



Primer Antitüberküloz İlaçlara Dirençli *Mycobacterium Tuberculosis* Kompleks İzolatlarında Dirençle İlişkili Yaygın Mutasyonların Araştırılması

İbrahim Halil Şahin¹, Nezahat Akpolat², Gülfer Yakıcı³, Nida Özcan²

1 Bitlis Eren Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Anabilim Dalı, Bitlis, Türkiye

2 Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

3 Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Türkiye

Geliş: 25.07.2024 Revizyon: 16.09.2024 Kabul Tarihi: 18.09.2024

Öz

Amaç: Dünya çapında ciddi bir halk sağlığı sorununa dönüşen çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) etkenlerinin hızlı bir şekilde teşhisi ve direnç profilinin belirlenmesi, tüberküloz için doğru tedavi protokollerin oluşturulmasında ve kontrolünde kritik bir öneme sahiptir. Yapılan bu çalışma ile tüberküloz ön tanılı hastaların klinik materyallerinden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarının MGIT 960 SIRE sistemi ile fenotipik olarak primer anti-tüberküloz ilaçlara direnç profillerinin ve GenoType MTBDR plus testi ile bu direnç gelişimi ile ilişkilendirilen *rpoB*, *KatG*, *rrs*, *InhA*, *embB* gibi genlerdeki yaygın mutasyonların saptanması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmaya Ocak 2014-Ağustos 2019 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji biriminde, klinik materyallerden izole edilen, immünokromotografik bir antijen (Ag) testi olan MPT64 (BD, Polonya) ile MTBK izolatları olduğu tespit edilen ve BACTEC MGIT 960 sistemi ile primer anti-tüberküloz ilaçlara dirençli olduğu saptanan klinik izolatlar dahil edildi. Toplam 69 izolattan 32'si (%46,4) çok ilaca dirençli (ÇİD), 34'ü (%49,3) izoniazid (INH) ile birlikte primer seçenek anti-tüberküloz ajanlardan bir veya birkaçına, üçü (%4,3) ise rifampine (RIF) dirençli olduğu saptanan izolatlar GenoType MTBDR plus yöntemi ile dirençle ilişkili genlerdeki yaygın mutasyonlar tespit edildi.

Bulgular: Rifampin dirençli izolatların 19'ünde (%57,6) *rpoB* geninin 531. kodonundaki TCG/TTG mutasyonu, izoniazid dirençli izolatların 14'ünde (%46,7) *katG315* gen bölgesindeki AGC/ACC mutasyonu, 8'inde (%26,7) ise *inhA* gen bölgesinin -15 pozisyonunda C/T mutasyonları dirence yol açan yaygın mutasyonlardı.

Sonuç: Primer anti-tüberküloz ilaçlara dirençle ilgili mutasyonların belirlenmesinde kullanılan genotipik test (GenoType MTBDR plus) sonucunda, rifampisin direnci ile ilgili mutasyonların en çok *rpoB* geninin 531. kodonunda TCG/TTG mutasyonunun, izoniazid'e direncin ise *katG* geninin 315. kodonunda AGC/ACC (Ser315Thr) mutasyonunun ve *inhA* gen bölgesinin -15 pozisyonundaki C/T mutasyonlarının dirence yol açan sık mutasyonlar olduğu saptanmış olup bu konuda daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, GenoType MTBDR plus, ilaç direnci, *rpoB*, *KatG*

DOI: 10.5798/dicletip.1552636

Yazışma Adresi / Correspondence: İbrahim Halil Şahin, Bitlis Eren Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Anabilim Dalı, Bitlis, Türkiye, e_mail: ihsahin@beu.edu.tr

Investigation of Resistance-Related Common Mutations in *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Isolates Resistant to First-Line Anti-Tuberculosis Drugs

Abstract

Objective: Rapid identifying and assessing the resistance patterns of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) agents, which has become a significant global public health issue, is critical for establishing and controlling the correct treatment protocols for TB. This study aims to assess the phenotypic resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains isolated from clinical materials of patients with a preliminary diagnosis of tuberculosis to primary anti-tuberculosis drugs by the automated MGIT 960 SIRE system (BD Phoenix, USA) and to detect prevalent mutations in genes like *rpoB*, *KatG*, *rrs*, *InhA*, and *embB* linked to the development of this resistance, using the GenoType MTBDR plus test.

