

# Pirazinamid Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarında Direnç ile İlişkili *pncA*, *rpsA* ve *panD* Gen Mutasyonları ve Spoligotiplerin Araştırılması

## Investigation of *pncA*, *rpsA* and *panD* Gene Mutations Associated with Resistance in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates and Spoligotyping

Didem ÖZGÜR<sup>1</sup>(ID), Seda TEZCAN ÜLGER<sup>2</sup>(ID), Mediha Begüm KAYAR<sup>3</sup>(ID), Can BIÇMEN<sup>4</sup>(ID), Ahmet ASLANTÜRK<sup>5</sup>(ID), Mahmut ÜLGER<sup>6</sup>(ID), Gönül ASLAN<sup>2</sup>(ID)

<sup>1</sup> Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.

<sup>1</sup> Kafkas University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kars, Turkey.

<sup>2</sup> Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>2</sup> Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

<sup>3</sup> Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

<sup>3</sup> Gaziantep Islamic Science and Technology University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Gaziantep, Turkey.

<sup>4</sup> Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

<sup>4</sup> Dr. Suat Seren Chest Disease and Chest Surgery Education and Research Hospital, Microbiology Laboratory, İzmir, Turkey.

<sup>5</sup> Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüberküloz Referans Laboratuvarları, Ankara.

<sup>5</sup> Public Health Agency of Turkey, Tuberculosis Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

<sup>6</sup> Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

<sup>6</sup> Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

\*Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 2017-1-TP3-2229 numaralı proje ile desteklenmiş olup Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmaya ait veriler Uluslararası Mikobakteri Sempozyumu (28-30 Kasım 2019, Mersin)'nda sözlü sunum olarak sunulmuş ve en iyi 2. bildiri ödülünü almaya hak kazanmıştır.

**Makale Atfı:** Özgür D, Tezcan Ülger S, Kayar MB, Biçmen C, Aslantürk A, Ülger M ve ark. Pirazinamid dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında direnç ile ilişkili *pncA*, *rpsA* ve *panD* Gen mutasyonları ve spoligotiplerin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2022;56(2):191-205.

### ÖZ

Pirazinamid (PZA), tüberküloz (TB) tedavisinde kullanılan birinci seçenek anti-TB ilaçlarıdır. PZA'nın peristan haldeki basilleri ortadan kaldırarak tedavi süresini 9-12 aydan altı aya kısaltabilme yeteneği göz önüne alındığında, tedavi rejiminin önemli bir taşıını oluşturduğu görülmüştür. PZA direncine neden olan temel mekanizma %70-97 oranında *pncA* mutasyonları iken, *rpsA* ve *panD* mutasyonlarının da dirence neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, PZA dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında dirençle ilişkilendirilen *pncA*, *rpsA* ve *panD* gen mutasyonlarını, PZA direncini belirlemede pirazinamidaz (PZAz) enzim testinin etkinliğini, antitüberküloz ilaç duyarlılığını ve spoligotipleme yöntemi ile izolatların ait oldukları aileleri belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmaya PZA dirençli 46 *M.tuberculosis* izolatı dahil edilmiştir.

**İletişim (Correspondence):** Dr. Öğr. Üyesi Didem Özgür, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 36100 Kars, Türkiye. Tel (Phone): +90 (474) 225 11 50/ 3296, E-posta (E-mail): didem.ozgur@kafkas.edu.tr

