ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAKLI HASTALARDA ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DİRENCİNE SAHİP *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARININ MOLEKÜLER ÇALIŞMASI

Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI tarafından hazırlanan **"Iraklı Hastalarda Antitüberküloz İlaç Direncine Sahip *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Moleküler Çalışması"** adlı tez çalışması 14/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Asmar MANKHI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Iraklı Hastalarda Antitüberküloz İlaç Direncine Sahip *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Moleküler Çalışması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Progı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (14/06/2023).

Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAKLI HASTALARDA ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇ DİRENCİNE SAHİP *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İZOLATLARININ MOLEKÜLER ÇALIŞMASI

Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Asmar MANKHI

Mycobacterium tuberculosis, birincil olarak akciğerleri etkileyen, akciğer tüberkülozuna neden olan ve diğer bölgeleri etkileyerek ekstrapulmoner tüberküloza neden olan oldukça bulaşıcı bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı, farklı ilaç direnci tiplerini (mono, multi, poly, XDR, RR) ve ilaç direncine neden olan genleri belirlemektir. Ayrıca ilaç direncinin doğru tespiti ve uygun tedavi planlarının oluşturulması için önemli bilgiler sağlar. Mayıs 2022'den Kasım 2022'ye kadar Bağdat'taki Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarında bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, 3.250 şüpheli tüberküloz vakası arasından yakın zamanda kontrol edilen 43 vaka ve daha önce tüberküloz tedavisi görmüş 107 kişiden oluşan toplam 150 tüberküloz hastası alınmıştır. Tüm hastalara direkt muayene (AFB testi), kültür, oransal ilaç duyarlılık testi (DST), Gene-Xpert testi ve line probe assay (LPA) gibi konvansiyonel yöntemlerle inceleme yapılmıştır. FLD'ler için yaş grubu ve cinsiyete göre Fenotipik DST'ye göre sonuçlar erkeklerde 86, kadınlarda 64 vaka olarak saptanmıştır. En az vaka 55-64 yaş grubunda görülürken, 5-14 yaş grubundaki vaka sayısı oldukça az bulunmuştur. Belirti ve semptomlar direncin tipine göre farklılık gösterir. FLD ve MDR vakalarında en sık görülen semptom tipi, 63 vaka ile orta tiptir. RR vakalarında 34 vaka ile orta tiptir. MONO ve POLY dirençli vakalarda sırasıyla 8 vaka görülmüştür. Bu bulgular, Irak'ta ilaca dirençli tüberkülozu ele almak için etkili stratejilere olan acil ihtiyacın altını çizmektedir. Buna gelişmiş tanı teknikleri, özel tedavi rejimleri ve gelişmiş sürveyans sistemleri, artan ilaç direnci sorunuyla mücadele etmek ve tüberküloz yönetiminde hasta sonuçlarını iyileştirmek için oldukça gereklidir.

2023, 79 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: İlaç direnci, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, XDR, Genetik araştırma

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR STUDY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES WITH ANTITUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE IN IRAQI PATIENTS

Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Ahmed Asmar MANKHI

Mycobacterium tuberculosis is a potential cause of tuberculosis, a highly contagious disease that primarily affects the lungs, causing pulmonary tuberculosis and affecting other sites, causing extrapulmonary tuberculosis. The aim of this study is to identify different types of drug resistance (mono, multi, poly, XDR, RR) and to identify the genes that cause drug resistance. It also provides important information for the accurate detection of drug resistance and the creation of appropriate treatment plans. From May 2022 to November 2022, a study was carried out at the National Tuberculosis Reference Laboratory in Baghdad. A total of 150 tuberculosis patients were recruited for this study, comprising 43 recently controlled cases among the 3,250 suspected tuberculosis cases and 107 individuals who had previously received tuberculosis treatment. The results according to the Phenotypic DST for FLDs by age group and gender were 86 cases in men and 64 cases in women, While most cases were seen in the 25-34 age group, then in the 35-44 age group and 65 years old and over, the least cases were seen in the 55-64 age group and the number of cases in the 5-14 age group is very low. The frequency of clinical signs and symptoms according to age group and gender was determined as moderate type in 65 cases, mild type in 47 cases and finally severe type in 36 cases. Signs and symptoms differ according to the type of resistance. The most common symptom type in FLD and MDR cases is the intermediate type with 63 cases. In RR cases, it is medium type with 34 cases. In MONO and POLY resistant cases, 8 cases were seen, respectively. These findings underscore the urgent need for effective strategies to address drug-resistant tuberculosis in Iraq, including improved diagnostic techniques, tailored treatment regimens, and enhanced surveillance systems is necessary to combat the growing challenge of drug resistance and improve patient outcomes in tuberculosis management.

2023, 79 pages

Keywords: Drug resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, XDR, Genetic investigation

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilimsel yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Ayşenur KAYABAŞ AVŞAR'a ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Asmar MANKHI'ya sabrı, yol göstericiliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI

Çankırı, Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR TARAMASI **4**
2.1 *Mycobacterium tuberculosis*: İlaca dirençli tüberkülozun esasları **4**
2.2 İlaç Direnci Türleri **5**
2.3 Birinci Basamak Anti-TB İlaçlar **6**
2.4 İkinci Basamak Anti-TB İlaçlar **9**
2.4.2 Diğer aminoglikozidler **11**
2.4.3 Anti-TB ilaç dirençleri **11**
2.5 Tüberküloz Tanısı **12**
2.5.1 Kültür **14**
2.6 İlaçlarla İlişkin Testler **15**
2.6.1 Moleküler tanı **15**
2.6.2 Xpert cihazı **16**
2.6.3 Tespit edilen RIF direnci **18**
2.6.4 Tespit edilemeyen RIF direnci **18**
2.6.5 Çizgi probu deneyleri (LPA) sistemi **18**
3. MATERYAL VE METOD **23**
3.1 Materyaller **23**
3.1.1 Cihazlar **23**
3.1.2 Kimyasallar, ortam ve boyalar **24**
3.1.3 Kitlerin listesi **24**
3.1.4 Çalışma denekleri **25**

3.2 Metod 25
3.2.1 Örneklerin toplanması 25
3.2.2 Güvenlik ve dezenfektasyon 25
3.3 Laboratuvar Yöntemleri 26
3.3.1 Balgam incelemesi için geleneksel yöntemler 26
3.3.2 Molekül tespiti 27
3.3.3 Kültür 28
3.3.4 Moleküler tanı yöntemleri 32
3.4 İstatistiksel Analiz 38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 39
4.1 Bulgular 39
4.2 Tartışma 46
4.2.1 LPA ve orantılı DST yöntemi (PM) arasındaki uyum 47
4.2.2 Sonuçlara geri dönüş süresi 48
4.2.3 Mutasyon modeli 48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 57
5.1 Sonuçlar 57
5.2 Öneriler 57
KAYNAKLAR 59
EKLER 75
ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGELER DİZİNİ

-	Eksi
%	Yüzde
**	Önemli
/	Böl
+	Artı
<	Büyüktür
=	Eşit
>	Daha az
±	Artı eksi
≤	Büyük veya eşit
≥	Daha az veya eşit
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
Ca	Calsium
Cu	Bakır
dk	Dakika
dL	Desilitre
g	G
kg	Kilogram
L	Litre
m^2	Metrekare
Mg	Magnezyum
Mg	Miligram
mIU	Mili-uluslararası birimler
mL	Mililitre
mmol	Milimol
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	dk'daki Devir Sayısı
Se	Selenyum
Zn	Çinko

KISALTMALAR DİZİNİ

AMK	Amikasin
BSL2	Biyo-güvenlik kabini sınıf 2
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRDR	İlaca direnç belirleme bölgesi
EMB	Etambutol
FLD	Birinci basamak tüberküloz ilaçları
FQ	Florokinolon
GYR	*GyrA*se
INH	İzoniazid
K	Kanamisin
KAP	Kapreomycin
MDR	Çoklu ilaca dirençli
MFB	Asit hızlı basil
Mtb	*Mycobacterium* tuberculosis
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTB	Akciğer tüberkülozu
PZA	Pirazinamid
RIF	Rifampisin
SLD	İkinci basamak tüberküloz ilaçları
SM	Streptomisin
TB	Tüberküloz
tRNA	Transfer ribonükleik asit
XDR-TB	Yaygın ilaç dirençli tüberküloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Direkt smear mikroskopisi (Jena *et al.* 2017) 13
Şekil 2.2 Kültür (Bento *et al.* 2021) 15
Şekil 2.3 Xpert MTB/RIF cihazı (Rani *et al.* 2017) 17
Şekil 2.4 DNA`nın replikasyonu (Msxlabs 2016) 19
Şekil 4.1 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için Fenotipik DST: - erkeklerde vakaların yaş grubu 5-14 iken kadınlarda 15-24 olarak bulunmuştur. 40
Şekil 4.2 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için Direnç Türü (Genotipik) 41
Şekil 4.3 SLD'ler için yaş grubu ve cinsiyete göre direnç tipi (Genotipik) 43
Şekil 4.4 Yaş grubu ve cinsiyete göre belirti ve semptomlar:- Yaş grubuna göre en fazla belirti ve semptom 25 - 34 yaş grubunda ve sonuncusu 5-14 yaş grubundadır. 44
Şekil 4.5 FLD belirti ve semptomlarına karşı direnç 45
Şekil 4.6 SLD'lere Direnç Belirti ve Semptomlar 46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan ekipman ve aletler 23
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar, besiyerleri ve boyalar 24
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitlerin listesi 24
Çizelge 3.4 GeneXpert (Cephid) sistemi reaktifi 27
Çizelge 3.5 PCR amplifikasyonu 34
Çizelge 3.6 PCR döngüleri progı 35
Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan primerler 38
Çizelge 4.1 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için fenotipik DST 39
Çizelge 4.2 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için direnç tipi (Genotipik) 40
Çizelge 4.3 Yaş grubu ve cinsiyete göre ÖÖB'ler için fenotipik DST 41
Çizelge 4.4 Yaş grubu ve cinsiyete göre SLD'ler için Direnç Türü (Genotipik) 42
Çizelge 4.5 Yaş grubu ve cinsiyete göre belirti ve semptomlar 43
Çizelge 4.6 FLD Belirti ve semptomlarına karşı direnç 44
Çizelge 4.7 Sonuçların çizgi probu tahlili ile karşılaştırılması 48
Çizelge 4.8 İstatistiksel analiz 48
Çizelge 4.9 FLD için genlerin LPA bantlarındaki mutasyon sıklığı 49
Çizelge 4.10 SLD için genlerin LPA bantlarındaki mutasyon sıklığı 49

1. GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), öncelikle akciğerleri etkileyerek akciğer tüberkülozu (TB) oluşturan ve diğer bölgeleri etkileyerek akciğer dışı TB'ye de yol açan çok bulaşıcı bir hastalık olan tüberkülozun (TB) potansiyel nedenidir. Akciğer TB'si ve akciğer dışı TB olmak üzere iki kısımda sınıflandırılmaktadır. TB olarak bilinen bulaşıcı hastalığa Mtb bakterisi neden olmaktadır (Lee and Yeo 2015, WHO 2018).

Ölümle sonuçlanabilen başlıca enfeksiyöz ajan olarak immün yetmezlik sendromunun (AIDS) statüsünü geçmiştir (WHO 2018). Yeni Mtb enfeksiyonunun önlenmesi ve bu enfeksiyonların TB hastalığına dönüşmesinin engellenmesi, tüberkülozun neden olduğu hastalık ve ölüm yükünün azaltılması için esastır. Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Üye Devletleri, tüm dünyada var olan ihtiyacı karşılamak için genel olarak TB salgınını ortadan kaldırma hedefine doğru ilerlemeye karar vermiştir ayrıca tüberküloza bağlı tüm ölümlerin ve acıların önlenmesini hedeflemektedir. Bu strateji için 2015 yılı başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir (WHO 2015, Matteelli *et al.* 2018).

Dünya Sağlık Örgütü, 1997 yılından bu yana TB'nin önlenmesi konusunda kaydedilen ilerlemeleri sunmak amacıyla her yıl küresel tüberküloz raporu yayınlamaktadır (Falzon *et al.* 2017, WHO 2018). Son olarak 2017 yılında, tüberküloz enfeksiyonuna sahip olan 10 milyon kişi olduğu belirtilmiştir. Bu kişilerin beş buçuk milyonu erkek, üç buçuk milyonu kadın ve bir milyonu çocuklardan oluşmaktadır. Ayrıca, bu enfeksiyonlardan kaynaklanan 1,6 milyon ölümün gerçekleştiği bildirilmiştir ve bu ölümlerin 0,3 milyonu HIV ile birlikte enfekte olan kişilerden kaynaklanmaktadır (WHO 2018).

Tüberküloz (TB), dünya genelinde her ülkenin karşılaşabileceği bir hastalıktır. END TB stratejisi (2016-20) kapsamında, en az 48 ülke, tüberküloz, HIV ve çok ilaca dirençli tüberküloz açısından Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) üç yüksek yük ülkesi (HBC) listesinden en az birinde yer almaktadır. Bu ülkeler arasında Çin, bu üç sıralamada da yer alan 14 ülkeden biridir. Diğer listedeki ülkeler ise genellikle Afrika ve Asya'da bulunmaktadır (WHO 2018).

Her yıl, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) üç yüksek yük ülkesi (HBC) olarak belirlenen ülkeler, dünya genelindeki tüberküloz (TB) vakalarının %84'ünden, TB/HIV vakalarının %83'ünden ve çok ilaca dirençli tüberküloz (MDR-TB) vakalarının %87'sinden sorumlu olmaktadır (WHO 2018). Düşük tüberküloz yüküne sahip olarak sınıflandırılan ülkeler, hastalıktan en az etkilenen ve her yıl 100.000 kişide 10'dan az (Heuvelings *et al.* 2017) vaka olarak tanımlanan çok düşük aktif TB hastalığı prevalansı kaydeden ülkelerdir. Kanada, ABD, Avustralya, Batı Avrupa ve Yeni Zelanda gibi kişi başına düşen gelirin yüksek olduğu ülkeler buna örnektir (Zammarchi *et al.* 2014, Khazaei *et al.* 2017, WHO 2018). Yaklaşık 1,7 milyar insanın ya da dünyanın yüzde 23'ünün gizli tüberküloz enfeksiyonu (LTBI) taşıdığı ve yaşamlarının bir noktasında aktif tüberküloz hastalığına yakalanma riski altında olduğu tahmin edilmektedir.

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a) antagonist tedavisi, maligniteler, yaşlanan nüfus ve diğerleri gibi bağışıklık sistemini etkileyen tıbbi risklere sahip bireylerde TB hastalığı gelişme riski önemli ölçüde artmaktadır (Marais *et al.* 2013, Hameed *et al.* 2018).

İzoniazid, rifampisin, etambutol ve pirazinamid, genel olarak ilaca duyarlı tüberküloz için birinci basamak tedavi rejimini oluşturan dört ilaçtır. Bu tedavi planı 6-9 ay arasında süren bir tedavi sürecinden oluşmaktadır (Lienhardt *et al.* 2010, Conde ve Silva 2011, Nasiri *et al.* 2017, Honeyborne *et al.* 2019).

İlaca duyarlı TB vakalarının en az yüzde 85'i etkili bir şekilde tedavi edilmektedir ve 194 üye devlet tarafından dünya sağlık örgütüne tutarlı bir şekilde bildirilmektedir. Öte yandan, ilaca dirençli tüberküloz suşlarının gelişimi genellikle hastaların reçete edilen ilaç proglarına uymamalarının yanı sıra TB ilaçlarının yanlış kullanımı veya uygulanmasından kaynaklanmaktadır (Nguyen 2016).

Düşük sosyoekonomik durum, alkol kullanımı, diğer hastalıklarla koenfeksiyon, evde bir TB hastasının bulunması ilaca dirençli tüberküloz hastalığı için risk faktörleridir (Singla 2017, Hameed *et al.* 2018, WHO 2018). İlaca dirençli tüberkülozun kontrol altına alınması için hızlı ve zamanında tüberküloz (TB) teşhisi, uygun ilaç tedavisi ve TB direnci ile ilgili sosyal bilgilendirme sağlanması gibi önlemler alınabilir. Bu,

ilerleyen ilaca dirençli tüberkülozun yönetilmesi için önemli bir yaklaşımdır. Ayrıca, etkili bir ilaç rejimi uygulanması ve ilaçların düzenli olarak kullanılması da önemli faktörlerdir. Bu stratejilerin başarısı, sosyal istihbaratın sağlanması ve ilaç uygulama rutininin takip edilmesiyle mümkün olabilir (Pinto and Menzies 2011).

Öte yandan, ilaca dirençli tüberkülozun büyümesi, TB tedavisi ve hastalık kontrolü için bir zorluk ve dünya çapında halk sağlığı için ciddi bir tehlike olmaya devam etmektedir (Raviglione and Sulis 2016, WHO 2018). Mtb'de ilaç direncinin gelişmesine birden fazla süreç katkıda bulunmaktadır (Saeedi and Hajoj 2017, Rojas *et al.* 2019).

Bu nedenle toleransın biyokimyasal, genetik ve moleküler temellerinin anlaşılması, yeni tedavi teknikleri geliştirmek ve ilaç direnciyle mücadele etmek için büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, mevcut veya geliştirilme sürecinde olan yeni ve yeniden tasarlanmış anti-TB ilaçları ile ilgili güncel gelişmelerin yanı sıra Mtb'nin ilaçlara karşı direnç geliştirdiği süreçlere odaklanılmaktadır. Bu bilgilerin, etkin TB tedavisi ve klinik bakım için gerekli olan ilaç direncinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olması beklenmektedir (Warrier *et al.* 2016). Bu çalışmanın amacı, ilaç direncinin farklı türlerini (mono, multi, poli, XDR, RR) belirlemek ve ilaç direncine neden olan genleri tespit etmektir. Ayrıca, tüberküloz hastalarında ilaç direncini teşhis eden laboratuvar testlerini karşılaştırmaktır. Bu çalışma, ilaç direncinin doğru bir şekilde saptanması ve uygun tedavi planlarının oluşturulması için önemli bilgiler sağlamayı hedeflemektedir.

2. LİTERATÜR TARAMASI

Dünya genelinde TB önemli bir sağlık riski oluşturmaktadır. Hastalığa neden olan enfeksiyöz ajan olan dirençli bakterilerin varlığı, durumu onlar için daha da tehlikeli hale getirmektedir. Son birkaç yıl içinde, daha da ciddi ilaç direnci türlerine ilişkin raporlar ortaya çıkmıştır. *M. tuberculosis*'in ilaç direnci mekanizmalarında yer alan moleküler işlemler ve ilgili moleküler mekanizmalar daha iyi anlaşılırsa, hızlı antibiyotik direnci tespiti için mevcut yöntemler iyileştirilecek ve aktivite ve geliştirme için yeni ilaç hedefleri bulmak daha kolay olacaktır (Safi *et al.* 2013).

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*: İlaca dirençli tüberkülozun esasları

Mycobacterium cinsine ait bakterilerin çok çeşitli ilaçlara karşı doğal olarak dirençli olduğu düşünülmektedir. Bu durum çoğunlukla aşırı derecede kalın olan ve yağ bakımından zengin hücre zarına bağlanmıştır (Jarlier and Nikaido 1994). Hücre zarından geçtikten sonra, bazı antibiyotikler enzimler tarafından parçalanarak veya yapıları değişerek bakterileri öldürme yeteneklerini kaybedebilir. Bu da onları işe yaramaz hale getirebilmektedir (Wang *et al.* 2006, Warrier *et al.* 2016).

Buna ek olarak, *M. tuberculosis*'te çeşitli efluks sistemleri bulunmuştur; ancak bu sistemlerin klinik olarak anlamlı düzeyde ilaç direnci sağlamadaki önemi tartışmalıdır. Efluks sistemlerinin çok çeşitli durumlarda ifade edildiği keşfedildiğinden (Gupta *et al.* 2010, Li *et al.* 2015), yüksek seviyeli ilaç direncine doğru bir basamak olarak hareket etmeleri mümkündür. *M. tuberculosis*'in bir diğer özelliği de sürekli yatay gen transferinin olmamasıdır (Cole *et al.* 1998, Bolotin and Hershberg 2015).

Mycobacterium cinsi içerisindeki farklı türler arasında yatay gen transferi olgusu gözlemlenmiştir. Bu, *Mycobacterium* türleri arasında genetik materyalin yanı sıra genlerin değişimi ve transferinin gerçekleşebildiğini göstermektedir (Rabello *et al.* 2012), ancak bu, bakteriyel direncin gelişiminde motive edici bir güç gibi görünmemektedir. Direnç fenotiplerinin büyük çoğunluğu, duyarlılık plazmidi veya

diğer genetik unsurların aksine kromozom değişiklikleri ile açıklanabilir. Bunun nedeni kromozomal mutasyonların hareketli genetik bileşenlere göre daha stabil olmasıdır. İlaç direnci yöntemlerini değerlendirmek amacıyla çeşitli *M. tuberculosis* türleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. *M. smegmatis, M. tuberculosis*'ten yaklaşık 1,5 kat daha büyük bir genoma sahip olan çevresel bir *Mycobacterium*'dur ayrıca en sık kullanılan modeldir.

2.2 İlaç Direnci Türleri

Çok ilaca dirençli tüberküloz hastalarında, tüberküloza neden olan bakteriler rifampin gibi en güçlü tüberküloz ilaçlarına karşı direnç geliştirmiştir. Bu ilaçlar, tüberküloz hastalığı olan tüm bireylerin tedavisinde kullanılır. Tüberküloz tedavisi konusunda uzman olan tüberküloz uzmanlarına başvurmak önemlidir (Bolotin and Hershberg 2015).

Pre-eksprese ilaca dirençli tüberküloz (pre-XDR TB) olarak da bilinen, izoniazid, rifampin ve bir florokinolona dirençli tüberküloz bakterilerinin veya izoniazid, rifampin ve ikinci basamak bir ilaca (amikasin, kapreomisin ve kanamisin) dirençli tüberküloz bakterilerinin neden olduğu çok ilaca dirençli tüberkülozun (MDR TB) bir şeklidir (Warrier *et al.* 2016).

Çoklu ilaca dirençli tüberkülozun (XDR TB) yaygın bir formu olan yaygın ilaca dirençli tüberküloz (XDR TB), tüberküloz bakterilerinin bir florokinolon olan izoniazide ve ikinci basamak bir enjekte edilebilir ilaca karşı direnç geliştirdiği nadir bir durumdur. XDR TB hastaları, izoniazid, rifampin gibi güçlü tüberküloz ilaçlarına dirençli olmaları nedeniyle daha az başarıyla sonuçlanan alternatif tedavilere başvurmak zorunda kalmaktadır.