Methods: MTBC isolates obtained from clinical samples at the mycobacteriology laboratory of Dicle University Hospital from January 2014 to August 2019 were included. The isolates were identified as MTBC isolates by an immunochromatographic antigen (Ag) test-MPT64 (BD, Poland) and found to be resistant to primary anti-tuberculosis drugs by the automated BACTEC MGIT 960 system. Among 69 isolates, 32 (46.4%) were multidrug resistant (MDR), 34 (49.3%) were resistant to isoniazid (INH) and one or more of the primary anti-tuberculosis drugs, and three (4.3%) were resistant to rifampin (RIF).

Results: TCG/TTG mutation at codon 531 of *rpoB* gene was the common mutation responsible for resistance in 19 (57.6%) RIF resistant isolates, AGC/ACC mutation in *katG*315 gene region in 14 (46.7%) INH resistant isolates and C/T mutations at position -15 of *inhA* gene region in 8 (26.7%) INH resistant isolates.

Conclusion: The genotypic test (GenoType MTBDR plus) used to identify mutations associated with resistance to primary anti-tuberculosis drugs revealed that the most common mutations linked to rifampicin resistance were the TCG/TTG mutation located at codon 531 of the *rpoB* gene, the AGC/ACC (Ser315Thr) mutation located at codon 315 of the *katG* gene, and C/T mutations at position -15 in the *inhA* gene region. The AGC/ACC (Ser315Thr) mutation at codon 315 of the *katG* gene and C/T mutations at position -15 of the *inhA* gene region were identified as the most common contributors to resistance, aligning with results from earlier studies on the subject.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, GenoType MTBDR plus, drug resistance, *rpoB*, *KatG*.

GİRİŞ

İnsanlık tarihi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan tüberküloz (TB), tarih boyunca yol açtığı salgınlarla insanlık tarihine çarpıcı bir biçimde damgasını vurduğu gibi günümüzde de en ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Dünya nüfusunun dörtte birinin *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) üyeleri ile enfekte olduğu ve bu kişilerin aktif tüberküloz gelişimi için on yıllarca sürecek büyük bir kaynak oluşturduğu tahmin edilmektedir^{1,2}. Yaş ve cinsiyetten bağımsız olarak toplumdaki tüm bireyleri etkileyebilme potansiyeline sahip olan TB, tek bir bulaşıcı ajandan kaynaklanan küresel ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir².

Bir yoksulluk hastalığı prototipi olan TB'nin gelişimi ve yayılması için bilinen sosyo-ekonomik ve çevresel risk faktörlerine ek olarak, Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) ve özellikle 1940'lı yıllarda başlayan

kemoterapide kullanılan anti-tüberküloz ilaçlara karşı, MTBK suşlarında intrinsik biyolojik faktörlere bağlı olarak var olan ilaç direncine ek olarak kazanılmış direnç de ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu predispozan faktörler, tüberküloza karşı verilen mücadelenin başarıya ulaşmasını zorlaştırdığı gibi, günümüzde çoklu ilaç direncinin de ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır. Özellikle TB tedavisinde kullanılan birinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlardan rifampisin ve isoniazide karşı çoklu ilaç dirençli (Multi drug resistance tuberculosis=MDR-TB, ÇİD-TB) ve yaygın ilaç dirençli (Extensively drug resistance Tuberculosis=XDR-TB, YİD-TB) olarak adlandırılan, rifampisin artı herhangi bir florokinolon artı bedakuilin ve linezolid ilaçlarından en az birine dirençli TB'nin ortaya çıkması, post antibiyotik çağı başlatmış ve tedavi edilebilir ve önlenebilir bir enfeksiyonu

yetersiz ve eksik tedavi uygulamalar sonucunda yaşamı tehdit eden hastalığa dönüştürmüş durumdadır^{1,2}.