PZA direnci ile ilişkilendirilen *pncA*, *rpsA*, *panD* mutasyonları in-house polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini takiben uygulanan DNA dizilemeyle araştırılmıştır. İzolatların ilaç duyarlılıkları Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) sistemiyle, PZA varlığı kolorimetrik PZAz enzim testiyle ve ailelerin belirlenmesi spoligotiplendirme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. PZA dirençli 46 izolatın 24 (%52.2)'ü PZA'e tek başına dirençli, 11 (%23.9)'i çok ilaca dirençli (ÇİD)-TB ve 11 (%23.9)'i de birden çok ilaca dirençli (BÇİD)-TB olarak tespit edilmiştir. PZA dirençli *M.tuberculosis* izolatlarının %73.9 (34)'unda direnç ile ilişki gen mutasyonları saptanmıştır. İzolatların %71.7(33)'sinde *pncA*, %28.2 (13)'sinde *rpsA* ve %4.3 (n= 2)'ünde *panD* mutasyonları tespit edilmiştir. Mutasyon saptanan 12 izolatta *pncA/rpsA* gen mutasyonları ve iki izolatta *pncA/panD* gen mutasyonları birlikteliği belirlenmiştir. Kolorimetrik PZAz testi ile enzim varlığı tespit edilen 9 (%19.6) izolatın 3 (%33.3)'ünde *pncA* gen mutasyonları gözlenmiştir. *pncA* geninde A226C (%27.3), A152C (%24.2), C169G (%21.2) A422C (%9.1), G145A (%6.1), A29G (%6.1), A424G (%3) ve T464G (%3) olmak üzere "missense" mutasyon şeklinde sekiz farklı nokta mutasyonu tespit edilmiştir. *rpsA* geninde en sık A636C (%42.9) sessiz mutasyonlar ve G1318A (%42.9) "missense" mutasyonlar; *panD* geninde ise C66G (%50) "nonsense" ve A145G (%50) "missense" mutasyonlar saptanmıştır. PZA dirençli izolatların genotiplendirilmesi sonucunda en sık karşılaşılan genotiplerin 17 (%36.9) izolat ile T1 kümesinde yer aldığı; bunu sırası ile 7 (%15.2) izolat ile Beijing, 6 (%13) izolat ile H3, 5 (%10.9) izolat ile TUR ve 4 (%8.7) izolat ile LAM 9 ailelerinin takip ettiği belirlenmiştir. Ayrıca ORPHAN ailesine ait 2 (%4.3) izolat; LAM TUR, LAM 2, LAM 7, T2, T5-RUS1 ailelerine ait birer izolat tespit edilmiştir. Çalışmamız, Türkiye'de PZA direncine neden olduğu tespit edilmiş *pncA*, *rpsA* ve *panD* gen mutasyonlarının tamamının araştırdığı ilk çalışmadır. PZA direnci ile ilgili yapılan epidemiyolojik araştırmalar, direnç mekanizmasının aydınlatılmasına ve direncin saptanmasına yönelik hızlı tanı sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *M.tuberculosis*; pirazinamid; *pncA*; *rpsA*; *panD*.

## ABSTRACT

Pyrazinamide (PZA) is one of the first-line anti-tuberculous drugs used in the treatment of tuberculosis (TB). Considering the ability of PZA to shorten the treatment period from 9-12 months to six months by eliminating persistent bacilli, it appears to be an important cornerstone of TB therapy. While the main mechanism causing the PZA resistance is *pncA* mutations at a rate of 70-97%, it has been determined that *rpsA* and *panD* mutations can also cause resistance. In this study, we aimed to investigate the *pncA*, *rpsA* and *panD* gene mutations, the efficiency of the pyrazinamidase (PZAse) enzyme test in determining PZA resistance, the drug susceptibility and their families in PZA-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Totally 46 PZA resistant *M.tuberculosis* isolates were included in the study. The *pncA*, *rpsA* and *panD* mutations caused by PZA resistance were investigated by in-house PCR followed by DNA sequencing method. Drug susceptibility was determined with Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, USA) system, the presence of PZAse was evaluated by colorimetric PZAse enzyme assay and the families were determined by the spoligotyping method. Of the 46 PZA-resistant isolates, 24 (52.2%) were identified as PZA monoresistant, 11 (23.9%) multidrug resistant (MDR)-TB and 11 (23.9%) poly drug resistant (PDR)-TB. Gene mutations associated with resistance were detected in 73.9% (34) of PZA-resistant *M.tuberculosis* isolates. The *pncA*, *rpsA* and *panD* mutations were found in 71.7% (33), 28.2% (12) and 4.3% (2) of the isolates, respectively. The coexistence of *pncA/rpsA* and *pncA/panD* gene mutations were determined in 12 and two isolates, respectively. The *pncA* gene mutations were observed in 3 (33.3%) of 9 (19.6%) isolates whose enzyme presence was detected by the colorimetric PZAse test. In the *pncA* gene, eight different point mutations in the form of missense mutation; A226C (27.3%), A152C (24.2%), C169G (21.2%), A422C (9.1%), G145A (6.1%), A29G (6.1%), A424G (3%) and T464G (3%) were detected. In the *rpsA* gene, A636C (42.9%) silent and G1318A (42.9%) missense mutations and in the *panD* gene, C66G (50%) nonsense and A145G (50%) missense mutations were the most common mutations detected. As a result of genotyping of PZA resistant isolates, the most common genotypes were found in T1 cluster with 17 (36.9%) isolates; followed by the families of Beijing with 7 (15.2%) isolates, H3 with 6 (13%) isolates, TUR with 5 (10.9%) isolates, and LAM 9 with 4 (8.7%) isolates, respectively. In addition, 2 (4.3%) isolates belonging to the ORPHAN family and one isolate belonging to each of LAM TUR, LAM 2, LAM 7, T2, T5-RUS1 families were identified. Our study is the first to investigate all *pncA*, *rpsA* and *panD* gene mutations that have been found to cause PZA resistance in Türkiye. Epidemiological studies on PZA resistance will make important contributions to the determination of resistance mechanism and the development of methods that will provide rapid diagnosis for the detection of resistance.

