark. 2014). MmpS-MmpL proteinleri, MTB hücrelerinin zarı boyunca lipitleri, virülans faktörlerini ve bazı ilaçları transfer eder. Özellikle MmpS5 ve MmpL5 bedakulinin dışa atımını destekler (Milano ve ark., 2009).

Her 108 organizmadan birinde bedakuline direnç kazandıran bir mutasyon bulunmaktadır. Bedakulin için iki potansiyel mutasyon yolu vardır. Birisi yukarıda da bahsedilen Akış pompasının ekspresyonu, diğeri ise atpE geninin mutasyonudur. AtpE genindeki 63 ve 66. lokasyonlardaki mutasyonlar, BDQ'nun ATP sentaz enziminin c alt birimlerine afinitesi ile meydana gelir (Huda, 2023).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmanın etik onayı

Yapılan çalışmada , Çukurova Üniversitesi / Tıp Fakültesi Etik İnceleme Komitesi'nin onayıyla yalnızca Türkiye'nin Adana kentindeki Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden izolatlar alındı.

3.2. *Mycobacterium tuberculosis* complex örneklerinin seçilmesi

Çukurova Üniversitesi yerleşkesinde bulunan Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarı olarak işlev gören, Tropikal Hastalıklar Uygulama ve Araştırma Merkezi (T.H.A.U.M.)'ne 7 farklı ilden gönderilen Tüberküloz şüpheli klinik örneklerden yapılan İlaç duyarlılık testi sonucu 41 MDR-TB ve 30 duyarlı suş izole edilmiştir. Çalışmamızda bu izolatlar kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan kitler

Bactec MGIT tüpleri, Bactec MGIT OADC Supplement, BD, Bactec MGIT PANTA, BD, Streptomisin (STR), Isoniazid (INH), Rifampisin (RIF), Ethambutol (ETM), Pirazinamid (PZA), Becton Dickonson'dan satın alınmıştır. ExoZAP AMPLIQON PureIT, Sephadex (Sigma-Aldrich), BigDye Terminator v3.1 Cycle sekans kiti, ABD, ADS SupreDye v.3.1 Cycle sequencing kit, 2x PCRmaster mix (Thermo scientific), QIAGEN EZ1virus Mini kit v.2.0 izolasyon kiti, abm One script Plus cDNA Synthesis Kit, hot FIREPol SolisGreen qPCR Mix, 5x kiti (Solis BIODYNE),

3.4. Kullanılan cihazlar

Bactec MGIT 960 Sıvı Kültür Sistemi, BD, ABD, Blu ray biotech thermal cycler, Thermo Elektroforez tankı, Quantom ST UV jel görüntüleme cihazı, Eppendorf AG22331soğutmalı mikrosantrifüj, VWR Isı bloğu, Fırın, Arçelik md553 mikrodalga fırın, Lab compaion Otoklav, Bosch +4 °C buzdolabı, Altus -20 °C dondurucu, Scanlaf mars 500 Biyogüvenlik kabini ve bir ABI Prism 3130 Sanger sekans dizileme analizörü, Roche Lightcycler 96 RT-qPCR cihazı, Nanodrop spektrofotometre

3.5. İlaç duyarlılık testi

Kantitatif ilaç duyarlılık testi için, bakteri üremesini kolaylaştırmak amacıyla yarı otomatik bir MGIT 960 sistemi ve TB eXiST modülüne sahip EpiCenter yazılımı kullanıldı. Büyüme tespiti için kullanılan MGIT 960 platformu, floresans söndürme bazlı oksijen sensörünü kullanan yarı otomatik bir cihazdır. Bu teknik, *M. tuberculosis'* de ilaç duyarlılık testi (İDT) için laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan antibiyogram işlemi için şu basamaklar izlendi; MGİT besilerinde üreyen bakteri kültürünün seyreltilmesi, ilaç solüsyonlarının

oluşturulması, İDT'de kullanılacak yeni MGİT besiyerlerinin hazırlanması, hazırlanan ilaçların tüplere dağıtılması, seyreltilen bakteri süspansiyonunun ekimi, örneklerin cihaza yüklenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi.

SIRE kiti ile yapılan İDT sonucunda çoklu ilaç direncine (ÇİD-MDR) sahip çıkan örnekler tekrar antibiyograma alınarak Pirazinamid direncine bakılmıştır.

3.5.1. Bakteri kültürünün seyreltilmesi

50mL'lik falkon tüplerine her bir örnek için 4ml ve 10 mL'lik steril ultra saf su konuldu. Numaralandırılmış MTBK pozitif her bir örnekten 500 µl önce 4 mL'lik falkona ardından bu tüpten 100 µl alınıp 9,9 mL'lik falkona inoküle edidi.

3.5.2. İlaç solüsyonlarının oluşturulması

Liyofize halde olan birinci basamak ilaçlardan Streptomisin, İzoniyazid, Rifampisin Etambutol ilaç Şişelerine 4 ml, Pirazinamide ise 2,5 ml steril ultra saf su eklenerek sulandırdık. Bu durumda sırasıyla 8.3, 83, 415, 8000 µg/mL olacak şekilde stok hazırlandı.

3.5.3. İDT'de kullanılacak yeni MGİT besiyerlerinin hazırlanması:

SIRE kitindeki birinci basamak ilaçların İDT'si için 4 MGİT tüpü hazırlandı. İlaçların baş harfi olan S,İ,R,E harfleri yazıldı. Kontrol tüpüne ise K harfi yazılarak her bir MTBK pozitif örnek için 5 tüp hazır hale getirildi. Pirazinamid için ise bir kontrol bir de ilaç tüpü hazırlandı. Bu tüplerin herbirine 800 µl supplement eklendi.

3.5.4. Hazırlanan ilaçlarının tüplere dağıtılması

Her bir ilaç grubu kendi tüpüne 100 µl olacak şekilde inoküle edildi. Bu durumda Steptomisin, İzoniyazid, Rifampisin, Etambutol, Pirazinamid konulan MGİT tüplerinde son konsantrasyon sırasıyla 0.2, 0.2, 0.1, 5 ve 100 µg/mL olmuştur.

3.5.5. Seyreltilen bakteri süspansiyonunun ekimi

SIRE kiti için 500 µl MTBK pozitif örnek inoküle edilen 4mL'lik ultra saf sudan 100 µl alınarak 9.9 mL'lik falkona pipetlenmiştir. Böylece 1/100 oranından seyreltme yapılmıştır. Kontrol tüpüne bu falkondan 100 µl, ilaç tüplerine de 4 mL saf su bulunan falkondan 500 µl ekilmiştir. Pirazinamid için ise hem kontrol tüpüne hem de ilaç tüpüne bu seyreltme oranlarında bakteri ekilmiştir.

3.5.6. Örneklerin cihaza yüklenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi

Hazırlanan tüpler MGIT 960 BACTEC kültür cihazına yerleştilmiştir. Kontrol tüpünün 400 GU'ya ulaşarak antibiyotik duyarlılık testini sonuçlandırana kadar takip edilmiştir. Antibiyotikleri

içeren besiyerlerini değerlendirirken, standartlarda belirlenmiş olan 100 GU eşik değerinin altında kalan veya eşik değerini geçen tüpleri duyarlı veya dirençli şeklinde yorumlanmıştır. Kontrol tüpünde 4 günden önce 400 GU üreme gözlenmesi kontaminasyon ya da inokulum fazlalığı şeklinde yorumlanmış ve antibiyotik duyarlılık testleri tekrar edilmiştir.. Yirmi bir günden sonra üreme gözlenmeyen (400 GU) kontrol tüpleri ise bakteri yoğunluğu yetersiz olarak değerlendirildi ve antibiyotik duyarlılık testi tekrar edilmiştir.

3.6. DNA ekstraksiyonu

MTBK pozitif örneklerden Mickle protokolü ile genomik DNA izole edilmiştir. Protokolün basamakları şu şekildedir.

1) Her bir pozitif örnekten Pastör pipet ile 0.5-1 mL aralığında alınarak 1.5 mL'lik eppendorf mikrosantrifüj tüpüne koyulmuştur.
2) Bu tüpler 95°C'de dakika termal blokta bekletilerek bakterinin canlılığını yitirmesi sağlanmıştır.
3) 12.7 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
4) Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş ve 500 µl TE (Tris-EDTA) buffer ekleyip pipetaj yapılmıştır.
5) Tekrar 12.7 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
6) Supernatant dökülmüş bu sefer 250µl TE buffer ekleyip pipetaj yapıldıktan sonra, 50-100 mikrogram asit ile yıkanmış cam boncuk eklenmiştir.
7) Örnekler, hücrelerin parçalanması için 2 dakika mickle cihazına koyulmuştur.
8) 12.7. rpm'de 10 dk. santrifüj işleminden sonra supernatant pipet ile çekilerek yeni mikrosantrifüj tüplerine koyulmuştur.
9) Elde edilen supernatant DNA olarak kabul edilmiş ve - 20 °C' de moleküler çalışmalar içim saklanmıştır.

3.7. *M.tuberculosis* ve *M.bovis'* in moleküler yöntemlerle ayırt edilmesi

Bu bakterilerin PncA genindeki nükleotid farkı göz önünde bulundurularak 2 farklı primer çifti dizayn edilmiştir. Liyofize halde gelen primerler üretici firmanın belirlediği sulandırma miktarı kullanılarak hazırlanıp -20 °C'de saklanmıştır. Dizayn edilen primer çiftleri çizelge 3.1.de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *M.tuberculosis* ve *M.bovis* primerleri

Primer adı	5’- 3’
tb-F	ATG CGG GCG TTG ATC ATC GTC
tb-R	CGG TGT GCC GGA GAA GCG G
bv-F	ATG CGG GCG TTG ATC ATC GTC
bv-R	CGG TGT GCC GGA GAA GCC G

3.7.1. PCR

41 MDR ve 30 duyarlı örneğimizin her biri bu 2 çift primer ile PCR yapılmıştır. PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.2’de belirtilmiştir. Her çalışmada pozitif kontrol olarak *M. tuberculosis* H37Rv, negatif kontrol olarak ise dH_2O kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. *M.tuberculosis* ve *bovis* reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	**Hacim µL (her bir örnek için)**
Syber green mastermix	12.5
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
Su	6
D.M.S.O.	1
DNA	5
TOPLAM	25

PCR reaksiyonu BLUE-RAY Biotech TurboCycler lite thermal cycler cihazına yerleştirilerek çizelge 3.3’ de belirtilen PCR programında çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.3. M.tuberculosis ve bovis ayrımı PCR Programı

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C-10dk.	1
Denatürasyon	94°C-1 dk..	30
Yapışma	67 °C-1 dk.	
Uzama	72 °C-30 sn.	
Son Uzama	72 °C-10dk.	1

3.7.2. Elektroforez

PCR aşamasından sonra çoğalması gereken DNA'nın varlığının tespiti için elektroforez işlemine geçilmiştir. Öncelikle 10X TBE tampon buffer stok olarak hazırlanmıştır. 500 mL tampon için; 53.9 gr Trisbase 27.5 gr Borik asit, 3.72 gr EDTA tartılarak pH 8'e ayarlanmıştır. Çalışmamızda hem jel için hem de elektroforez tankı için 1X tampon kullanılacağından stok tampon çözeltisinden 100 mL alınıp üzerine 900 mL saf su eklenerek 1X tampon hazırlanmıştır. Jelimiz için 2 gr Agaroz tartarak, 100ml 1xTBE buffer içeren erlene eklendi. Mikrodalga fırında kaynatılarak soğumaya bırakıldı. Üzerine 5µl ethidium bromide eklenerek tarakları takılmış tanka döküp soğuması beklenildi. Elektroforez tankının içine 1X buffer eklendi ve donan jel tanka konuldu. İlk kuyuya marker diğer kuyulara da 5 µl amplikon koyarak tank 120 V'da 40 dk. çalıştırıldı. Jel görüntüleme cihazında görüntülenerek sonuçlar değerlendirildi.

3.8. PanD, PncA, HadC , Rv0678 genleri için PCR ve Elektroforez

Her bir gen bölgesi için hazırlanan primer dizileri Çizelge 3.8.a 'da, PCR reaksiyon karışımları 3.4' de ifade edilmiştir.