Küresel olarak, son on yıldır tespit edilmiş olan yeni TB vakalarının içerisindeki ÇİD-TB veya rifampisine dirençli (RD) TB vakalarının oranı %2,6–4 daha önce tedavi edilmiş kişiler arasında %11–23 düzeyinde olduğu rapor edilmiştir². Son küresel tahminler, 2022’de yaklaşık 370-450 bin yeni ÇİD veya RD-TB vakasının tespit edilebildiğini ve bunların küresel düzeyde yıllık anti-tüberküloz ilaca dirençli vakaların ancak %40’nı oluşturduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde ÇİD-TB hastaları için uygulanan tedavi rejimleri, ilaca duyarlı TB vakalarındaki tedavi rejimleriyle karşılaştırıldığında daha uzun süreli tedavi süreci gerektirmesi, daha yüksek toksisite profiline sahip ikinci seçenek ilaçların kullanımı ve bunun sonucunda hastalar üzerinde ciddi yan etkilere sahip olmaları, bedaquilin ve linezolid gibi yeni anti-tüberküloz ilaçlar geliştirilmiş olursa da, uygulanan mevcut tedavi rejimlerinin tatmin edici olmaktan uzak olduğunu göstermektedir².

Muhtemelen küresel sağlığın karşı karşıya olduğu en derin zorluklardan biri olan TB kontrolü ve eliminasyonundaki en büyük engelin ÇİD-TB olguların ortaya çıkması ve yayılması olduğu göz önüne alındığında, klinik materyallerden izole edilen TB etkenlerinin primer anti-tüberküloz ilaçlara direnç profillerinin belirlenmesi ve bu ilaçlara direnç gelişimi ile ilişkilendirilen *rpoB*, *KatG*, *rrs*, *InhA*, *embB* gibi genlerdeki baskın mutasyonların izlenmesi ilaca dirençli tüberküloza yanıt vermek ve terapötik rejimlerin tasarlanması için hayati bir öneme sahip olacaktır.

Yapılan bu kesitsel çalışma ile bölgemizde TB ön tanılı hastaların klinik örneklerinden izole edilen MTBK izolatlarından TB salgınları yönünden risk oluşturabilme potansiyeline sahip ÇİD-TB suşlarının, primer anti-tüberküloz ajanlara karşı direnç profillerini ve direnç

ilişkilendirilen yaygın mutasyonlar araştırılmış ve elde edilen sonuçlar ile bölgemiz için prediktif veri oluşturulmuştur.

YÖNTEMLER

Örneklerin Toplanması

Diyarbakır ve çevre illerde bulunan farklı hastane ve verem savaş dispanserlerinden Ocak 2014-Ağustos 2019 tarihleri arasında akciğer tüberkülozu ve/veya şüpheli temas öyküsü ile Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji birimine farklı klinik ve polikliniklerden gönderilen hastalara ait balgam, bronkoalveoler lavaj (BAL), apse, açlık mide sıvısı (AMS), BOS, doku ve eklem sıvısının bulunduğu klinik materyallerden sıvı bazlı (BACTEC MGIT960) ve katı bazlı (LöwensteinJensen-LJ) besiyerlerinden izole edilen ve MPT64 (BD, Polonya)antijen testi ile MTBK olarak tanımlanan 69 izolat çalışmaya dâhil edildi.

Fenotipik Direnç Analizi

Kültür ortamında üreyen ve MBTK üyesi olduğu saptanan izolatların Streptomisin (SM), İzoniazid (INH), Rifampin (RIF), Etambutol (ETB) gibi primer anti-tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 SIRE (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. Kısaca; SM (1 µg/mL), INH (0.1 µg/mL), RIF (1 µg/mL) ve ETB (5 µg/mL) için son konsantrasyonları ayarlanmış Middlebrook 7H9 Broth besiyeri içeren ve polimiksin B, nalidiksik asit, azlosilin ve trimetoprim antibiyotikleri ile amfoterisin B antifungalı içeren PANTA solüsyonu eklenmiş Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) tüplerine 250 µL bakteri süspansiyonu eklenerek BACTEC cihazında inkübasyona bırakıldı. İlaçlı tüplerdeki floresan konsantrasyonu, cihazdaki ilaç içermeyen kontrol tüplerindeki ile karşılaştırılarak sonuçlar dirençli veya duyarlı olarak sınıflandırıldı.