HIV virüsü veya bağışıklık sistemini zayıflatabilecek başka hastalıkları olan kişiler, XDR TB söz konusu olduğunda özel bir endişe kaynağıdır. Bu kişilerin enfekte olduktan sonra tüberküloz hastalığına yakalanma olasılıkları ve hastalığa yakalandıktan

sonra vefat etme olasılıkları daha yüksektir. X-ray ilaca dirençli TB tedavisi, TB uzmanlarıyla konsültasyonu içermelidir (Ando *et al.* 2014).

2.3 Birinci Basamak Anti-TB İlaçlar

2.3.1 Rifampisin

İlk olarak 1972 yılında rifamisinin bir türevi olarak geliştirilen bir antitüberküloz ilaçtır. İzoniazid ile birlikte, tüberküloz için kullanılan çoklu ilaç tedavisi rejiminin temelini oluşturur. Şu anda mevcut olan en güçlü antibiyotiklerden birini temsil etmektedir. Rifampisin hem aktif olarak gelişen hem de büyümeyen basillere karşı etkilidir (Mitchison 1979). *M. tuberculosis'*teki RNA'nın alt kısmına bağlanarak, RNA moleküllerinin uzamasını önleyebilmektedir. İlacın antitüberküloz etkisi vücutta bu şekilde ortaya çıkmaktadır (Blanchard 1996).

Rifampisine dirençli bakterilerin ezici çoğunluğu izole edilen *M. tuberculosis* suşlarında *rpoB* geninde, yani RNA'nın ikincil kısmını kodlayan gende mutasyonlar bulunabilir. Bunun doğrudan bir sonucu olarak, ilaca karşı afinitenin azalmasına ve nihayetinde ilaç direncinin gelişmesine yol açan konformasyonel durum değişiklikleri meydana gelmektedir (Telenti *et al.* 1993).

rpoB geninin "sıcak nokta bölgesi" olarak adlandırılan, 507-533 kodonlarını kapsayan ve rifampisine bağışıklığı olan Mtb örneklerinin yaklaşık %96'sında bulunan 81 bp'lik bir bölgenin değişiklikler içerdiği gösterilmiştir. Bu bölge aynı zamanda antibiyotik inhibisyon bölgesi ve klaritromisin inhibisyon bölgesi olarak da adlandırılır. Rifampisin direnci belirleyici bölge (Ramaswamy and Musser 1998). Araştırmaların büyük çoğunluğunun bulgularına göre, rifampisin direnci çoğunlukla kodonlardaki mutasyonlarla ilişkilidir (Somoskovi *et al.* 2001, Caws *et al.* 2006). Bu olay çok daha nadir olsa da, *rpoB* geninin sıcak nokta bölgesinin dışında mutasyonların gelişebildiği birkaç durumda belgelenmiştir (Heep *et al.* 2000, Sin *et al.* 2011).

Bakterilerin diğer rifamisin türleri, örneğin rifabutin gibi, karşısında direnç geliştirme olasılığı vardır. Öte yandan, belirli kodonlardaki mutasyonlar, örneğin 518 veya 529, rifampisine karşı düşük düzeyde dirençle ilişkili olmasına rağmen, bakterilerin hala rifabutin gibi diğer rifamisinlere karşı savunmasız olduğunu göstermektedir (Yang *et al.* 1998, Cavusoglu *et al.* 2004). Bu, antiretroviral tedaviye ihtiyaç duyan TB hastaları için önemlidir. Çünkü rifabutin, mevcut diğer seçeneklerden daha az etkili olan sitokrom P450 CYP3A reaktif oksidazın bir yükselticisidir (Burman 2001). Buna karşın, rifampisin monorezistansı çok nadir görülen bir olgudur ve rifampisine dirençli olan hemen hemen tüm bakteri türleri, başta izoniazid olmak üzere bazı ilaçlara karşı da duyarlıdır (Traore *et al.* 2000).

Genom dizilimi kullanılarak yapılan son araştırmalar, RNA'nın ve alt birimlerini kodlayan *rpoA* ve *rpoC*'de telafi edici varyantların kabul edildiğini ortaya çıkarmıştır. Bu mutasyonlar *rpoA* geninin yanı sıra *rpoC* geninde de tespit edilmiştir (Comas *et al.* 2011). Bu adaptif modifikasyonlar bazı koşullarda daha iyi bir hastalık aktarımı ile bağlantılıdır ve suşların *in vivo* etkinliklerini geri kazanma yeteneklerinden sorumlu olmaları mümkündür (Brandis and Hughes 2013, De Vos *et al.* 2013).

2.3.2 İzoniazid

İzoniazid ilk kez 1952 yılında antitüberküloz ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır ve günümüzde rifampisinle birlikte TB tedavisinde kullanılan birincil ilaç olarak hizmet vermeye devam etmektedir. İzoniazid, rifampisinin aksine yalnızca çoğalma yeteneğine sahip metabolik olarak aktif bakterilere karşı etkilidir. İzoniazid aynı zamanda kaldırılmış asit hidrazid olarak da bilinir (Zhang *et al.* 1992). NADH bağımlı enoil-açil taşıma proteini (ACP)-redüktaz olarak bilinen bir enzim tarafından üretilen kimyasalların oluşumunu inhibe ederek etkisini gösterebilir. Bu enzim *inhA* olarak bilinen gen tarafından kodlanmaktadır (Rawat *et al.* 2003). Bu ilacın etkisizliği çeşitli genlerdeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Bu genlerle ilişkili olan durumlar, ilacın temel yapısına bakılmaksızın reçetenin etkisiz olduğunu zaten göstermektedir (Shi *et al.* 2011).

katG ve *inhA*'daki gen mutasyonları izoniazid direncinin iki ana moleküler yolağı ile ilişkilendirilmiştir. Bir dizi araştırmanın bulgularına göre (Hazbón *et al.* 2006), bu iki gendeki mutasyonlar izoniazid direnciyle en sık ilişkili olan mutasyonlardır. Bu mutasyon nedeniyle, ilacın antibakteriyel etkisini gösterebilmesi için gerekli olan izoniazid-NAD dimerini üretebilen bir izoniazid üretilir (Vilchèze and Jacobs, 2007, Rozwarski *et al.* 1998). Bu mutasyon MDR suşlarında daha yaygındır ve çeşitli çalışmalarda izoniazide karşı yüksek düzey dirençle (MIC > 1 g/mL) ilişkilendirilmiştir (Fenner *et al.* 2012).

Hazbón *et al.* (2006)'nin çalışmasında bu mutasyonun MDR suşlarda görülme olasılığının daha yüksek olduğunu bulunmuştur. Daha az yaygın olarak, *inhA*'nın aktif bölgesinde bir mutasyon meydana gelir ve bu da bu tür izoniazid-NAD eklentisi için çekimin azalmasına neden olur. Bu mutasyon genellikle düşük dereceli direnç ile ilişkilidir (MIC 1 g/mL). Mutasyonlar için en yaygın yer olan 15C/T pozisyonunda yer almıştır. *inhA*'daki mutasyonlar sadece izoniazide karşı direnç oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda izoniazide kimyasal olarak benzeyen ve aynı hedefi paylaşan bir ilaç olan etiyonamide karşı da dirence neden olur (Banerjee *et al.* 1994, Larsen *et al.* 2002). *inhA* kodlama bölgesindeki bir genle birlikte *inhA* promotör bölgelerindeki bir varyasyonun, etiyonamide karşı çapraz direncin yanı sıra yüksek düzeyde antibiyotik karşıtlığına neden olmaktan sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır (Machado *et al.* 2013).

Son araştırmalar ilgi çekici bir gerçeği ortaya çıkarmıştır: izoniazid-NADP eklentisinin 4R enantiyomeri Mtb'deki detoksifiye edici enzimlerde inhibitör aktivite yaratmaktadır. Bu bulgu, *dfrA*'daki mutasyonların *M. tuberculosis*'te izoniazid direncinin gelişiminde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Argyrou *et al.* 2006). *Mycobacterium tuberculosis*'teki antibiyotik hedeflerinin DNA'sı üzerine yapılan bir araştırma, *inhA* ve *dfrA*'ya ek olarak, yüksek afinite ile asilasyon süreçleriyle etkileşen toplam 16 farklı enzim olduğunu göstermiştir. Bu durum izoniazidin bakteri üzerindeki henüz tam olarak tanımlanmamış potansiyel etkilerine işaret ediyor olabilir (Argyrou *et al.* 2006). Öte yandan, yakın zamanda yapılan iki araştırma, *dfrA*'da izoniazid direnciyle bağlantılı bir mutasyon olmadığı sonucuna varmıştır (Ho *et al.* 2009).

Mtb'nin *ahpC* geni, oksijen radikalleri ara ürünlerine karşı toleransla bağlantılı olan bir alkil hidroperoksidaz dönüştürücü üretir. İlk başlarda *ahpC* üretimindeki düzensizliklerin izoniazid direnci göstergeleri olarak işlev görebileceği düşünülmüştür. Öte yandan, daha yeni çalışmalar durumun kesinlikle böyle olmadığını göstermiştir (Rinder *et al.* 1998). *ahpC*'nin aktivasyonundaki değişikliklerin izoniazid direncinin nedeni olmaktan ziyade düzeltici ayarlamalar olduğu artık iyi bilinmektedir. Bu değişimler katalaz/peroksidaz performansındaki azalmadan sorumludur (Sherman *et al.* 1996). Ayrıca, *ahpC*'nin daha fazla üretilmesi vücudun buna karşı duyarlılığında bir artışa yol açmayabilir (Heym *et al.* 1997).

Çok sayıda çalışma, *M. tuberculosis*'in izoniazide dirençli klinik izolatlarında diğer genlerdeki genetik varyantları tanımlamıştır. Bu polimorfizmler *kasA* geninin yanı sıra oxyR-ahpC'de de bulunmuştur (Hazbón *et al.* 2005, Cardoso *et al.* 2007, Ando *et al.* 2011). Ancak, bu enzimlerin izoniazid direncinin gelişiminde doğrudan bir rol oynadığı kesin olarak kanıtlanmamıştır. Ayrıca, bu enzimlerin eş-dirençten sorumlu olan mutasyonların makul bir şüphenin ötesinde olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar hücre içinde INH-NAD bileşiğinin seçici olarak engellenmesiyle sonuçlanan bir değişim oranına neden olmaktadır (Miesel *et al.* 1998, Vilcheze *et al.* 2005). Ayrıca, yeni bir araştırma *mabA*'daki anlamsız bir mutasyonun *inhA*'nın aşırı ekspresyonu yoluyla *M. tuberculosis*'te direnç sağladığını göstermiştir (Ando *et al.* 2014).

2.4 İkinci Basamak Anti-TB İlaçlar

2.4.1 Florokinolonlar

Günümüzde ÇİD-TB (Çok İlaca Dirençli Tüberküloz) tedavisinde ikinci savunma hattının ilaçları olarak kullanılmaktadırlar. Hem florokinolon hem de ofloksasin, ana molekül olan nalidiksik asidin yapay varyantlarıdır. Nalidiksik asit, sıtma tedavisinde kullanılan bir ilaç olan klorokinin bir sonucu olarak tesadüfen keşfedilmiştir (Goss *et al.* 1965). Moksifloksasin ve gatifloksasin, şu anda klinik çalışmalarda test edilen ve tüberküloz için toplam tedavi süresini azaltmak amacıyla kullanılması düşünülen yeni kinolon örnekleridir (Maruri *et al.* 2012).

Florokinolonlar, bakterilere karşı etkili olurlar çünkü bakterilerin hayatta kalması için gereken topoizomeraz adlı iki enzimi bloke ederler. Fàbrega *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmaya göre, bu proteinlerin kodlanmasından sorumlu olan *gyrA, gyrB, parC* ve *parE* genleri bulunmaktadır. DNA giraz olarak da bilinen tek tip II topoizomeraz Mtb'de bulunur; sonuç olarak bu enzim florokinolon etkisinin tek hedefidir (Aubry *et al.* 2004). DNA'nın süper sarılması, iki ve iki alt birimden oluşan bir tetramer olan tip II topoizomeraz enzimi tarafından katalize edilir.

Bu alt birimler sırasıyla *gyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanır (Takiff *et al.* 1994). Mtb'nin florokinolon antibiyotiklere direnç kazanmasının en yaygın yolu, *gyrA* veya *gyrB*'nin penisilin direncini belirleyen alanında meydana gelen kromozomal değişikliklerdir. En sık mutasyona uğradığı tespit edilen *gyrA* pozisyonları 90 ve 94 iken, 74, 88 ve 91 pozisyonlarında da mutasyonlar gözlenmiştir (Cheng *et al.* 2004, Sun *et al.* 2008).

Mtb'nin *gyrA* geninde doğal bir polimorfizm olduğu keşfedilmiştir. Bu polimorfizm, bakteri suşlarında da mevcut olduğu için florokinolon direnci ile ilişkili değildir. Bu etkileyici bir keşiftir (Musser 1995).

Ayrıca, *gyrA*'da *T80A* ve *A90G* genlerine sahip olmanın aynı anda çok sayıda kinolona karşı aşırı duyarlılığa nasıl yol açtığını gösteren bir araştırma da yapılmıştır. Bu ekstra kayda değer bir bulgudur. Bu bulgu, Mtb'deki antibiyotik direnci sorununun başlangıçta neden olduğu düşünülenden daha karmaşık olduğu anlamına gelebilir (Cheng *et al.* 2000).

Nadir çalışmalarda gelişiminin ofloksasine duyarlı kaldığı tespit edilmiş olsa da, florokinolonların birbirleri arasında belli düzeyde çapraz direnç sergilediği genel olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak, efluks sistemlerinin katılımı TB gelişiminin potansiyel bir nedeni olarak öne sürülmüştür (Aubry *et al.* 2006).

2.4.2 Diğer aminoglikozidler

Kanamisin, Kapreomisin, Amikasin, Viomisin aynı etki şekli olan protein sentezi sürecini baskılayarak çalışır. Öte yandan, döngüsel peptit antibiyotikler kapreomisin ve viomisin kullanır. Dördü de MDR-TB tedavisi için ikinci basamak ilaçlar olarak kabul edilmektedir (Gillespie 2002).

Bu mutasyonlar en yaygın olarak *rrs* geninin 1400 ve 1401 pozisyonlarında gözlenmiştir. Öte yandan, 1483 konumunda da mutasyonlar tespit edilmiştir (Alangaden *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 1998). Daha önce düşünülenin aksine, kanamisin ve amikasin arasında tamamen bir direnç eksikliği yoktur.

Enzimin aşırı ekspresyonu ve kanamisine karşı yüksek direnç, eis promotörünün -10 ve -35 pozisyonlarındaki mutasyonların sonucudur (Zaunbrecher *et al.* 2009). Bu mutasyonlar amikasine karşı dirençle sonuçlanmamıştır. Klinik izolatlarda minimal düzeyde kanamisin direnci gösterenlerin %80'inde bu mutasyonların genomlarda tespit edildiği bulunmuştur (Campbell *et al.* 2011).

2.4.3 Anti-TB ilaç dirençleri

Tüberküloz, halk sağlığını tehdit eden önemli bir bulaşıcı hastalık olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan tahminlere göre 2012 yılında 8.6 milyon yeni TB teşhisi konmuş kişi bulunmaktadır ve hastalık 1.3 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur. Reşit olmayanlarda neredeyse yarım milyon enfeksiyon belgelenmiş ve HIV/AIDS pozitif olanlar arasında 320.000'den fazla ölüm gerçekleşmiştir (Gandhi *et al.* 2006).

Ayrıca, ilaçlara karşı direnç gelişimi daha da endişe verici bir eğilimdir. 2012'de 450.000 MDR-TB vakası olduğu ve bunun 170.000 ölümün nedeni olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığın tedavisinde kullanılan en önemli ilaçlardan ikisi olan rifampisin ve izoniazide dirençli bakteri genotipleri ile karakterize edilir. 2006 yılından

bu yana, *M. tuberculosis*'in daha da fazla ilaca dirençli suşlarının ortaya çıktığı ve bunların yoğun ilaç direnci (XDR-TB) olarak etiketlendiği tespit edilmiştir. Bu bakteriler sadece MDR-dirençli değil, aynı zamanda herhangi bir antibiyotiğe ve en azından intravenöz ikinci basamak ilaçlara karşı da dirençlidir. Son zamanlarda, test için erişilebilen tüm ilaçlara karşı bağışıklığı olduğu keşfedilen *M. tuberculosis* suşlarının keşfi ile daha endişe verici bir durum ortaya çıkmıştır (Shi *et al.* 2011).

Tüberkülozda her türlü ilaç direncinin erken bir aşamada teşhis edilmesi, dirençli suşların gelişimini en aza indirmek ve kontrol altına almak için mücadelede önemli bir bileşendir. (Moazed and Noller 1987).

2.5 Tüberküloz Tanısı

2.5.1 Doğrudan smear mikroskopisi

Bu teknik Ziehl tarafından icat edilmiş ve daha sonra Neelsen tarafından revize edilmiştir (Zaunbrecher *et al.* 2009).

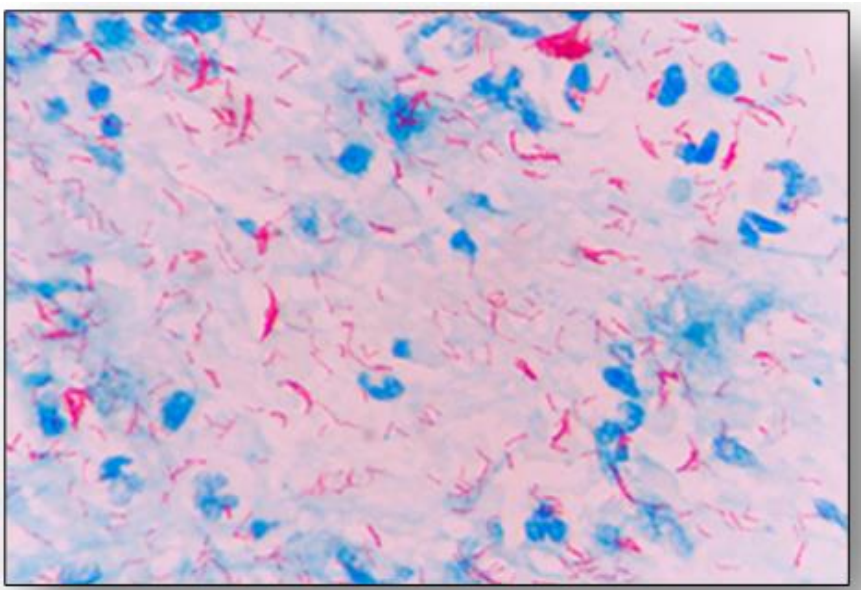
Sistem aynı zamanda eşanlamlısı olan sıcak asit-hızlı boyama tekniği ile de anılmaktadır. *Mycobacterium* spp. en karmaşık mikroorganizmalardan biri olarak bilinir ve sonuç olarak Ziehl-Neelsen kimyasalları ile özellikle titiz bir işlem gerektirir (Spies *et al.* 2008).

Bakteri türlerin tanımlanması ve araştırılması için daha kapsamlı işlemler gerektirdiğinden, genellikle Ziehl-Neelsen veya sıcak asit-hızlı boyama tekniği gibi yöntemler kullanılır. Bu teknikler, boya derinliği sağlayarak daha detaylı sonuçlar elde etmeyi amaçlar. *Mycobacterium* türlerinin hücre duvarını renklendirmek için Ziehl-Neelsen boyası en temel düzeyde olan fuksin ve fenol moleküllerini kullanır (Gillespie 2002).

Mycobacterium basit boyalara kolayca tutunmadığından, tüm bakteri hücre duvarlarına nüfuz etmek ve görünürlüğü sağlamak için karbol-fuschin ve fenolik ile birlikte ısı kullanımı gereklidir (Warrier *et al.* 2016). *Mycobacterium*'un hücre duvarı, esas olarak mikolik asitten oluşan yüksek bir lipid içeriğine sahiptir. Bu, hücre duvarına mumsu bir doku verir, onu hidrofilik yapar ve geçirimsiz hale getirir. Bunlar ß-hidroksikarboksilik asitler olarak bilinir ve toplam 90 karbon atomundan oluşurlar. Bakterilerin asit direncinden sorumludurlar (Alexander *et al.* 2012).

Bazik bir yapıya sahip olan karbol-fuschin kullanımı, mikolik ve lipid hücre duvarı gibi bakterilerin olumsuz bileşenlerine güçlü bir bağlanma ile sonuçlanır. Isı kullanımı ile birlikte asit alkol ilavesiyle güçlü bir kompleksin oluşması, kompleksin çözücüler kullanılarak uzaklaştırılmasını zorlaştırır (Spies *et al.* 2008).

Aside dirençli basiller ana boya olan karbol-fuschin'in kırmızı tonunu alırlar. Asit-hızlı olmayan bakteriler ise asit-alkol karışımının eklenmesiyle renklerini kolayca kaybederler, ancak bunun yerine kontrol kapasitesi boyası metilen mavisini aldıktan sonra mavi görünürler. *M. tuberculosis* ve *M. leprae* bu yöntem kullanılarak başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Zaunbrecher *et al.* 2009).



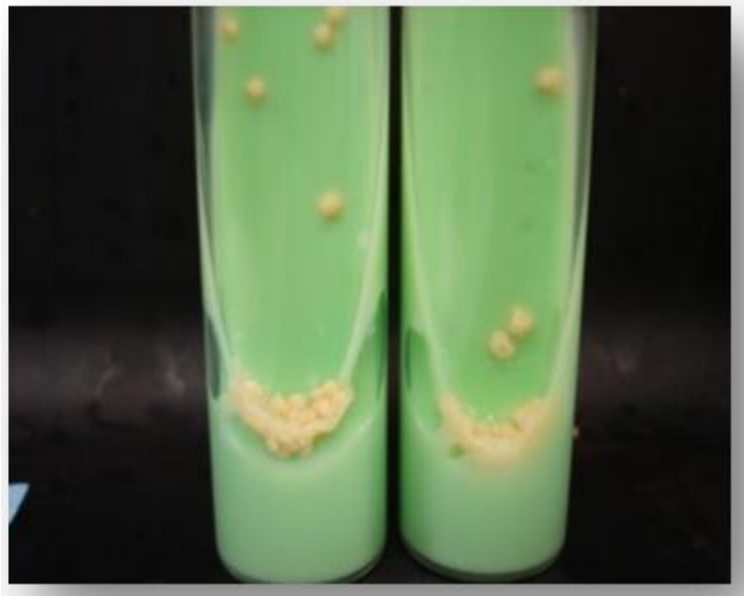
Şekil 2.1 Direkt smear mikroskopisi (Jena *et al.* 2017)

2.5.1 Kültür

Kültür testi sadece birçok *Mycobacterium* türünü birbirinden ayırmak için değil, aynı zamanda bakteri türünün bir ilaca duyarlı olup olmadığını ve kimliğini belirlemek için de gereklidir. Öte yandan, birkaç dk içinde çoğalabilen diğer birçok bakterinin aksine, Mtb çok yavaş yayılır. Buna ek olarak, gelişim için gerekli koşullar, birincil izolasyonda basit kimyasal olarak tanımlanmış besiyerinde yetiştirilemeyeceği şekildedir. Gliserol ve aspartik asit içeren yumurtadan zenginleştirilmiş besiyerleri (örneğin Lowenstein-Jensen) veya sığır albümini ile işlenmiş agar bazlı besiyerleri, *M. tuberculosis*'in önemli miktarlarda büyümesine izin veren tek besiyeri türüdür. Bununla birlikte, kültür teknikleri oldukça maliyetlidir ve önemli miktarda bilgi gerektirmektedir (Zhang *et al.* 2013).