Çizelge 3.4. Primer dizileri

GEN	PRİMER	SEKANS(5' 3')	UZUNLUK(bp)
PanD	F	TCAACGGTTCCGGTCGGCTGCT	420
	R	TATCCGCCACTGCTGCACCACCTT	
PncA	F	GCTTGCGGCGAGCGCTCCA	561
	R	GGTTGGGTGGCCGCCGCTCAG	
HadC	F1	GAGTTTGCCCCGAGCTGT	501
	F2	GAGTTTGCCCGAGCTGT	
	F3	GGCGGCAAGAAGATTTTCGG	
	R	GCCGATGTTGGGAAAACCC	
Rv0678	F	TGAAGTTCACGCCGGTCTGG	560
	R	CAGCGAACCGGAGAGGACGACTGA	

Çizelge 3.5. PCR reaksiyon karışımları

Reaksiyon bileşenleri	**Hacim µL (her bir örnek için)**
Solis green mastermix	6
Forward primer	0.25
Reverse primer	0.25
Su	8.5
D.M.S.O.	1
DNA	4
TOPLAM	20

Her bir genin PCR döngüleri ise Çizelge 3.6, 3.7,3.8,3.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. PanD PCR döngüsü

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C-10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C-1 dk.	35
Yapışma	55 °C-1 dk.	
Uzama	72 °C-2 dk.	
Son Uzama	72 °C-10 dk.	1

Çizelge 3.7. PncA PCR döngüsü

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94 °C-5 dk.	1
Denatürasyon	94 °C-1 dk.	30
Yapışma	55 °C-1 dk.	
Uzama	72 °C-1 dk.	
Son Uzama	72 °C-5 dk.	1

Çizelge 3.8. HadC PCR döngüsü

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94 °C-5 dk.	1
Denatürasyon	94 °C-1 dk.	35
Yapışma	58 °C-1 dk.	
Uzama	72 °C-1 dk.	
Son Uzama	72 °C-10dk.	1

Çizelge 3.9. Rv0678 PCR döngüsü

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C-5 dk.	1
Denatürasyon	95°C-30 sn.	35
Yapışma	58 °C-30 sn.	
Uzama	72 °C-30 sn.	
Son Uzama	72 °C-10dk.	1

Elektroforez işlemleri ise 3.7.2. de belirtilen şartlar sağlanarak yapılmıştır.

3.9. Sanger sekans dizi analizi

M. tuberculosis'in 560-bp Rv0678, 420-bp PanD, 501 bp-HadC, 561-bp PncA gen bölgeleri Sanger DNA dizileme tekniği kullanılarak dizilendi. analiz yöntemi olarak Sanger sekans dizileme yöntemi kullanıldı. Reaksiyonlar dört ddNTP içeren tek bir tüpte gerçekleştirildi; bunların tümü, farklı dalga boylarında yayılan boyalarla işaretlenmiş ve cihazın lazeri bu dalga boylarını okuyarak çalışılan bölgenin Gen dizisini çıkarmıştır.

PCR sonuçlarının Sanger DNA sekans analizi, bir BigDye Terminator Cycle Sequencing kiti ve bir ABI Prism 3130 DNA analizörü kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin analizi için temel yerel hizalama arama aracı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) kullanılmıştır. Dizi analizi; ExoSAP ile amplikonların temizlenmesi, Cycle sequence PCR aşaması, Sephadex ile saflaştırma ve amplikonların Sanger dizi analizi cihazına yüklenmesi basamaklarını içermektedir.

3.9.1. ExoSAP ile amplikonların temizlenmesi

Çizelge 3.4'de gösterilen genlerin PCR ürünleri elde edildikten sonra, 5 µl PCR ürününe ExoZAP kitinin talimatlarına göre 2 µl enzim eklenerek, 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra karışım 80°C'de 15 dk. tutularak enzim inaktif hale getirildi.

3.9.2. Cycle sequence PCR aşaması

PanD, PncA, HadC , Rv0678 genleri için Çizelge 3.4'de belirtilen primer çiftlerinden tek yönlü olarak forward primerler seçilerek son konsantrasyonu 4 mikromol olacak şekilde hazırlandı. Cycle sequence reaksiyon karışımları ADS SupreDye v.3.1 Cycle sequencing kit'i kullanılarak hazırlandı. Reaksiyon karışımı ve döngüsü çizelge 3.10 ve 3.11'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. Cycle sequence reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	**Hacim µL (her bir örnek için)**
Supre dye	1
Primer	2
Su	3
5x buffer	2
Exozap DNA	2
TOPLAM	10

Çizelge 3.11. Cycle sequence döngüsü

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	96°C-1dk.	1
Denatürasyon	96°C-10 sn.	25
Yapışma	50 °C-5 sn.	
Uzama	60 °C-4dk.	

3.9.3. Sephadex ile saflaştırma

Cycle Sequence ürünlerini sekans cihazına yüklemeden önce sephadex spin kolon yöntemini kullanarak tekrar bir saflaştırma yapıldı. 1gr sephadex tartılarak 14 mL ultra saf su eklenmesiyle bir karışım hazırlandı. Elde edilen karışımla oluşturulan kolonlara amplikonları yükleyerek aşağıdaki protokole göre saflaştırma işlemini gerçekleştirildi.

1) Spin kolonlar 1.5 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
2) Her kolona 750 µl olacak şekilde hazırlanan sephadex karışımı eklendi.
3) 4500 rpm'de 2dk. santrifüj yapıldı, sephadex kolonlar oluşturdu.
4) Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı, oluşan sephadex kolona cycle sequence sonrası oluşan amplikonarımız yüklendi.
5) 4500 rpm'de 3 dk. Santrifüj yapıldı. Toplama tüpünden elde edilen saflaştırılmış DNA -20 °C' de saklandı.

3.9.4. Amplikonların Sanger dizi analizi cihazına yüklenmesi

- 20 °C 'de saklanan DNA, 96 kuyuya sahip reaksiyon plate'ine yerleştirilerek ABI Prism 3130 Sanger sekans dizileme cihazından alınan sonuçlar http://www.ncbi.nih.gov/BLAST sitesi kullanılarak analiz edildi.

3.10. RealTime qPCR Analizi

3.10.1. RNA izolasyonu

QIAGEN EZ1virus Mini kit v.2.0 izolasyon kiti kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda örnekler hazırlandı.

1) Liyofize haldeki Carrier RNA içerisine elution bufferdan 310 µl pipetlendi ve kullanılacak kısım aliquotlara ayrıldı.
2) Elution bufferdan 49 µl/ örnek, hazırlanan RNA stok solüsyondan 3.8 µl/ örnek ve internal kontrolden 7.2 µl/ örnek tüplerinden sırasıyla ve miktarlarında 1.5 ml'lik tüpler içerisine dağıtılarak her bir örnek için karışım hazırlandı.
3) Çalışma rackı yüklendi.
4) Hazırlanan Kartuş rackı ve çalışma rackı cihaz içerisinde uygun pozisyonlara yerleştirilerek çalışma alanının kapağı kapatıldı cihaz çalıştırıldı.

NanoDrop Spektrofotometre kullanılarak RNA'nın A260nm/A280nm dalga boylarında değerleri ölçülerek varlığı tespit edildi. RNA -80°C'de saklandı.

3.10.2. cDNA Sentezi

RNA üreticinin tavsiyeleri ışığında cDNA kitine (abm One script Plus cDNA Synthesis Kit) göre kopyalandı. Çizelge 3.12' de kullanılan komponentlerin adı ve miktarı belirtilmiştir.

Çizelge 3.12. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	**Hacim µL (her bir örnek için)**
5x buffer	4
dNTP	1
Primer	1
One script plus RTase	1
Su	8
RNA	5
TOPLAM	20

Daha sonra tüpler bir termal döngüleyiciye yerleştirildi ve program 55°C 15 dk. ve 85°C 5 dk.olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen cDNA -20°C'de saklanmıştır.

3.10.3. RT qPCR aşaması

Çalışılan genlerin adı, hazırlanan primer dizisi ve uzunluğu çizelge 3.13'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.13. RT qPCR Gen ve Primerleri

GEN	**PRİMER**	**SEKANS(5' 3')**	**UZUNLUK(bp)**
mmpL5	F	TGATCAACAAGATCGCCAAG	
	R	TGAATGTCGTTGACCTGCTC	
mmpS5	F	GGATACCGCTGCTCATCCT	
	R	CGTCGAGGTCCAGGTAGTTG	
Rv0678	F	TGAAGTTCACGCCGGTCTGG	560
	R	CAGCGAACCGGAGAGGACGACTGA	

Test Roche marka Lightcycler 96 model cihazda Hot FIREPol SolisGreen qPCR Mix, 5x kiti (Solis BIODYNE) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir kuyucuk için çizelge 3.14'deki PCR karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.14. RT qPCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	**Hacim µL (her bir örnek için)**
Syber green mastermix	4
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
Su	13
cDNA	2
TOPLAM	20

Hazırlanan karışım thermal cycler cihazına çizelge 3.15'deki şartlar sağlanarak koyuldu ve cihaz çalıştırıldı.

Çizelge 3.15. RT qPCR döngüsü

	Sıcaklık-süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C-10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C-10 sn.	40
Yapışma	60 °C-20 sn.	
Uzama	72 °C-20 sn.	

Housekeeping geni Rv0678 ve efflux dışa atım pompası ile ilişkili mmpL5, mmpS5 genleri için tüm numunelerde Ct değerlerinin alınması ile ΔCt hesaplandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

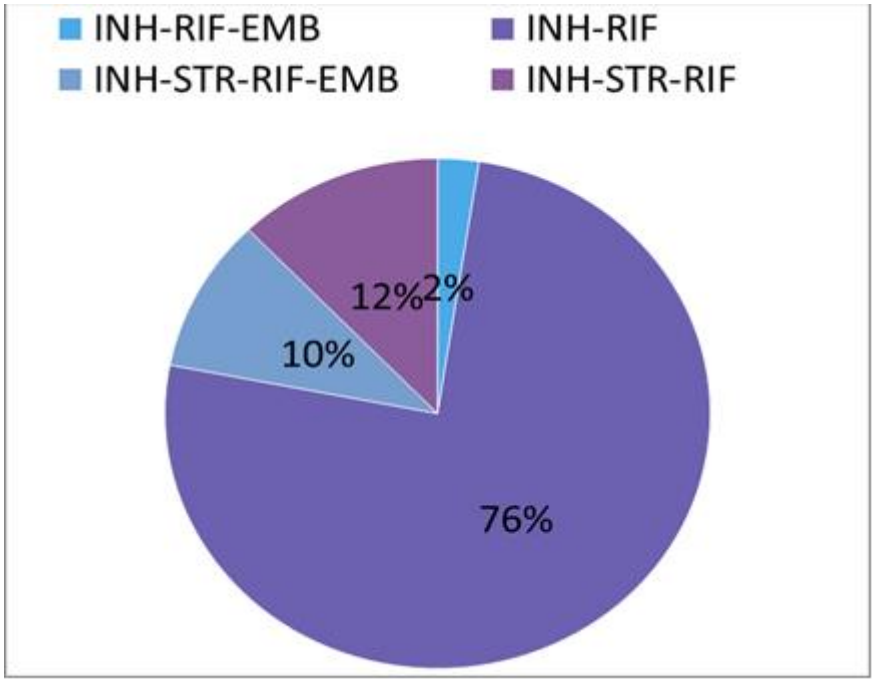
4.1. Bulgular

4.1.1. Duyarlılık testi

Çukurova Üniversitesi yerleşkesinde bulunan Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarı olarak işlev gören, Tropikal Hastalıklar Uygulama ve Araştırma Merkezi (T.H.A.U.M.)'ne 7 farklı ilden gönderilen Tüberküloz şüpheli klinik örneklere İlaç duyarlılık testi yapılmıştır. Tüm numuneler bu testten sonra seçilmiştir.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan streptomisin, izoniazid, rifampisin, etambutol ve pirazinamid ilaçları ile yapılan testler sonucunda SIRE kitindeki ilaçlara tamamen duyarlı 30 örnek kontrol grubu olarak seçilmiştir. En az iki ilaça dirençli örnekler ise çoklu ilaç direncine (MDR) sahip olarak tanımlanmıştır. 41 adet MDR çalışmamıza dahil edilmiştir. Daha sonra MDR örneklerin pirazinamid direncine bakılmış ve 41 örnekten 11 tanesinin duyarlı (%27), geri kalan 30 örneğin ise (% 73) pirazinamide dirençli olduğu gösterilmiştir. 41 MDR örneğin 31 (%76)'inin izoniazid-rifampisine, 5 (%12)'inin izoniazid-streptomisin-rifampisine, 1 (%2) inin izoniazid, rifampisin-etambutole, 4 (%10)'ünün ise izoniazid-streptomisin-rifampisin-etambutole dirençli olduğu bulunmuştur.

Şekil 4.1' de ise MDR suşların İlaç duyarlılık profilleri, Çizelge 4.1' de MDR örneklerin pirazinamid direnç profili gösterilmiştir.