GenoType MTBDR plus Genotipik Direnç Analizi için Deoksiribonükleik Asit (DNA) İzolasyonu

Fenotipik ilaç duyarlılıkları MGIT 960 SIRE yöntemiyle ile RIF ve/veya INH direnci tespit edilen izolatlar, GenoType MTBDR plus (LPA; Hain Life Sciences, Almanya) DNA LineProbe tekniği ile genotipik direnç analizi yapılarak, dirençten sorumlu mutasyonların varlığı ve mevcut mutasyonların sıklığını belirlemek amacı ile DNA izolasyonu üretici firma talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

GenoType MTBDR plus Genotipik Direnç Analizi

Üretici firmanın (LPA; Hain Life Sciences, Almanya) talimatları doğrultusunda DNA izolasyonunu takiben PCR işlemi için, kit içeriğinde bulunan biotin ile işaretli primerleri içeren AM-A ve AM-B amplifikasyon karışımlarından sırası ile 10µl ve 35µl olacak şekilde toplam çalışılacak örnek sayısına göre hazırlandı ve tüplere dağıtıldı. Toplam hacim 50µl olacak şekilde karışımlara 5µl DNA eklendi ve Thermal Cycler'da üretici firmanın önerileri doğrultusunda belirtilen amplifikasyon aşamalarını kullanarak reaksiyon gerçekleştirildi. PCR işlemi sonrasında ampliconların striplere hibridizasyonunu manuel olarak üretici firma talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, Hain Lifescience GenoType MTBDR plus direnç analizi ve mutasyon araştırma cetveli ile karşılaştırarak yorumlandı.

BULGULAR

Merkez Laboratuvarı Mikobakteriyoloji birimine gönderilen hastalara ait klinik materyallerden izole edilen primer anti-tüberküloz ilaçlara dirençliliğini fenotipik olarak sıvı bazlı MGIT960 SIRE (Becton Dickinson, ABD) yöntemi ile belirlenen, 32 (%46,4) suş ÇİD-TB iken geri kalan suşlardan üçü (%4,3) mono-RIF, 16 (%23,2)'sı da INH ile birlikte primer seçenek anti-

tüberküloz ajanlardan bir veya bir kaçına dirençli toplam 69 MTBK izolatın 65'inde (%94,2) GenoType MTBDR plus testi ile dirençle ilişkili yaygın mutasyonlar saptandı. 2 ÇİD ve 2 INH dirençli toplam 4 izolat yetersiz DNA konsantrasyonu ve/veya kontamine DNA varlığından kaynaklanan sebeplerden dolayı çalışma dışı bırakıldı.

Fenotipik tanımlamadan sonra moleküler çalışmalara uygun kalitede DNA ekstrakte edilerek çalışmaya dahil edilen izolatların, MGIT960 fenotipik duyarlılık testi sonucunda; STR ve INH dirençli 18 (%27,7), mono-INH dirençli 14 (%21,5) olmak üzere toplam 32 (%49,2) izolatın INH dirençli (INH-R), MDR direnç patern tanımına göre değerlendirdiğimizde bütün anti-tüberküloz ilaçlara dirençli 21 (%32,3), INH ve RIF dirençli 4 (%6,2), STR, INH ve RIF dirençli 3 (%4,6) ve INH, RIF ve EMB dirençli 2 (%3,1) olmak üzere toplam 30 (%46,2) izolatımızın MDR direnç paterni ile uyumlu olduğunu, mono-RIF direncinin (monoRIF-R) 3 (%4,6) hasta izolatında görüldüğü tespit edildi (Tablo I).

Tablo I: Dirençli izolatlar için moleküler direnç mekanizmaları ve dağılımları

Direnç Profili	Örnek Sayısı	
	n	%
ÇİD	32	46,2
monoRIF-R	3	4,6
monoINH-R	16	21,5
RIF-R +diğer	0	0
INH-R +diğer	18	27,7
Toplam	69	100

ÇİD: Çoklu ilaç direnci, monoRIF-R: Tek başına rifampin direnci, monoINH-R: Tek başına izoniazid direnci, RIF-R: Rifampin direnci, INH-R: Isoniazid direnci