Tüberkülozun kesin tanısını koymak için Mtb'nin önce kültür ortamından izole edilmesi ve ardından belirli *in vitro* testler kullanılarak tanımlanması gerekir. Tüberküloz basili üretmek amacıyla, çoğunluğu üç temel kategoriden birine giren çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir: yumurta bazlı besiyerleri, agar bazlı besiyerleri ve sıvı besiyerleri. Yumurta bazlı besiyerleri, aşağıda listelenen tüm koşulları karşılamaları nedeniyle balgam örneklerinin ekimi için en iyi seçenektir (Juréen *et al.* 2008).

Lowenstein-Jensen (LJ) besiyeri, çoğu zaman tüberküloz kültürü için kullanılan besiyeridir. Mtb'nin gelişimi gliserol içeren LJ besiyerinde teşvik edilirken, *Mycobacterium bovis*'in gelişimi gliserin içermeyen ancak piruvat içeren LJ karışımında teşvik edilir. Gliserol LJ besiyerinde mevcut değildir (Alexander *et al.* 2012).



Şekil 2.2 Kültür (Bento *et al.* 2021)

2.6 İlaçlarla İlişkin Testler

Laboratuvarda ilaç direnci taraması, yürütülmesi ve standardize edilmesi en zor işlemlerden biridir. Yüzde tekniği, mutlak konsantrasyon yöntemi (MIC yöntemi) ve direnç yöntemleri, bakterilerin belirli bir ilaca karşı duyarlı olup olmadığını tespit etme sürecinde kullanılan üç temel yaklaşım olarak önerilmiştir. Standardize edildiklerinde ve uygun şekilde uygulandıklarında her üç yaklaşımın da eşit derecede etkili olduğu gösterilmiştir. RNTCP kapsamında kullanım için yüzde yaklaşımı önerilmektedir çünkü önemli sayıda laboratuvar bu tekniği DST ile kullanım için uyumlu hale getirmiştir (Alexander *et al.* 2012).

2.6.1 Moleküler tanı

Son on yıl boyunca, teşhis laboratuvarı, oluşturulan temelin işlenmesini çok daha verimli hale getiren bir dizi önemli değişikliği hayata geçirmiştir. Mikroskopi ve üreme hala dünya çapında TB laboratuvar tanı sürecinin temel direkleri olmasına rağmen, son yirmi yılda moleküler tanı testleri gibi yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. İmmünoassaylerin çoğu iki ana alanda yoğunlaşmıştır: (i) PCR gibi amplikon yöntemleri kullanılarak Mtb'ye özgü nükleik asitlerin tanımlanması, (ii) sekanslama

veya nükleik asit hibridizasyonu kullanılarak antitüberküloz ilaçlara karşı dirençle bağlantılı gen mutasyonlarının saptanması (Juréen *et al.* 2008).

Mikobakterilerin 16S rRNA gen dizisi verileri veya oligohibridizasyon ve stres tiplemesi ile Mtb morfolojik karakterlerinin vurgulanması ve farmakogenetik modellerin tespit edilmesine ek olarak, bu çalışmanın basit ve ana katkısındaki son olaylar bu ilerlemelere katkıda bulunmaktadır. Genel olarak, genom istikrarsızlığı ile genomun korunması arasında bir denge kurulması evrim, tür çeşitliliği ve direnç gelişimi için temel teşkil etmektedir. Aynı zamanda, yarı otomatik kültür tekniklerinin kullanımının, klinik örneklerin mikobakteriyel incelemesinde gelişmiş bir hassasiyete ve kısaltılmış bir geri dönüşe önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2013).

Bu gelişmeler, tanı süreci üzerindeki etkileri nedeniyle çocuklarda TB tanısı koyma açısından özellikle önemlidir. Bununla birlikte, yeni tespit yöntemlerinin etkilerini değerlendirmek ve maliyet etkin olup olmadıklarını belirlemek için daha fazla temel ve uygulamalı araştırma yapılmalıdır. Ayrıca, tıbbi ve laboratuvar hizmetlerinin test bulgularına zamanında tepki vermesini mümkün kılmak için yeni teşhis yöntemlerini değerlendiren klinik çalışmaların planlanması ve kalitesinde iyileştirmeler yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, yeni tanı yöntemlerinin gelişmiş ülkelerin ulusal TB kontrol çabalarına faydalı bir şekilde dahil edilebilmesi için önemli ek çalışmaların yapılması gerekmektedir (Alexander *et al.* 2012).

2.6.2 Xpert cihazı

MTB/RIF testi, TB hastalığının ve ilaç direncinin hızlı bir şekilde belirlenmesine yardımcı olan devrim niteliğinde bir testtir. Test, 60 dkdan kısa bir süre içinde hastanın rifampin ve *M. tuberculosis* kompleksine (MTBC) dirençli olup olmadığını belirleyebilmektedir. Buna karşılık, sıradan kültürlerde MTBC'nin üremesi iki ila altı hafta sürebilir ve tipik ilaç direnci testi bu zaman dilimine üç hafta daha ekleyebilir. Testin sağladığı veriler, tedavi süreçlerinin belirlenmesinde ve enfeksiyon yönetimine ilişkin kararların zamanında alınmasında yardımcı olmaktadır (Warrier *et al.* 2016).



Şekil 2.3 Xpert MTB/RIF cihazı (Rani *et al.* 2017)

Buna ek olarak, şüpheli çoklu ilaç direnci vakalarını hızlı bir şekilde belirleme yeteneğine sahiptir. En güçlü antitüberküloz ilaçlarından ikisi olan izoniazid (INH) ve rifampisin (RIF), bazı tüberküloz suşlarına karşı etkisizdir. RIF'e direnç, çok ilaca dirençli tüberkülozun (MDR TB) bir öngörücüsüdür çünkü vakaların çoğunda RIF'e direnç INH'ye duyarlılıkla birlikte bulunur. Diğer ilaç duyarlılık testi yöntemlerinin bulgularını beklemekle karşılaştırıldığında, tüberküloz hastalarında RIF direncinin hızlı bir şekilde tespit edilmesi, muhtemelen etkili tedaviye çok daha erken başlamalarını sağlayabilir (Simons *et al.* 2013).

Xpert MTB/RIF testinin bulguları, numunede MTBC bulunup bulunmadığını belirlemek için bilgi sağlar. Sonuç, belirli koşullar altında 'geçersiz' olarak değerlendirilebilir ve bu durumda testin bir kez daha yapılması gerekir. MTBC bulunması durumunda, bulgular organizmanın RIF'e dirençli olup olmadığını gösterebilir (Simons *et al.* 2013).

2.6.3 Tespit edilen RIF direnci

RIF direnci için test yapılırken, hem MTBC hem de RIF direnci için pozitif olan sonuçlar, bakterilerin RIF'e dirençli olma olasılığının yüksek olduğunu gösterir. Bu durum, başka bir hızlı test bataryası ile doğrulanmalıdır. RIF direnci doğrulanırsa, uygun bir tedavi rejiminin seçilebilmesi için her ikisine ve ilk ikinci basamak ilaçlara karşı antimikrobiyal direnç için moleküler tanı kontrolü yapılmalıdır. RIF direnci teyit edilmemişse, her ikisine karşı kemorezistans için hızlı tanı taraması yapılmamalıdır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), halk sağlığı laboratuvarlarına ücretsiz hızlı moleküler ilaç direnci testi (MDDR) hizmetleri sunmaktadır (Alexander *et al.* 2012).

2.6.4 Tespit edilemeyen RIF direnci

MTBC için pozitif ancak RIF direnci için negatif sonuçlar, mikropların büyük olasılıkla antimikrobiyal ajan RIF'e duyarlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, birinci basamak TB ilaçları için üremeye dayalı kalitatif tespit, Mtb için pozitif çıkan tüm numunelerde yapılmalıdır (Simons *et al.* 2013).

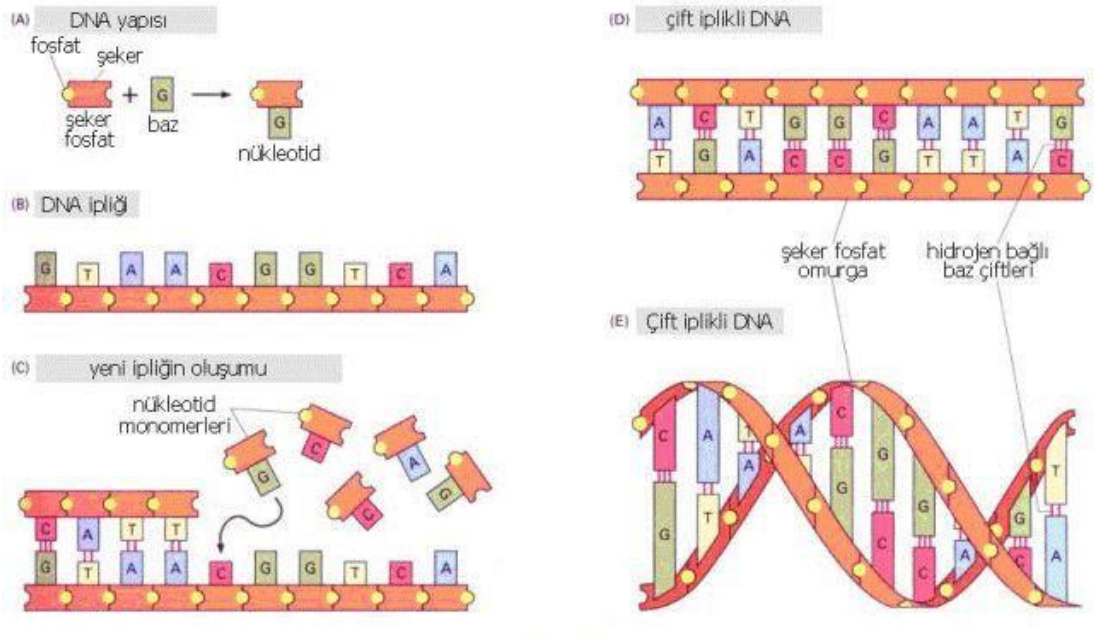
2.6.5 Çizgi probu deneyleri (LPA) sistemi

LPA (Çizgi Probu Tahlili), üretici tarafından sağlanan metodolojiye uygun olarak gerçekleştirilir. Bu test, DNA sıyırma tekniğine dayanır ve DNA ekstraksiyonu, multipleks PCR çoğaltımı ve ters hibridizasyon olmak üzere üç aşamadan oluşur. Her bir adım sırasıyla gerçekleştirilir ve bu süreçlerde Dünya Sağlık Örgütü'ne göre takip edilir (Okamoto *et al.* 2007).

Yaklaşım üç aşamadan oluşmuştur: birincisi DNA'nın ekstraksiyonu, ikincisi multipleks PCR replikasyonu (Şekil 2.6) ve üçüncüsü de ters hibridizasyon olarak belirlenmiştir. Tüpten çıkarıldıktan sonra DNA şeridi örnek sayısına göre etiketlenmiştir. Bundan sonra, 20 L eşleşen amplikon testi içeren her bir kuyucuğa

renkli bileşen yukarı bakacak şekilde dökülmüştür. Kuyu iki inkübatörün içine yerleştirildikten sonra hibridizasyon işlemi başlatılmıştır. Hibridizasyon işlemi, hibridizasyon tamponunun 15 dk boyunca twincubator makinesi içindeki bir su banyosunda 45 ºC ısıtılmasıyla başlamıştır (Gillespie 2002).

Kullanılan tepsinin her bir kuyucuğuna 20 L miktarında denatüre edici çözelti pipetlenmiştir. Bundan sonra karışım 1 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kuyu çıkarıldıktan sonra, bu amaç için tasarlanmış bir solüsyon kullanılarak temizlenmiştir. Her bir kuyucuğa bir mL konjugat eklendikten sonra otuz dk inkübe edilmiş, ardından çekilmiş ve durulama solüsyonu ile temizlenmiştir. Her şey söylenip yapıldıktan sonra, kuyucuğa 1 ml substrat eklenmiş ve distile su kullanılarak iki kez temizlenmeden önce on dk inkübasyona bırakılmıştır. Şeritlerin havada kurumasına izin verildikten sonra bulgular makinede taranmış ve Mycobacterium tuberculosis'in tespit edildiği, dirençli olduğu, duyarlı olduğu ya da geçersiz olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (Finken *et al.* 1993).



Şekil 2.4 DNA`nın replikasyonu (Msxlabs 2016)

Iraklı hastalarda TB ve Mtb kemorezistansının hızlı bir şekilde tanımlanması için bir LPA olan TB ilaç direncinin tespit doğruluğu incelenmiştir. Bu LPA hem klinik hem de

araştırma ortamlarında kullanılabilir. Aktif TB için tanısal bir biyobelirteç olarak LPA kullanarak Mtb DNA'sını tanımlamak için, sürüntü örneklerinde önemli miktarda basil DNA'sı olması gerektiğini keşfedilmiştir. Balgam yayma mikroskopisi AFB varlığını ortaya koyan hastalarda duyarlılık %93 iken, balgam yayma mikroskopisi AFB varlığını ortaya koymayan hastalarda testin duyarlılığı sadece %23 olmuştur. RIF, INH, FQ ve SLI direncini belirleme duyarlılığı, değerlendirilen tüm ilaçlar için %90'dan olmuştur, ancak WHO hedef ürün profilleri, kültüre dayalı AST'nin referans standart olduğu varsayılarak optimum seviyelerde oluşturulmuştur. Birçok test turundan sonra bile, SLI ilaç direnci testlerinin dörtte birinden fazlasının bulguları belirsiz kalmıştır (Tan *et al.* 2014).

LPA'yı inceleyen daha önceki iki araştırmada, neredeyse yalnızca balgam yayma mikroskobu AFB varlığını ortaya koyan bireylerden alınan numuneler incelenmiştir. LPA RIF/INH'nin duyarlılığının, yayma mikroskopisinde fark edilebilir. AFB bulunan bireylerde MTB DNA'sını tanımlamak için yetersiz olduğunu keşfedilmiştir. Sonuç olarak, test bu hastalar için önerilmiştir.

RIF/INH stripinin klinik uygulamada kullanılmasının başlıca amacı ÇİD-TB ve RR-TB tespiti içindir. RIF için %84 ve INH karşıtlığı için %90'lık bir farkındalık, Genotype MTBDRplus VER 1.0 ve VER'e göre yetersiz kaliteyi göstermektedir (Gandhi *et al.* 2006). Ayrıca, bu değerlendirmelerdeki hastaların çoğunda AFB içeren balgam bulunmuştur (Mitchison 1979). İsviçre ve Güney Afrika'da yürütülen farklı bir araştırmada, GenID LPA testi balgam yayma mikroskopisinde tespit edilebilir AFB bulunan hastalardan alınan korunmuş balgam örneklerini analiz etmek için kullanılmıştır. Bu çalışma da aynı şekilde her üç şeridin de yüzde yüz özgüllüğe sahip olduğunu ortaya koymuştur (Migliori *et al.* 2012).

RIF direnci mevcut olduğunda, FQ direncinin tespiti, enfeksiyonu tedavi etmek için anti-TB ilaç rejimlerinin oluşturulması açısından özellikle önemlidir. Bu bulgu GenID sonuçlarına dayanmaktadır (Yang *et al.* 1998). Antimikrobiyal haricinde SLI artık tavsiye edilmese de, bu araştırmanın yapıldığı dönemde MDR/RR-TB tedavisinin önemli bir parçası olmuştur. Genotype MTBDRsl VER 1.0 kullanılarak toplam 1.639

denekle yapılan sekiz araştırmada, GenID SLI şeridi sırasıyla %87 ve %100'e kıyasla %75 duyarlılık ve %88 özgüllük göstermiştir (Yang *et al.* 1998).

Oga-Omenka *et al.* (2020) yaptıkları çalışma da, Afrika'daki koşullarda moleküler TB teşhislerinin eksikliği ve bu teşhislerin oluşturulması gerekliliğine ilişkin gerçek dünya durumu simüle etmişlerdir.. Hasta kayıtları, aylar süren bir eğitim döneminden ve bir pilot aşamadan sonra başlamıştır. Bununla birlikte, deneylerimizden güvenilir bulgular elde etmek için genellikle bunları birden fazla kez yapmak zorunda kalmışlardır. Testin, özellikle de GenID SLI LPA'nın yeniden yapılması mümkün olmasına rağmen, test büyük olasılıkla bant oluşumunun tamamlanmaması nedeniyle hatalı sonuçlar (%23) elde etmişlerdir. HIV/AIDS-pozitif hasta sayısının nispeten yüksek olmasının (kohort 1'de %73 ve kohort 2'de %49) testin performansı üzerinde bir etkisi olması olasılığını dikkate almışlardır (Oga-Omenka *et al.* 2020)

Spesifik olarak, FQ ve SLI'ya tolerans nadirdir ve verilerin yanlış yorumlanmasını önlemek için dikkatle okunması gerekir (Cavusoglu *et al.* 2001) ve henüz yayınlanmamış daha sonraki çalışmalardan bilindiği üzere, bu çalışmada RIF için daha sonra benimsenen 0,5 mg/L yerine 1,0 mg/L'lik bir kritik konsantrasyon kullanmış olmalarına rağmen, RIF karşıtlığını AST'den daha doğru tahmin etmiştir (Traore *et al.* 2000).

Lojistik ve mali kısıtlamalar nedeniyle, örneklem boyutunu genişletmek veya söz konusu numunelerin genom dizilimi ile fenotipik AST bulgularını doğrulamak mümkün olmamıştır. Bu durum, örneklem büyüklüğünü artırmaya çalışırken de geçerli olmuştur. Birkaç Mtb soyunun varlığının Mtb tespitini nasıl etkilediğini belirlemek mümkün olmamıştır. DNA bantlarının yorumlanmasına iki farklı okuyucu katkıda bulunmuştur; bununla birlikte, genellikle zayıf bant oluşumu, deneyimli şerit okuyucuların bile panellerden doğru okumalar almasını zorlaştırmaktadır. Doğru bulgular elde etmek için yapılması gereken çok sayıda tekrar testi, numunelerin laboratuvarda işlenmesi sırasında daha büyük bir hata olasılığı ile bağlantılı olabilir (Caws *et al.* 2006).

Tüberkülozda ilaç direnci hala büyük ölçüde insan müdahalesinin bir sonucudur. *M. tuberculosis*'te kendiliğinden meydana gelen gen değişikliklerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve mikropları en sık kullanılan anti-tüberküloz ilaçlara karşı dirençli hale getirmektedir. Öngörülen tedavi sürecine uyulmaması, bu fenomene katkıda bulunan birincil faktör olarak tanımlanmıştır. Tipik tüberküloz tedavisi altı ay boyunca dört ilacın alınmasını içerir. Ancak hastada MDR-TB varsa, bu tedavi 18 ila 24 aya kadar uzatılmalı ve ikinci basamak ilaçları da içermelidir (Alexander *et al.* 2012).

Bazı genlerin ifadesindeki değişikliklerin Mtb'de antibiyotik direncinin ortaya çıkmasıyla açıkça bağlantılı olmasına rağmen, ilaca dirençli suşların herhangi bir gelişme göstermediği çok sayıda örnek bulunmaktadır. Ayrıca, antibiyotik direnci ve gelişimi ile bağlantılı yeni alanları belirlemek için tüm genom dizilimini kullanan yakın tarihli bir araştırma, tüberküloz ilaç direncinin daha önce inanılandan daha karmaşık bir süreç olduğunu göstermiştir (Zhang *et al.* 2013). Ayrıca, efluks pompa sistemlerinin süreçleri ile klinik ilaç direncinin evrimi arasındaki ilişkinin ve varsa porinlerin doğuştan gelen dirençte oynadığı rolün daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu nedenle, şu anda erişilebilir olan anti-TB ilaçlarına karşı dirençli bakterilerin farklı yöntemlerine ilişkin anlayışımızı genişletmek çok önemli bir araştırma önceliğidir. Bu, tüberküloz bulaşmasının kinetiği ve tüberküloz için yeni tedavilerin araştırılması ve geliştirilmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir (Juréen *et al.* 2008).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyaller

3.1.1 Cihazlar

Cihazlar Çizelge 3.1.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları ve aletleri

Cihazlar	Üretici firma / Menşei
Otoklav	Hiryma üretim şirketi /Tokyo/Japonya
Santrifüj	Sigma, Harz/Almanya
Falcon tüpleri	BBL BD/ABD
Gen Xpert sistemi	Cepheid/ABD
GTQ Cycler 96	HainLifesscinence/ Almanya
İnkübatör	Memmert/Almanya
Inspissator	Memmert/Almanya
Işık mikroskobu	Olympus/Japonya
Mikropipet (1000µL)	Sigma, Harz/Almanya
Mikropipet (20- 200µL)	Gilson instrument/Fransa
Mikropipet (hassas ayarlanabilir ve sabit	Slamed /Almanya
farklı boyutlarda) ve uçlar	Bauokline /Almanya
Su banyosu sonorex	My Fugene, Çin
Mikro Spin Santrifüj	GOSONIC/Çin
Mikrodalga Fırın	Precision/Almanya
Sıcak hava fırını	Memmert/Germny/Fransa
Mera pipeti cam+ plastik	Ataco/Çin
pH metre	Biomax, Desaga, Heidel/Almanya
Soğutmalı santrifüj	Sigma, Harz/Almanya
Buzdolabı + derin dondurucu	Arçelik/Türkiye
Buzdolabı	National/Baglike
Rotatest çalkalayıcı	Luck Hum/İngiltere
Güvenlik kabini	Faster/Almanya
Vidalı kapaklı şişeler	Schott/Almanya

3.1.2 Kimyasallar, ortam ve boyalar

Uygulanan materyaller Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Çizelge 3.4 Kullanılan malzeme

Kimyasallar, ortamlar ve lekeler	Üretici firma / Menşei
Rifampisin, INH, ETH tozu	Hindistan
Levofloksasin, moksifloksasin	Hindistan
Lowenstein orta taban	Becton & Dickinso şirketi/ABD
Baryum klorür	B.D.H./ İNGILTERE
Karbol fuksin çözeltisi	B.D.H./ İNGILTERE
Disodyum hidrojen mono fosfat (Na2HPO4)	B.D.H./ İNGILTERE
Etanol mutlak	B.D.H./ İNGILTERE
Gliserol Çözeltisi	Scherman /İngiltere
Amikasin	Hindistan
Hidroklorik asit (HCI)	PGCC/ BIRLEŞIK KRALLIK
Lizozim	Promega/ ABD
Metilen mavisi çözeltisi	Scherman k/İngiltere
Sodyum hidroksit (NaOH)	Becton & Dickinso /ABD
Normal salin	Abdol /Mısır
Cider Yağı	Himedia/Hindistan
Fenol kristali	Loba Chemic/Hindistan
Proplean glikol çözeltisi	B.D.H./İNGILTERE
Sodyum hidroksit (NaOH)	Himedia/Hindistan
Sodyum hipoklorit	B.D.H./İNGILTERE
Sodyum klorür (NaCl)	B.D.H./İNGILTERE
Sülfürik asit	B.D.H./İNGILTERE

3.1.3 Kitlerin listesi

Araştırmamızda kullanılan kitler Çizelge 3.5'te sunulmuştur.