Şekil 4.1. MDR suşların ilaç direnç profili

Çizelge 4.1. MDR örneklerin pirazinamid direnç profili

Örnek no.	Test sonucu	Örnek no.	Test sonucu
MDR 1	**R**	**MDR 25**	**R**
MDR 2	**S**	**MDR 26**	**R**
MDR 3	**R**	**MDR 27**	**R**
MDR 4	**R**	**MDR 28**	**S**
MDR 5	**R**	**MDR 29**	**R**
MDR 6	**R**	**MDR 30**	**R**
MDR 7	**R**	**MDR 31**	**S**
MDR 8	**R**	**MDR 32**	**R**
MDR 9	**S**	**MDR 33**	**R**
MDR 10	**S**	**MDR 34**	**S**
MDR 11	**R**	**MDR 35**	**R**
MDR 12	**R**	**MDR 36**	**R**
MDR 13	**S**	**MDR 37**	**R**
MDR 14	**R**	**MDR 38**	**R**
MDR 15	**R**	**MDR 39**	**R**
MDR 16	**S**	**MDR 40**	**R**
MDR 17	**R**	**MDR 41**	**R**
MDR 18	**S**		
MDR 19	**R**		
MDR 20	**R**		
MDR 21	**S**		
MDR 22	**S**		
MDR 23	**R**		
MDR 24	**R**		

S: sensitive; Duyarlı
R: resistance; Dirençli

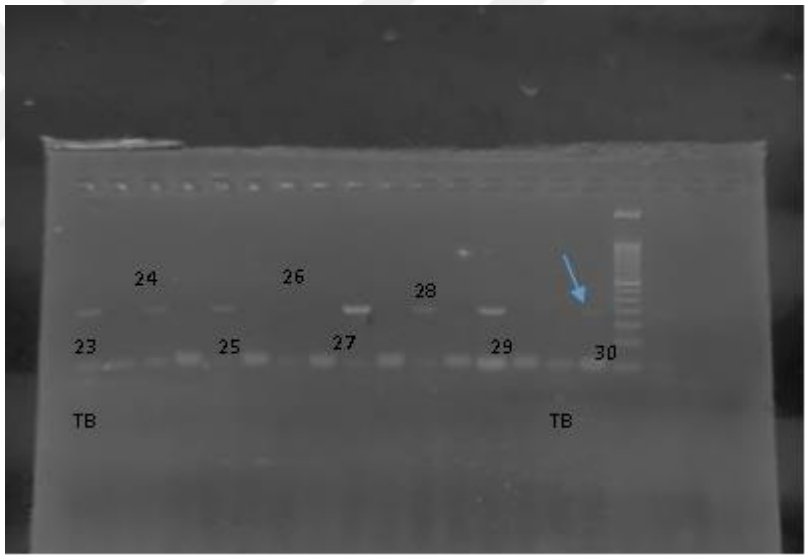
4.1.2. *M. Tuberculosis ve M. bovis* ayrımı

41 MDR ve 30 duyarlı suş olmak üzere 71 örneğin DNA ekstraksiyonu yapılmış, PCR ve elektroforez işlemlerinin ardından PncA geninde 185 bp'de , *M. tuberculosis* ve *M.bovis* arasında PCR ürünlerinin bant vermelerine göre sonuçlar değerlendirilmiştir.

PncA geninde 169'uncu nükleotid *M.tuberculosis*'de sitozin (C) iken *M.bovis*'de guanin (G)'dir. 3.7. de primer-tb ve primer-bv olarak dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan yukarıda da bahsedilen moleküler çalışmalardan sonra her örneğin iki farklı primer ile yapılan çalışması yanyana yüklenmiş olup 185 bp'de primer-tb olarak adlandırılan primer ile çoğalan amplikonun karşısında bant var ise *M. Tuberculosis*, primer-bv olarak adlandırılan primer ile çoğalan amplikonun karşısında bant var ise *M.bovis* olarak yorumlanmıştır.

Toplam 71 örnekten (41 MDR ve 30 Duyarlı) sadece 1 tane örnek (MDR 30) *M. bovis* olarak tanımlanmış geri kalan örneklerin ise *M.tuberculosis* olduğu gösterilmiştir.

Şekil 4.2' de elektroforez sonucu oluşan jel görüntüsü, Çizelge 4.2' de ise örneklerin hangi tür bakteriye ait olduğunu gösteren karşılaştırma sonucu gösterilmiştir. Jel görüntüsünde aynı örnek için sırayla MDR tb ve bv primlerleri yüklenmiştir. Şekilde markerın solundaki ilk iki kuyu 30 numaralı MDR örnek içi sırayla tb ve bv primerlerini içerirken tb'de bant vermez iken bv de bant vermiştir. Görüntüde diğer örneklerin ise *M.tuberculosis* olduğu gözlenirken sadece markerin solundaki örneğin *M.bovis* olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2. *M.tuberculosis* ve *M. bovis* ayrımı jel görüntüsü

Çizelge 4.2. *M.tuberculosis* ve *M. bovis* karşılaştırma sonucu

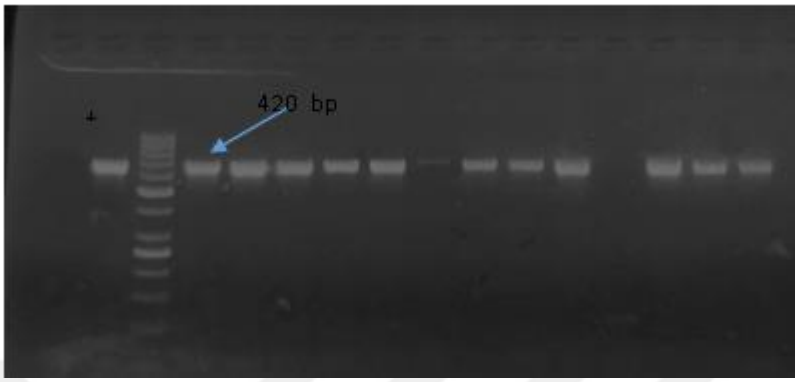
Örnek no.	Test sonucu	Örnek no.	Test sonucu	Örnek no.	Test sonucu
MDR 1	M.tuberculosis	MDR 25	M.tuberculosis	DUYARLI 8	M.tuberculosis
MDR 2	M.tuberculosis	MDR 26	M.tuberculosis	DUYARLI 9	M.tuberculosis
MDR 3	M.tuberculosis	MDR 27	M.tuberculosis	DUYARLI 10	M.tuberculosis
MDR 4	M.tuberculosis	MDR 28	M.tuberculosis	DUYARLI 11	M.tuberculosis
MDR 5	M.tuberculosis	MDR 29	M.tuberculosis	DUYARLI 12	M.tuberculosis
MDR 6	M.tuberculosis	MDR 30	M. bovis	DUYARLI 13	M.tuberculosis
MDR 7	M.tuberculosis	MDR 31	M.tuberculosis	DUYARLI 14	M.tuberculosis
MDR 8	M.tuberculosis	MDR 32	M.tuberculosis	DUYARLI 15	M.tuberculosis
MDR 9	M.tuberculosis	MDR 33	M.tuberculosis	DUYARLI 16	M.tuberculosis
MDR 10	M.tuberculosis	MDR 34	M.tuberculosis	DUYARLI 17	M.tuberculosis
MDR 11	M.tuberculosis	MDR 35	M.tuberculosis	DUYARLI 18	M.tuberculosis
MDR 12	M.tuberculosis	MDR 36	M.tuberculosis	DUYARLI 19	M.tuberculosis
MDR 13	M.tuberculosis	MDR 37	M.tuberculosis	DUYARLI 20	M.tuberculosis
MDR 14	M.tuberculosis	MDR 38	M.tuberculosis	DUYARLI 21	M.tuberculosis
MDR 15	M.tuberculosis	MDR 39	M.tuberculosis	DUYARLI 22	M.tuberculosis
MDR 16	M.tuberculosis	MDR 40	M.tuberculosis	DUYARLI 23	M.tuberculosis
MDR 17	M.tuberculosis	MDR 41	M.tuberculosis	DUYARLI 24	M.tuberculosis
MDR 18	M.tuberculosis	DUYARLI 1	M.tuberculosis	DUYARLI 25	M.tuberculosis
MDR 19	M.tuberculosis	DUYARLI 2	M.tuberculosis	DUYARLI 26	M.tuberculosis
MDR 20	M.tuberculosis	DUYARLI 3	M.tuberculosis	DUYARLI 27	M.tuberculosis
MDR 21	M.tuberculosis	DUYARLI 4	M.tuberculosis	DUYARLI 28	M.tuberculosis
MDR 22	M.tuberculosis	DUYARLI 5	M.tuberculosis	DUYARLI 29	M.tuberculosis
MDR 23	M.tuberculosis	DUYARLI 6	M.tuberculosis	DUYARLI 30	M.tuberculosis
MDR 24	M.tuberculosis	DUYARLI 7	M.tuberculosis		

4.1.3. PanD, PncA, HadC, Rv0678 genlerinin PCR ve sekans analizi

71 örnek için bedakulin direnci ile ilişkisi olduğu bilinen Rv0678 geni ve pirazinamid direnci ile ilişkili PanD, PncA, HadC genlerinin her biri için PCR ve jel elektroforez işlemleri yapılmıştır. Her bir gen için istenilen bölgede bant görülmesi bize o bölgenin çoğaldığını göstermiştir. Bant görülen örneklerin temizlenmesi, işaretlenip çoğaltılması ve saflaştırılması aşamalarından sonra sekans ile dizileme yapılmıştır.

PanD' nin PCR ve sekans analizi

50 bp'lik marker kullanılarak yapılan elektroforez işlemi sonrası 420 bp' ye sahip gen bölgesinde görülen bantlar DNA'nın varlığını göstermiştir. Şekil 4.3'de UV ışık altındaki jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.3. PanD geninin jel görüntüsü

Toplam bu gen için 71 sekans analiz yapılmıştır. Bunun 41 tanesi MDR, 30'u ise birinci basamak ilaçlara tamamen duyarlı suştur. Toplam 16 örnekte mutasyon bulunmuştur. MDR içerisinde 30 örnek PZA dirençli iken 11 örnek PZA duyarlıdır. PZA dirençli suşlarda 12 örnekte mutasyon görülürken (12/30) mutasyonları içerisinde 5 mutasyon ile 133. Kodunda 1 sitozin(C) insersiyonu ile görülen mutasyon tüm PZA dirençli PanD mutasyonları içerisinde %41.6 ile en fazla bulunan mutasyon olmuştur. 4 numunede ise 145. Nükleotitde görülen Adenin'in Guanin'e dönmesi ile bulunan mutasyon bir nokta mutasyonudur ve yanlış anlamlı (missense) mutasyon olarak belirlenmiştir. 2 örnekte 361. Nükleotitten sonra Timin insersiyonu bulunmuş, 1 örnekte ise yine bir nokta mutasyonu olan Sitozin'in Guanin'e dönmesi ile anlamsız (nonsense) mutasyon bulunmuştur.

Pza duyarlı 11 MDR örneğinde ise 377 nükleotitten sonra 1 tane Adenin bazının delesyona uğraması sonucu oluşan 1 tane çerçeve kayması mutasyonu görülmüştür.

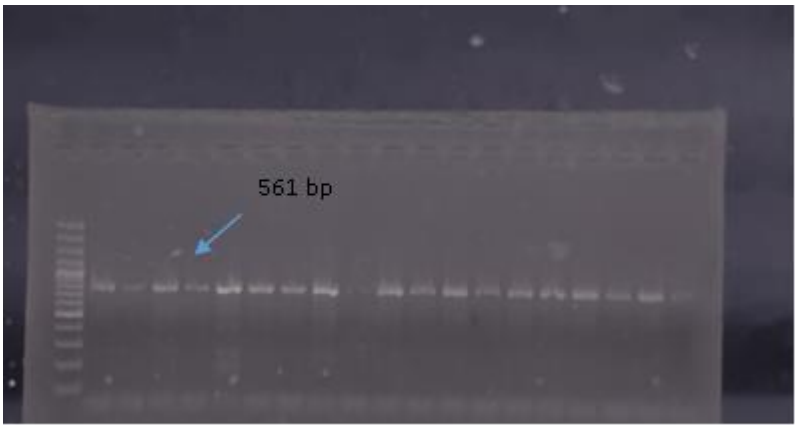
Tüm birinci basamak ilaçlara duyarlı 30 örneğin sekans analizi sonucunda ise 3 tane 145. Nükleotitte Adenin'in Guanin'e dönüşmesi ile oluşan nokta mutasyon görülmüştür. Görülen tüm mutasyonlar çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. panD gen bölgesinde tespit edilen mutasyonlar

		izolat sayısı	Nükleotid değişimi	Kodon değişimi	Kodon numarası	Aminoasit değişimi	Patern
MDR n=41	Pza dirençli n= 30	5	+C	Insersiyon	133	ORF Shift	399+C
		4	A-G	ATC-GTC	49	Ile-val	A145G
		2	+T	Insersiyon	121	ORF Shift	361+T
		1	C-G	TAC-TAG	22	Tyr-stop	C66G
	Pza duyarlı n=11	1	-A	Delesyon	126	ORF Shift	377-A
DUYARLI n=30		3	A-G	ATC-GTC	49	Ile-val	A145G

PncA'nın PCR ve sekans analizi

50 bp'lik marker kullanılarak yapılan elektroforez işlemi sonrası 561 bp'ye sahip gen bölgesinde görülen bantlar DNA'nın varlığını göstermiştir. Şekil 4.4'te UV ışık altındaki jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.4. pncA geninin jel görüntüsü

Yapılan sekans sonucunda toplam 71 örnekten 27 örnekte mutasyon bulunmuştur. Bunların 25'i MDR örneklere ait iken 2 tanesi duyarlı örneklere aittir. 30 PZA dirençli MDR örnekte toplam 22 mutasyon bulunmuştur. 226. Nükleotite Adenin'in Sitozin'e dönüşmesi sonucu 8 örnekte yanlış anlamlı bir nokta mutasyon görülmüştür. 6 örnekte 152. Nükleotitte Adenin Sitozin'e dönüşerek yine bir nokta mutasyon belirlenmiştir. 3 örnekte 464. Nükleotit olan Timin Guanine dönerken

yine 3 örnekte 169. Nükleotitte Sitozin Guanin'e dönüşerek nokta mutasyon oluşturmuştur. En az görülen mutasyonlar ise 1'er örnekle 318. Nükleotitten sonra 1 Sitozin delesyonu ve 29. Nükleotit olan Adenin'in Guanin' e dönüşmesi ile görülen mutasyondur.