Fenotipik yöntemler ile 30 ÇİD ve 3 monoRIF dirençli toplam 33 izolatın RIF ve INH direnç mekanizması, hibridizasyon temelli bir moleküler test olan Hain Lifescience GenoType MTBDR plus yöntemi ile değerlendirildi. Fenotipik ve genotipik direnç profili sonuçları karşılaştırıldığında; analiz edilen izolatların

rifampisin ve isoniyazid için sırası ile 31/33 (%93,4) ve 26/30 (%86,6) olarak tespit edildi. Dirençli suşlardan 19 (%57,6) izolatta RIF direncinden *rpoB* genin 531. gen bölgesinde TCG/TTG (Ser531Leu) mutasyonunun, INH direncinde ise 14 (%46,7) izolatta katG315 gen

bölgesindeki AGC/ACC (Ser315Thr) mutasyonunun, 8 (%26,7) izolatta da *inhA* gen bölgesinin -15 pozisyonunda C/T (C15T) mutasyonları dirence neden olan yaygın mutasyonlar olarak saptandı (Tablo II).

Tablo II: Dirençli MTBK izolatlarının moleküler direnç mekanizmaları ve dağılımları

Gen	Kodon	NükleotidDeğişimi	Amino AsitDeğişimi	İzolatsayısı	
				n	%
<i>rpoB</i>	516	GAC/GTC	Asp 516 Val	3	%9,1
	526	CAC/GAC	His 526 Asp	5	%15,2
	526	CAC/TAC	His 526 Tyr	1	%3
	531	TCG/TTG	Ser 531 Leu	19	%57,6
	Diğer			5	%15,2
<i>katG</i>	315	AGC/ACC	Ser 315 Thr	14	%46,7
	315	AGC/AAC	Ser 315 Asn	4	%13,3
	Diğer			3	%10
<i>inhA</i>	-15	C/T	C15T	8	%26,7
	- 8	T/A	T8A	2	%6,7
	Diğer			1	%3,3

TARTIŞMA

Bir yoksulluk hastalığı prototipi olan TB, tedavi edilebilir ve önlenabilir bir enfeksiyon hastalığı olmasına rağmen, her yıl 10 milyondan fazla yeni vaka sayısı ile günümüzde önemli bir küresel sağlık sorunu ve insanlığı etkileyen önemli salgın etkenlerindedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), TB'yi 2022 yılında tek bir enfeksiyöz etkene bağlı ölümlerde Koronavirüs enfeksiyonundan (COVID-19) sonra ikinci sırada (1.3 milyon) göstermiştir².

TB'nin etkin tedavisi ve kontrolü, enfeksiyonun tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlardan INH ve RIF dirençli olarak tanımlanan ÇİD-TB suşlarının ortaya çıkmasıyla, ülkemizde olduğu gibi dünyanın birçok ülkesinde büyük bir engel teşkil etmektedir. MTBK suşlarında intrinsik biyolojik faktörlere bağlı olarak var olan ilaç direncine ek olarak kazanılmış direnç de ortaya çıkmaya başlamıştır. Kazanılmış direncin moleküler temellerini MTBK izolatlarının kromozomal genlerindeki mutasyonların neden olduğu hedef moleküllerin değiştirilmesi nedeniyle meydana

geldiğinden ilişkili genlerdeki mutasyonların araştırılması, TB tedavi protokollerin oluşturulmasında ve TB ile etkin mücadelede önem arz etmektedir³.

TB tedavisinde önemli bir bileşen olan ve ÇİD-TB için bir gösterge olarak kabul edilen RIF direncinin moleküler temeli RIF dirençli MTBK izolatlarının yaklaşık %96'sında, RNA polimeraz enziminin beta alt birimini kodlayan *rpoB* geninde 81 baz çifti içeren 507-533 kodonlarında mutasyonlar saptanmasıdır. Bu bölge aynı zamanda rifampisin direncini belirleyen bölge "rifampin resistance determining region (RRDR)" ve ya "hot spot" bölge olarak da bilinir⁴. Yapılan çalışmaların çoğunda *rpoB* genindeki 516. , 526. ve 531. kodonlarındaki mutasyonların rifampisin direnci ile ilişkili en yaygın mutasyonlar olduğu bildirilmiştir⁵. RIF direncinin aksine INH direnci, *inhA* genin aktif bölgesi, *inhA* promotor bölgesi ve *katG* içindeki mutasyonların dâhil olduğu karmaşık bir genetik kombinasyon sonucu ortaya çıkar⁶. Yapılan çalışmalar INH dirençli TB suşlarının %50-95 *katG* geninin 315.

kodonunda ve/veya *inhA* geninin promotor bölgesinin -15. Pozisyonundaki mutasyonların dirençle ilişkilendirilen sık mutasyonlar olduğu gösterilmiştir⁷.