Çizelge 3.6 Kullanılan kitler

Kitler	Menşei	Kit katalog ve lot numaraları
Geno Type MTBDR Plus Kit	HainLifesscinence/Almanya	OV00216
Ziehl -Nelseen staining kit	B.D,H/İngiltere	8971/17a
Geno type MTBDRsl KIT	HAIN life science/ Almanya	AAX00089
Xpert MTB/RIF KIT	Cepheid/ABD	1000512302

3.1.4 Çalışma denekleri

Mayıs 2022 ve Kasım 2022 tarihleri arasında Bağdat'taki Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı prospektif ve kohort temelli olarak tasarlanan bir araştırma yürütmüştür. Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi amacıyla 150 tüberküloz hastası toplanmıştır (tüberküloz olduğundan şüphelenilen 3.250 kişiden 43'ü yakın zamanda kontrol edilmiş vakalardır ve 107'si geçmişte tüberküloz tedavisi görmüştür). Hastaların cinsiyet, yaş gibi bilgilerini içeren öyküleri alınmış ve her bir TB hastası için klinik durum ve AntiTB ilaç alım öyküsünü de içeren hasta listesi hazırlanmıştır. Tüm hastalar doğrudan muayene (AFB testi), kültür, orantılı DST, Gene-Xpert testi ve LPA tahlili gibi geleneksel yöntemlerle incelenmiştir.

3.2 Metod

3.2.1 Örneklerin toplanması

Her hastadan günün erken saatlerinde temiz, şeffaf ve kırılmaz infüzyon kutuları kullanılarak beş mL balgam örneği alınmıştır. Kaplar ayrıca sıkıca oturan bir kapağa ve drenaj için geniş bir açıklığa sahipti. Tüm klinik numuneler, doğrudan muayene, Gen Xpert analizi, kültür ve DST'nin yanı sıra Xpert MTB/RIF Ultra incelemesi için yedi ve hat probu testi için yirmi dört numuneden oluşan testler için laboratuvara gönderilmiştir.

3.2.2 Güvenlik ve dezenfektasyon

Tüm bakteri testleri biyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir. Biyolojik kabini sterilize etmek için ultraviyole ışık (UV) kullanılmış ve mikobakterilerin aerosol ile kontaminasyonunu ve yayılmasını önlemek ve yüzeylerdeki yabancı DNA'yı yok etmek için sıkı aseptik koşullar altında yapılmıştır.

Laboratuvar çalışmaları boyunca eldiven ve maske (N 95) kullanılmıştır. Çalışma

masalarını ve davlumbazı dezenfekte etmek ve sterilize etmek için %70'lik etanol alkol kullanılmıştır. Otoklav 121°C'de 15 psi (inç kare başına pound) basınçla 20 dk boyunca tüm kültür ortamlarını, normal salin, tampon ve distile suyu sterilize etmek için kullanılmıştır. Tüm cam kapları sterilize etmek için 200 °C'de 2 saat süreyle sıcak hava fırını kullanılmıştır.

3.3 Laboratuvar Yöntemleri

3.3.1 Balgam incelemesi için geleneksel yöntemler

Prensip: Ziehl-Neelson boyası olarak bilinen bakteriyolojik bir boya, çoğunlukla mikobakteriler olmak üzere aside dirençli organizmaları tespit etmek için kullanılan hızlı bir prosedürdür. Tüberküloz gibi aside dirençli organizmaların hücre duvarları, organizmaların lipid çift katmanlı olmaması nedeniyle önemli miktarda lipid bileşikleri içerir. Bu asitler, G boyası gibi diğer teknikler kullanılarak yapıldığında boyamaya dirençlidir (Anmar 2016).

Prosedür:

- Örnekler lam üzerine yaklaşık 1 ½ cm x1 cm boyutlarında yayılmıştır.
- Lam yayması 10 dk boyunca havada kurutuldu ve ardından filtre kağıdıyla süzülen ve lamın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde dökülen karbol fuksin ile ıslatılmıştır.
- Her lam %3 asit alkol ile 2 dk boyunca ya da artık renk görünmeyene kadar boyanmıştır.
- Lamlar musluk suyu ile durulanmış ve ardından metilen mavisi boyası ile boyanmıştır.
- Lamlar 1 dk bekletilmiş ve musluk suyuyla durulanmıştır.
- Lamlar kuru olmalıdır.

Lam yağa batırılarak mikroskop altında (100X) iki yatay çizgi ya da üç dikey çizgi ile en az 300 alan okunacak şekilde incelenmiştir. Pozitif veya negatif olarak kaydedilen

sonuçlar *Mycobacterium tuberculosis* mavi arka çevresi ile kırmızı görünür (Al-Jebouri and Wahid 2013).

3.3.2 Molekül tespiti

Gene Xpert sistemi, PTB hastalarının 106 balgam örneğine uygulanmış, 63 örnek pozitif ancak rifampisin için hassas, 43 örnek ise pozitif ve rifampisin için dirençli bulunmuştur.

Reaktifler: Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.7 GeneXpert (Cephid) sistemi reaktifi

Reaktifler	Miktarlar
Tris Tampon, EDTA	Kartuş başına 4 mL
Örnek reaktifi (sodyum hidroksit ve izopropanol)	10 adet 8 mL şişe

Prosedür:

- Numunelerin kimlikleri her bir Xpert MTB/RMP kartuşuna yapıştırılan etiketlere yazılmıştır.
- Steril bir transfer pipeti kullanılarak materyalin bir mLsi Xpert MTB/RMP ile analiz edilmek üzere vidalı kapaklı konik bir tüpe aktarılmıştır.
- Steril bir transfer pipeti eklenerek bir mL numuneye bir mL numune eklenmiş ve iki hacim 10 ila 20 kez şiddetli bir şekilde karıştırılmıştır.
- Numune oda sıcaklığında on beş dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sırasında beş ila on dk geçtikten sonra materyal üzerinde yaklaşık on ila yirmi hızlı vorteks dönüşü gerçekleştirilmiştir.
- Sıvılaştırılmış numune, menisküs minimal eşiğin üzerine çıkana kadar tedarik edilen steril transfer pipeti kullanılarak transfer pipetine aspire edilmiştir.
- Kartuşun kapağı çıkarılmış ve numune Xpert MTB/RMP kartuşunun açık portuna yerleştirilmiştir. Ardından aerosol oluşma olasılığını azaltmak için çözelti yavaşça dökülmüştür. Kanıtlar ekte bulunabilir.

- Kartuşun kapağı kapalı konumdaydı.
- Önce bilgisayara güç verildi ve ardından cihaz etkinleştirildi.
- Windows masaüstünde bulunan kolayca kumandasına çift tıklama yapılmıştır.
- Kullanıcı adı ve şifre girildikten sonra yazılıma başarılı bir şekilde giriş yapılmıştır.

- Penceredeki "test oluştur" simgesi seçilmiş ve tıklanmıştır. Kartuş Barkodunu Tara etiketli iletişim penceresi görüntülenmiştir.
- Kartuş üzerinde bulunan barkod üzerinde bir tarama gerçekleştirildi. Şimdi "test oluştur" etiketli pencere görüntülenmiştir.
- Öğe kimliği taranmış ve bunun için belirlenmiş kutuya girilmiştir.
- Testi başlat başlıklı bir simge seçilmiş ve tıklanmıştır.

Ekipmanın kapağı 2 saat sonra açılmış ve veriler ekte ayrıntılı olarak açıklandığı şekilde analiz edilmiştir (Boehme *et al.* 2010).

Sonuçların yorumlanması:

- *Mycobacterium tuberculosis*'in Hedef DNA'sı tanımlanmıştır.
- RMP direncine dair herhangi bir kanıt yoktur; ayrıca *rpoB* geninde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.
- RMP direncinin tespit edilmesine yol açan *rpoB* geninde bir değişiklik bulunmuştur.
- Tanımlayıcı faktörde RMP direnci: Mtb konsantrasyonu çok düşüktü, bu da direncin hesaplanamadığı anlamına geliyordu.
- Mtb bulunamamıştır ve hedef DNA'sı da bulunamamıştır.

3.3.3 Kültür

Yumurta bazlı bir besiyeri olan katı besiyerinin (LJ gibi) avantajları şunlardır:

- Basittir, hazırlaması kolaydır ve maliyeti uygundur.
- Diğer mikroorganizmaların büyümesini inhibe eder ve böylece kontaminasyonu

azaltır.

- *Mycobacterium tuberculosis* için izole edilmiş koloniler ve morfoloji gözlemlenebilir ve diğer suşlardan birincil olarak ayırt edilebilir.

LJ tuz hazırlama yöntemiyle veya kullanıma hazır toz olarak hazırlanabileceği gibi hazır besiyeri şişeleri olarak da elde edilebilir.

Toz LJ ortam hazırlama:

Bu çalışmada, 37,2 g kullanıma hazır toz 600 mL ilave suda (PH=7) 12 ml gliserol ile süspanse edilmiştir. Karışım 121 Cº'de 15 dk boyunca otoklavda sterilize edildikten sonra 45-60ºC'ye soğutulmuştur.

Yumurta çözeltisi hazırlama (1L):

Taze yumurtalar kullanılmıştır; yumurta fırça ile iyice yıkanmış ve 30 dk boyunca sıvı temizleyicide (%5) sıçramış, daha sonra su ile yıkanmış ve temiz bir bezle kurutulmuştur. Yumurtalar, steril kaşıkla taze olduklarından emin olmak için petri kabına bağımsız olarak eklenebilir, dezenfekte edilmiş şişe, karıştırılabilir ve sanitize edilmiş boru kullanılarak çok katmanlı temizlenmiş sargıdan geçirilebilir.

Malakit Yeşili Çözeltisi (2%):

İki g malaşit yeşili tozu 100 mL steril ilave suya eklenmiş ve ardından 30 dk boyunca su banyosunda çözülmüştür.

Ortam hazırlama:

1 L yumurta karışımına 20 mL malaşit yeşili (%2) eklenmiş ve soğuduktan sonra tuz çözeltisine ilave edilerek karıştırılmıştır. 6 ml besiyeri daha sonra sterilize edilmiş vidalı kapaklı şişelere (üniversal) dağıtılmıştır. Şişeler 45-50 dk boyunca 80-85°C'de eğimli

konumda inspissatöre yerleştirilmiştir. Hava kabarcığı oluşumunu önlemek için inspissatörün sıcaklığı 85°C'den fazla olmamalıdır.

Akciğer örneklerinin katı besiyerinde (LJ) yetiştirilmesi prosedürü:

Numune ekimi, petroff dekontaminasyon yöntemine göre yapılmıştır.

Bununla birlikte, laboratuvar tüberküloz merkezinde (DST) tahmini için birçok yöntem vardı. Bu çalışmada, orantılı yöntem kullanılmış, LJ besiyeri hazırlanmış ve 4 steril volümetrik şişeye (her biri için 200 mL) eklenmiş ve farklı hacimlerde antibiyotik ile karıştırılmıştır.

Antibiyotik içeren besiyerlerinin hazırlanması:

DST için antibiyotik preparatları:

Rifampisin preparatı (RMP):

- Stok çözelti: 2,5 mL etilen glikol içine 0,01 mg RMP eklenir ve karışım 70 °C'de su banyosunda yapılmıştır
- Stok çözeltinin 2 mL'si 200 mL LJ besiyerine konur.

  İlacın LJ besiyerindeki nihai konsantrasyonu 40 µg/mL olmuştur.

  İzoniazid hazırlama (INH):

- Stok çözelti: 20 mL steril distile su içine 0,2 mg INH eklenmesi.
- Çözelti A: 0,5 mL stok çözeltinin 4,5 mL steril distile suda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.
- Çözelti B: 0,5 mL çözelti A'nın 4,5 mL steril distile suda seyreltilmesiyle

hazırlanmıştır.

- Çözelti 0,4 mL miktarında 200 mL LJ besiyerine karıştırılır; LJ besiyerindeki toplam ilaç miktarı 0,2 µg/mL'dir.

Streptomisin hazırlama (STR)

- Stok çözelti: 0,2 mg SMP'nin 20 mL steril distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.
- Çözelti A: 0,5 mL stok çözeltinin 4,5 mL steril distile suda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır
- Çözelti B: 2 mL stok çözeltinin 2 mL steril distile suda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır

1,6 mL A çözeltisi 200 mL LJ besiyeri ile karıştırıldığında, LJ besiyerindeki toplam ilaç miktarı 4 µg/mL olmuştur.

Etambutol hazırlama (ETH):

- Stok çözelti: 0,2 mg EMP'nin 20 mL sterilize distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.
- Çözelti A: 0,5 mL stok çözeltinin 4,5 mL steril distile suda seyreltilmesiyle hazırlanımıştır.
- Çözelti B: 0,5 mL çözelti A'nın 4,5 mL steril distile suda seyreltilmesiyle hazırlanımıştır.
- 4 mL B çözeltisi 200 mL LJ besiyeri ile karıştırılır, toplam miktar 2 µg/mL olur.

Besiyeri karışımı eğimli pozisyon için vidalı kapaklı bir şişeye eklenmiş ve 85°C'de 45 dk boyunca karıştırılmıştır.

McFarland çözeltisi (1mg/mL) konsantrasyonlu kültür süspansiyonundaki bakteri

hücrelerinin sayısını tahmin etmek için kullanılır, tampon 1 3 x 108 hücre/mL'ye eşittir. Tampon 2 ise 1x108 hücre/ml'ye eşittir ve aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (Menkhi 2015):

İlk olarak: 1,175 g hidratlı baryum klorür ($BaCl_2H_2O$) 100 mL damıtık suda çözülür.

İkinci olarak: 100 mL damıtık suya 1 mL konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) eklenmiştir.

Tampon 1: 9,9 mL H_2SO_4'e 0,1 mL $BaCl_2$ eklenmiştir.

Tampon 2: 9,95 mL H_2SO_4 üzerine 0,5 mL $BaCl_2$ eklenmiştir.

1 mg/mL *Mycobacterium* süspansiyonu taze koloniden (1 aydan daha az) 1mL distile suya bir loop dolusu kültür üremesi eklenerek hazırlanmıştır, süspansiyonun bulanıklığı 0,5 Mcfarland stander'a ayarlanmalıdır. Kültür için gerekli dilüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlanır:

Beş adet sterilize edilmiş test tüpü alınmıştır. Her tüpe 4,5 mL sterilize distile su konur. Bakteri süspansiyonundan 15 dk sonra 0,5 mL alınır ve tüp 1'e eklenir; tüp 1'den aynı miktar alınır ve tüp 2'ye eklenir ve bu şekilde tüp 5'e kadar devam edilir ve son 0,5 mL atılır. Beş seri dilüsyon hazırlanmıştır. Tüpler (2, 4) atılmış ve seyreltici tüpleri (1, 3, 5) kullanılmak üzere saklanmıştır. Seyreltici tüplerinden 0,1 mL alınmış ve vidalı kapaklı şişedeki ilaçlı (RIF, SM, EMB, INH) LJ besiyerine ve 37°C, 3-4 hafta inkübe edilen ilaçsız LJ besiyerine (kalite kontrol olarak) eklenmiştir.

3.3.4 Moleküler tanı yöntemleri

Gene Xpert sistemi, PCR ve PCR'nin ters transkripsiyonunu kullanarak zor numuneler için numune hazırlama sürecini entegre edebilir ve basitleştirebilir (Floyd *et al.* 2018).

Ultra, pediyatrik, ekstrapulmoner ve pulmoner örneklerde TB ve rifampisin direncini

belirlemek için kullanılır. En güncel yükseltilmiş versiyonu, öncekinden daha doğrudur ve yakın zamanda Dünya Sağlık Örgütü tarafından kullanım için onaylanmıştır (Lin *et al.* 2018).

Bu test, Mtb'nin *rpoB* geninin yanı sıra rifampine direnç kazandırabilecek ilgili mutasyonları arayan bir nükleik asit amplifikasyonudur. Dünya Sağlık Örgütü 2010 yılında bu testin akciğer ve şüpheli TB tespitinde kullanılmasına onay vermiştir.2017 yılının Mart ayında Dünya Sağlık Örgütü yeni nesil Xpert'e onay vermiştir. *IS6110* ve *IS1081* genleri olmak üzere iki ekstra hibridizasyon hedefine ve daha büyük bir reaksiyon odasına sahiptir; bu üç özellik birlikte analitik hassasiyeti yaklaşık 8 katına çıkarmaktadır. Artan hassasiyet seviyeleri gösteren bir dizi araştırma, akciğer örneklerinde *M. tuberculosis* tespiti konusunda yapılmıştır (Chin *et al.* 2019).

İlaca dirençli tüberkülozu olan yedi hastaya test için Xthis kiti verildi ve tüm bulguları RIF direnci açısından pozitif çıkmıştır.

DNA-strep olarak bilinen teknik, MTBDR plustestinin temelini oluşturur. Tüm süreç şu üç aşamaya ayrılmıştır:

- DNA'nın ekim için kullanılan ortamdan uzaklaştırılması.
- Multipleks bir ortamda biyotinlenmiş primerler kullanılarak yapılan bir amplifikasyon.
- Ters yönde hibridizasyon.

Amplifikasyon sürecinde, her biri hem A hem de B amplifikasyon karışımlarına (AM-A ve AM-B) dahil edilen polimeraz ve primerler dahil olmak üzere her bileşen kullanılmıştır. Membran şeritlerini kaplamak için üretilen nükleik asitlere eşdeğer spesifik problar kullanılmıştır. Tek sarmallı amplikonlar problara ancak kimyasal olarak denatüre edildikten (hibridizasyon) sonra bağlanır (Ling *et al.* 2008).

LJ ortamı DNA inaktivasyonu ve pozitif Lowenstein tüplerinden ekstraksiyon:

- 1,5 ml'lik tüpe (eppendorf tüpü) 1 mL D.W. konulmuştur.
- Bakteri kolonileri 2, 3 tüpten ilmekle alınmıştır ve D.W. tüpünde çözülmüştür.
- Tüp daha sonra 95°C'de 30 dk termomiksere yerleştirilmiştir.
- İnaktif bakteri tüpü daha sonra 12 dk boyunca ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiştir.
- Daha sonra tüp 4°C'de 13000 tur/dk ile 10 dk santrifüje yerleştirimiştir.
- DNA içeren süpernatant alınmış ve 1,5 ml'lik tüpe konmuş, geri kalanı ise atılmıştır.
- DNA ürünü 20°C'de saklanmıştır.

PCR Amplifikasyonu:

NRL'de DST ile DR tanısı konulan 23 MTB kompleksi izolatı için çizgi probu analizleri gerçekleştirilmiştir. DNA hazırlama yöntemi tarif edilmiştir. Her izolat için, PCR amplifikasyon karışımı (45µl) üreticinin talimatına göre hazırlanmıştır, PCR karışımı 10µl (AM-A), 35µl (AM-B), 5µl şablon içermektedir DNA eklendikten sonra, toplam hacim 50 ul'ye getirilmiş ve karşılaştırma olarak 5 ul steril filtrelenmiş su içeren bir boş örnek kullanılmıştır (3-5).

Çizelge 3.8 PCR Amplifikasyonu

MTBDRplus testi	**Miktar (µL)**
Amplifikasyon karışımları A(AM-A)	10
Amplifikasyon karışımları B (AM-B)	35
DNA	5
Son hacim	50

Termo-döngü koşulu, 95°C'de 15 dk boyunca denatüre proteinlerden oluşan bir başlangıç döngüsünün ardından 25 sn boyunca 95°C'de 30 döngü, 40 sn boyunca 50°C ve 40 sn boyunca 70°C bağlanma ve son olarak 8 dk boyunca 70°C son bir uzatma adımından oluşur (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.9 PCR döngüleri progı

Aşama	Sıcaklık (C^o)	Süre	Döngü
1	95	15 dk	1
2	95	25 sn	30
	50	40 sn	
	70	40 sn	
3	70	8 dk	1

Hibritleşme:

a. Hazırlık

Çözeltilerden herhangi birini kullanmadan önce TwinCubator çalıştırılmış, hibridizasyon tamponu (HYB) ve sıkı yıkama çözeltisi (STR) 45°C'ye getirilmiş ve denatürasyon çözeltisi (DEN), durulama çözeltisi (RIN), konjugat tamponu (CON-D) ve substrat tamponu (SUB-D) dahil olmak üzere diğer çözeltiler oda sıcaklığına getirilmiştir. Hem konjugat konsantre çözeltisi (CON-C) hem de substrat konsantre çözeltisi (SUB-C) uygun tamponlarıyla 1:100 oranında seyreltilmiştir.

b. Hibritleşme

- Denatürasyon solüsyonundan (DEN) 20 µL özel tepsinin kuyucuklarının bir köşesine dağıtılmıştır.
- PCR ürününden 20 µL DEN solüsyonuna eklenmiş, karışım pipetle aşağı yukarı karıştırılmış ve tepsi oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Bu sırada, tüpten cımbızla alınan şeritler, renkli işaretleyicinin altındaki mavi / kırmızı / yeşilin sol tarafındaki hibridizasyon için kurşun kalemle örnek numaraları ile işaretlenmiştir.