**Keywords:** *M.tuberculosis*; pyrazinamide; *pncA*; *rpsA*; *panD*.

## GİRİŞ

Pirazinamid (PZA) nikotinamidin sentetik pirazin analogu olup, duyarlı ve çok ilaca dirençli (ÇİD)-tüberküloz (TB) tedavi rejiminde diğer ilaçlar ile kombine kullanılan önemli bir primer anti-TB ilaçtır<sup>1-3</sup>. PZA, TB tedavi süresini izoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) ile birlikte 9-12 aydan 6 aya düşürmesi ve diğer anti-TB ilaçlardan farklı olarak makrofaj fagolizozomlarındaki "semi-dormant" basil grubunu öldürerek in vivo sterilizan etki göstermesi ile TB tedavisinde kritik rol oynamıştır<sup>2,4-6</sup>.

Mikobakterilerin PZA'ya duyarlılığı pirazinamidaz (PZAz) enziminin varlığına bağlıdır<sup>7</sup>. PZA, mikobakteri hücre duvarından pasif difüzyon ile girdikten sonra 561 nükleotit uzunluğundaki *pncA* geni tarafından kodlanan PZAz/nikotinamidaz enzimi tarafından aktif formdaki pirazinoik asit (POA)'e çevrilir<sup>1,7,8</sup>. Bu nedenle mikobakterilerde primer PZA direnç mekanizması, PZAz aktivitesinin kaybolmasına veya azalmasına neden olan *pncA* geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır<sup>5,9</sup>. Mutasyonlar *pncA* geninde çok çeşitli ve değişik bölgelerde görülmekle birlikte, PZAz enziminin katalitik bölgeleri (Asp8, Lys96 ve Cys138) ve metal bağlama alanlarını (Asp49, His51 ve His71) içeren 3-17, 61-85, 132-142 kodonları arasında kalan üç bölgede kümelenmiştir<sup>6</sup>. Ayrıca, *pncA* mutasyonu olmayan PZA dirençli *M.tuberculosis* izolatlarında; translasyonda rol oynayan ribozomal protein S1 (*rpsA*, Rv1630) geninde, aspartat dekarboksilaz kodlayan *panD* geninde ve ATP'ye bağlı substrat açılımını ve ClpP1/P2 komplekslerine translokasyonu katalize eden ClpC1 proteininde meydana gelen mutasyonlar da direnç ile ilişkilendirilmiştir<sup>4,5,10,11</sup>.

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI)], PZA'yı duyarlılık testinde çalışılması gereken birincil anti-TB ilaçlar arasında bildirmesine rağmen, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) direnç için rutin test edilecek antimikobakteriyel ilaç grubuna dahil etmemektedir<sup>12,13</sup>. Anti-TB ilaçların duyarlılık testinde referans yöntem olarak kullanılan agar proporsiyon yöntemiyle besiyerinin pH'sını PZA'nın aktivite gösterebileceği ve mikobakterilerin üreyebileceği bir düzeyde tutmanın zor olması nedeniyle yanlış sonuçlara elde edilmektedir<sup>14,15</sup>. Günümüzde PZA duyarlılığının belirlenmesinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi [Food and Drug Administration (FDA)] tarafından onay alan VersaTREK MYCO TB (Thermo Fisher ,TREK Diagnostics, Birleşik Krallık) ve BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) olmak üzere iki sistem bulunmaktadır<sup>16</sup>. Ayrıca, PZA direncini belirlemede alternatif olarak Wayne tarafından geliştirilen kolorimetrik PZAz enzim testi de kullanılmaktadır<sup>15</sup>.

Bu çalışmada, PZA dirençli *M.tuberculosis* izolatlarında dirençle ilişkilendirilen *pncA*, *rpsA* ve *panD* gen mutasyonlarını, PZA direncini belirlemede PZAz enzim testinin etkinliğini, anti-TB ilaç duyarlılığını ve spoligotipleme yöntemi ile izolatların ait oldukları aileleri belirlemek amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile (Tarih: 27.07.2017 ve Karar No: 2017/223) gerçekleştirildi.

## Örneklerin Seçimi

Mersin Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı (n= 5), Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n= 14) ve Tüberküloz Referans Laboratuvarı (n= 27)'na gelen TB şüpheli hastaların klinik örneklerinden izole edilen ve PZA'ya dirençli olduğu tespit edilen toplam 46 *M.tuberculosis* izolatu çalışmaya dahil edildi.