Günümüzde mikobakterilerde ilaç direncinin saptanmasında kullanılan çok sayıda ticari ve laboratuvar tasarımı moleküler metot geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden LineProbAssay (LPA), GeneXpert MTB/RIF assay (Cepheid, ABD) ve GenoType MTBDR plus (Hain Lifesciences, Almanya) DSÖ tarafından mikobakterilerde ilaç duyarlılıkların belirlenmesi için kullanım onayı almışlardır⁸.

Primer anti-tüberküloz ilaç direnciyle ilişkilendirilen RIF ve INH mutasyonlarını tespitinde, sekanslamayla yüksek oranda korelasyon gösteren GenoType MTBDR plus kitinin kullanıldığı bu çalışmada, MGIT960 fenotipik duyarlılık testleriyle RIF dirençli suşların 31/33(%93,4)'ünde *rpoB* genin RRDR bölgesinde dirençle ilişkilendirilen mutasyonlar saptanmış olup, bu oran Tayland (%96,1)⁹, Hindistan (%96,7)¹⁰, Güney Çin (%95,0)¹¹ de yapılan çalışmalardan daha düşük, Güney Afrika(88,6%)¹², Filipinler (%69,7)¹³, Vietnam (%74,3)¹⁴, Güney Kore (%78,0)¹⁵ ve Bangladeş (%92,7)¹⁶ gibi ülkelerde yapılan çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmada, dirençli suşlardan 19'unda (%57,6) rifampisin direnci ile ilişkilendirilen *rpoB* genin RRDR bölgesinin 531. kodonunda saptanmış olup Bangladeş(57,4%)¹⁶, Rusya (52,4)¹⁷, Vietnam (39,2%)¹⁴, dan daha yüksek, İspanya (72,3%)¹⁸, Hindistan (65,1%)¹⁹, Tayland (58,5%)⁹, Güneydoğu Çin (58,5%)¹¹'de yapılan çalışmalardan daha düşük bulunmuştur.

Çalışmadaki RIF dirençli izolatların 19/31 (%57,6)'inde *rpoB* geni üzerinde 531. gen bölgesinde TCG/TTG (Ser 531 Leu) mutasyonu tespit edilmiş olup bu oran Almanya (%73,6)²⁰, Hindistan (%65,1)¹⁹ gibi ülkelere daha düşük, Etiyopya (%50,3)²¹, Letonya (%41,2)²² gibi ülkelere daha yüksek

bulunmuştur. Uluslararası alanda yapılan çalışmalarda bu oran %47-70,5 olup elde ettiğimiz veriler, literatür ile uyumluluk gösterdiği gibi ülkemizdeki yapılan çalışmalarla da (60%)²³benzerlik göstermiştir.

Yapılan birçok çalışma yüksek düzeyde rifampisin direncinin genellikle kodon 531 veya 526'daki mutasyonlardan kaynaklandığını ve vakaların yaklaşık %65 ile %86'sını oluşturduğunu göstermiştir. *rpoB* genin 531. kodonundaki TCG/TTG (Ser 531 Leu) mutasyonu dünyada yapılan farklı çalışmalar toplamında %56 oranı ile bu çalışma ile (%57,6) benzerlik göstermesine rağmen, bu çalışmadan farklı olarak 526. kodonun CAC/TAC (His526Tyr) mutasyonu (%25), bu çalışmadaki 5 (%15,2)izolat ile ikinci en sık tespit edilen 526 CAC/GAC (His 526 Asp) mutasyonundan daha yüksek oranda bulunmuştur²⁴. *katG* geninde kodon 315, en sık mutasyona uğrayan kodondur ve kodon 315'teki mutasyonlarla oluşan amino asit, *katG* genindeki diğer kodonlara göre en yüksek değişkenliğe sahiptir. Önceki çalışmalar, klinik olarak dirençli izolatlarda S315T mutasyonunun göreceli olarak yaygın olduğunu ve sıklığının %46 ile %85 arasında değiştiğini göstermiştir.