- Etiketlenmiş şeritler tepsideki her bir kuyucuğa örnek numaralarına göre yerleştirilmiştir ve şeritlerin hibridizasyon solüsyonu tarafından tamamen daldırıldığından emin olunmalıdır.
- Tepsi TwinCubator'a yerleştirilmiş ve 300-350 tur/dk çalkalayıcıda 45°C'de 30 dk

inkübe edilmiştir.

- Vakum pompası ile HYB tamamen aspire edilmiştir.
- Her şeride bir mL STR eklendi ve tepsi TwinCubator'da 300-350'de çalkalanarak 45 °C'de 15 dk inkübe edilmiştir.
- STR tamamen uzaklaştırılmıştır.
- Her şerit TwinCubator'da RT'de 1 dk boyunca 1 mL RIN ile yıkanmıştır (inkübasyondan sonra RIN dökülmüştür).
- Her şeride bir ml seyreltilmiş konjugat eklenmiş ve TwinCubator'da RT'de 30 dk boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- Çözelti uzaklaştırılmış ve her bir şerit TwinCubator'da 1mL RIN ile 1 dk süreyle iki kez ve 1ml distile su ile 1 dk süreyle bir kez yıkanmıştır (çözelti her seferinde uzaklaştırılmıştır).
- Her bir şeride bir ml seyreltilmiş substrat eklenmiş ve çalkalanmadan alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunarak inkübe edilmiştir (inkübasyon süresi bantlar açıkça görülene kadar 6-25 dk arasında değişmektedir).

Sonuçların Yorumunun Değerlendirilmesi:

Hibridize edilmiş şeritler verilen bir değerlendirme kağıdına yapıştırılmış, pozitif sinyaller kaydedilmiş ve türler yine verilen bir yorumlama Çizelgesu yardımıyla tanımlanmıştır. Her LPA bandında altı standarttan oluşan toplam 27 yanıt bölgesi (bant) vardı. Yabani tip bir grubun olmaması ya da mutant bir bandın varlığı dirençli bir türün varlığının kanıtı olarak görülmüştür. *RIF* ve/veya *INH* genlerinde kısmi amplifikasyon varsa, sonuçların geçersiz olduğu düşünülmüştyür (Anek-vorapong *et al.* 2010, Yadav *et al.* 2013, Albert *et al.* 2010).

DNA inaktivasyonu ve ekstrasyonu:

Farklı örnek türlerinden DNA inaktivasyonu ve ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler bulunmaktadır (örneğin pozitif LJ tüplerinden veya sedimanlardan ve doğal olarak sedimanlardan DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak kimyasal DNA ekstraksiyonu). Bu

çalışmada, büyük miktarda DNA elde edilen fiziksel bir yöntem (LPA ekstraksiyon adımında açıklandığı gibi pozitif LJ tüplerinden DNA inaktivasyonu ve ekstraksiyonu) kullanılmıştır, ancak eşlik eden döküntüler, ürünün jel elektroforezi ile incelenmesinden önce bir kez daha geleneksel PCR adımıyla çoğaltılmadan önce DNA saflaştırma gereksinimine neden olmaktadır.

DNA Saflaştırma Yöntemi:

Daha önce açıklanan yöntemle ekstrakte edilen DNA aşağıdaki şekilde saflaştırılmıştır:

- Saflaştırılacak DNA çözeltisi 1,5 mL sıvı içeren bir mikrosantrifüj tüpüne eşit miktarda fenol, kloroform ve izoamil alkol konmuştur.
- Karışımı on saniye boyunca hızlıca karıştırın, ardından oda sıcaklığındayken on beş saniye boyunca mikrosantrifüjlenmiştir.
- Karışımın üst kısmında bulunan ve DNA'yı içeren sulu faz, 200 mikrolitre kapasiteli bir pipetör kullanılarak dikkatlice ekstrakte edilmiş ve yeni bir tüpe taşınmıştır. Sulu ve organik fazlar arasındaki arayüzde beyaz bir çökelti varsa organik katmanın yeniden ekstrakte edilmesi ve sulu fazların havuzlanması gerekir.
- DNA içeren çözeltiye pH'ı 5,2 ve konsantrasyonu 3M olan bir hacim sodyum asetat eklenmiştir. Bundan sonra, çözelti ya vortekslenerek ya da tüpe parmakla birkaç kez hızlıca vurularak hızla karıştırılmıştır.
- Tuz eklendikten sonra iki ila 2,5 hacim buz gibi soğuk %100 alkol eklenmiştir (hacim tuz uygulandıktan sonra tahmin edilmiştir). Vorteksleme hareketi kullanılarak karıştırıldıktan sonra, bileşenler en az beş dk boyunca kırık kuru buza daldırılmıştır.
- Çözelti, beş dk süreyle ayarlanmış bir açıyla mikrosantrifüjde yüksek hızda döndürüldükten sonra süpernatant atılmıştır.
- Oda sıcaklığında, %70 konsantrasyona sahip 1 ml hacminde etanol eklenmiştir Adım 6'daki mikrosantrifüj prosedürü uygulandıktan sonra tüp birçok kez ters çevrilmiştir.
- Numuneden süpernatant alınmıştır Öğenin havada kuruması için 15 dk ayrılmıştır

- DNA peleti 100 mikrolitreye eşit hacimde ultra saf su içinde yeniden süspanse edilmiştir

Ek olarak, DNA için moleküler ağırlık belirteci kuyucuklardan birine yerleştirilmiştir. İncelenen DNA örnekleri ve yükleme boyası uygun oranlarda nazikçe karıştırıldıktan sonra, içerikler daha sonra oluşturulmuş kuyucuklara yerleştirilmiştir. DNA bir elektrik alanı altında çözülmeye çalışılırken, güç kaynağında güç tipik olarak 60 volta ayarlanmıştır. Elektroforezin ardından sonuçlar bir trans-tor (NCFBI 2020) üzerinde ultraviyole (UV) ışık kullanılarak bantlar halinde görüldükten sonra fotoğraflanmıştır Çizelge 3.10 .

Çizelge 3.11 Bu çalışmada kullanılan primerler şunlardır (Huard *et al.* 2003)

Primer tipi ve hedef lokus	Primer adı	Nükleotid dizisi	Lokasyon	Boyut (bp)
katG203	katG203F	TC3 GCC ATG GGT CTT ACC GAA AGT GTG 3	2155273-302	370
rpoB	*rpoB*F	TCA AGG AGA AGC GCT ACG A- 3	760688-706	359

3.4 İstatistiksel Analiz

Verilerin girişi ve analizi için SPSS 2016 sürümü kullanılmıştır. Sayısal verilerin yanı sıra yüzdeler ve ayrık değişkenlerin diğer sayısal gösterimleri, uygun olduğu şekilde hesaplanmıştır. Ayrık değişkenler arasındaki ilişkinin önemini belirlemek için bağımsızlık testi olan ki kare testi kullanılmıştır. Bulgular, P değeri 0.05 veya daha düşük ise anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Ahmad *et al.* 2007).

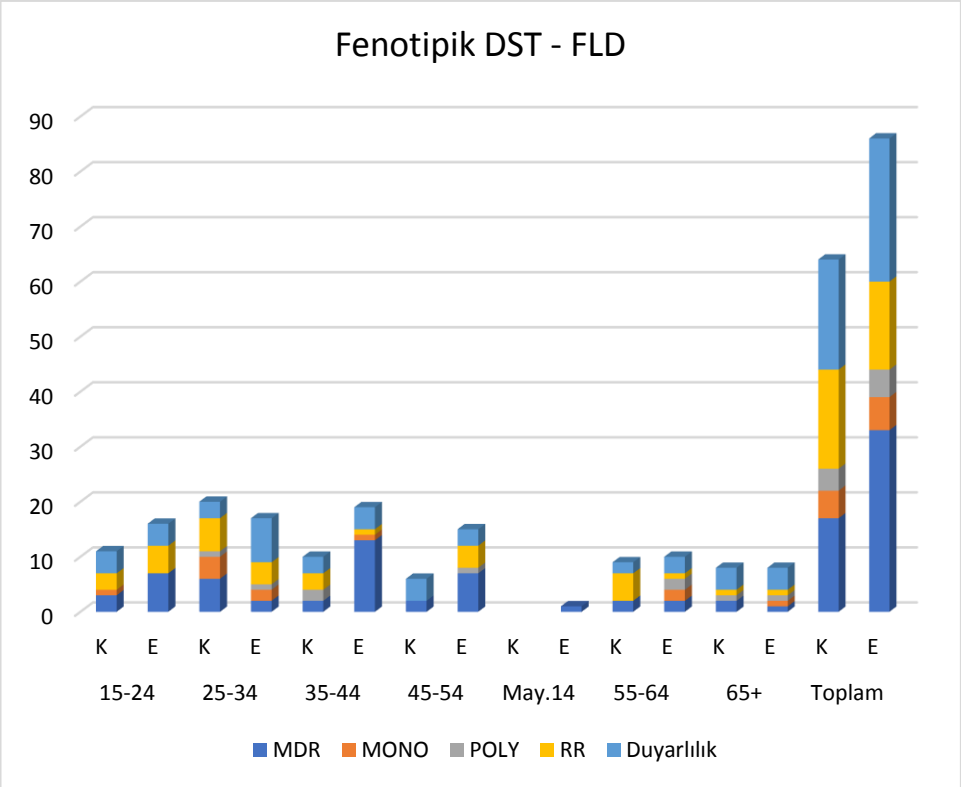
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 FLD'ler için Fenotipik DST'nin yaş grubu ve cinsiyete göre dağılımını (frekans) göstermektedir. Erkeklerde 86, kadınlarda 64 vaka görülmüş olup kadın/erkek oranı 1-1,3'tür. En fazla vaka 25-34 yaş grubunda, daha sonra 35-44 yaş grubunda ve 65 yaş ve üzeri yaş grubunda görülürken, en az vaka 55-64 yaş grubunda görülmüştür ve 5-14 yaş grubunda vaka sayısı çok düşüktür. Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2, yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için Direnç tipini (Genotipik) göstermektedir Çizelge 4.1.

Çizelge 4.2 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için fenotipik DST

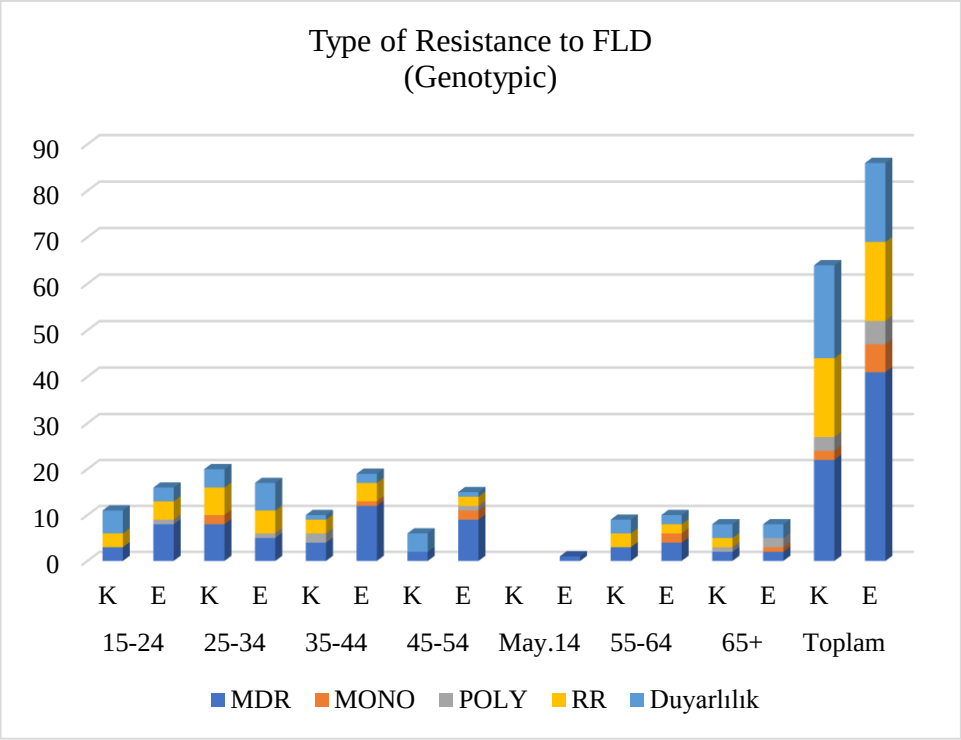
		Fenotipik DST				
Yaş Grubu	**Cinsiyet**	**MDR**	**MONO**	**POLY**	**RR**	**Duyarlılık**
15-24	K	3	1		3	4
	E	7			5	4
25-34	K	6	4	1	6	3
	E	2	2	1	4	8
35-44	K	2		2	3	3
	E	13	1		1	4
45-54	K	2				4
	E	7		1	4	3
5-14	K					
	E	1				
55-64	K	2			5	2
	E	2	2	2	1	3
65+	K	2		1	1	4
	E	1	1	1	1	4
Toplam	K	17	5	4	18	20
	E	33	6	5	16	26



Şekil 4.1 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için Fenotipik DST: - erkeklerde vakaların yaş grubu 5-14 iken kadınlarda 15-24 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için direnç tipi (Genotipik)

		FLD'ye Direnç Türü (Genotipik)				
Yaş Grubu	**Cinsiyet**	**MDR**	**MONO**	**POLY**	**RR**	**Duyarlılık**
15-24	K	3			3	5
	E	8		1	4	3
25-34	K	8	2		6	4
	E	5		1	5	6
35-44	K	4		2	3	1
	E	12	1		4	2
45-54	K	2				4
	E	9	2	1	2	1
5-14	K					
	E	1				
55-64	K	3			3	3
	E	4	2		2	2
65+	K	2		1	2	3
	E	2	1	2		3
Toplam	K	**22**	**2**	**3**	**17**	**20**
	E	41	6	5	17	17



Şekil 4.2 Yaş grubu ve cinsiyete göre FLD'ler için Direnç Türü (Genotipik)

Çizelge 4.4 Yaş grubu ve cinsiyete göre ÖÖB'ler için fenotipik DST

		SLD'ler için Fenotipik DST		
Yaş Grubu	**Duyarlılık**	**Sensitive**	**PRE XDR**	**XDR**
15-24	K	6	4	1
	E	13	2	1
25-34	K	15	3	2
	E	11	4	2
35-44	K	7	3	
	E	11	6	2
45-54	K	4	1	1
	E	12	1	2
5-14	K			
	E		1	
55-64	K	7	1	1
	E	9	1	
65+	K	6	2	
	E	6	1	1
Total	K	45	14	5
	E	62	16	8

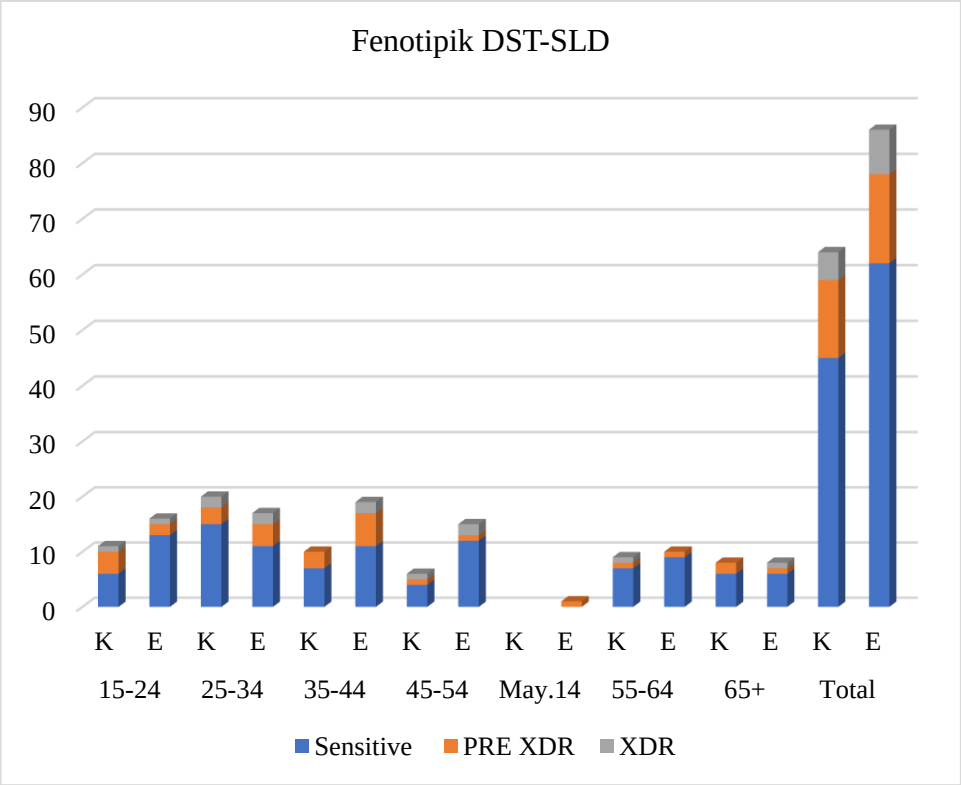
Çizelge 4.4, ÖÖG (Özgül Öğrenme Güçlüğü) için Fenotipik DST'nin yaş grubu ve cinsiyete göre dağılımını (frekans) göstermektedir.

Erkeklerde 86, kadınlarda 64 vaka görülmüş olup, erkek/kadın oranı 1,3-1'dir ve en fazla vaka 25-34 yaş grubunda görülmüş olup, bunu 35-44 yaş ve 65 yaş ve üzeri yaş grubu izlemiştir. 55-64 yaş grubu en az vaka görülen yaş grubudur ve 5-14 yaş grubunda vaka sayısı çok düşüktür.

Şekil 4.3 Yaş grubu ve cinsiyete göre ÖÖG'ler için fenotipik DST: - erkeklerde vakaların yaş grubu 5-14 iken kadınlarda 15-24 olarak bulunmuştur Çizelge 4.5.

Çizelge 4.6 Yaş grubu ve cinsiyete göre SLD'ler için Direnç Türü (Genotipik)

		SLD'ler için Direnç Türü (Genotipik)		
15-24	K	6	5	
	E	14	1	1
25-34	K	17	3	
	E	11	5	1
35-44	K	7	2	1
	E	12	7	
45-54	K	4	1	1
	E	12	1	2
5-14	K			
	E		1	
55-64	K	6	3	
	E	8	2	
65+	K	6	2	
	E	7	1	
Total	K	46	16	2
	E	64	18	4

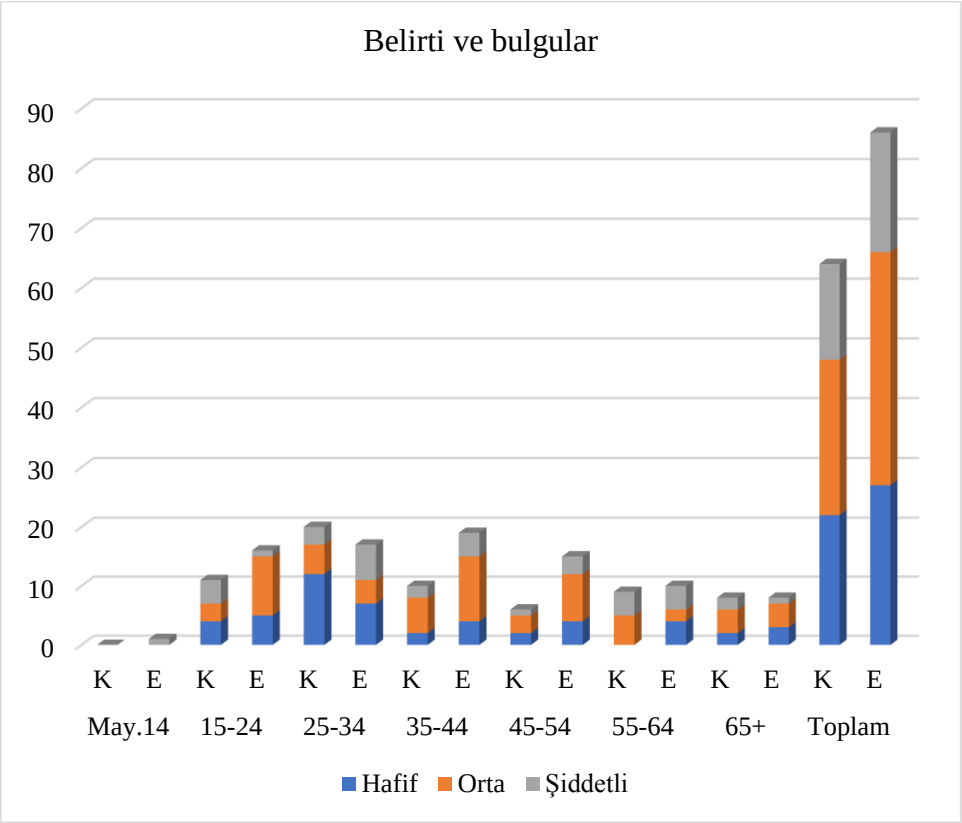


Şekil 4.3 SLD'ler için yaş grubu ve cinsiyete göre direnç tipi (Genotipik)

Çizelge 4.7 Yaş grubu ve cinsiyete göre belirti ve semptomlar

		Belirtiler ve Semptomlar		
Yaş grubu	Cinsiyet	Hafif	Orta	Şiddetli
5-14	**K**	0	0	0
	E	0	0	1
15-24	**K**	4	3	4
	E	5	10	1
25-34	**K**	12	5	3
	E	7	4	6
35-44	**K**	2	6	2
	E	4	11	4
45-54	**K**	2	3	1
	E	4	8	3
55-64	**K**	0	**5**	4
	E	4	2	4
65+	**K**	2	4	2
	E	3	4	1
Toplam	**K**	22	26	16
	E	27	39	20

Şekil 4.4 yaş grubu ve cinsiyete göre klinik belirti ve semptomların sıklığı, 65 vakada orta tip, 47 vakada hafif tip ve son olarak 36 vakada şiddetli tip olarak tespit edilmiştir Çizelge 4.8.