PZA duyarlı MDR'larda ise 3 mutasyon vardır. Bu üç mutasyonda çerçeve kayması mutasyonu olarak değerlendirilmiştir. 2 örnekte 349. Nükleotitten sonra bir Timin insersiyonu diğer 1 örnekte ise 212. Nükleotitten sonra Adenin delesyonu görülmüştür.

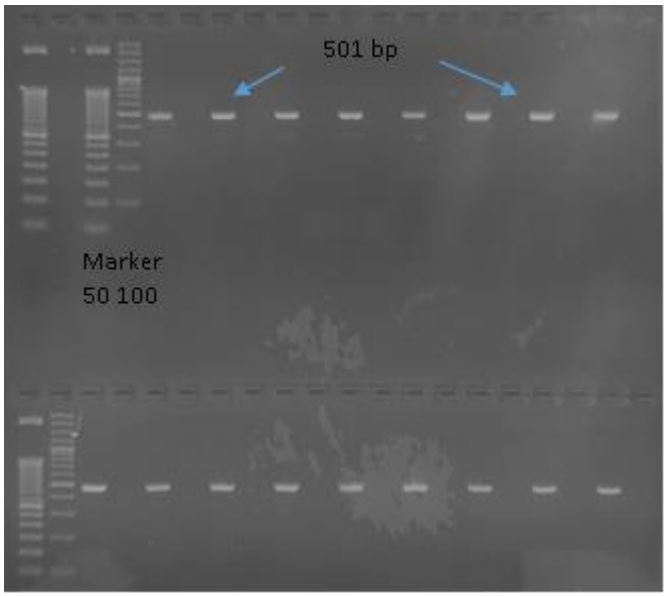
Yapılan İDT sonucu birinci basamak ilaçlara duyarlı 30 örnekte sadece 2 numunede 544. Nükleotitten sonra Timin delesyonu ile aynı mutasyon görülmüştür. Tüm sonuçlar çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. *pncA gen bölgesinde tespit edilen mutasyonlar*

		izolat sayısı	Nükleotid değişimi	Kodon değişimi	Kodon numarası	Aminoasit değişimi	Patern
MDR n=41	Pza dirençli n= 30	8	A-C	ACT-CCT	76	Thr-Pro	A226C
		6	A-C	CAC-CCC	51	His-Pro	A152C
		3	T-G	GTG-GGG	155	Val-Gly	T464G
		3	C-G	CAC-GAC	57	His-Asp	C169G
		1	-C	Delesyon	106	ORF shift	318-C
		1	A-G	CAG-CGG	10	Gln-Arg	A29G
	Pza duyarlı n=11	2	+T	Insersiyon	117	ORF shift	349+T
		1	_A	Delesyon	71	ORF shift	212-A
DUYARLI n=30		2	-T	Delesyon	182	ORF shift	544-T

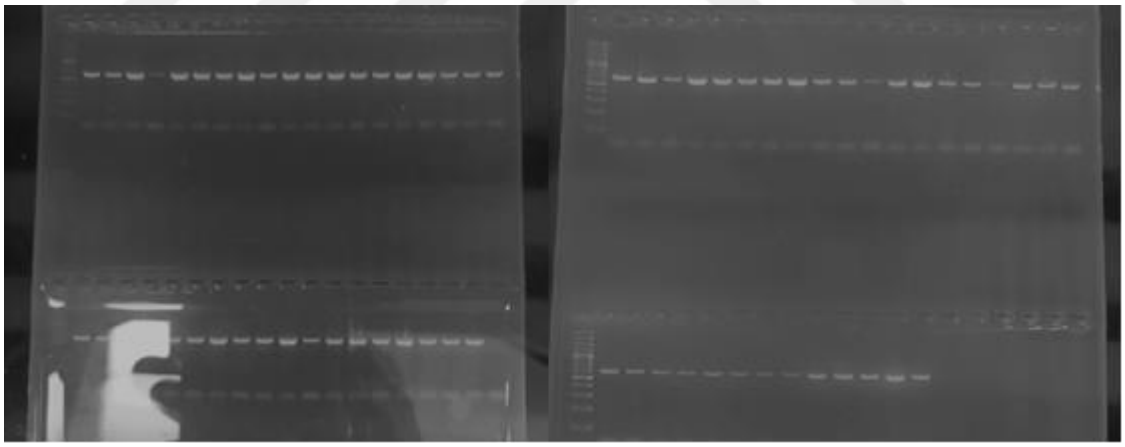
HadC'nin PCR ve sekans analizi

50 ve 100 bp'lik marker kullanılarak yapılan elektroforez işlemi sonrası 501 bp' ye sahip gen bölgesinde görülen bantlar DNA'nın varlığını göstermiştir. Mutasyon olan H37Rv ve H37Ra referans şunları arasındaki 1 tane C nükleotiti farkını düşünerek dizayn edilen F1 (H37Ra'da C nükleotinin olduğu mutasyon olmayan bölgeyi içerir) ve F2 (H37Rv'de mutasyon olan bölgeyi içerir) primerleri ile yapılan PCR işlemi sonucunda mutasyon görülmemiştir. Şekil 4.5'te F1 primeri ile çoğalan örneklerin jel görüntüsü ve F2 primerinin karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4.5. F1 ve F2 primerlerinin jel görüntüsü

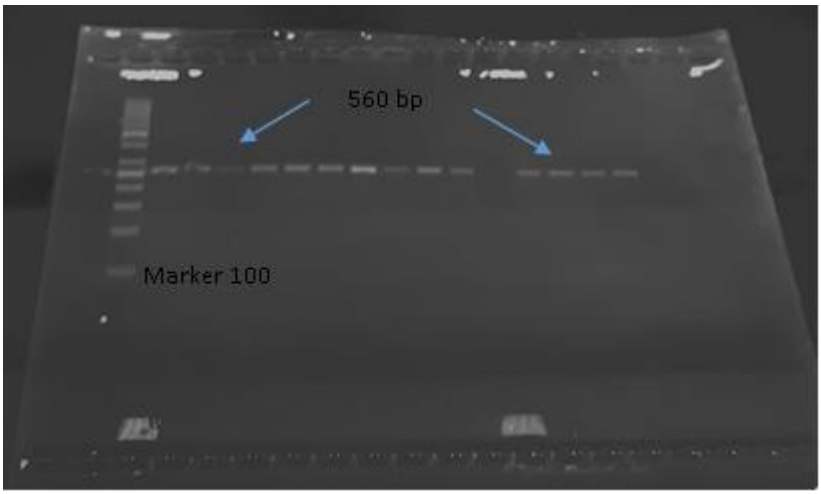
F1'de bant gözüküp F2'de ise bant görülmemesi mutasyon olmadığını belirtir. Bu gendeki mutasyonun varlığı Sanger Sekans dizileme yöntemiyle tekrar test edilmiştir. Sekans analizi için kullanılacak olan F3 primeri ile yapılan PCR ve elektroforez işlemi sonucunda Şekil 4.6'da UV ışık altındaki MDR ve duyarlı örneklerin jel görüntüsü görülmektedir.


Şekil 4.6. MDR ve Duyarlı örneklerin jel görüntüsü

HadC geninin Sekans analizi; şekil 4.6'da görülen bantlara sahip numunelerin alınıp bölüm 3.9.da anlatılan Sanger sekans dizi analizi basamakları gerçekleştirilerek yapılmıştır. Yapılan sekans analizi sonucunda herhangi bir mutasyona rastlanılmamıştır.

Rv0678'in PCR ve sekans analizi

560 bp büyüklüğündeki gen bölgesinin elektroforez sonucu oluşan jel görüntüsü Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Yapılan DNA dizi analizinde herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir.



Şekil 4.7. Rv0678 geninin jel görüntüsü

4.1.4. RealTime qPCR Analizi

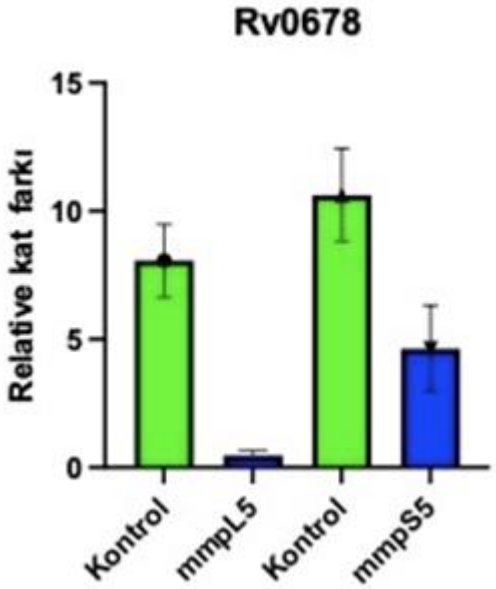
NanoDropTM Spektrofotometre kullanılarak RNA'nın varlığı A260nm/A280nm dalga boyunda ölçülmüştür. Oranı 1.8-2.1 değer aralığında olan örnekler alınarak sonraki aşamalara geçilmiştir. cDNA sentezinden sonra antibiyotik direnci ile ilişkili mutasyonlar ile Efflux pompası genlerinin korelasyonunu araştırmak için Housekeeping geni olan Rv0678 ile Efflux dışa atım pompasından sorumlu mmpL5 ve mmpS5 genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildi.

Ekspresyon seviyeleri kantitatif Real-Time PCR ile yapıldı. Referans olarak housekeeping geni Rv0678 kullanıldı. Çıkan sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplaması referans alınarak ekspresyon düzeyleri arasındaki kat farkı değeri hesaplandı.

Öncelikl kontrol ve çalışılan gen bölgeleri için Ct değerleri hesaplandı. Her örnek için üç tekrar yapılarak ortalama Ct değerleri belirlendi. Çalışılan genin (mmpL5 ve mmpS5) Ct değerinden housekeeping genin Ct değeri çıkartılarak ΔCt değeri bulundu. Daha sonra kontrol grubunun ortalama ΔCt değeri hesaplandı. Ardından her bir örneğin ΔCt‟sinden ortalaması hesaplanan kontrol grubunun ΔCt‟sini çıkartarak ΔΔCt elde edildi. Bulduğumuz ΔΔCt değerini formülde yerine yerleştirerek ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), kontrol ve çalışılan genin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin sonuçlarını elde ettik. Daha sonra ekspresyon düzeyleri arasındaki rölatif kat farkını bulmak için kontrol ve çalışılan gen bölgesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri , kontrol grubuna ait en küçük $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerine bölündü. Hem kontrol grubunda hem de çalışılan gen grubundaki değerlerin ortalaması alınarak kat farkları hesaplandı.

Buna göre Duyarlı (kontrol) ve Dirençli (MDR) gruplar karşılaştırıldığında mmpL5 ve mmpS5 genlerinde Rv0678’in ekspresyon seviyesini kontrol ettiğimizde, mmpS5 geninin kontrol grubundaki 2 numaralı örnek değeri aykırı gözlem olarak değerlendirilmiş ve işleme alınmamıştır. Yapılan çalışma sonucunda ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur. mmpL5 geni için ortalama relative kat farkı 0.47 iken kontrolun ortalaması 8.11 bulunmuş aynı

şekilde mmpS5 geninin ortalaması 4.63 iken kontrol grubunun ortalama değeri 10.15 olarak görülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.8'de grafikle gösterilmiştir.