Fenotipik olarak INH dirençli 30 klinik izolatın 26(%86,6)'sında dirençle ilgili yaygın mutasyonların saptanmış olduğu bu çalışmadaki izolatların 14 (%46,7)'ünde *katG*315 gen bölgesindeki AGC/ACC(Ser 315 Thr) mutasyonunun, 8 (%26,7) izolatın da *inhA* geninin-15 pozisyonundaki C/T mutasyonlarının dirence yol açan sık mutasyonlar olduğu görüldü. İsoniazid direnci ile ilgili yapılan çalışmalarda *katG*315 gen bölgesindeki AGC/ACC(Ser 315 Thr) mutasyon oranı, İsviçre (%62,3)²⁵, Türkiye (60%)²³, İtalya (%64,7)²⁶, Rusya (9,7%)¹⁷, Letonya (%94,1)²², Pakistan (%72,5)²⁷ dan düşük bulunmuş fakat Avusturalya, Kolombiya, Hindistan, Meksika, İspanya, Teksas ve New York City gibi ülke ve bölgelerdeki referans

laboratuvarlardan elde edilen klinik izolatlarla gerçekleştirilen bir çalışmada elde edilen %46'lık gibi bir oranla uyumlu olarak bulunmuştur²⁸.

Ülkemizde yapılan ÇİD, mono-RIF ve mono-INH olmak üzere toplam 1329 izolatin direncinin genotipik mekanizmasının araştırıldığı çalışmada, bu çalışmaya benzer olarak rifampisin dirençli izolatlarda en sık ancak daha yüksek oranda (%78,7, 137/174) 531. kodon TCG/TTG, ikinci en sık (%4, 7/174) ise 526. kodon His 26Asp mutasyonunun varlığını tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada INH direncinden sorumlu birinci ve ikinci sıklıkta görülen mutasyonlar bu çalışma verilerine benzer olarak sırasıyla, *katG*315 AGC/ACC (Ser 315 Thr) ve *inhA* C15T mutasyonları olarak belirlenmiş, bu çalışmada saptanan *inhA* T8A (%6,7) mutasyonu ise bildirilmemiştir²⁹.

Gaziantep ilinde yapılan çalışmada ise, RIF direncinden sorumlu S531T mutasyonu %14.9 oranı ile bu çalışmadaki orandan (%57,6)düşük kalsa da, bu çalışma verilerine benzer şekilde en sık tespit edilen mutasyon olmuş, ikinci sırada ise His 526 Tyr mutasyonu (%3) bildirilmiştir. Çalışmalarına dâhil ettikleri INH dirençli izolatların tamamında *katG* geni 315. Kodon S315T, %7,4'ünde ise bu çalışmadan (%26,7) düşük oranda *inhA* geni C15T mutasyonu tespit etmişlerdir³⁰.

SONUÇ

Fenotipik yöntemler ile 30 ÇİD ve 3 monoRIF dirençli toplam 33 izolatin moleküler direnç mekanizması, hibridizasyon temelli Hain Lifescience GenoType MTBDR plus yöntemi ile değerlendirildi. Fenotipik ve genotipik direnç profili sonuçları karşılaştırıldığında; analiz edilen izolatların rifampisin ve isoniyazid için sırası ile 31/33 (%94) ve 26/30 (%86,6) suştafenotipik direncin bilinen bir moleküler direnç mekanizması ile izah edilebileceği belirlendi. Dirençli suşlardan 19 (%57,6) izolatta RIF direncine *rpoB* genine ait 531. gen

bölgesinde TCG/TTG mutasyonu, INH direncine ise 14 (%46,7) izolatta *katG* 315 gen bölgesindeki AGC/ACC mutasyonu, 8 (%26,7) izolatta da *inhA* geninin -15 pozisyonundaki C/T mutasyonlarının neden olduğu görüldü. RIF ve INH için GenoType MTBDR plus yöntemiyle tespit edilen sonuçlar MGIT960 SIRE yöntemiyle yüksek oranda uyum gösterdiğinden mikobakteriyoloji laboratuvarlarında ÇİD-TB vakalarında ilaç direncinin hızlı tespitinde başarıyla uygulanabilir.