## Antimikobakteriyel Duyarlılık Testleri

Katı Löwenstein-Jensen (LJ) ve sıvı MGIT besiyerinde üremiş ve +4°C'de saklanmış olan *M.tuberculosis* izolatları ilk önce Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine, daha sonra katı LJ besiyerine pasajlanarak canlandırıldı. LJ besiyerinde üreyen izolatlarının antimikobakteriyel duyarlılık testleri; streptomisin (SM), INH, RIF ve etambutol (EMB) için tasarlanmış olan BACTEC MGIT 960 SIRE kiti ile PZA duyarlılığı ise özel PZA besiyeri kullanılarak BACTEC MGIT 960 PZA kiti ile BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) cihazında üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı.

## Pirazinamidaz Testi

PZAz enzim varlığının belirlenmesi amacıyla Wayne ve arkadaşlarının<sup>15</sup> belirttiği şekilde PZAz enzim testi uygulandı. PZAz agarda pembe bant oluşturan enzimin varlığıyla tespit edildi. Testte pozitif kontrol olarak *M.tuberculosis* H37RV, negatif kontrol olarak *M.bovis* BCG suşu kullanıldı.

## *pncA*, *rpsA* ve *panD* Gen Bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mutasyon Analizi

LJ besiyerinde üreyen *M.tuberculosis* kolonilerine hızlı DNA ekstraksiyon protokolü uygulandı<sup>17</sup>. Bu yöntemde bir öze dolusu koloni, 1 ml steril distile su içerisinde süspansedildi ve 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı. Daha sonra mikrosantrifüj tüp 12 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanın spektrofotometre ile DNA ölçümü yapılarak yeterli miktarda DNA (10 nanogram) bulunduğu kontrol edildi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nda kalıp olarak kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

PZA direncinden sorumlu mutasyonların belirlenmesi amacıyla ilk olarak *pncA*, *rpsA* ve *panD* gen bölgelerini hedefleyen in-house PCR yöntemi uygulandı. Literatürlerden seçilen *pncA* geninin bir bölümünü ve 165 baz çifti (bp) upstream regülatör bölgesini kapsayan 760 bp uzunluğundaki bölge için *pncA*-7/8; *rpsA* geninin 742 bp büyüklüğünde başlangıç ve 960 bp büyüklüğünde bitiş bölgeleri için sırasıyla *rpsA*-1/5 ve *rpsA*-7/8; *panD* geninin 650 bp uzunluğundaki bölge için *panD*-F/R olmak üzere özgül primer dizileri kullanıldı<sup>1,10</sup>. PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer dizi çiftleri Tablo 1'de verilmiştir.

Her bir örneğin PCR amplifikasyonu 50 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. *pncA* ve *rpsA* gen bölgeleri için PCR reaksiyon karışımı; 5 µl 10X PCR tampon çözeltisi, 2 µmol/µl MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, her bir primerden 0.25 pmol/µl, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl kalıp DNA içerecek şekilde hazırlandı. *panD* gen bölgesi için PCR reak-

**Tablo I. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyonlarında Kullanılan Primer Dizileri**

Primerler	Hedef bölge uzunluğu (bp)	Primer birleşme sıcaklığı (T)	5'-3' dizi
<i>pncA</i> gen bölgesi			
<i>pncA</i> -7	760	64°C	GCCGCCAACAGTTCATCC
<i>pncA</i> -8			GATTGTGCTCACTACATCACC
<i>rpsA</i> gen bölgesi			
<i>rpsA</i> -1	742	62°C	ATCTGTCCCTACGACCCAAC
<i>rpsA</i> -5			ACCGTCCACACCCGCCGAGA
<i>rpsA</i> -7			CGTGGACAGCAACGACTTC
<i>rpsA</i> -8	960		AAGGCACCATCCGAAAGGG
<i>panD</i> gen bölgesi			
<i>panD</i> -F	650	55°C	TCAACGGTTCGGTCCGGCTGCT
<i>panD</i> -R			TATCCGCCACTGCTGCACGACCTT

siyon karışımı; 5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (NH<sub>4</sub>), 6 µl dimetil sülfoksit (DMSO), 2.5 µmol/µl MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, her bir primerden 0.25 pmol/µl, 1.25 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl kalıp DNA içerecek şekilde hazırlandı.

*pncA* ve *rpsA* gen bölgeleri için örneklerin amplifikasyon koşulları, 96°C'de üç dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 38 döngü 95°C'de 10 saniye denatürasyon, 64°C (*pncA*) ve 62°C (*rpsA*)'de 10 saniye bağlanma ve 72°C 20 (*pncA*) ve 40 (*rpsA*) saniye uzama basamakları ve son olarak 72°C'de üç dakika son uzama basamağı şeklinde uygulandı. *panD* gen bölgesi için örneklerin amplifikasyon koşulları, 94°C'de 15 dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 30 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de bir dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de yedi dakika son uzama basamağı şeklinde uygulandı.