Şekil 4.8. mmpL5 ve mmpS5 genlerinin kontrole göre relative kat farkı

İstatistik analizi IBM SPSS 20.0 programı kullanılarak yapılmıştır. 30 Duyarlı ve 41 MDR olan suşlardan normal dağılım göstermeyen örnekler çıkarılmış 23 kontrol (Duyarlı) grubuna karşılık 39 gözlem (MDR) grubu dahil edilmiştir. Rv0678 gen bölgesinde ilaç direncinden sorumlu olduğu bilinen efflux pompası ile ilişkili mmpS5 ve mmpL5 genlerinin RT-qPCR yöntemiyle ekspresyon seviyeleri SSPS ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. mmpS5 ve mmpL5 genlerinin ekspresyon seviyelerinin SPSS analizi sonuçları

	Duyarlı		Dirençli		
	M	Iqr	M	Iqr	P
mmpS5	9.01	10.74	1.61	3.04	< 0.001
mmpL5	5.65	7.95	0.05	0.08	< 0.001
M: median , Iqr: Interquartile range					

Yapılan çalışmanın sonucunda değerler median ve Interquartile range olarak özetlendi. Ekspresyon düzeylerinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım olmadığı bulundu. Duyarlı ve Dirençli gruplarda ekspresyon düzeyleri normal

dağılmadıkları için Mann-Whitney testi ile karşılaştırıldı. Analizin istatistik önem düzeyi 0.05 olarak kabul edildi. Çok yüksek düzeyde istatiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü

Çalışılan 39 MDR örneğinin her birinin mmpL5 ve mmpS5 için relative kat farkı çizelge 4.6'da gösterilmektedir. mmpL5 geninde 39 örnekten 35'i 0 ile 1 arasındaki değerlere sahiptir ki bu sayı tüm örneklerin % 89'unu ifade eder. mmpS5 geninde ise bu sayı 15 olurken yüzdesi %38 olarak görülmüştür. mmpS5 geninde mmpL5 genine göre dağılım çeşitlilik göstermektedir. 7 örnek 1-2 kat farkı arasında iken ,5 örneğin relative kat farkı 2 civarında, 3 örneğin 3, 9 örneğin ise 4 kattan fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. MDR-TB klinik izolatlarında Bedakulin direnci ile ilişkili efflux pompası genlerinin ekspresyon seviyeleri

GEN	MDR İzolatlarının Relative kat değişimlerinin sayısı (2-ΔΔCT) n=39				
	0	1	2	3	>4
	Frekans/ %	Frekans/ %	Frekans/ %	Frekans/ %	Frekans/ %
mmpL5	35/89	1/2	1/2	0/0	2/7
mmpS5	15/38	7/19	5/13	3/7	9/23

4.1.5. Bütün örneklerin türü, antibiyotik duyarlılıkları, mutasyon analizi

Çizelge 4.7. Bütün örneklerin türü, antibiyotik duyarlılıkları, mutasyon analizi

Izolat no	**Türü**	**Direnç paterni**	***pncA***	***hadC***	***panD***	***RV0678***
Mdr 1	M.tub	PZA/S/I/R			399+C	
Mdr 2	M.tub	I/R				
Mdr 3	M.tub	PZA/S/I/R/E	A152C		A145G	
Mdr 4	M.tub	PZA/I/R	A29G			
Mdr 5	M.tub	PZA/S/I/R	A226C			
Mdr 6	M.tub	PZA/S/I/R			C66G	
Mdr 7	M.tub	PZA/I/R	A226C			
Mdr 8	M.tub	PZA/I/R	A152C			
Mdr 9	M.tub	I/R	349+T			
Mdr 10	M.tub	S/I/R				
Mdr 11	M.tub	PZA/I/R	A226C			
Mdr 12	M.tub	PZA/I/R	A226C			
Mdr 13	M.tub	I/R	349+T			
Mdr 14	M.tub	PZA/I/R	A152C		A145G	
Mdr 15	M.tub	PZA/I/R	T464G			
Mdr 16	M.tub	I/R				
Mdr 17	M.tub	PZA/I/R			399+C	
Mdr 18	M.tub	I/R				
Mdr 19	M.tub	PZA/I/R	A226C			
Mdr 20	M.tub	PZA/I/R	C169G			
Mdr 21	M.tub	I/R			377-A	
Mdr 22	M.tub	I/R	212-A			
Mdr 23	M.tub	PZA/I/R	T464G			
Mdr 24	M.tub	PZA/I/R/E			361+T	
Mdr 25	M.tub	PZA/I/R				
Mdr 26	M.tub	PZA/I/R				
Mdr 27	M.tub	PZA/I/R	A152C		A145G	
Mdr 28	M.tub	PZA/I/R			399+C	
Mdr 29	M.tub	I/R				
Mdr 30	M.bovis	PZA/I/R	A226C			
Mdr 31	M.tub	I/R				

Çizelge 4.7. Bütün örneklerin türü, antibiyotik duyarlılıkları, mutasyon analizi (devamı)

Mdr 32	M.tub	PZA/S/I/R/E	A152C		399+C	
Mdr 33	M.tub	PZA/S/I/R	C169G			
Mdr 34	M.tub	I/R				
Mdr 35	M.tub	PZA/S/I/R/E	A226C		361+T	
Mdr 36	M.tub	PZA/S/I/R/E			399+C	
Mdr 37	M.tub	PZA/I/R	318-C			
Mdr 38	M.tub	PZA/I/R	A152C		A145G	
Mdr 39	M.tub	PZA/I/R	A226C			
Mdr 40	M.tub	PZA/I/R	C169G			
Mdr 41	M.tub	PZA/I/R	T464G			
Duyarlı 1	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 2	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 3	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 4	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 5	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 6	M.tub	T. Duyarlı			A145G	
Duyarlı 7	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 8	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 9	M.tub	T. Duyarlı	544-T			
Duyarlı 10	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 11	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 12	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 13	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 14	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 15	M.tub	T. Duyarlı			A145G	
Duyarlı 16	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 17	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 18	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 19	M.tub	T. Duyarlı			A145G	
Duyarlı 20	M.tub	T. Duyarlı				

Çizelge 4.7. Bütün örneklerin türü, antibiyotik duyarlılıkları, mutasyon analizi (devamı)

Duyarlı 21	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 22	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 23	M.tub	T. Duyarlı	544-T			
Duyarlı 24	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 25	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 26	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 27	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 28	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 29	M.tub	T. Duyarlı				
Duyarlı 30	M.tub	T. Duyarlı				

Mdr : ÇİD , *M.tub*: *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M.bovis*: *Mycobacterium bovis*, PZA: Pirazinamid, S:Streptomisin, I: Izoniazid, R: Rifampisin, E: Etambutol,
T.Duyarlı: Tamamen duyarlı

4.2. Tartışma

Çoklu ilaca dirençli tüberküloz (Multi Drug Resistant, MDR-TB), ilk basamak anti-TB ilaçların en güçlü iki üyesi olan INH ve RIF antibiyotiklerinin her ikisine birden direnç geliştirmiŞ TB basilleri için kullanılan terimdir. Bu iki ilaçtan sadece birisine direnç geliştirmiş basiller bu grupta yer almazlar. Bir bölgede çoklu ilaç direnci oranı yüksek olduğunda tüberkülozun kontrol altına alınması giderek zorlaşmaktadır.

Porsuk ve Cerit (2021) bir verem savaş dispanserine 2012-1019 yılları arasında gelen numunelerden izole ettikleri *M. tuberculosis* suşlarında ilaç duyarlılık testi çalışmışlardır. 296 numunenin İDT sonucunda vakaların %11.1'inde en az 1 birinci basamak antitüberküloz ilaca direnç olduğunu tespit ederlerken çoklu ilaca direnci (ÇİD) ise %2.4 olarak hesaplamışlardır.

Özen (2020) 'in 2011-1019 arasında Balıkesir şehir hastanesine TB şüphesi ile gönderilen hastaların klinik örneklerinden izole ettiği suşlarla yaptığı benzer bir çalışmada ise izolatların %1 'ini ÇİD-TB olarak belirlemiştir.

Arslan ve ark (2021) Dokuz Eylül Üniversite hastanesinde yapmış oldukları çalışmada ise ÇİD'i % 0.6 olarak bulmuştur.

Dicle ve ark (2023) 2013-2018 yılları arasında doğu anadolu bölgesinde tüberküloz ön tanılı hastalarla yaptıkları 6 yıllık çalışmada 120 MTBK tanısı olan hasta numunelerine uyguladıkları İDT sonucunda %0.8'inin PZA dirençli, sadece %3.3'ünün ise ÇİD'e sahip olduğunu raporlamışlardır.

Öz ve ark (2012) 17 MDR suşta % 42'sinin INH-RIF dirençli , Eker ve Nağıyev (2023) 44 MDR örneğin yapılan ilaç duyarlılık testi sonucu %61'inin INH-RIF-STR dirençli olduğunu belirtirken, Kuo ve ark (2018) 63 MDR örnekte %30 oranında PZA-INH-RIF direnci olduğunu göstermiştir. Belirtilen çalışmalardan da anlaşıldığı üzere çoklu ilaça direnç oranının 0.6 ile 3.3 arasında değiştiği görülürken bizim yaptığımız 985 İDT sonucu 41 örnek ÇİD'e sahipken oranı % 4 olarak bulunmuştur. PZA-INH-RIF direnci ise çalışmamızda 21 örnekle % 51 oranında çıkmıştır. Örnek sayısı, tedavi öncesi ve sonrası ilaç kullanımı gibi değişkenlerin çıkan yüksek oran üzerinde etkili olduğu söylenebilir. Sağlık Bakanlığı'na bağlı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün en son 2021 yılında yayımlanan Türkiye verem savaş raporunda göre Türkiye ÇİD-TB açısından yüksek hastalık yüküne sahip 30 ülke arasında değildir**.** Küresel TB 2020 Raporunda Türkiye'de tahmini RD/ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,4, önceden tedavi görmüş olgularda ise %9,7 olarak verilmiştir. 2021 Raporunda ise bu tahmini değerlere yer verilmemiştir. Çalışmamızda ÇİD % 4 olarak bulunurken bu hastaların yeni olgumu yoksa tedavi görmüş hastalar mı olduğu belirlenememiştir. Covid pandemisi ile beraber ÇİD oranlarında dalgalanmalar yaşandığı düşünülmektedir.

TB hastalığı, hem tarih boyunca hem de günümüzde enfeksiyonlara bağlı hastalıklar içersinde çok önemli bir yere sahiptir (Luo ve ark., 2011). Bakteriyolojik olarak değerlendirildiğinde bazı özellikleri ve DNA'larındaki genlerin bir kısmının çok benzemesinden dolayı birbirine yakın ilişkili türler "kompleks" başlığı altında toplanmaktadır. "M.tuberculosis kompleks" *M.tuberculosis* (insan), *M.bovis* (sığır), *M.microti* (kemirici hayvanlar), *M.africanum* (insan) türlerinden oluşmaktadır (Hlavsa ve ark., 2008).

İnsanlardaki tüberküloz vakalarının yaklaşık % 1-2'sini *M.bovis* oluştururken, gelişmekte olan ülkelerde *M.bovis*'in sebep olduğu tüberkülozun ise yaklaşık % 10-20'sini oluşturur (Mueller ve ark., 2013). *M.bovis*'in yapılan çalışmalar sonucunda ilk bulunan ilaçlardan pirazinamide karşı doğal dirençli olduğu gösterilmiş (Kanene ve ark., 2014).

İnsanlarda yapılan çeşitli çalışmalar göstermiştir ki *M. bovis* zoonotik enfeksiyonunun pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketiminden kaynaklanma olasılığı daha yüksektir ve daha az sıklıkla hayvandan insana veya insandan insana bulaşma da gözlenmiştir (Bobadilla ve ark., 2015; Ortiz ve ark. 2019).

Chan ve ark. (2021) yapmış olduğu çalışmada 202 insan *M.bovis* izolatlarından % 100'ünün PZA'ya dirençli olduğu; 52 (% 25.7)'sinin INH'ye dirençli olduğu; 5 (% 2.5)'inin INH ve STR'ye dirençli olduğu; 3 (% 1.5)'ünün INH ve RIF'e dirençli olduğu ve 1 (% 0.5)'inin ise INH, RIF ve EMB'ye dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Dört *M.bovis* izolatının da ÇİD (INH ve RIF) olduğunu bildirmişlerdir.

Solo ve ark (2021) MDR *Mycobacterium tuberculosis* genotiplerinin karakterizasyonunu yaptıkları çalışmalarında toplam 274 klinik izolatta spoligotiplendirme yöntemiyle izolattların türü ve familyalarını göstermiştir. 124 MDR tuşu vardır. LAM ,CAC, T aileleri sırasıya %54, %16,%14 oranlarında bulunurken Harlem, EIA, Beijing familyalarını düşük oranlarda da olsa göstermişlerdir. Tüm bu MTBK türleri içinde ise sadece 3 tane (%1.1) *M.bovis* izolatı olduğu görülmüştür. Yaptığımız çalışmada ise 71 MTBK içinden sadece 1 örneğin % 1.4 oranında M.bovis olduğu bulunmuştur. PZA duyarlılık testi sonucunda *M.bovis* oranının insanda meydana gelen tüberküloz hastalığındaki yüzdesinin literatürlerde verilen oranlara uygunluğu gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen toplam 71 örnekten % 38 (27)'inde pncA mutasyonu, %22 (16)'sinde panD mutasyonu görülürken 41 MDR örneğin 30 tanesi PZA dirençli iken PZA dirençlilerde pncA mutasyonu % 73 (22), panD mutasyonu % 40 (12) olarak bulunmuştur. 4 (%13) örnekte (MDR 38,14, 27, 3) hem pncA (A152C) hem PanD (A145G) mutasyonu beraber bulunmaktadır. MDR 32 numaralı örnekte ise A152C ve 399+C pncA/panD mutasyonları birlikte görülmüştür. PZA dirençli izolatların % 16'sında (5 örnekte) 2 farklı mutasyon aynı örnekte görülmüştür. Fenotipik olarak PZA dirençli bulunan 30 örneğin 28'inin %93 başarı oranı ile genotipik olarakta dirençli bulunmuştur. Bu nedenle, tam genom dizilimi gibi moleküler bazlı yöntemler, zahmetli ve zaman alıcı olan geleneksel duyarlılık testleriyle karşılaştırıldığında katma değer sunduğundan, PZA'ya dirençli TB'nin saptanması için büyük bir potansiyele sahiptir (Naluyenge ve ark.,2020). Dirençli örneklerde en fazla görülen mutasyonlar pncA'da %36 ile A226C, %27 ile A152C iken panD 'de %41.6 ile 299+C, %33 ile A145G mutasyonlarıdır. pncA geninde görülen diğer mutasyonlar; %13 (3 örnek) ile T464G ve C169G mutasyonları, %4 (1 örnek) ile 318-C ve A29G mutasyonlarıdır. PanD geninde görülen diğer mutasyonlar ise %16 (2 örnek) 361+T ve % 8.4 (1 örnek) C66G'dir. PZA dirençli olup mutasyon görülmeyen 2 örnek dikkat çekmektedir. Vallejos Sanchez ve ark (2020) ; Rehman ve ark (2021) belirttiği gibi pncA ve panD mutasyonları dışında rpsA genine bağlı mutasyonlar ile ilgili de direnç olabileceği düşünüldüğünden bu 2 örnekte çıkan sonuç olağan karşılanmaktadır. PZA direnciyle ilişkisi olduğu düşünülen hadC geni ve BDQ direnci ile ilişkisi olan Rv0678'de herhangi bir mutasyona rastlanılamamıştır.