Etik Kurul Onayı: Çalışmamız Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.09.2020 tarihli oturumda ve Karar No: 01/2020-13 ile onaylandı. Çalışma uluslararası bildirge, kılavuza uygun gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yayınla ilgili yazarların çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma DÜBAP tarafından TIP 20.004 nolu projeye desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP koordinatörlüğüne teşekkür ederiz

Declaration of Conflicting Interests: The authors have no conflict of interest regarding this study.

Financial Disclosure: This study was supported by Dicle University Scientific Research Project Coordinator, TIP 20.004.

KAYNAKLAR

1. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16(4): 202–13.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [Internet]. [Erişim: 10 Ağustos. 2024]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
3. Valim ARM, Rossetti MLR, Ribeiro MO, Zaha A. Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(8): 3119–22.

4. Müller B, Borrell S, Rose G, Gagneux S. The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Genet*. 2013; 29(3): 160–9.
5. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(1): 13–21.
6. Wahab HA, Choong YS, Ibrahim P, Sadikun A, Scior T. Elucidating Isoniazid Resistance Using Molecular Modeling. *J Chem Inf Model*. 2009; 49(1): 97–107.
7. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009; 13(11): 1320–30.
8. World Health Organization. Technical manual for drugs susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018. [Erişim: 10 Ağustos. 2024]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514842>
9. Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, et al. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(5): 446–53.
10. Suresh N, Singh UB, Arora J, et al. *rpoB* gene sequencing and spoligotyping of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India. *Infect Genet Evol*. 2006; 6(6): 474–83.
11. Guo JH, Xiang WL, Zhao QR, et al. Molecular Characterization of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Sichuan Province in China. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61(4): JJID.2008.264.
12. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177(7): 787–92.
13. Aye KS, Nakajima C, Yamaguchi T, et al. Genotypic characterization of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar. *J Infect Chemother*. 2016; 22(3): 174–9.
14. Minh NN, Van Bac N, Son NT, et al. Molecular Characteristics of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Vietnam. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(3): 598–601.
15. Yoon JH, Nam JS, Kim KJ, et al. Molecular characterization of drug-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 72(1): 52–61.
16. Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, et al. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis*. 2012; 92(6): 529–34.
17. Marttila HJ, Soini H, Eerola E, et al. A Ser315Thr Substitution in KatG Is Predominant in Genetically Heterogeneous Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Originating from the St. Petersburg Area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(9): 2443–5.
18. Torres MJ, Criado A, González N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002; 6(4): 160–3.
19. Singhal R, Myneedu VP, Arora J, et al. Detection of multi-drug resistance & characterization of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North-Eastern States of India using GenoType MTBDR plus assay. *Indian J Med Res*. 2014; 140(4): 501–6.
20. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDR plus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(8): 2635–40.
21. Mekonnen D, Admassu A, Mulu W, et al. Multidrug-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* and associated gene mutations in Ethiopia. *Int J Infect Dis*. 2015; 39: 34–8.

22. Tracevska T, Jansone I, Broka L, Marga O, Baumanis V. Mutations in the *rpoB* and *katG* Genes Leading to Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(10): 3789–92.
23. Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G. Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in southern Turkey. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61(4): 255–60.
24. Wulandari DA, Hartati YW, Ibrahim AU, Pitaloka DAE, Irkham. Multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Chim Acta*. 2024; 559: 119701.
25. Chryssanthou E, Ångeby K. The GenoType® MTBDRplus assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Sweden. *APMIS*. 2012; 120(5): 405–9.
26. Miotto P, Piana F, Penati V, et al. Use of Genotype MTBDR Assay for Molecular Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains Isolated in Italy. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(7): 2485–91.
27. Khan AS, Phelan JE, Khan MT, et al. Genetic mutations underlying isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Tuberculosis*. 2023; 138: 102286.
28. Hazbón MH, Brimacombe M, Del Valle MB, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(8): 2640–9.
29. Yazısız H, Hircin Cenger D, Uçarman N, Altın S. The molecular patterns of resistance to anti-tuberculosis drugs: an analysis from Istanbul, Turkey. *J Chemother*. 2020; 32(2): 66–74.
30. Gazel D, Çeylan K, Çalışkan Türk G, Karşılıgil T. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Isolated from the Samples of Patients Living in Northern Syria. *Mikrobiyol Bul*. 2023; 57(3): 444–53.