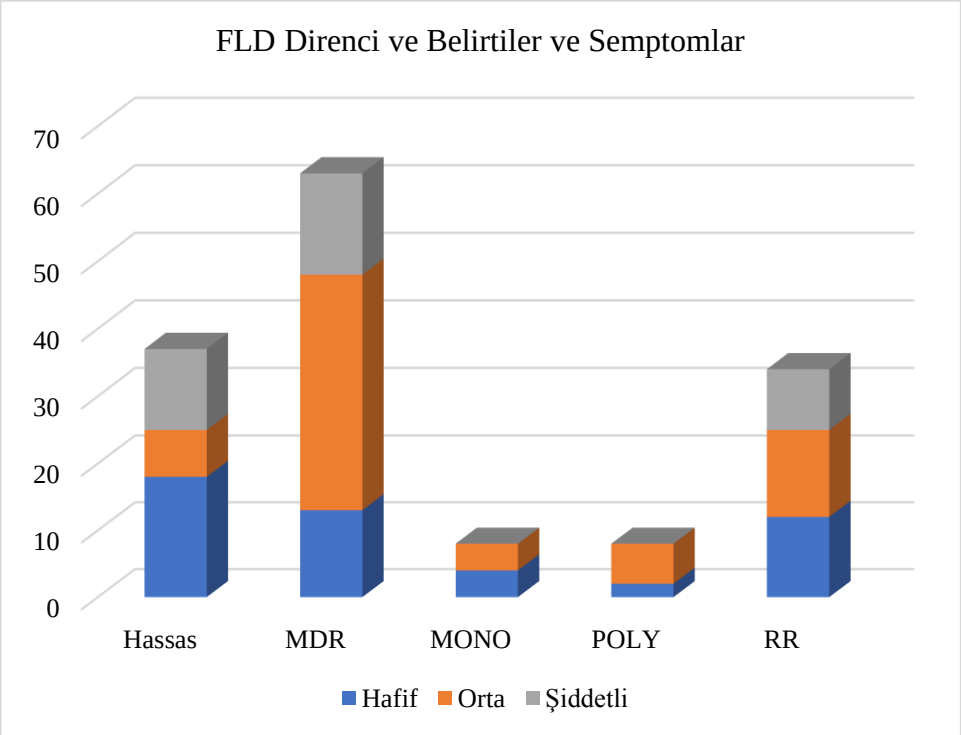
Şekil 4.5 Yaş grubu ve cinsiyete göre belirti ve semptomlar:- Yaş grubuna göre en fazla belirti ve semptom 25 - 34 yaş grubunda ve sonuncusu 5 - 14 yaş grubundadır.

Çizelge 4.9 FLD belirti ve semptomlarına karşı direnç

	Belirtiler ve Semptomlar		
Direnç Tipi	**Hafif**	**Orta**	**Şiddetli**
Hassas	18	7	12
MDR	13	35	15
MONO	4	4	0
POLY	2	6	0
RR	12	13	9

Belirti ve semptomlar direnç tipine göre farklılık göstermektedir. FLD ve MDR vakalarında en yaygın belirti tipi 63 vaka ile orta tiptir. RR vakalarında ise 34 vaka ile orta tiptir. MONO ve POLY dirençli vakalarda ise sırasıyla 8 vaka görülmüştür.

Eşlik eden hastalıklara ve klinik kriterlere göre sınıflandırılan çeşitli antitüberküloz ilaç direnci; katılan 150 hastanın 66'sında kronik bronşit, %30,4'ünde öksürük, %77'sinde ateş, %89,1'inde kilo kaybı, %29,3'ünde kas miyoziti, %20,7'sinde malnütrisyon ve %20,7'sinde nefes darlığı (SOB) görülmüştür. Burada sunulan bu klinik bulgular ışığında, vakalar klinik olarak hafif, orta veya şiddetli semptomlara sahip olarak sınıflandırılmıştır.

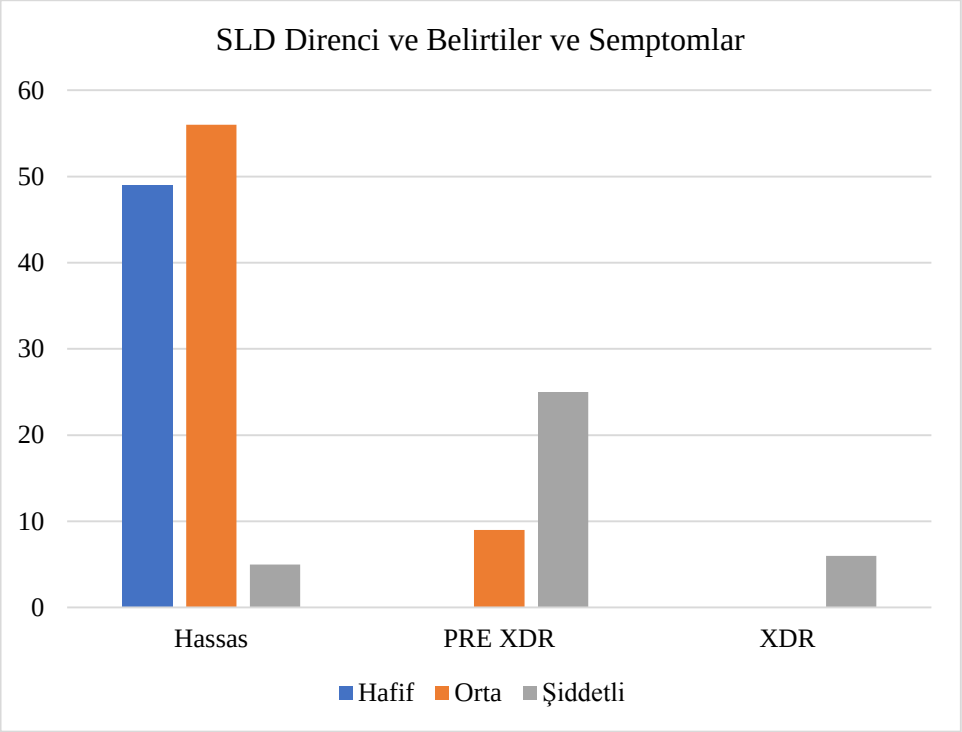


Şekil 4.6 FLD belirti ve semptomlarına karşı direnç

Çizelge 4.7 SLD belirti ve semptomlarına direnç

	Belirtiler ve Semptomlar		
Direnç Tipi SLD	**Hafif**	**Orta**	**Şiddetli**
Hassas SLD	49	56	5
PRE XDR	0	9	25
XDR	0	0	6

Direnç tipine bağlı olarak, SLD'ye sahip tüm XDR vakalarında (6 vaka), şiddetli tipte klinik belirti ve semptomlar gözlenirken, PRE XDR vakalarının 25'inde şiddetli tip görülmektedir. Hem PRE XDR hem de XDR vakalarında hafif tip belirti ve semptomlar görülmemiştir. Çalışmaya dahil olan 150 hastadan 19'u (anoreksi), 66'sı (öksürük), 72'si (viral enfeksiyon), 28'i (yoğun burun akıntısı), 82'si (kilo kaybı), 27'si (asteni) ve 19'u (solunum sıkıntısı) belirti ve semptomlar yaşamıştır.



Şekil 4.7 SLD'lere Direnç Belirti ve Semptomlar

4.2 Tartışma

Bağdat'taki ulusal tüberküloz enstitüsünde yürütülen çalışmada toplam 3.250 tüberküloz hastası değerlendirmeye alınmıştır. Tüberküloz insidansı tüm yaş gruplarında %4,6 (150/3250) olarak bulunmuştur. Tüm TB doğrulanmış olgularda Rifampisin dirençli TB (RR) oranı %38 (57/150), Linezolid koruyucu TB %26 (39/150), MONO dirençli TB %16 (24/150), POLY dirençli TB %5 olarak bulunmuştur. 3 (8/150), ÇİD TB oranı %15,3 (23/150), PRE XDR TB %22,6 (34/150) ve XDR TB %4 (6/150 Rifampisine dirençli tüberküloz prevalansı test edilen vakalar

arasında %5,6 ve daha önce tedavi görmüş vakalar arasında %25,4 olmuştur. Rifampisine dirençli tüberküloz ile cinsiyet (kadın olmak) ve önceki TB tedavisi arasında anlamlı korelasyonlar bulunmuştur (Nguyen 2016, Madhuri *et al.* 2015).

Akciğer tüberkülozu olduğundan şüphelenilen toplam 3 250 hastaya tarama yapılmıştır. Bunlardan toplam 150 balgam örneği, ZN yaymasında aside dirençli basil varlığı açısından pozitif test edildiği için araştırmada kullanılmıştır. AFB pozitif yaymaların enfeksiyon yükünün neden olduğu RNTCP skorlamasına göre, incelenen 150 balgam örneğinin 48'inde +3 basil yükü, 15'inde yetersiz basil yükü, 35'inde +1 basil yükü, 52'sinde +2 basil yükü ve 15'inde + basil yükü vardı (Barnard *et al.* 2008).

Orantılı DST yöntemine göre, 150 vakadan sadece 37'si (%24,6) birinci basamak ilaçların tümüne karşı hassas (duyarlı) bulunmuştur. Geri kalan 113 (%75,3) vaka dirençli TB vakasıydı. 150 numunenin tamamı, hat probu tahlili kullanılarak geçerli ve yorumlanabilir sonuçlar üretebilmiştir.

4.2.1 LPA ve orantılı DST yöntemi (PM) arasındaki uyum

LPA, %98,1 duyarlılık, %97,8 seçicilik ve 0,96 kappa değeri ile 57 rifampisine dirençli bakterinin 56'sını tanımıştır. Oran DST yaklaşımı artık antibiyotik direncini tespit etmek için 'Altın Standart' olarak kabul edilmektedir. 39 antibiyotik suşundan 35'i %92,1 duyarlılık, %97,9 doğruluk ve 0,90 Kappa değeri ile başarılı bir şekilde tanımlanabilmiştir. Bu nedenle, Kappa katsayısı pozitif çıkmıştır. Çizelge 4.8'de gösterildiği gibi, 23 ÇİD suşundan 21'inin tanımlanması %95 duyarlılık, %98,33 özgüllük ve 0,93 kappa değeri ile gerçekleştirilmiştir, suşlardan ikisi, beşi ve üçü rifampisin direnci, antibiyotik direnci ve ÇİD karşıtlığının algılanması söz konusu olduğunda uyumsuz sonuçlar vermiştir (Huyen *et al.* 2010).

Çizelge 4.10 Sonuçların çizgi probu tahlili ile karşılaştırılması

İlaç	Her iki yönteme de dirençli	Uyuşmayan sonuçlar		Uyuşmayan sonuçların yüzdesi (%)
		Oran yöntemine göre hassas ancak hat probu testine göre dirençli	Oran yöntemine göre dirençli ancak hat probu testine göre hassas	
R	57	1	1	2
H	39	1	4	5
H and R (MDR)	23	1	2	3

Çizelge 4.11 İstatistiksel analiz

İlaç	Duyarlılık (%)	Spesifiklik (%)	PPV (%)	NPV (%)	Kappa katsayısı
R	98.1	97.8	98.1	97.8	0.96
H	92.1	97.9	97.9	92.3	0.90
H and R (MDR)	95	98.33	94.4	96.7	0.93

4.2.2 Sonuçlara geri dönüş süresi

Genotipik test, numunenin hazırlanması, DNA'nın çıkarılması ve hat probu tahlilinin gerçekleştirilmesi için geçen süre de dahil olmak üzere, test bulgularını yalnızca 24 ila 48 saat içinde sağlamıştır. Oysa standart duyarlılık testi 10 ila 12 hafta sürüyordu.

4.2.3 Mutasyon modeli

Virülans ve patojenite aptamerlerine katılan TUB bandının her birinde bulunması nedeniyle 150 suşun tamamının Mtb kompleksine ait olduğuna dair kanıt vardı. (Raveendran *et al.* 2012), Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.10, 57 rifampisine dirençli bakteri arasında gözlenen mutasyonların şu şekilde olduğunu göstermektedir: suşların %83,01'inde *rpoB* WT8'in yokluğu ve suşların %47,19'unda S531L değişikliğinin bulunması.

Çizelge 4.13 FLD için genlerin LPA bantlarındaki mutasyon sıklığı

rpoB	**Mutasyonun sıklığı**	**KATG**	**Mutasyonun sıklığı**	**inhA**	**Mutasyonun sıklığı**
_ WT2,3,4	1	_ WT1	7	_WT1	2
_ WT3,4, +MUT1	3	_ WT1, +MUT1	15	_WT1, +MUT 1	32
_ WT8	12	MUT1	10	_wT1,2, +MUT 1	2
_ WT8, +MUT2B	1	W.T	119	MUT1	13
_ WT8, +MUT2B,3	1			W.T	103
_WT2, +MUT2A	2				
_WT2,3,4,+MUT2B	1				
_WT3,4, +MUT1	2				
_WT7, +MUT2B	10				
_WT8, + MUT2A,3	1				
_WT8, + MUT3	51				
MUT2B	3				
MUT3	8				
W.T	54				

rpoB gen mutasyonu sıklığı (-WT8, + MUT3) 51 vaka (- WT8) 12 vaka (-WT7, +MUT2B) 10 vaka *rpoB*'deki en düşük mutasyon (WT2, 3, 4, - WT8, +MUT2B - WT8, +MUT2B, 3 - WT2, 3, 4, +MUT2B - WT8, + MUT2A, 3) 1 vaka idi.

KATG gen mutasyonu sıklığı (WT1, +MUT1) 15 vaka ile (MUT1) 10 vakadan fazla olup KATG'deki en düşük mutasyon (WT1) 7 vakadır. *inhA* gen mutasyonu sıklığı (WT1, +MUT 1) 32 vaka ile (MUT1) 13 vakadan daha fazlaydı ve *inhA*'daki en düşük mutasyon (wT1, 2, +MUT 1 - WT1) 2 vakaydı.

Çizelge 4.14 SLD için genlerin LPA bantlarındaki mutasyon sıklığı

gyrA	**Mutasyonun sıklığı**	**gyrB**		**Rrs**	**Mutasyonun sıklığı**	**eis**	**Mutasyonun sıklığı**
_ WT3	1	W.T	150	_WT1, +MUT1	4	W.T	150
_WT1,2,3	3			W.T	146		
_WT2 , + MUT1	2						
_WT2 , +MUT3c	2						
_WT3 , +MUT3c	13						
_WT3 , +MUT3c,3A	1						
MUT2 , MUT3C	2						
MUT3B	3						
MUT3C	13						
W.T	110						

GyrA gen mutasyon sıklığı (WT3, +MUT3c - MUT3C) 13 vaka ile (WT1,2,3 - MUT3B - MUT2, MUT3C - WT2, + MUT1 - WT2, + MUT1) 2 vakadan fazla olup *gyrA*'da en düşük mutasyon (WT3 - WT3 , +MUT3c,3A) 2 vaka olup gyrB'de mutasyon görülmemiştir. *Rrs* gen mutasyon sıklığı (WT1, +MUT1)4 vaka olup eis'te mutasyon görülmemiştir.

39 izoniazid dirençli izolatın %100'ünde *katG* mutasyonları görülmüş, %87,5'inde S315T1 mutasyonu ve %2'sinde S315T2 mutasyonu tespit edilmiştir. katG WT bantları incelenen her bir suşta (%100) bulunmamıştır. Bir inhA WT bandının eksikliği on bir MDR suşunda ve iki monorezistan bakteride gözlenmiştir. Araştırmamızda, sadece iki farklı suşta heterorezistans kanıtı bulduk: birinde MUT2A ve MUT3 bandına ek olarak tüm WT bantları vardı, diğerinde ise MUT 1 ve MUT 3 bantlarına ek olarak tüm WT bantları vardı. PM ile rifampisine dirençli oldukları belirlenmiştir.

Irak, düşük ila orta düzeyde bir tüberküloz yüküne sahip olmasından dolayı, ülkenin tüberküloz programının bir parçası olarak tüberkülozun, özellikle de çok ilaca dirençli tüberkülozun hızlı bir şekilde teşhis edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bağdat Ulusal

Tüberküloz Enstitüsü (NTI), onaylı bir tüberküloz laboratuvarına sahip olması ve dünya genelinde en fazla sayıda ilaca dirençli aktif tüberküloz hastasını tedavi etmesiyle bilinmektedir (Mäkinen *et al.* 2006)

Çalışmamızın sonuçlarına göre, LPA yöntemi izoniazid direncini tespit etme konusunda %98,1 duyarlılık ve %97,8 özgüllük oranlarıyla oldukça iyi bir performans sergilemiştir. Bu istatistikler, önceki çalışmaların bulgularıyla uyumlu olup rifampisin direncini tespit etme açısından %92,1 duyarlılık ve %97,9 özgüllük göstermektedir. Ayrıca, MDR tüberkülozunun tanısında %95 duyarlılık ve %98,33 özgüllük elde edilmiş olup diğer çalışmalarla da uyumlu bir korelasyon sergilemektedir. Kappa katsayısının yüksek olması, iki testin sonuçlarının birbirine tutarlı bir şekilde uyuştuğunu göstermektedir (Çavuşoğlu *et al.* 2006, Kapur *et al.* 1994)

Bununla birlikte, yüzde tekniğiyle sağlam olarak sınıflandırılan ancak LPA yöntemine göre duyarlı olduğu belirlenen organizmalar, dimorfik olarak ortaya çıkmayan, sessiz mutasyon olarak da bilinen bir mutasyonun sonucu olabilir. Bu durum, ileride daha fazla araştırma yapılması gereken potansiyel konulardan biridir.

Klinik numuneler üzerinde doğrudan uygulanan ve sonuçların sadece 24 ila 48 saat içinde elde edildiği LPA testi, sadece tedavi eden doktorlar için değil, aynı zamanda hastalara da önemli bir fayda sağlamaktadır. Özellikle yüksek vaka yükü olan bölgelerde, çok sayıda numunede hızlı MDR testinin yapılması, erken ve uygun tedaviye başlama açısından son derece faydalı olacaktır. Bu, büyük bir avantaj sağlayacaktır. Ayrıca, fenotipik testlerde karşılaşılan ve kültür örneklerinin kaybına neden olan katı kültür ortamı enfeksiyonu gibi sinir bozucu bir sorun, LPA gibi hızlı genotipik testler kullanılarak aşılabilmektedir. Tüberküloz teşhisi, gelecekteki çalışmalar için önemli ve gereklidir. Çünkü tüberkülozun HIV pandemisinin bir sonucu olarak atipik şekilleri daha yaygın hale gelmektedir (Kapur *et al.* 1994).

Çavuşoğlu *et al.* (2011) çalışmasında, LPA'nın *rpoB* genine hedeflenen probunun dahil edilmesiyle, rifampisine dirençli mikropların %98,1'ini etkili bir şekilde tanımlayabildiği bulunmuştur. Benzer bulgular, Vietnam'da WT 8 bantlarının eksikliği

ve S531L sıcak nokta mutasyonunun varlığı açısından da gözlemlenmiştir. Bu özelliklerin her ikisi de aynı suşlarda bulunabilmektedir. Ancak, Çin, Güney Afrika ve Danimarka'da yapılan ek araştırmalar, sıcak nokta mutasyonlarının daha sık görüldüğünü ortaya koymuştur. Bu da farklı coğrafi bölgelerde suşların biyolojik çeşitliliğinin var olduğunu göstermektedir. Mtb'deki mutasyonlar, bir popülasyonun genetik profilinden ve hastalığın etnik kökeninden büyük ölçüde etkilendiği için (Günther *et al.* 2022), belirli bir mutasyonun sıklığının değerlendirilmesi tedavi direncini izlemek için faydalı bir yöntem olabilir. Bu aynı zamanda daha fazla mutasyonu hedefleyen yeni testlerin yapılmasının gerekip gerekmeyeceğini de belirleyecektir.

Yüksek tüberküloz insidansına sahip ülkelerde, izoniazid direncine yol açan katG mutasyonlarının yaygın olduğu belirlenmiştir. Bu mevcut araştırmada da aynı gözlem yapılmış ve izoniazide dirençli her bir suşta katG mutasyonlarının direnç oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Diğer araştırmacıların bulgularına göre, en yaygın mutasyon olan S315T1 saptanmıştır. Önemli bir bulgu olarak, izoniazid monorezistanlı suşların sekizinde katG mutasyonları ve ikisinde inhA mutasyonları ile monorezistanlığın tanımlanmış olmasıdır. İzoniazid, RNTCP ilaç rejimlerinde önemli bir role sahip olduğundan, Hindistan gibi INH monorezistan oranlarının yüksek olduğu ülkelerde rifampisine duyarlı bir suşun aynı zamanda duyarlı olacağını varsaymak yanlış olacaktır (Çavuşoğlu *et al.* 2006).

Heterorezistans olarak da bilinen belirli bir tedavide her iki ilaca duyarlı izolatın varlığı, LPA tarafından tanınabilir çünkü vahşi tip spektrumların varlığı hassas suşlarla güçlü bir şekilde ilişkilidir ve dirençli suşlarla ilişkili mutajenez bantları bulunur. Heterorezistans, aynı hastada her iki ilaca dirençli suşların varlığı anlamına gelir. İki farklı suşun enfeksiyona neden olduğu heterorezistans durumu, Mumbai, Fransa ve Türkiye gibi farklı bölgelerde yapılan araştırmalar da dahil olmak üzere belgelenmiştir. Heterorezistans, özellikle yeni tanı konulan hastalarda sıkça gözlenen bir durumdur. Bununla birlikte, ilaçların uyguladığı güçlü seçici baskı, tek bir suşun dirençli ve hassas formlara ayrılmasına neden olabilir, bu da daha önce tedavi görmüş hastalarda ortaya çıkar. LPA, doğrudan klinik örnekler üzerinde uygulandığında heterorezistansı tespit

etme olasılığını artırarak anti-TB tedavilerinin etkinliğini değerlendirmek için kullanılabilir. LPA analiziyle elde edilen örneklerin ilaç direnci tespit edilmiş ve bu örneklerin mutant organizmalara ait olduğu doğrulanmıştır. Bu doğrulamayı yapabilmek için örneklerin farklı ilaçlara karşı duyarlılığı analiz edilmiştir. Sonuç olarak, klinik bir numunenin LPA tarafından başlangıçta ilaca dirençli olarak belirlendiği tespit edilirse, doktor ilaca dirençli tüberküloz olduğu ve ilaca dirençli TB tedavisi için rutin bir protokol uygulanması gerektiği sonucuna varabilir. Bunun sebebi, ilaca dirençli tüberkülozun standart tüberküloz tedavisinden farklı bir tedavi yaklaşımı gerektirmesidir (Nkengasong 2011, Çavuşoğlu *et al.* 2011). Bunun nedeni, heterorezistan suşların birden fazla ilaca karşı direnç geliştirmiş olma olasılığının daha yüksek olmasıdır.

LPA analizi, mutasyonları önceden tespit edebilmesine rağmen, sonuçların fenotipik bir ilaç duyarlılık testiyle daha sonra doğrulanması her zaman önerilir. Bu doğrulama gerekliliği, LPA'nın mutasyonları tespit edebilmesine rağmen geçerlidir. LPA, akciğer tüberkülozu için test algoritmasının değerli bir bileşeni olsa da, bulgular her zaman doğrulanmalıdır. Bu durum, LPA metodolojisinin önemli bir bileşeni olsa da geçerlidir.