Çeşitli çalışmalarda ilaca duyarlı ve MDR-TB izolatlarında PZA direncinin yaygınlığı araştırılmıştır. Yakın zamanda yapılan bir meta-analizde, PZA direncinin prevalansı ilaca duyarlı kişilerde %0-9, MDR-TB izolatlarında ise %31-89 arasında bulunmuştur (Chang ve ark 2011).

PZA direncinde dikkat edilmesi gereken en temel direnç mekanizması %70-90 ile pncA geninde oluşan mutasyondan kaynaklanmaktadır (Njire ve ark., 2016).

pncA'daki mutasyonlar PZA'ya karşı direncin birincil mekanizmasıdır (Scorpio ve Zang ,1996). Dirençli suşlarda pncA mutasyon oranı farklı bölgeler arasında farklılık gösterir; örneğin Brezilya'da % 45,7 , İran'da %70,6, Tayvan'da %75,0, İsveç'te % 94'dür (Jie ve ark.,2020). MDR suşlarda PZA direncinin prevelansı Avrupa'da % 69.1 iken Doğu akdenizde % 80'dir

(Whitfield ve ark., 2015).Bu çalışmada PZA'ya dirençli suşların %73'ünde pncA mutasyonu bulunmuştur ki hem Avrupa hem Doğu akdeniz oranları ile uyum göstermektedir.

Lie ve ark (2021) klinik izolatlarda pncA mutasyonlarının karakterizasyonu için yaptıkları araştırmada, 465 izolattan 346 izolatta pncA mutasyonu tanımlarken 254 (%81.9)'ünü MDR suşlarda bulmuştur.

Pang ve ark (2017) Çin'de yaptığı MDR-TB'de pirazinamid direnç mekanizmasının araştırmasına yönelik bir çalışmada 133 MDR tüberküloz izolatlarına fenotipik genotipik deneyler yapmış ve 83 örneğin (%62.4)'ünün MIGIT 960 sisteminde PZA dirençli sonuç verdiğini, ekstra olarak %83.1'inin streptomycin dirençli, %51.8'inin ofloxacin dirençli, %22.9'unun kanamycin dirençli, %18.1'inin amikacin dirençli %12'sinin capromycin dirençli olduğunu, DNA dizi analizi sonucunda mutasyonların %88 oranda pncA geninde mutasyon bulduğunu ifade etmiştir

Jie ve ark (2020) MDR *M.tuberculosis* arasındaki PZA direncine baktıkları Çinde yaptıkları çalışmasında toplam 152 MDR suşundan 102'ini (%67) PZA dirençli bulurken 47 (%31) örneğin ise duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda 41 MDR suşundan 30'u (%73) PZA dirençli, 11'i (%27) PZA duyarlıdır. Çalışmamızla da uygunluk gösteren yakın oranlar bulunduğundan buradan da anlaşılacağı üzere MDR suşlarda yüksek oranda PZA direnci de gözükmektedir. Yine aynı çalışmada dirençli suşun 102'sinin pncA mutasyonu barındırdığı, Bunların 82 (%80) nokta mutasyonu, 20'sinin (%20) ise çerçeve kayması mutasyonun gözlendiği belirtilmiş. Yaptığımız çalışmada ise PZA dirençli 30 örnekten mutasyon görülen 22 örneğin tamamının nokta mutasyonu olduğu görülmüştür. 1 delesyon ve 2 insersiyon içeren çerçeve kayması görülen mutasyonlar sadece PZA duyarlı 3 örnekte % 27 ve tüm birinci basamak ilaçlara duyarlı 2 örnekte ise 2 delesyon %6 oranında bulunmuştur. Jie ve ark 13 suşda da birden fazla mutasyon bulurken çalışmamızda 5 örneğin hem PncA hem de panD mutasyonu birlikte bulunmuştur.

Özgür'ün (2019) pirazinamide dirençli suşlarla yaptığı doktora tezinde 46 izolatın 2 tanesinde (% 4.3) panD mutasyonu belirlemiştir. 66. Nükleotitte C-G değişimi olurken, 145. Nükleotitte ise A-G değişimi olmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada da aynı mutasyonlar görülürken frekansı farklıdır. 16/71 oranında yani tüm örneklerin % 22.5 inde panD mutasyonuna rastlanmıştır. 30 MDR PZA dirençli örnekte ise bu oran 12/30 ile % 40'dır. 145. Nükleotitte %33 oranında mutasyon varken, %8 oranında 66. Nükleotitte mutasyon bulunmuştur. 2 izolatta ise pncA ve panD mutasyonunu belirtmiştir.

Tuerxun (2019) ise birinci basamak ilaçlara tamamen duyarlı 100 örnek ile yaptığı çalışmasında PZA direnç testi sonucu 59'unun PZA dirençli 41'inin ise PZA duyarlı olduğunu belirtirken dirençli izolatlarda panD geninde toplam 9/59 ile %15 oranında mutasyon bulurken PZA duyarlı izolatlarda 5/41 ile % 12 oranında mutasyonu gözlemlemiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak PZA dirençli örneklerde 417.

Nükleotitte Guanin insersiyonu bulmuştur. PZA duyarlı örneklerde ise bizim bulduğumuz mutasyon oranı %9'dur. Çalışmamızda bulunan mutasyona Tuerxun'un çalışmasında da karşılaşılmıştır.

hadC, bakterilerdeki yeni bir yapıya karşılık gelen, hidrataz 2 ailesinden iki heterodimerik dehidratazın (HadAB ve HadBC) alt birimleridir. Bunlar *Mtb* yağ asidi sentaz tip II (FAS-II) sisteminin bir parçasıdır ve (*3R*)-hidroksiasil-ACP dehidrasyonunun aşamasını katalize ederler (Sacco ve ark., 2007).

MTB H37Ra suşunun zayıflamasının muhtemelen birkaç farklı genetik lezyondan kaynaklandığı bulunmuştur. Bunlardan birisi de Rv0637 (hadC) genine *MTB* H37Ra'ya özgü bir C nükleotidi insersiyonudur (Lee ve ark., 2008). H37Rv suşunda ise 86. Nükleotitte bir C delesyonu ile SNP (tek nükleotit poliformizmi) bulunmaktadır.

Yaptığımız çalışmada herhangi bir mutasyon bulunamamıştır. Bunun nedeninin örnek sayısınının az olabileceği düşünülebilir bunun yanında Zhang ve ark (2013) hadC geninin üreyen bakterilerdeki mikolik asit sentezinde görev aldığını belirtip , PZA'nın ise dormant durumda bulunan MTB'ye etkili olduğunu ifade eder. Bunun yanında hadC geni ile ilgili yayımlanan çalışmalar çok sınırlı sayıda olmakla beraber Hameed ve ark (2018) MDR ve XDR izolatlarda ilaç direnç mekanizmaları ile ilişkili moleküler hedefleri belirttikleri makalelerinde hadC'nin direnç ile alakası olabildiği düşünüldüğünden biz de çalışmamıza bu gen bölgesini dahil ettik. Herhangi bir mutasyon bulamadık bunun sebebi belki de Singh ve ark (2022); Grzegorzewicz ve ark (2012)'nın yapmış olduğu çalışmalarda hadc genini sıklıkla ikinci seçenek etkenlerden olan izoksil (ISO) ve tiasetazon (TAC) direnci ile ilişkilendirmeleri olabilir. Biz çalışmamızda ikinci seçenek ilaçlara veya bu etkenlere bakmadığımızdan dolayı bir sonraki aşama bu etkenlere de bakarak direnç olmadığını göstermek olabilir.

Efflux pompası ile ilişkili mmpS5-mmpL5 genlerinin ekspresyon seviyelerini incelediğimiz RT-qPCR analizi sonucu bu genlerin eksprese olmadıkları bulunmuştur. Rv0678 ile yapılan sekans analizinde herhangi bir mutasyona rastlamamamız neden eksprese olmadıklarını açıklamaktadır.

Son yıllarda dünyanın her yerinde BDQ bazlı tedavi rejimlerinin klinik başarısızlığı vakaları belgelenmiştir (Keller ve ark. 2015), vakaların çoğunda bir akış pompası yolunu kodlayan Rv0678 genindeki mutasyonların geniş çaptaki dirençten sorumlu olduğu bulunmuştur (Hartkoorn ve ark. 2014, Somoskovi ve ark. 2015). Andries ve ark (2014) MmpS5-MmpL5 akış pompasını kodlayan genlerin transkripsiyonel bir baskılayıcısı olan Rv0678'deki mutasyonlardan kaynaklandığını göstermiş sonuçta verapamil ve reserpin kullanarak, in vitro olarak BDQ minimum inhibitör konsantrasyonlarını azalttığını belirtmiştir.

Villellas ve ark. Belçika'da, CFZ veya BDQ'ya hiç maruz kalmamış MDR-TB hastalarının yüksek bir yüzdesinin Rv0678 geninde mutasyonlara sahip olduğunu bulmuştur. (Villellas ark. 2017). Bunun aksine, yaptığımız analizde, tamamen ilaca duyarlı (30) ve MDR (41) izolat arasında Rv0678 geninde herhangi bir mutasyon bulamadık. Rv0678 geninde herhangi bir mutasyon bulamayan sonuçlarımız Singh ve arkadaşlarının araştırmasıyla ve Ghajavand ve arkadaşlarının çalışmalarıyla tutarlıdır. (Ghajavand ve ark., 2019; Singh ve ark., 2020). Yang ve ark (2020) Rv0678 genindeki bir mutasyonun bedakulin direncine yol açan ana faktör olduğunu belirtmesine rağmen araştırmamızda böyle bir mutasyona rastlamadık.

Elde edilen sonuçlar diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bulgular arasında bazı farklılıklar olduğu ve bunun deney koşulları arasındaki farklılıklardan, izolatların duyarlılık profillerindeki farklılıklardan, örnek sayılarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Pirazinamid direnci ve Bedakulin direnci arasında bir ilişki olup olmadığı sorgulanmış bu nedenle pncA, panD, hadC ve Rv0678 genlerinin rolü araştırılmıştır. Bu amaçla 30 duyarlı ve 41 MDR izolatı seçilerek bunların ilaç duyarlılıkları, türleri, mutasyonları, ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve şu sonuçlara varılmıştır.

1) 71 MTBK izolatınından sadece 1 (%1.4) tanesi *M. bovis* olarak tanımlanmıştır. PZA'ya karşı doğal direnci bilinen *M.bovis*'in yaptığımız ilaç duyarlılık testinde de PZA'ya dirençli olduğu bulunmuştur.
2) 41 MDR örneğin 31 (%76)'inin izoniazid-rifampisine, 5 (%12)'inin izoniazid-streptomisin-rifampisine, 1 (%2) inin izoniazid, rifampisin-etambutole, 4 (%10)'ünün ise izoniazid-streptomisin-rifampisin-etambutole dirençli olduğu belirlenmiştir. Çoklu ilaca ve yaygın dirençli tüberkülozlu (ÇİD/YİD TB) hastaların, tedavi aldıktan sonra hastalıklarından kurtulma şansı daha düşüktür. Test ettiğimiz antitüberküloz ilaçların birlikte kullanımı hastalığın hem çoklu ilaca hem de yaygın dirençli türlerine sahip hastaların tedavisinde etkilidir. Antimikrobiyal ilaçların kötüye kullanımını durdurma konusunda bir ilerleme kaydetmek isteniyorsa, bunlar üzerinde fenotipik olarak ilaç duyarlılık testleri yapmaya, genotipik olarak analizler yapmaya devam etmeliyiz.
3) Çalışmamızda MDR suşlarda yüksek oranda (%73) PZA direnci bulunmuştur. ÇİD suşlarda PZA direncinin yüksek çıkması beklendiğinden sonuçlar literatür ile uyumludur. PZA 'nın ilaca duyarlı ve ilaca dirençli tüberkülozun özellikle de çoklu ilaca dirençli (ÇİD-MDR) TB'nin tedavisi için gerekli olduğu bilinmektedir (Zhang ve ark 2024). Dolayısıyla ilaca devam edilirken diğer ilaçlarla kombinasyonunda çapraz direnç oluşturup oluşturmadığı belirlenerek kullanılmalıdır.
4) Fenotipik olarak 30 PZA dirençli örnek çalışmamızda kullanılırken bunların %93'ünün (28'inin)genotipik olarak da direnç genlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu da bize zaman yönünden fenotipik testler yapılırken uğrayacağımız kaybı azaltabileceği için genotipik testlerin de tanıda daha fazla kullanılabileceğini göstermiştir.
5) panD mutasyonu 12/ 30 ile % 40 oranında tespit edilmiştir. Böyle bir yüzdenin çıkması panD geni üzerinde daha fazla çalışma yapmaya teşvik etmelidir. Bu sayede yeni mutasyonlarla beraber direnç yüzdesinin artmasındaki nedenler bulunabilinir.
6) pncA mutasyonu 22/30 oranı ile %73 olarak bulunmuştur. Bu yüzde literatürdeki mutasyon frekanslarına uymaktadır. PZA-R, özellikle de pncA bölgesine atıfta bulunulan gen mutasyonu, MDR'yi teşvik edebilir; bu fenomen esas olarak PZA-R'nin INH-R üzerindeki fonksiyonu ile ilişkilidir. MDR-TB tedavisinde PZA-R'nin özellikle

ilişkili üç mutasyonun (pncA bölgesiyle ilişkili mutasyonlar) dikkate alınması ve mekanizmasının araştırılması önemlidir.