Amplifikasyon ürünleri, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 120 voltta 40 dakika elektroforez uygulandıktan sonra ultraviyole altında görüntülendi. *pncA* 7/8, *rpsA* 1/5, *rpsA* 7/8 ve *panD*/F genlerinin tespiti için gerçekleştirilen PCR ürünlerinde sırasıyla 760, 742, 960 ve 650 bp uzunlukta bantlar pozitif olarak değerlendirildi.

Amplifikasyon ürünlerine "Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing" (Applied Biosystems, ABD) kiti kullanılarak sense ve antisense zincirlerinin "cycle sequence" PCR'ı yapıldı. ABI PRISM 3130XL "Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, ABD) cihazında, dizi analizi verileri kromatografi şeklinde elde edildi. Dizi analizi sonuçları Chromas programı (ver. 2.6.6 Technelysium Pty Ltd, Avustralya) ile değerlendirildi. Clustal X (ver. 2.1, İrlanda) programında her iki zincir karşı karşıya getirilerek hizalandı. Sonra, GENDOC (ver. 2.6.002) DNA dizi analizi programında, uç kısımlardaki fazla hizalanmamış diziler kırıldıktan sonra, son konsensus dizi şeklinde kaydedildi. Elde edilen diziler ve referans *M.tuberculosis* H37RV dizisi (Genbank accession number: NC\_000962; Gene ID: 888260-*pncA*, 885188-*rpsA*, 885596-*panD*), çoklu gen hizalama programı olan Clustal X

ile karşılaştırıldı ve *pncA*, *rpsA* ve *panD* gen bölgelerindeki spesifik nükleotid değişiklikleri belirlendi.

### Spoligotiplendirme

Spoligotiplendirme yöntemi, üretici firmanın önerileri (Isogen Bioscience BV, Hollanda) doğrultusunda gerçekleştirildi. PCR tekniği ile 36 bp uzunluğunda direkt tekrar (direct repeat, DR) bölgeleri, 5'-ucundan biotin ile işaretli DRa 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC3' ve DRb: 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3' primerleri kullanılarak amplifiye edildi. PCR sonrası ampikonların hibridizasyonu gerçekleştirildi ve hibridizasyon sonrası ürünler streptavidin alkalin fosfat enzimi ve fosfatlı kemifloresan substratı eklenerek görünür hale getirildi. Hibridizasyonu sonucu oluşan blotlanmalar dikkate alınarak spacer bölgelerinin varlığı, oktal kodlama anahtarı kullanılarak 0-7 arasında 15 rakamdan oluşan "Okta kod" formatına çevrildi. Elde edilen veriler SpolDB4 veritabanı kullanılarak küme ve "clade"ler belirlendi (Erişim adresi: <http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVIT-Demo>; Erişim tarihi: 03 Şubat 2019).

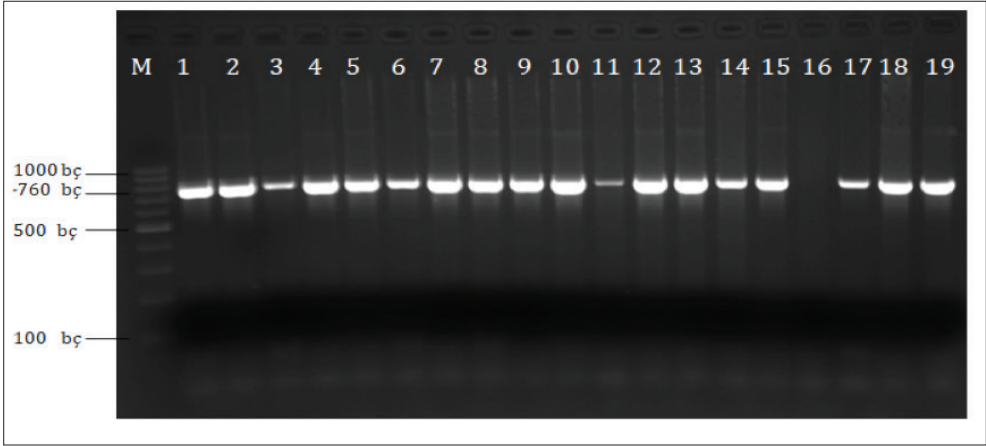
### BULGULAR

Çalışmada, BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) ile PZA dirençli 46 izolatın 24 (%52.2)'ü PZA tek ilaca dirençli, 11 (%23.9)'i ÇİD-TB ve geri kalan 11 (%23.9)'i de birden çok ilaca dirençli (BÇİD) TB olarak değerlendirilmiştir. Çok ilaca dirençli 11 izolatın dokuzu test edilen bütün primer anti-TB ilaçlara dirençli tespit edilirken, iki izolatta da EMB dışındaki diğer primer anti-TB ilaçlara direnç saptanmıştır. Birden çok ilaca dirençli izolatların % 45.5 (5/11)'inde ise SM/PZA direnç birlikteliği en yüksek oranda tespit edilmiştir. Kolorimetrik PZAz testi ile PZA dirençli 46 izolatın 9 (%19.6)'unda PZAz enzim varlığı tespit edilirken, 37 (%80.4) izolatta pembe bant oluşmadığı gözlemlenerek negatif kabul edilmiştir.