Bu çalışma, hastaların rifampisine dirençli tüberküloz (RR-TB) teşhisi ve potansiyel maruziyet kaynakları arasındaki ilişkiyi araştırmış ve not etmiştir. Aynı zamanda, olası maruziyet faktörleri ile katılımcıların RR-TB teşhisi arasındaki ilişkiyi de incelemiştir. Rifampisine dirençli TB ile inatçı öksürük arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.019$). Ayrıca, rifampisine dirençli TB ile akut öksürük arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0.019$). Bunun yanı sıra, rifampisine dirençli TB ile hem anemi ($p=0.006$) hem de klinik astemi ($p=0.098$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Öte yandan, diğer faktörlerle RR-TB arasında fark edilebilir bir ilişki bulunmamıştır.

Bu çalışmada, tüberküloz şüphesi olan 150 hastanın 57'sinde rifampisine dirençli tüberküloz (RR-TB) tespit edilmiştir. RR-TB olan hastaların %15,7'si (9/57) hiç tedavi görmemişken, %84,2'si (48/57) tedavi görmüş hastalardan oluşmaktadır. Toplanan veriler, bu artışa yol açan özel faktörlerin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesine olanak

sağlamamaktadır. Yeni suşlara sahip olan bireyler genellikle geç bir tanı almakta ve tanı anında ilerlemiş hastalık durumunda olmaktadır. Öte yandan, toplamda yüksek bir direnç oranının tespit edilmesi, kontrolün geç yapıldığını göstermektedir. Bazı tüberküloz ortamlarında, in vitro hücre kaynaklarının değerlendirilmesi sınırlı olabilir ve hızlı moleküler tanı araçları arasında seçim yapmak zor olabilir. Sonuç olarak, ilaç direncini teşhis etmek için gereken süre bazen oldukça uzun olabilmektedir (Zhang *et al.* 2011).

Irak Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı tarafından 2015 yılında belirtildiği üzere, yalnızca tedavi başarısızlığı yaşayan ve birkaç aylık tedavi sonrasında mikroskopik incelemede pozitif sonuç veren hastalar, GeneXpert çalışmasından faydalanabilmektedir. Bu durumun başlıca nedeni, mevcut mali kaynakların yetersiz olması ve bu durumun kartuş sıkıntısına yol açmasıdır. Ancak, 2019 yılı başından itibaren tüberküloz belirtileri gösteren herkese moleküler testi içeren yeni bir algoritma geliştirilmiştir. Bu test, herkese uygulanabilir. Bu yöntem, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) "End TB" stratejisinin hızlı tanı testi için önerilerini yerine getirmeyi amaçlamaktadır. GeneXpert, bu benimsenen moleküler araç, doğru ve hızlı tüberküloz teşhisini yaparak hastaların daha iyi tedavi edilmesini sağlamaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), tanı konmuş bireyler arasında Çok İlaç Dirençli Tüberküloz'un (ÇİD-TB) yayılma oranını %2,4 olarak tahmin etmektedir. Araştırmanın örnekleme popülasyonu ve bu tahminin federal düzeye uyarlanmasının zorlukları, bu çalışmadaki tahmin ile DSÖ tarafından yayınlanan tahmin arasındaki farkı açıklamaya yardımcı olabilir. Bununla birlikte, ulusal istatistiklerin mevcut olmaması nedeniyle, bu araştırma Irak Cumhuriyeti'ndeki durum hakkında ön bir analiz sunmaktadır ve bu da dikkate alınmalıdır (Hauck *et al.* 2009). Dahası, bu araştırma sadece mevcut hastalar üzerinde yapılmışken, kendi araştırmamız sadece yeni teşhis konulan hastalarda gerçekleştirilmiştir. Bu iki çalışma arasındaki fark, ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının yayılmasının endişe verici bir şekilde arttığını göstermektedir.

Rifampisine dirençli tüberküloz vakalarının çoğunluğunda tedavi edilebilme imkanının olduğunu belirtmek önemlidir. Ancak, ikinci basamak tedavisi, sıkı bir doz rejimine ve

uzun bir süreye bağlı olarak gerçekleştirilir. Ayrıca, hastaların tedavi sürecinde tıp uzmanlarının desteği ve gözetimi gerekmektedir. Irak Cumhuriyeti Kontrol Programı, tüberkülozun hem birinci basamak hem de ikinci basamak tedavisi için ücretsiz tedavi sunmaktadır (Vijdea *et al.* 2008).

İstatistiksel olarak anlamlı olan klinik semptomlar arasında kronik öksürük ($p = 0.005$), akut öksürük ($p = 0.019$), anemi ($p = 0.06$) ve fiziksel halsizlik ($p = 0.098$) bulunmaktadır. Duyarlı tüberkülozun klinik semptomları, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilen semptomlarla aynıdır. Ayrıca, Avuşolu ve diğer araştırmacılar (2011) gibi diğer yazarlar da benzer klinik semptomların rifampisine dirençli tüberküloz ile ilişkili olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Bu araştırmada, 113 katılımcının tamamında ikinci basamak ilaçlara duyarlılık genotipik testi yapılmıştır. Bu test sonuçlarına göre, katılımcıların 34'ünde florokinolonlara dirençli olduğu, 6'sında ise florokinolonlara ve ikinci basamak enjekte edilebilir ilaçlara dirençli olduğu belirlenmiştir. Çalışma popülasyonumuzdaki yüksek ilaca dirençli tüberküloz prevalansı endişe vericidir ve dirençli suşların yayılmasını önlemek için toplumun büyük çaba sarf etmesini gerektirmektedir. Bu bulgular doğrultusunda, XDR-TB teşhisi konan tüm hastaların duyarlılık taramasından geçerek erken ve etkili tedaviye başlamaları sağlanmalıdır. Bu, en iyi sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır. Kongo Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada, daha önce tedavi görmüş 13 hastanın bulunduğu bir grup üzerinde yapılan araştırmanın sonuçlarına göre, 3 hastanın florokinolonlara kısmi direnç gösterdiği ve 1 hastanın ise florokinolonlara ve ikinci basamak enjekte edilebilir ilaçlara karşı direnç geliştirdiği görülmüştür (Elion Assiana *et al.* 2021).

Ancak, Okemba-Okambi'nin çalışmasında, bu tür bir direncin daha önce pediatrik gruplarda tespit edildiği belirtilmektedir (Günther *et al.* 2022). Bu durum, araştırmamız ile Okemba-Okambi'nin çalışması arasında önemli bir farklılık olduğunu vurgulamaktadır (Günther *et al.* 2022).

Hastaların tedavisine mümkün olan en kısa sürede başlamak için doğru tanı testlerine erişmek son derece önemlidir. Şu anda mevcut tedavi seçeneklerinin göz önüne alındığında, XDR-TB'nin tedavi edilme olasılığı hala oldukça düşüktür. İlaç direncinin seviyesi, hastalığın riski ve bağışıklık sistemi işleyişi gibi faktörler, iyileşme olasılığını etkileyen önemli unsurlardır. Bu nedenle, MDR-TB hastaları için tedaviye başlamadan önce mikobakteri topluluğunun kemorezistansını doğrulamak ve ikinci basamak anti-TB testi ile varlığını dışlamak için anti-TB (DST) duyarlılığı testine ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bu testler, ÇİD-TB hastalarının başarılı bir şekilde tedavi edilmesini sağlamak için gereklidir (Elion Assiana *et al.* 2021).

Ulusal kontrol programı, hastalığın moleküler tekniklerle tespit edildiği kişiler için birinci ve ikinci basamak anti-tüberküloz tedavisi sunmaktadır. Tedavi süreci bazen uzun olabilir ve uygun bakım yönetiminin sağlanması için uyuma büyük önem verilmelidir. Anti-tüberküloz ilaçların karışımı konusunda standartlaştırılmış yönergeler mevcuttur ve bu yönergelerin uygun bir şekilde uygulanması tedavi sürecinin başarısını etkilemektedir.

Bu çalışma, tüberküloz şüphesi olan ve tedavi almamış veya almış olan bireylerde RR-TB prevalansının yanı sıra PRE XDR ve XDR-TB bulgularını ortaya koyması açısından öncü bir çalışmadır. Bu bulgular, tüberküloz vakalarının tedavisiyle ilgili güvenilir veriler sunmakta ve iyi donanımlı bir ulusal Mikobakteri laboratuvarının kurulmasını teşvik etmektedir.

MTB direncinin epidemiyolojik örüntüsünü daha iyi anlamak için, bu araştırmanın sadece NTI'deki değil, diğer şehirlerdeki ek TB ortamlarına da genişletilmesi gerektiği açıktır. Bu ortamlar dünyanın herhangi bir yerinde olabilir. Ayrıca, TB ilaç direncini hem birinci hem de ikinci basamak tedavi düzeylerinde izlemek için izleme sistemlerinin iyileştirilmesi önemlidir (Mujuni *et al.* 2022, Afshari *et al.* 2019).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

1. Bu çalışmada FLD dirençleri SLD dirençlerinden daha fazladır

2. MDR vakaları, FLD dirençlerinde diğer vakalardan biraz daha fazladır ve bunu RR dirençleri takip eder.

3. SLD dirençleri XDR öncesi vakalarda XDR vakalarından daha fazladır.

4. Hem FLD hem de SLD direnç vakalarında yaş grubu çoğunlukla 18-44 yaş arasındadır.

5. İlaç dirençlerinin moleküler tanısı geleneksel laboratuvar testlerine göre daha bilgilendirici ve doğru testlerdir.

6. Bu çalışmada ilaç direncinden sorumlu genler sıklıkları ile *rpoB, KATG, inhA, eto, gyrA, gyrB, rrs, eis* olarak belirlenmiştir.

7. Irak'ta daha önce tüberküloz tanısı almış hastalarda bu araştırmada rifampisin direnci prevalansının yüksek olduğu ve yaygın ilaç dirençli tüberkülozun varlığı tespit edilmiştir.

5.2 Öneriler

1. Moleküler testler, tüberkülozun herhangi bir ortamında antitüberküloz ilaç direncinin teşhisinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

2. İyi bir takip sistemi uygulayan ve hassas tüberküloz vakalarıyla ilgilenen iyi bir ulusal TB programının, ilaç direnci vakalarını önleyeceği önerilmektedir.

3. RR ve preXDR vakalarının erken teşhisi, MDR ve XDR'yi önlemek için büyük değer taşıyacağı düşünülmektedir.

4. NTP TB, ilaç direnci tanısında yeni moleküler teknolojiyi uygulamalısının daha iyi sonuç veereceği önerilmektedir (10- renkli Genexpert ve sekanslayıcı)<

5. Tüberkülozun hızlı teşhisi için kültür ve orantılı DST işlemlerinin katı besiyerinden (zaman alıcı) hızlı sıvı besiyerine (zaman tasarrufu) güncellenmesi gerekmektedir.

6. Yüksek performans özellikleri ve hızlı geri dönüş süresinin bir sonucu olarak LPA, verilerimizin de gösterdiği gibi, MDR tüberküloz prevalansının yüksek olduğu bir bölgede doğru ve erken tanı koymak için yararlı bir tanı aracı olacağı öngörülmektedir.

7. Bu çalışmanın sonuçları, ülke çapında hem hızlı hem de doğru yöntemler kullanılarak tüberkülozda ilaç direncinin gelişimi konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir.

8. Antibiyotik duyarlılığının önceki tedaviyle birlikte ortaya çıkması, tıbbi tedaviyi etkileyen MTB oluşumunu en aza indirmek için tedavinin daha fazla izlenmesi gerektiğini göstermektedir.

9. Bu çalışmada, ilaç direnci mutant genlerinin çoğu tespit edilmiştir, dolayısıyla bu teknik klinisyenlerin TB hastalarını yönetmesine rehberlik edebilecek önemli bir araç haline geleceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Afshari, M., Aarabi, M., Parsaee, M., Nezammahalleh, A. and Moosazadeh, M. 2019. Determinant factors of drug resistant tuberculosis in Iran, a case control study. Clinical Epidemiology and Global Health, 7(3): 322-324.

Ahmad, S., Jaber, A. A. and Mokaddas, E. 2007. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. Tuberculosis, 87(2): 123-129.

Alangaden, G. J., Kreiswirth, B. N., Aouad, A., Khetarpal, M., Igno, F. R., Moghazeh, S. L., Manavathu, E. K. and Lerner, S. A. 1998. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 42: 1295–1297.

Alexander, D. C., Ma, J. H., Guthrie, J. L., Blair, J., Chedore, P. and Jamieson, F. B. 2012. Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A role for *pncA* but not *rpsA*. Journal of Clinical Microbiology, 50(11): 3726-3728.

Al-Jebouri, M. M. and Wahid, N. M. 2013. An evaluation of QuantiFERON-TB gold in-tube and immunological tests for TB diagnosis in Iraqi patients. Methodology.

Ando, H., Kitao, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, S., Mori, T. and Kirikae, T. 2011. Downregulation of katG expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol., 79: 1615–1628.

Ando, H., Miyoshi-Akiyama, T., Watanabe, S. and Kirikae, T. A. 2014. silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol., 91: 538–547.

Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., van Gestel, J., Timmerman, P. and Zhu, M., Lee, E. 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 307: 223–227.

Anek-Vorapong, R., Sinthuwattanawibool, C., Podewils, L. J., McCarthy, K., Ngamlert, K., Promsarin, B. and Varma, J. K. 2010. Validation of the GenoType® MTBDR plus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. BMC infectious diseases, 10: 1-6.

Anmar, N. 2016. Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from King Abdullah Medical City, Makkah, Saudi Arabia. Microbiology Resource Announcements, 1: 4(3).

Argyrou, A., Jin, L., Siconilfi-Baez, L., Angeletti, R. H. and Blanchard, J. S. 2006. Proteome-wide profiling of isoniazid targets in *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry, 45: 13947–13953.

Argyrou, A., Vetting, M. W., Aladegbami, B. and Blanchard, J. S. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase is a target for isoniazid. Nat. Struct. Mol. Biol., 13: 408–413.

Aubry, A., Pan, X. S., Fisher, L. M., Jarlier, V. and Cambau, E. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* DNA *gyrAse*: Interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. Antimicrob. Agents Chemother., 48: 1281–1288.

Aubry, A., Veziris, N., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V. and Fisher, L. M. 2006. Novel *gyrAse* mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: Functional analysis of mutant enzymes. Antimicrob. Agents Chemother., 50: 104–112.

Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G. and Jacobs, W. R. 1994. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. Science, 263: 227–230.

Barnard, M., Albert, H., Coetzee, G., O'Brien, R. and Bosman, M. E. 2008. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 177(7): 787-792.

Barry, V. C., Belton, J. G., Conalty, M. L., Denneny, J. M., Edward, D. W., O'Sullivan, J. F., Twomey, D. and Winder, F. A. 1957. A new series of phenazines (rimino-compounds) with high antituberculosis activity. Nature, 179: 1013–1015.

Bento, C. M., Gomes, M. S. and Silva, T. 2021. Evolution of antibacterial drug screening methods: current prospects for mycobacteria. Microorganisms, 9(12): 2562.

Blanchard, J. S. 1996. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Annu. Rev. Biochem., 65: 215–239.

Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S., Krapp, F., and Perkins, M. D. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. New England Journal of Medicine, 363(11): 1005-1015.

Bolotin, E. and Hershberg, R. 2015. Gene loss dominates as a source of genetic variation within clonal pathogenic bacterial species. Genome biology and evolution, 7(8): 2173-2187.

Boshoff, H. I., Myers, T. G., Copp, B. R., McNeil, M. R., Wilson, M. A. and Barry, C. E. 2004. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: Novel insights into drug mechanisms of action. J. Biol. Chem., 279: 40174–40184.

Brandis, G. and Hughes, D. 2013. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying *rpoB* Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother., 68: 2493–2497.

Burman, W. J. and Jones, B. E. T. 2001. Treatment of HIVHIV-related tuberculosis in the era of effective antiretroviral therapy. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 164: 7–12.

Campbell, P. J., Morlock, G. P., Sikes, R. D., Dalton, T. L., Metchock, B., Starks, A. M., Hooks, D. P., Cowan, L. S., Plikaytis, B. B. and Posey, J. E. 2011. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 55: 2032–2041.

Cardoso, R. F., Cardoso, M. A., Leite, C. Q., Sato, D. N., Mamizuka, E. M., Hirata, R. D., de Mello, F. F. and Hirata, M.H. 2007. Characterization of ndh gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 102: 59–61.

Cavusoglu, C., Karaca-Derici, Y. and Bilgic, A. 2004. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known rpoB mutations. Clin. Microbiol. Infect., 10: 662–665.

Cavusoglu, C., Turhan, A., Akinci, P. and Soyler, I. 2006. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 44(7): 2338-2342.

Caws, M., Duy, P. M., Tho, D. Q., Lan, N. T., Hoa, D. V. and Farrar, J. 2006. Mutations prevalent among rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. J. Clin. Microbiol., 44: 2333–2337.

Chen, J. M., Uplekar, S., Gordon, S. V. and Cole, S. T. 2012. A point mutation in *cycA* partially contributes to the D-cycloserine resistance trait of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. PLoS One, 7: e43467.

Cheng, A. F., Yew, W. W., Chan, E. W., Chin, M. L., Hui, M. M. and Chan, R. C. 2004. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 48: 596–601.

Cheng, S. J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L. and Zhang, Y. 2000. pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(3): 528-532.

Comas, I., Borrell, S., Roetzer, A., Rose, G., Malla, B., Kato-Maeda, M., Galagan, J., Niemann, S. and Gagneux, S. 2011. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. Nat. Genet., 44: 106–110.

Conde, M. B. and Silva, J. R. 2011. New regimens for reducing the duration of treatment of drug- susceptible pulmonary tuberculosis. Drug development research, 72(6): 501-508.

Çavuşoğlu, C., Gürsel, D. and Aktoprak, H. B. 2011. Evaluation of the genotype MTBDRplus assay for the diagnosis of tuberculosis and rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in clinical specimens. Turkish Journal of Medical Sciences, 41(3): 419-425.

Çavuşoğlu, C., Gürsel, D. and Aktoprak, H. B. 2011. Evaluation of the genotype MTBDRplus assay for the diagnosis of tuberculosis and rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in clinical specimens. Turkish Journal of Medical Sciences, 41(3): 419-425.

De Vos, M., Müller, B., Borrell, S., Black, P. A., van Helden, P. D., Warren, R. M., Gagneux, S. and Victor, T. C. 2013. Putative compensatory mutations in

the rpoC gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. Antimicrob. Agents. Chemother., 57: 827–832.

Donchev, D., Ivanov, I. N., Stoikov, I., Sabtcheva, S., Kalchev, Y., Murdjeva, M. and Hristova, R. 2023. Improvement and Validation of a Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA8+) for *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. Microorganisms, 11(2): 444.

Elion Assiana, D. O., Abdul, J. B. P. A., Linguissi, L. S. G., Epola, M., Vouvoungui, J. C., Mabiala, A. and Ntoumi, F. 2021. Epidemiological profile of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among Congolese patients. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 20(1): 1-8.

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. and Vila, J. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb. Biotechnol., 2: 40–61.

Falzon, D., Schünemann, H. J., Harausz, E., González-Angulo, L., Lienhardt, C., Jaramillo, E. and Weyer, K. 2017. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. European Respiratory Journal, 4: 93.

Fenner, L., Egger, M., Bodmer, T., Altpeter, E., Zwahlen, M., Jaton, K., Pfyffer, G. E., Borrell, S., Dubuis, O. and Bruderer, T. 2012. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 56: 3047–3053.

Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, A. and Böttger, E. C. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Molecular Microbiology, 9(6): 1239-1246.

Floyd, K., Glaziou, P., Zumla, A. and Raviglione, M. 2018. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era. The Lancet Respiratory Medicine, 6(4): 299-314.

Gandhi, N. R., Moll, A., Sturm, A. W., Pawinski, R., Govender, T., Lalloo, U., Zeller, K., Andrews, J. and Friedland, G. 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as

a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIVHIV in a rural area of South Africa. Lancet, 368: 1575–1580.

Gillespie, S. H. 2002. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(2): 267-274.

Goss, W. A., Deitz, W. H. and Cook, T. M. 1965. Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Bacteriol., 89: 1068–1074.

Gupta, P. K., Langridge, P. and Mir, R. R. 2010. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. Molecular Breeding, 26: 145-161.

Günther, G., Saathoff, E., Rachow, A., Ekandjo, H., Diergaardt, A., Marais, N. and Nepolo, E. 2022. Clinical Evaluation of a Line-Probe Assay for Tuberculosis Detection and Drug-Resistance Prediction in Namibia. Microbiology Spectrum, 11: e00259-22.

Hameed, W. U., Basheer, M. F., Iqbal, J., Anwar, A. and Ahmad, H. K. 2018. Determinants of Firm's open innovation performance and the role of R & D department: an empirical evidence from Malaysian SME's. Journal of Global Entrepreneurship Research, 8: 1-20.

Hartkoorn, R. C., Uplekar, S. and Cole, S. T. 2014. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 58: 2979–2981.

Hassan, A., Fattouh, M., Atteya, I., Mohammadeen, H. and Ahmed, H. 2014. Validation of a rapid tuberculosis PCR assay for detection of MDR-TB patients in Sohag University Hospital. Appl. Environ. Microbiol, 2: 65-69.

Hauck, Y., Fabre, M., Vergnaud, G., Soler, C. and Pourcel, C. 2009. Comparison of two commercial assays for the characterization of *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 64(2): 259-262.

Hazbón, M. H., Bobadilla del Valle, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., Filliol, I., Cavatore, M. and Alland, D. 2005. Role of *embB* codon 306 mutations in Mycobacterium tuberculosis revisited: a novel association with broad drug

resistance and IS 6110 clustering rather than ethambutol resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(9): 3794-3802.

Hazbón, M. H., Brimacombe, M., Bobadilla del Valle, M., Cavatore, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J. and García-García, L. 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 50: 2640–2649.

Heep, M., Rieger, U., Beck, D. and Lehn, N. 2000. Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both Helicobacter pylori and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 44: 1075–1077.

Heuvelings, C. C., de Vries, S. G., Greve, P. F., Visser, B. J., Bélard, S., Janssen, S. and Grobusch, M. P. 2017. Effectiveness of interventions for diagnosis and treatment of tuberculosis in hard-to-reach populations in countries of low and medium tuberculosis incidence: a systematic review. The Lancet Infectious Diseases, 17(5): e144-e158.

Heym, B., Stavropoulos, E., Honoré, N., Domenech, P., Saint-Joanis, B., Wilson, T. M., Collins, D. M., Colston, M. J. and Cole, S.T. 1997. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun., 65: 1395–1401.

Hillemann, D., Rüsch-Gerdes, S. and Richter, E. 2008. In vitro-selected linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. Antimicrob. Agents Chemother., 52: 800–801.