7) hadC geninde herhangi bir mutasyon bulunamamıştır. Bu durum tüberküloz referans şunları olan H37Ra ve H37Rv deki 1 adet sitozin nükleotitinin insersiyon ve delesyona sahip olması baz alınarak yapılan PCR yöntemiyle gösterilmiş olup yapılan Sanger sekans dizi analizi ile de mutasyon olmadığı doğrulanmıştır.
8) mmps5-mmpL5 efflux pompa genleri ile yapılan RT-qPCR analizi sonucu eksprese olmadıkları görülürken Rv0678 geninde herhangi bir mutasyon bulunmaması bu sonucu desteklemektedir. BDQ'nun kullanımının çok sınırlı olması direk gelişiminin henüz başlamadığını düşündürmektedir. Dirençle ilişkili genlerin moleküler incelemesi, Türkiye'nin güneyindeki MTB izolatlarında BDQ direncinden atpE genindeki değişikliklerin sorumlu olduğunu ortaya çıkarmıştır. Rv0678 geninde BDQ'ya dirençli izolatlar pozitif olarak test edilmediğinden, mevcut dirençle ilişkili genlerin belirlenmesinin, belirli bakterilerin bu ilaca (atpE, Rv0678) karşı dirençli hale geldiği süreçleri anlamak için yeterli olmadığı açıktır. Sonuç olarak, şu anda BDQ duyarlılığının ölçülmesinde, test edilecek gen bölgelerinin sayısının arttırılması ile yapılacak genotipik testlerle beraber fenotipik olarak ilaç duyarlılık testleri yapılarak direnç bulunabilinir. Akış pompalarının, *M. tuberculosis* kompleks izolatlarında, özellikle BDQ direnciyle ilişkili atpE, Rv0678, mutasyonlarına sahip suşlarda BDQ tarafından elde edilen dirençte önemli bir rol oynadığı gösterilebilir.
9) PZA direnci ile ilgili genlerde mutasyon bulunurken BDQ direncinden sorumlu Rv0678'de herhangi bir mutasyon bulunamaması bu iki ilaç arasında direnç yönünden bir ilişki olmadığını göstermekle beraber yukarıda bahsedilen BDQ direncinden sorumlu olduğu düşünülen atpE geninin çalışılması ile bir ilişki kurulabilir.

Ülkemizde yapılan PZA direncine neden olan mutasyonlar ile ilgili çalışmalar bulunurken BDQ direncine neden olan mutasyonlarla ilgi çalışmalar ilk önce bizim laboratuvarlarımızda başlamıştır. Ekibimizin yaptıkları diğer çalışmalarla beraber PZA-BDQ dirençleri arasındaki ilişki, BDQ direncinden sorumlu olduğu düşünülen Rv0678 geninin efflux dışa atım pompasındaki rolü ilk defa bu tezde çalışılmıştır. Yapılan çalışmanın bundan sonra yapılacak araştırmalara kaynak olacağı düşünülmüştür.

Çalışmamıza sınırlı sayıda örnek dahil edilmiştir dolayısıyla bölgemizde yaygın olan PZA direnç oranlarının belirlenebilmesi ve dirençten sorumlu mutasyonların daha detaylı incelenebilmesi için daha fazla klinik izolatın dahil edildiği çalışmalar yapılması, bu çalışmalara PZA direncinden sorumlu rpsA gibi farklı gen bölgelerinin de eklenmesi ile bu mutasyonların çeşitlerinin gerçekleşme oranları hakkında araştırmalar yapılabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

Andersen, P., Doherty, T. M., Pai, M., Weldingh, K. (2007). The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted?. *Trends in molecular medicine*, *13*(5), 175-182.

Anonim 1: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/dokumanlar-tuberkuloz/raporlar.html [Son erişim tarihi: 25.06.2024].

Andries, K., Villellas, C., Coeck, N., Thys, K., Gevers, T., Vranckx, L., ... & Koul, A. (2014). Acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline. *PLOS one*, *9*(7), e102135.

Alipanah, N., Cattamanchi, A., Menzies, R., Hopewell, P. C., Chaisson, R. E., & Nahid, P. (2016). Treatment of non-cavitary pulmonary tuberculosis with shortened fluoroquinolone-based regimens: a meta-analysis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *20*(11), 1522-1528.

Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., ... & Jarlier, V. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 307(5707), 223-227.

Arslan, N., Özkarataş, M. H., Esen, N., & Özkütük, A. (2021). Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının İlk Sıra Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, *51*(2), 172-179.

Black, A. T., Hamblion, E. L., Buttivant, H., Anderson, S. R., Stone, M., Casali, N., ... & Booth, L. (2018). Tracking and responding to an outbreak of tuberculosis using MIRU-VNTR genotyping and whole genome sequencing as epidemiological tools. *Journal of Public Health*, *40*(2), e66-e73.

Bobadilla-del Valle, M., Torres-González, P., Cervera-Hernández, M. E., Martínez-Gamboa, A., Crabtree-Ramirez, B., Chávez-Mazari, B., Ponce de León, A. (2015). Trends of Mycobacterium bovis isolation and first-line anti-tuberculosis drug susceptibility profile: a fifteen-year laboratory-based surveillance. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(9), e0004124.

Borisov, S. E., K. Dheda, M. Enwerem, R. R. Leyet, L. D'Ambrosio, R. Centis, G. Sotgiu, S. Tiberi, J.-W. Alffenaar and A. Maryandyshev (2017). "Effectiveness and safety of bedaquiline-containing regimens in the treatment of MDR-and XDR-TB: a multicentre study." European Respiratory Journal 49(5).

Brosch, R., Gordon, S. V., Pym, A., Eiglmeier, K., Garnier, T., & Cole, S. T. (2000). Comparative genomics of the mycobacteria. *International journal of medical microbiology*, *290*(2), 143-152.

Bryant, J. M., Schürch, A. C., Van Deutekom, H., Harris, S. R., De Beer, J. L., De Jager, V., ... & Van Soolingen, D. (2013). Inferring patient to patient transmission of Mycobacterium tuberculosis from whole genome sequencing data. *BMC infectious diseases*, *13*, 1-12.

Cao, Y., Parmar, H., Gaur, R. L., Lieu, D., Raghunath, S., Via, N., ... & Chakravorty, S. (2021). Xpert MTB/XDR: a 10-color reflex assay suitable for point-of-care settings to detect isoniazid, fluoroquinolone, and second-line-injectable-drug resistance directly from Mycobacterium tuberculosis-positive sputum. *Journal of clinical microbiology*, *59*(3), 10-1128.

Chan, T. H., Huang, C. S., Tu, C., & Jou, R. (2022). Bovine tuberculosis in Taiwan, 2008–2019. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(4), e814-e822.Che, Y., Bo, D., Lin, X., Chen, T., He, T., & Lin, Y. (2021). Phenotypic and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Ningbo, China. *BMC Infectious Diseases*, *21*(1), 605.

Chang, K. C., Yew, W. W., & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(10), 4499-4505.

Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., ... & Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, *396*(6707), 190-190.

Conde, M. B., Efron, A., Loredo, C., De Souza, G. R. M., Graça, N. P., Cezar, M. C., ... & Chaisson, R. E. (2009). Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial. *The Lancet*, *373*(9670), 1183-1189.

Conradie, F., Diacon, A. H., Ngubane, N., Howell, P., Everitt, D., Crook, A. M., ... & Spigelman, M. (2020). Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, *382*(10), 893-902

Cox, H., Goig, G. A., Salaam-Dreyer, Z., Dippenaar, A., Reuter, A., Mohr-Holland, E., ... & Furin, J. (2022). Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study. *Journal of clinical microbiology*, *60*(3), e02362-21.

Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. Respiratory medicine, 100(11), 1862-1870.

Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases, 5(1).

Deye, G. A., Gettayacamin, M., Hansukjariya, P., Im-erbsin, R., Sattabongkot, J., Rothstein, Y., Ohrt, C. (2012). Use of a rhesus Plasmodium cynomolgi model to screen for anti-hypnozoite activity of pharmaceutical substances. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *86*(6), 931.

Dicle, Y., Aydın, E., & Tuna, D. K. (2023). Doğu Anadolu Bölgesi'nde Tüberküloz Ön Tanılı Hastalara Ait Klinik Örneklerin Altı Yıllık Sonuçları ve Antimikobakteriyel İlaçlara Direnç Oranları. Van Sağlık Bilimleri Dergisi, 16(1), 75-83. https://doi.org/10.52976/vansaglik.1191913

Drouillon, V., Delogu, G., Dettori, G., Lagrange, P. H., Benecchi, M., Houriez, F., Herrmann, J. L. (2009). Multicenter evaluation of a transcription-reverse transcription concerted assay for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, *47*(11), 3461-3465.

Eker E., Nağıyev, T. (2023). Mycobacterium Tuberculosis Kompleks Suşlarında İlaç Direncinin Real-Time PCR İle Hızlı Tespiti İçin Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Kitinin Değerlendirilmesi. *GEVHER NESIBE JOURNAL OF MEDICAL AND HEALTH SCIENCES*, *8*(4), 1148-1162.

Evans, C. A. (2011). GeneXpert—a game-changer for tuberculosis control. *PLoS medicine*, *8*(7), e1001064.

Fox, W., & Mitchison, D. A. (1975). Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, *111*(3), 325-353.

Ghajavand, H., M. Kargarpour Kamakoli, S. Khanipour, S. Pourazar Dizaji, M. Masoumi, F. Rahimi Jamnani, A. Fateh, S. D. Siadat and F. Vaziri (2019). "High prevalence of bedaquiline resistance in treatment-naive tuberculosis patients and verapamil effectiveness." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 63(3): e02530-02518.

Global tuberculosis report 2023.ISBN 978-92-4-008385-1 (electronic version)

Goletti, D., Stefania, C., Butera, O., Amicosante, M., Ernst, M., Sauzullo, I., Girardi, E. (2008). Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-Study. *PloS one*, *3*(10), e3417.

Goyal, M., Saunders, N. A., Van Embden, J. D., Young, D. B., & Shaw, R. J. (1997). Differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Journal of clinical microbiology*, *35*(3), 647-651.

Grzegorzewicz AE, Korduláková J, Jones V, Born SE, Belardinelli JM, Vaquié A, Gundi VA, Madacki J, Slama N, Laval F, Vaubourgeix J, Crew RM, Gicquel B, Daffé M, Morbidoni HR, Brennan PJ, Quémard A, McNeil MR, Jackson M.(2012). A common mechanism of inhibition of the Mycobacterium tuberculosis mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. J Biol Chem. 2012 Nov 9;287(46):38434-41. doi: 10.1074/jbc.M112.400994. Epub 2012 Sep 21. PMID: 23002234; PMCID: PMC3493888

Gutacker, M. M., Smoot, J. C., Migliaccio, C. A. L., Ricklefs, S. M., Hua, S., Cousins, D. V., ... & Musser, J. M. (2002). Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics*, *162*(4), 1533-1543.

Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., ... & Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS pathogens*, *1*(1), e5.

Hameed, H. A., Islam, M. M., Chhotaray, C., Wang, C., Liu, Y., Tan, Y., ... & Zhang, T. (2018). Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-Mycobacterium tuberculosis strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *8*, 114.

Hameed, H. A., Tan, Y., Islam, M. M., Lu, Z., Chhotaray, C., Wang, S., ... & Zhang, T. (2020). Detection of novel gene mutations associated with pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Southern China. Infection and Drug Resistance, 217-227.

Hartkoorn, R. C., S. Uplekar and S. T. Cole (2014). "Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrobial agents and chemotherapy 58(5): 2979-2981.

Hayman, J. (1984). *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time.

Heifets, L., & Lindholm-Levy, P. (1992). Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis*, *145*(5), 1223-5.

Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammmerer JS, Morlock GP, Et Al, (2008). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995- 2005. Clin Infect Dis 47(2):168e75. doi: 10.1086/589240

Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., & Engelhardt, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(10), 3963-3967.

Houben, R. M., & Dodd, P. J. (2016). The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS medicine*, *13*(10), e1002152.

Huda Ali Mohammed Ali Ahmed (2023).Bedaquiline Delamanid, And Linezolid Minimum Inhibitory Concentration Distributions And Resistance-Related Gene Mutations In Multidrug- Resistant Tuberculosis Strains Isolated From South Of Turkey, doktora tezi, Çukurova üniversitesi, adana,207 s.

Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., Jacobs Jr, W. R. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(21), 12420-12425.

Ibrahim, M., Andries, K., Lounis, N., Chauffour, A., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., & Veziris, N. (2007). Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(3), 1011-1015.