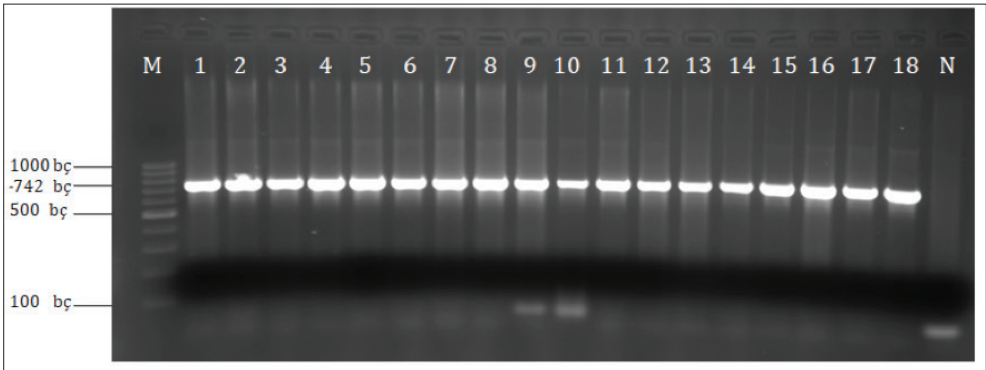
Çalışmaya dahil edilen *M.tuberculosis* izolatlarının *pncA* gen bölgesinin 760 bp, *rpsA* gen bölgesinin 742 ve 960 bp ve *panD* gen bölgesinin 650 bp olan kısımları in-house PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir (Şekil 1-4). *M.tuberculosis* izolatlarının %73.9 (34/46)'unda, PZA direncine neden olan *pncA*, *rpsA* veya *panD* gen mutasyonları saptanmıştır.

PZA dirençli izolatların %71.7 (n= 33)'sinde *pncA*, %28.2 (n= 13)'sinde *rpsA* ve %4.3 (n= 2)'ünde *panD* gen bölgelerinde mutasyonlar tespit edilmiştir. *pncA* gen mutasyonu tespit edilen 33 izolatta en yaygın olarak *pncA* gen bölgesinin; 9 (%27.3) izolat ile 226. kodonunda ACT'den CCT'ye (A226C, Thr→Pro), 8 (%24.2) izolat ile 152. kodonunda CAC'den CCC'ye (A152C, His→Pro) ve 7 (%21.2) izolat ile 169. kodonunda CAC'den GAC'ye (C169G, His→Asp) dönüşüm şeklinde nokta mutasyonları saptanmıştır. Daha az sıklıkla A422C (%9.1), G145A (%6.1), A29G (%6.1), A424G (%3) ve T464G (%3) mutasyon paternleri tespit edilmiştir. *pncA* geninde meydana gelen sekiz farklı nokta mutasyon paterninin tamamının "missense" mutasyon şeklinde gerçekleştiği görülmüştür (Tablo II). *rpsA* gen bölgesinde mutasyon saptanan 13 izolatın altısında *rpsA* geninin 742