Ho, Y. M., Sun, Y. J., Wong, S. Y. and Lee, A. S. 2009. Contribution of dfrA and inhA mutations to the detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob. Agents Chemother, 53: 4010–4012.

Honeyborne, I., Lipman, M., Zumla, A. and McHugh, T. D. 2019. The changing treatment landscape for MDR/XDR-TB—Can current clinical trials revolutionise and inform a brave new world?. International Journal of Infectious Diseases, 80: S23-S28.

Huyen, M. N., Tiemersma, E. W., Lan, N. T., Cobelens, F. G., Dung, N. H., Sy, D. N. and van Soolingen, D. 2010. Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for

diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. BMC İnfectious Diseases, 10(1): 1-8.

Jarlier, V., & Nikaido, H. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS microbiology letters, 123(1-2): 11-18.

Jena, B., Ludam, R., Chhotray, P. and Sahu, M. C. 2017. Detection of Mycobacterium Tuberculosis with Conventional Microscopic and Culture Methods. Int. J. Appl. Res, 3(12): 143-146.

Juréen, P., Werngren, J., Toro, J. C. and Hoffner, S. 2008. Pyrazinamide resistance and pncA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(5): 1852-1854.

Kapur, V., Li, L. L., Iordanescu, S., Hamrick, M. R., Wanger, A., Kreiswirth, B. N. and Musser, J. M. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. Journal of Clinical Microbiology, 32(4): 1095-1098.

Khazaei, M., Ranjbar, A., Arai, M., Sasaki, T. and Yunoki, S. 2017. Electronic properties and applications of MXenes: a theoretical review. Journal of Materials Chemistry C, 5(10): 2488-2503.

Larsen, M. H., Vilchèze, C., Kremer, L., Besra, G. S., Parsons, L., Salfinger, M., Heifets, L., Hazbon, M. H., Alland, D. and Sacchettini, J. C. 2002. Overexpression of inhA, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis, M. bovis* BCG and M. tuberculosis. Mol. Microbiol., 46: 453–466.

Lawn, S. D. and Nicol, M. P. 2011. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Future microbiology, 6(9): 1067-1082.

Lee, J. H. and Yeo, Y. 2015. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. Chemical engineering science, 125: 75-84.

Lienhardt, C., Vernon, A., & Raviglione, M. C. 2010. New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes. Current opinion in pulmonary medicine, 16(3): 186-193.

Lin, K., Xing, J., Quan, L. N., de Arquer, F. P. G., Gong, X., Lu, J. and Wei, Z. 2018. Perovskite light-emitting diodes with external quantum efficiency exceeding 20 per cent. Nature, 562(7726): 245-248.

Ling, S. D. 2008. Range expansion of a habitat-modifying species leads to loss of taxonomic diversity: a new and impoverished reef state. Oecologia, 156(4): 883-894.

Machado, D., Perdigão, J., Ramos, J., Couto, I., Portugal, I., Ritter, C., Boettger, E.C. and Viveiros, M. 2013. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with inhA double mutations. J. Antimicrob. Chemother., 68: 1728–1732.

Madhuri, K., Deshpande, S., Dharmashale, S. and Bharadwaj, R. 2015. Utility of line probe assay for the early detection of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. Journal of Global İnfectious Diseases, 7(2): 60.

Makarov, V., Lechartier, B., Zhang, M., Neres, J., van der Sar, A. M., Raadsen, S. A., Hartkoorn, R. C., Ryabova, O. B., Vocat, A. and Decosterd, L. A. 2014. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. EMBO Mol. Med., 6: 372–383.

Makarov, V., Manina, G., Mikusova, K., Möllmann, U., Ryabova, O., Saint-Joanis, B., Dhar, N., Pasca, M.R., Buroni, S. and Lucarelli, A. P. 2009. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. Science, 324: 801–804.

Mäkinen, H., Hynynen, J., Siitonen, J. and Sievänen, R. 2006. Predicting the decomposition of Scots pine, Norway spruce, and birch stems in Finland. Ecological Applications, 16(5): 1865-1879.

Manina, G., Bellinzoni, M., Pasca, M. R., Neres, J., Milano, A., Ribeiro, A. L., Buroni, S., Skovierová, H., Dianišková, P. and Mikušová, K. 2010. Biological and structural characterization of the *Mycobacterium smegmatis* nitroreductase NfnB, and its role in benzothiazinone resistance. Mol. Microbiol., 77: 1172–1185.

Marais, S., Pepper, D. J., Marais, B. J., & Török, M. E. 2013. HIV-associated tuberculous meningitis–diagnostic and therapeutic challenges. Tuberculosis, 90(6): 367-374.

Maruri, F., Sterling, T. R., Kaiga, A. W., Blackman, A., van der Heijden, Y.F., Mayer, C., Cambau, E. and Aubry, A. 2012. A systematic review of *gyrAse* mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrAse numbering system. J. Antimicrob. Chemother., 67: 819–831.

Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., Kawasaki, M., Tsubouchi, H., Sasaki, H., Shimokawa, Y. and Komatsu, M. 2006. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. PLoS Med., 3: e466.

Matteelli, A., Rendon, A., Tiberi, S., Al-Abri, S., Voniatis, C., Carvalho, A. C. C. and Migliori, G. B. 2018. Tuberculosis elimination: where are we now?. European Respiratory Review, 27: 148.

Menkhi, S. A., Shanoon, F. H. and Almayahi, B. A. 2017. Radiation pollution and cancer risks in Sulaimaniyah and Ninawa Cities, Iraq. Annual Research & Review in Biology, 1-9.

Miesel, L., Weisbrod, T. R., Marcinkeviciene, J. A., Bittman, R. and Jacobs, W. R., Jr. 1998. NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol., 180: 2459–2467.

Migliori, G. B., Centis, R., D'Ambrosio, L., Spanevello, A., Borroni, E., Cirillo, D. M. and Sotgiu, G. 2012. Totally drug-resistant and extremely drug-resistant tuberculosis: The same disease. Clin. Infect. Dis., 54: 1379–1380.

Mitchison, D. A. 1979. Basic mechanisms of chemotherapy. Chest., 76: 771–781.

Moazed, D. and Noller, H. F. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. Nature, 327(6121): 389-394.

Mujuni, D., Kasemire, D. L., Ibanda, I., Kabugo, J., Nsawotebba, A., Phelan, J. E. and Ssengooba, W. 2022. Molecular characterisation of second-line drug resistance among drug resistant tuberculosis patients tested in Uganda: a two and a half-year's review. BMC Infectious Diseases, 22(1): 1-10.

Musser, J. M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. Clin. Microbiol. Rev., 8: 496–514.

Nasiri, M. J., Haeili, M., Ghazi, M., Goudarzi, H., Pormohammad, A., Imani Fooladi, A. A. and Feizabadi, M. M. 2017. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. Frontiers in microbiology, 8: 681.

Nguyen, Q. H. 2016. Genetic determinants and evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam: toward new diagnostic tools (Doctoral dissertation, Université Montpellier).

Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S. and Ochi, K. 2007. Loss of a conserved 7- methylguanosine modification in 16S rRNA confers low- level streptomycin resistance in bacteria. Molecular Microbiology, 63(4): 1096-1106.

Palomino, J. C. and Martin, A. 2013. TMC207 becomes bedaquiline, a new anti-TB drug. Future Microbiol., 8: 1071–1080.

Palomino, J. C. and Martin, A. 2013. Tuberculosis clinical trial update and the current anti-tuberculosis drug portfolio. Curr. Med. Chem., 20: 3785–3796.

Parsons, L. M., Somosközi, Á., Gutierrez, C., Lee, E., Paramasivan, C. N., Abimiku, A. L. and Nkengasong, J. 2011. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. Clinical Microbiology Reviews, 24(2): 314-350.

Pasca, M. R., Degiacomi, G., Ribeiro, A. L., Zara, F., De Mori, P., Heym, B., Mirrione, M., Brerra, R., Pagani, L. and Pucillo, L. 2010. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. Antimicrob. Agents Chemother., 54: 1616–1618.

Petrella, S., Cambau, E., Chauffour, A., Andries, K., Jarlier, V. and Sougakoff, W. 2006. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 50, 2853–2856.

Pinto, L. and Menzies, D. 2011. Treatment of drug-resistant tuberculosis. Infection and drug resistance, 4: 129-135.

Protopopova, M., Hanrahan, C., Nikonenko, B., Samala, R., Chen, P., Gearhart, J., Einck, L. and Nacy, C.A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. J. Antimicrob. Chemother., 56: 968–974.

Rabello, M. C. D. S., Matsumoto, C. K., de Almeida, L. G. P., Menendez, M. C., de Oliveira, R. S., Silva, R. M. and Leao, S. C. 2012. First description of natural and experimental conjugation between mycobacteria mediated by a linear plasmid. PloS one, 7(1): e29884.

Ramaswamy, S. and Musser, J. M. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber. Lung Dis., 79: 3–29.

Ramaswamy, S. V., Reich, R., Dou, S. J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T. and Graviss, E. A. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 47: 1241–1250.

Rani, P., Bilolikar, A. K., Sarma, V. C., Udayasri, B., Reddy, S. G., Kakarla, P. L. and Poonam, A. R. 2017. A comparative study of AFB smear and GeneXpert MTB/RIF assay in pulmonary and extrapulmonary specimens and detection of rifampicin resistance in a tertiary care hospital. J Med Sci Res, 4: 115-20.

Raveendran, R., Wattal, C., Oberoi, J. K., Goel, N., Datta, S. and Prasad, K. J. 2012. Utility of GenoType MTBDRplus assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. Indian Journal of Medical Microbiology, 30(1): 58-63.

Raviglione, M. and Sulis, G. 2016. Tuberculosis 2015: burden, challenges and strategy for control and elimination. Infectious disease reports, 8(2): 6570.

Rawat, R., Whitty, A. and Tonge, P. J. 2003. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 13881–13886.

Reddy, V. M., Dubuisson, T., Einck, L., Wallis, R. S., Jakubiec, W., Ladukto, L., Campbell, S. 2012. Nacy, C. A. SQ109 and PNU-100480 interact to kill *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. J. Antimicrob. Chemother., 67: 1163–1166.

Reddy, V. M., Einck, L., Andries, K. and Nacy, C. A. 2010. In vitro interactions between new antitubercular drug candidates SQ109 and TMC207. Antimicrob. Agents Chemother., 54: 2840–2846.

Richter, E., Rüsch-Gerdes, S. and Hillemann, D. 2007. First linezolid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother., 51: 1534–1536.

Rinder, H., Thomschke, A., Rüsch-Gerdes, S., Bretzel, G., Feldmann, K., Rifai, M. and Löscher, T. 1998. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17: 508–511.

Rojas-Rueda, D., Nieuwenhuijsen, M. J., Gascon, M., Perez-Leon, D. and Mudu, P. 2019. Green spaces and mortality: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. The Lancet Planetary Health, 3(11): e469-e477.

Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Barton, D. H., Jacobs, W. R. 1998. Sacchettini, J. C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 279: 98–102.

Saeedi, M. and Hajoj, S. 2017. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* [Corrigendum]. Infection and Drug Resistance, 11: 1-2.

Safi, H., Lingaraju, S., Amin, A., Kim, S., Jones, M., Holmes, M. and Alland, D. 2013. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl-β-D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. Nature Genetics, 45(10): 1190-1197.

Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E. and Stover, C. K. 1996. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis. Science, 272: 1641–1643.

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

Simons, S. O., Mulder, A., van Ingen, J., Boeree, M. J. and van Soolingen, D. 2013. Role of *rpsA* gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance. Journal of Clinical Microbiology, 51(1): 382.

Somoskovi, A., Parsons, L. M. and Salfinger, M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir. Res., 2: 164–168.

Spies, F. S., Almeida da Silva, P. E., Ribeiro, M. O., Rossetti, M. L. and Zaha, A. 2008. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of

Mycobacterium tuberculosis and possible involvement of efflux mechanism. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(8): 2947-2949.

Stover, C. K., Warrener, P., van Devanter, D. R., Sherman, D. R., Arain, T. M., Langhorne, M. H., Anderson, S. W., Towell, J. A., Yuan, Y. and McMurray, D. N. 2000. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. Nature, 405: 962–966.

Sun, Z., Zhang, J., Zhang, X., Wang, S., Zhang, Y. and Li, C. 2008. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. Int. J. Antimicrob. Agents., 31: 115–121.

Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y. and Taniguchi, H. 1998. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol., 36: 1220–1225.

Takiff, H. E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W. M., Kreiswirth, B., Cole, S. T., Jacobs, W. R., Jr. and Telenti, A. 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother., 38: 773–780.

Tan, Y., Hu, Z., Zhang, T., Cai, X., Kuang, H., Liu, Y. and Zhao, Y. 2014. Role of pncA and rpsA gene sequencing in detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from southern China. Journal of Clinical Microbiology, 52(1): 291-297.

Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K. and Bodmer, T. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet, 341: 647–550.

Traore, H., Fissette, K., Bastian, I., Devleeschouwer, M. and Portaels, F. 2000. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. Int. J. Tuberc. Lung. Dis,. 4: 481–484.

Vijdea, R., Stegger, M., Sosnovskaja, A., Andersen, Å. B., Thomsen, V. Ø. and Bang, D. 2008. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin

and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. European Journal of Clinical Microbiology and İnfectious Diseases, 27(11): 1079-1086.

Vilchèze, C. and Jacobs, W. R. 2007. The mechanism of isoniazid killing: Clarity through the scope of genetics. Annu. Rev. Microbiol., 61: 35–50.

Vilchèze, C., Av-Gay, Y., Attarian, R., Liu, Z., Hazbón, M. H., Colangeli, R., Chen, B., Liu, W., Alland, D. and Sacchettini, J. C. 2008. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol., 69: 1316–1329.

Vilcheze, C., Weisbrod, T.R., Chen, B., Kremer, L., Hazbón, M.H., Wang, F., Alland, D., Sachettini, J.C. and Jacobs, W. R. 2005. Altered NADH/NAD+ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 49: 708–720.

Von Groll, A., Martin, A., Jureen, P., Hoffner, S., Vandamme, P., Portaels, F., Palomino, J. C. and da Silva, P. A. 2009. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. Antimicrob. Agents Chemother., 53: 4498–4500.

Wang, F., Jain, P., Gulten, G., Liu, Z., Feng, Y., Ganesula, K., Motiwala, A.S., Ioerger, T.R., Alland, D. and Vilchèze, C. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase is not a target relevant to the antitubercular activity of isoniazid. Antimicrob. Agents Chemother., 54: 3776–3782.

Warrier, P., Khan, M. N., Srivastava, V., Maupin, C. M. and Koh, C. A. 2016. Overview: Nucleation of clathrate hydrates. The Journal of chemical physics, 145(21): 211705.

World Health Organization. 2010. Multidrug and Extensively Drug-resistant TB (M/XDR-TB), 2010 Global Report on Surveillance and Response, WHO/HTM/TB/2010.3: Geneva, Switzerland.

World Health Organization. 2018. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide (No. WHO/CDS/TB/2018.19). World Health Organization.

World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2013, WHO/HTM/TB/2013.11: Geneva, Switzerland, 2013.

Yadav, R. K., Gastine, T., Christensen, U. R. and Duarte, L. D. 2013. Consistent scaling laws in anelastic spherical shell dynamos. The Astrophysical Journal, 774(1): 6.

Yang, B., Koga, H., Ohno, H., Ogawa, K., Fukuda, M., Hirakata, Y., Maesaki, S., Tomono, K., Tashiro, T. and Kohno, S. 1998. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and rpoB mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Antimicrob. Chemother, 42: 621–628.

Zammarchi, L., Giorni, A., Gabrielli, S., Strohmeyer, M., Cancrini, G. and Bartoloni, A. 2014. Human oestriasis acquired in Florence and review on human myiasis in Italy. Parasitology research, 113: 2379-2385.

Zaunbrecher, M. A., Sikes, R. D., Jr., Metchock, B., Shinnick, T. M. and Posey, J. E. 2009. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 20004–20009.

Zhang, H., Li, D., Zhao, L., Fleming, J., Lin, N., Wang, T., Liu, Z., Li, C., Galwey, N. and Deng, J. 2013. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. Nat. Genet., 45: 1255–1260.

Zhang, L., Ye, Y., Duo, L., Wang, T., Song, X., Lu, X. and Wang, L. 2011. Application of Genotype MTBDRplus in rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin in a high volum laboratory in Southern China. Molecular Biology Reports, 38(3): 2185-2192.

Zhang, Y. 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45: 529–564.

Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. and Cole, S. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature, 358: 591–593.

Zhao, F., Wang, X.D., Erber, L. N., Luo, M., Guo, A. Z., Yang, S. S., Gu, J., Turman, B.J., Gao, Y.R. 2014. Li, D. F. 2014. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 58: 1479–1487.

EKLER

EK 1. İlaç duyarlılık testleri (Lowenstein-Jensen Medium)

EK 2. Etik kurul onayı

EK 1. İlaç duyarlılık testleri (Lowenstein-Jensen Medium)









EK 2. Etik kurul onayı

T.C.
ANKARA 34. NOTERLİĞİ
Karanfil Sok. No: 19/3 Kızılay/ANKARA
Tel: 0312 425 46 40 - 419 69 30

6699

ırak Cumhuriyeti
Sağlık Bakanlığı
İdare, Finansal ve Hukuk İşleri Departmanı
İnsan Kaynakları İdare Şubesi

Sayı: A/5/5/M.A.D
Tarih: 30.08.2021

SOĞUK MÜHÜRLÜDÜR

TERCÜME

18 Mayıs 2023

İdari Karar

İdare vekilinin 02.06.2021 tarihli onayına, Planlama ve Kaynak Geliştirme Dairesi Başkanlığı/ İnsan Gücü Geliştirme/Çalışmalar Departmanının D.T.T 5/5/4 (5288) sayı ve 08.06.2021 tarihli yazısına istinaden Fen İşleri Sağlık Dairesinde görevli Biyoloji dalında lisans derecesi hamili laboratuvarcı (**KHALEEL JASIM MOHAMMED**'den) gereken taahhüt alınmıştır.

Karar:

Yukarıda adı geçen kişiye, Türkiye Cumhuriyeti/Çankırı Üniversitesinde Moleküler Biyoloji dalında yüksek lisans eğitimini tamamlamak için tüm giderleri kendisine ait olmak üzere 2020/2021 yılında yurtdışında eğitim görmesi için iki yıllık tam maaşlı izin verilmesine karar verildi. Bakanlığımız, öğrencinin eğitim ve mesken giderlerini kabul etmemektedir.

Sağlık Bakanı adına
Dr. Sami Şati Obed
İmza
29.08.2021

İşbu belge tarafımdan ibraz edilen (Aslına-Fotokopisine) sadık kalınarak (Türkçe-Arapça)'dan (Türkçe-Arapça)'ya çevirisi yapılmıştır.
Yeminli Tercüman: Ömer DEDE

İşbu belgenin dairemiz yeminli tercümanı Ömer DEDE tarafından (Türkçe-Arapça)'dan (Türkçe-Arapça)'ya çevrildiğini onaylarım.

T.C. ANKARA 34. NOTERLİĞİ İMZA YETKİLİ MEMUR AHMET DOKUMACI

DEDE TERCÜME
Danışmanlık Turizm Dış Ticaret Ltd. Şti.
Telefon: 0312 418 37 67
Cep: 0538 057 78 13
0555 105 55 62
E-mail: dedutercume@gmail.com
V.D.No. Çankaya 272 106 1639
Mersis No: 0272106163900001
Sicil No: 471760
Meşrutiyet Mah. Karanfil Sok. Uslupan Apt. Blok No: 16 İç Kapı No: 64 Çankaya/ANKARA

جمهورية العراق
وزارة الصحة
الدائرة الادارية والمالية والقانونية
قسم ادارة الموارد البشرية
العدد :د.ا.م/٥/٥/
التاريخ : ٢/ /٢٠٢١

كۆماري عيراق
وه زارتي ته ندروستي
له رمانگه‌ى كارگيرى و دار ايي و ياسايى
ژماره : د.ا.م / ٥/٥
به روار : / /٢٠٢١م

امر وزاري

استناداً لموافقة السيد الوكيل الاداري بتاريخ ٢٠٢١/٦/٢ وبناءً على ماجاء بمذكرة دائرة التخطيط وتنمية الموارد / قسم تطوير القوى العاملة / الدراسات ذات العدد د.ت.ت٥/٥/٤ (٥٢٨٨) في ٢٠٢١/٦/٨ ولتقديم م ر مختبر حاصل على بكلوريوس علوم الحياة **(خليل جاسم محمد)** في دائرة صحة الامور الفنية التعهد المطلوب .

تقرر :

منح المومأ اليه اجازة دراسية خارج العراق لمدة سنتين للعام الدراسي (٢٠٢٠-٢٠٢١) على النفقة الخاصة براتب تام لدراسة الماجستير/بايولوجي جزيئي من جامعة جانكيري في تركيا على ان لاتتحمل وزارتنا اي تبعات مالية خاصة بالدراسة والسكن .

6699
18 Mayıs 2023

الدكتور
سامي شاتي عبيد
ع/ وزير الصحة
٢٠٢١/ /٩

ANKARA 34. NOTERLİĞİ
İMZA YETKİLİ MEMUR
AHMET DOKUMACI

DEDE TERCÜME
Danışmanlık Turizm Dış Ticaret Ltd. Şti.
Telefon: 0312 418 37 67
Cep: 0538 057 78 13
0555 105 55 62
E-mail:dedetercume@gmail.com
V.D.No: Çankaya 272 106 1639
Mersis No: 0272106163900001
Sicil No: 475100
Meşrutiyet Mah.Karanfil Sok.Ulubahan Apt.Blok.No: 16 İç Kapı No: 64 Çankaya/ANKARA

نسخة عنه الى :

- دائرة الامور الفنية /للشعبة الادارية /لاتخاذ اللازم / مع الاحترام
- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ دائرة البعثات والعلاقات الثقافية/ للتفضل بالاطلاع / مع الاحترام
- دائرة التخطيط وتنمية الموارد/ قسم تطوير القوى العاملة/الدراسات/ مذكرتكم انفاً / مع الاحترام
- القسم القانوني /مذكرتكم ذات العدد (٩١٩٦) في ٢٠٢١/٨/٢٣
- قسم ادارة الموارد البشرية/شعبة الملاك/ وحدة الاحصاء الاداري/ مكتب القسم / المتابعة/الاضبارة الشخصية
- قسم ادارة الموارد البشرية/شعبة الدراسات وملح الالقاب

مسلغو ٨/٢٤

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Khaleel Jasim Mohammed AL-OGAIDI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-2023
Lisans	Madenat al-Elem Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012-2016