Irwin, S. M., Prideaux, B., Lyon, E. R., Zimmerman, M. D., Brooks, E. J., Schrupp, C. A., ... & Lenaerts, A. J. (2016). Bedaquiline and pyrazinamide treatment responses are affected by pulmonary lesion heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis infected C3HeB/FeJ mice. *ACS infectious diseases*, *2*(4), 251-267.

Kaneene JB, Miller R, Steele JH, Thoen CO, (2014). Preventing and controlling zoonotic tuberculosis: a One Health approach. Vet Ital. Jan-Mar;50(1):7-22. doi: 10.12834/VetIt.1302.08.

Keller, P. M., R. Hömke, C. Ritter, G. Valsesia, G. V. Bloemberg and E. C. Böttger (2015). "Determination of MIC distribution and epidemiological cutoff values for bedaquiline and delamanid in Mycobacterium tuberculosis using the MGIT 960 system equipped with TB eXiST." Antimicrobial agents and chemotherapy 59(7): 4352-4355.

Konno, K., Feldmann, F. M., & McDermott, W. (1967). Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *American Review of Respiratory Disease*, *95*(3), 461-469.

Kuo, C. Y., Wang, W. H., Huang, C. H., Chen, Y. H., & Lu, P. L. (2018). Resistance to first-and second-line antituberculosis drugs in Southern Taiwan: Implications for empirical treatment. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *51*(1), 88-93.

Lawn, S. D. (2012). Point-of-care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV-associated tuberculosis: a state of the art review. *BMC infectious diseases*, *12*, 1-12.

Lawn, S. D., Kerkhoff, A. D., Vogt, M., & Wood, R. (2012). Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases*, *12*(3), 201-209.

Lee, J. S., Krause, R., Schreiber, J., Mollenkopf, H. J., Kowall, J., Stein, R., ... & Kaufmann, S. H. (2008). Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of Mycobacterium tuberculosis H37Ra strain. *Cell host & microbe*, *3*(2), 97-103.

Lemos A.C.M, Matos E.D., 2013.Multidrug-resistant tuberculosis. Braz J Infect Dis,; 17 (2): 239-46. 1

Leung, A. S., Tran, V., Wu, Z., Yu, X., Alexander, D. C., Gao, G. F., ... & Liu, J. (2008). Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC genomics*, *9*, 1-12.

Li, K., Yang, Z., Gu, J., Luo, M., Deng, J., & Chen, Y. (2021). Characterization of pncA mutations and prediction of PZA resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from chongqing, China. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 594171.

Luo T, Jıang L, Sun W, Fu G, Meı J,Gao Q, (2011). Multiplex real-time PCR melting curve assay to detect drug-resistant mutations of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol, 49 (9), 3132-3138. doi: 10.1128/JCM.02046-10

Metin Otkun (2001). Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. Klimik Dergisi, Cilt 14, Sayı, 71-82s.

Milano, A., Pasca, M. R., Provvedi, R., Lucarelli, A. P., Manina, G., Ribeiro, A. L. D. J. L., ... & Riccardi, G. (2009). Azole resistance in Mycobacterium tuberculosis is mediated by the MmpS5–MmpL5 efflux system. *Tuberculosis*, *89*(1), 84-90.

Mitchison, D. A. (1985). The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy.

Moliva, J. I., Turner, J., & Torrelles, J. B. (2015). Prospects in *Mycobacterium bovis Bacille Calmette et Guérin* (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis?. *Vaccine*, *33*(39), 5035-5041.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (2006). *Manual of clinical microbiology: Volume 1* (No. Ed. 9). ASM press.

Naluyange, R., Mboowa, G., Komakech, K., Semugenze, D., Kateete, D. P., & Ssengooba, W. (2020). High prevalence of phenotypic pyrazinamide resistance and its association with pncA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Uganda. *PloS one*, *15*(5), e0232543.

Njire, M., Tan, Y., Mugweru, J., Wang, C., Guo, J., Yew, W., ... & Zhang, T. (2016). Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update. Advances in medical sciences, *61*(1), 63-71

Olaru, I. D., von Groote-Bidlingmaier, F., Heyckendorf, J., Yew, W. W., Lange, C., & Chang, K. C. (2015). Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *European Respiratory Journal*, *45*(4), 1119-1131.

Ortiz, O. F. A., Pérez, E. M. S., Flores, M. D. J. F., & Mateos, C. D. I. (2019). Linfadenitis cervical aguda por *Mycobacterium bovis* monorresistente. Reporte de caso. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, *37*(1), 30-33.

Özen, N. (2020). Klinik Örneklerden İzole Edilen Mycobacterium tuberculosis Kültür ve İlaç Duyarlılık Test Sonuçlarının Analizi ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Dağılımının İncelenmesi. *Mikrobiyol Bul*, *54*(4), 559-574.

Öz, Y., Aslan, M., Akşit, F., Durmaz, G., & Kiraz, N. (2012). Mycobacterium tuberculosis kompleks İzolatlarinin Primer Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Değerlendirilmesi. *Ankem Derg*, *26*(1), 20-24.

Özgür, D. (2019). Pirimer anti-tüberküloz ilaçlara dirençli ve duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarında pirazinamid direnci ile İlişkili pncA, rpsA ve panD Gen Mutasyonlarının Araştırılması, doktora tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin,75 s.

Pang, Y., Zhu, D., Zheng, H., Shen, J., Hu, Y., Liu, J., & Zhao, Y. (2017). Prevalence and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Southern China. *BMC Infectious Diseases*, *17*, 1-8.

Porsuk A.Ö, Cerit Ç. Bir Verem Savaş Dispanserine Kayıtlı Hastalardan İzole Edilen Mycobacterium Tuberculosis Suşlarında İlaç Duyarlılık Testleri Sonuçlarının Değerlendirilmesi. OTJHS. December 2021;6(4):508-513. doi:10.26453/otjhs.836584.

Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., & Cole, S. T. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. *Molecular microbiology*, *46*(3), 709-717

Radhakrishnan, A., Kumar, N., Wright, C. C., Chou, T. H., Tringides, M. L., Bolla, J. R., ... & Edward, W. Y. (2014). Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(23), 16526-16540.

Rehman, A. U., Ali, S., Rafiq, H., Rasheed, S., Nouroz, F., & Wadood, A. (2021). Computational Insight into the Binding Mechanism of Pyrazinoic Acid to RpsA Protein. *Current Chinese Science*, *1*(2), 207-215.Romagnoli, A., Etna, M. P., Giacomini, E., Pardini, M., Remoli, M. E., Corazzari, M., ... & Coccia, E. M. (2012). ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *Autophagy*, *8*(9), 1357-1370.

Sacco, E., Covarrubias, A. S., O'Hare, H. M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T. A., ... & Quémard, A. (2007). The missing piece of the type II fatty acid synthase system from Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(37), 14628-14633.

Rubinstein, E., & Keynan, Y. (2013). Quinolones formycobacterial infections. International journal of antimicrobial agents, 42(1), 1-4.

Schnippel, K., N. Ndjeka, G. Maartens, G. Meintjes, I. Master, N. Ismail, J. Hughes, H. Ferreira, X. Padanilam and R. Romero (2018). "Effect of bedaquiline on mortality in South African patients with drug-resistant tuberculosis: a retrospective cohort study." The lancet respiratory medicine 6(9): 699-706.

Scorpio, A., & Zhang, Y. (1996). Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nature medicine, 2(6), 662-667.

Serafini, A., Boldrin, F., Palu, G., & Manganelli, R. (2009). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. *Journal of bacteriology*, *191*(20), 6340-6344.

Sharma, A., Vashistt, J., & Shrivastava, R. (2022). Knockdown of the Type-II Fatty acid synthase gene hadC in *Mycobacterium fortuitum* does not affect its growth, biofilm formation, and survival under stress. *The International Journal of Mycobacteriology*, *11*(2), 159-166.

Shi, J., Su, R., Zheng, D., Zhu, Y., Ma, X., Wang, S., ... & Sun, D. (2020). Pyrazinamide resistance and mutation patterns among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Henan Province. *Infection and drug resistance*, 2929-2941.

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry 3rd, C. E., ... & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. Science, 333(6049), 1630-1632.

Singh, B. K., M. Soneja, R. Sharma, J. Chaubey, P. Kodan, P. Jorwal, N. Nischal, S. Chandra, R. Ramachandran and N. Wig (2020). "Mutation in atpE and Rv0678 genes associated with bedaquline resistance among drug-resistant tuberculosis patients: A pilot study from a high-burden setting in Northern India." International Journal of Mycobacteriology 9(2): 212.

Singh V, Grzegorzewicz AE, Fienberg S, Müller R, Khonde LP, Sanz O, Alfonso S, Urones B, Drewes G, Bantscheff M, Ghidelli-Disse S, Ioerger TR, Angala B, Liu J, Lee RE, Sacchettini JC, Krieger IV, Jackson M, Chibale K, Ghorpade SR. (2022). 1,3-Diarylpyrazolyl-acylsulfonamides Target HadAB/BC Complex in *Mycobacterium tuberculosis*. ACS Infect Dis. 2022 Nov 11;8(11):2315-2326. doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00392. Epub 2022 Nov 3. PMID: 36325756; PMCID: PMC9673142.

Slama, N., Jamet, S., Frigui, W., Pawlik, A., Bottai, D., Laval, F., ... & Quémard, A. (2016). The changes in mycolic acid structures caused by hadC mutation have a dramatic effect on the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular microbiology*, *99*(4), 794-807.

Solo, E. S., Suzuki, Y., Kaile, T., Bwalya, P., Lungu, P., Chizimu, J. Y., ... & Nakajima, C. (2021). Characterization of Mycobacterium tuberculosis genotypes and their correlation to multidrug resistance in Lusaka, Zambia. International Journal of Infectious Diseases, 102, 489-496.

Somoskovi, A., V. Bruderer, R. Hömke, G. V. Bloemberg and E. C. Böttger (2015). "A mutation associated with clofazimine and bedaquiline cross- resistance in MDR-TB following bedaquiline treatment." European Respiratory Journal 45(2): 554-557.

Sreevatsan, S., Pan, X. I., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., & Musser, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(18), 9869-9874.

Tasneen, R., Li, S. Y., Peloquin, C. A., Taylor, D., Williams, K. N., Andries, K., ... & Nuermberger, E. L. (2011). Sterilizing activity of novel TMC207-and PA-824-containing regimens in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(12), 5485-5492.

Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. (20119 Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. PLoS One.;6(4):e17601. (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017601).

Tuerxun, A. (2019). Çukurova bölgesindeki Pulmoner tüberkülozlu hastaların balgam örneklerinden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında pirazinamid direncinin moleküler mekanizmalarının araştırılması, yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana,56 s.

Van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., ... & Peters, P. J. (2007). M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, *129*(7), 1287-1298.

Vallejos-Sánchez, K., Lopez, J. M., Antiparra, R., Toscano, E., Saavedra, H., Kirwan, D. E., ... & Zimic, M. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* ribosomal protein S1 (RpsA) and variants with truncated C-terminal end show absence of interaction with pyrazinoic acid. *Scientific reports*, *10*(1), 8356.Veziris, N., Ibrahim, M., Lounis, N., Andries, K., & Jarlier, V. (2011). Sterilizing activity of second-line regimens containing TMC207 in a murine model of tuberculosis. *PLoS One*, *6*(3), e17556.

Vilchèze, C., & Jacobs, Jr, W. R. (2007). The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu. Rev. Microbiol.*, *61*, 35-50.

Villellas, C., N. Coeck, C. J. Meehan, N. Lounis, B. de Jong, L. Rigouts and K. Andries (2017). "Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72(3): 684-690.

Whitfield, M. G., Soeters, H. M., Warren, R. M., York, T., Sampson, S. L., Streicher, E. M., ... & Van Rie, A. (2015). A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. *PloS one*, *10*(7), e0133869.

Yang, J., Y. Pang, T. Zhang, X. Xian, Y. Li, R. Wang, P. Wang, M. Zhang and J. Wang (2020). "Molecular characteristics and in vitro susceptibility to bedaquiline of *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Shaanxi, China." International Journal of Infectious Diseases 99: 163-170.

Yu Pang, D. Z., Huiwen Zheng, Jing Shen, Yan Hu, Jie Liu, Yanlin Zhao. (2017). Prevalence and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Southern China. BMC Infectious Diseases(17:711).

Zhang, Y., & Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The international journal of tuberculosis and lung disease*, *7*(1), 6-21.

Zhang, Y., Li, Y., Liu, Y., Kong, X., Li, H., Wang, T., Tao, N. (2024). The influence of pyrazinamide resistant associated gene mutations on multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China.

Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., & Mitchison, D. (2014). Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiology spectrum*, *2*(4), 10-1128.

Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H., & Sun, Z. (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of antimicrobial chemotherapy, 52(5), 790-795

Zimhony, O., Vilcheze, C., Arai, M., Welch, J. T., & Jacobs Jr, W. R. (2007). Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(2), 752-754.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., & Daffé, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. Journal of bacteriology, 190(16), 5672-5680.

ÖZGEÇMİŞ

Hamdi GÖKAHMETOĞLU, İlkokul, ortaokul ve liseyi Alanya'da tamamladı. 2012 yılında Antalya Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji lisans bölümünden mezun oldu. Yüksek lisans derecesini, 2018 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesinin Biyomühendislik Anabilim dalından aldı. 2020 yılında Çukurova üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim dalında doktora eğitimine başladı.