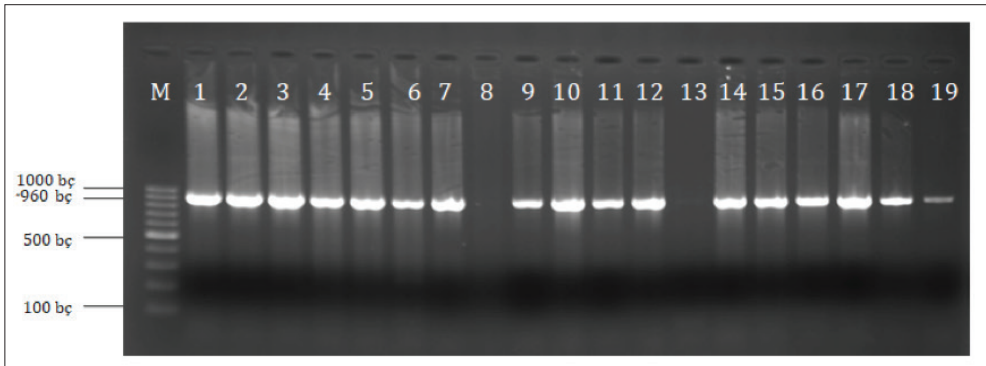




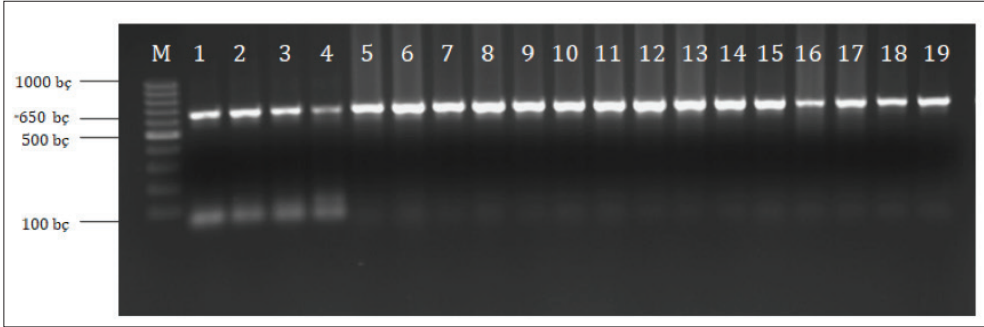
**Şekil 1.** *M. tuberculosis* DNA'sının *pncA* geninin *pncA* 7/8 primerleriyle amplifikasyonu sonrası oluşan 760 bp'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp DNA moleküler ağırlık belirteci, sütun 1-15, 17-19: 760 bp amplifikasyon ürünleri).



**Şekil 2.** *M. tuberculosis*'e ait *rpsA* geninin *rpsA* 1/5 primerleriyle amplifikasyonu (M: 100 bp DNA moleküler ağırlık belirteci, sütun 1-18: 742 bp amplifikasyon ürünleri, N: Negatif kontrol).



**Şekil 3.** *M. tuberculosis*'in *rpsA* geninin *rpsA* 7/8 primerleriyle amplifikasyonu (M: 100 bp DNA moleküler ağırlık belirteci, sütun 1-7, 9-12, 14-19: Amplikon büyüklüğü 960 bp).



Şekil 4. *M.tuberculosis*'in *panD* geninin *panD* F/R primerleriyle amplifikasyonu (M: 100 bp DNA moleküler ağırlık belirteci, sütun 1-19: Amplikon büyüklüğü 650 bp).

bp bölgesinde, yedisinde ise 960 bp bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir. *rpsA* mutasyon paternleri; 6 (%42.9) izolatta A636C sessiz mutasyonlar, 6 (%42.9) izolatta G1318A missense mutasyonlar, 1 (%7.1) izolatta A76T missense ve C96A nonsense mutasyonlar şeklinde görülmüştür (Tablo III). *rpsA* mutasyonu tespit edilen 13 izolatin 12'sinde *rpsA/pncA* mutasyon birlikteliği olduğu belirlenmiştir. *panD* mutasyonu saptanan iki izolatin birinde C66G "nonsense" mutasyon saptanırken, diğer izolatta A145G "missense" mutasyon tespit edilmiştir (Tablo IV). Ayrıca, *panD* mutasyonu saptanan iki izolatin *pncA* gen bölgesinde "missense" mutasyon varlığı görülmüştür.

PZA dirençli izolatların genotiplendirilmesi sonucunda en sık karşılaşılan genotiplerin 17 (%36.9) izolat ile T1 kümesinde yer aldığı; bunu sırası ile 7 (%15.2) izolat ile Beijing, 6 (%13) izolat ile H3, 5 (%10.9) izolat ile TUR ve 4 (%8.7) izolat ile LAM 9 ailelerinin takip ettiği görülmüştür. Ayrıca ORPHAN ailesine ait 2 (%4.3) izolat; LAM TUR, LAM 2, LAM 7, T2, T5-RUS1 ailelerine ait birer izolat tespit edilmiştir (Tablo V).

Tablo II. *pncA* Gen Bölgesinde Tespit Edilen Mutasyonların Dağılımı

İzolat Sayısı	Görülme Sıklığı (%)	Pozisyon	Nükleotit Değişimi	Kodon Değişimi	Aminoasit Lokasyonu	Aminoasit Değişimi	Patern
9	27.3	226	A→C	ACT→CCT	76	Thr→Pro	A226C
8	24.2	152	A→C	CAC→CCC	51	His→Pro	A152C
7	21.2	169	C→G	CAC→GAC	57	His→Asp	C169G
3	9.1	422	A→C	CAG→CCG	141	Gln→Pro	A422C
2	6.1	145	G→A	GAC→AAC	49	Asp→Asn	G145A
2	6.1	29	A→G	CAG→CGG	10	Gln→Arg	A29G
1	3.0	424	A→G	ACG→GCG	142	Thr→Ala	A424G
1	3.0	464	T→G	GTG→GGG	155	Val→Gly	T464G

Ala: Alanin, Asp: Aspartik asit, Asn: Asparajin, Arg: Arjinin, Gln: Glutamin, His: Histidin, Pro: Prolin, Thr: Treonin, Val: Valin.



**Tablo III.** *rpsA* Gen Bölgesinde Tespit Edilen Mutasyonların Dağılımı

İzolat Sayısı	Görülme Sıklığı (%)	Pozisyon	Nükleotit Değişimi	Kodon Değişimi	Aminoasit Lokasyonu	Aminoasit Değişimi	Patern
6	42.9	636	A→C	CGA→CGC	212	Arg→Arg	A636C
6	42.9	1318	G→A	GCG→ACG	440	Ala→Thr	G1318A
1	7.1	169	A→T	ATA→TTA	26	Ile→Leu	A76T
	7.1	96	C→A	TAC→TAA	32	Tyr→Stop	C96A

Ala: Alanin, Arg: Arjinin, Ile: İzolosin, Leu: Lösin, Stop: Stop kodon, Thr: Treonin, Tyr: Tirozin.

**Tablo IV.** *panD* Gen Bölgesinde Tespit Edilen Mutasyonların Dağılımı

İzolat Sayısı	Görülme Sıklığı (%)	Pozisyon	Nükleotit Değişimi	Kodon Değişimi	Aminoasit Lokasyonu	Aminoasit Değişimi	Patern
1	50.0	66	C→G	TAC→TAG	22	Tyr→Stop	C66G
1	50.0	145	A→G	ATC→GTC	49	Ile→Val	A145G

Tyr: Tirozin, Stop: Stop kodon, Ile: İzolosin, Val: Valin.

## TARTIŞMA

PZA, monositler ve makrofajlar içinde yavaş çoğalan mikobakteriler üzerinde en etkili tüberkülozid etkiye sahip primer anti-TB ilaçtır<sup>6</sup>. Ülkemizde ve dünyada rutin test edilecek antimikobakteriyel ilaç grubuna dahil edilmediğinden dolayı, PZA direnç oranlarını yansıtan veriler yapılan çalışmalar ile sınırlıdır ve etki mekanizması halen net bir şekilde açıklanamamıştır. PZA direnci ile *pncA* mutasyonu arasında %90'dan fazla yüksek bir korelasyon olduğu bildirilirken<sup>18-20</sup>; Yeni Zelanda'da<sup>21</sup> (%42), Brezilya'da<sup>7</sup> (%45.7), Güney Afrika'da<sup>22</sup> (%67) ve Çin'de<sup>23</sup> (%80), yapılan çalışmalarda düşük veya orta düzey korelasyon (%42-80) olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda PZA direnci ile *pncA* arasında %71.7 (33/46) oranında orta düzey bir korelasyon saptanmıştır. Tespit edilen korelasyon oranları *pncA* genindeki mutasyonların, fenotipik testlerin yerine PZA direncinin güvenilir bir şekilde tespit edilmesi için kullanılabilirliğini göstermektedir.

PZA direnci ile ilişkili *pncA* geninde meydana gelen mutasyonlar tüm genomda dağılmıştır. Mutasyonlar genellikle tek nükleotit değişimi veya daha az sıklıkla insersiyonlar, delesyonlar şeklinde meydana gelmektedir<sup>4</sup>. Yaptığımız bu çalışmada, *pncA* geninde meydana gelen mutasyonların tamamı tek nükleotit değişikliğinin neden olduğu "mis-sense" mutasyon şeklinde gerçekleşmiş ve tespit edilen sekiz farklı *pncA* mutasyon paterni yapılan diğer çalışmalarda da bildirilmiştir<sup>4,9,20,24,25</sup>.

*M.tuberculosis* kompleks içinde yer alan *M.tuberculosis* suşlarına karşı PZA etki gösterirken, *Mycobacterium bovis* intrinsik dirençlidir<sup>7</sup>. *M.bovis*'teki intrinsik PZA direnci, gelecekte olarak *pncA* geninin 169. nükleotidinde sitozinin guanine dönüşmesiyle (C169G) 57. pozisyonundaki histidin yerine aspartik asidin kodlanmasına (His57Asp) atfedilen bir fenomendir<sup>13</sup>. Çalışmamızda, *pncA* geninde %21.2'lik oranla üçüncü sıklıkla tespit etti-

**Tablo V.** İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları, Pirazinamidaz (PZAz) Enzim Testi, Mutasyon Analizi ve Spoligotipleme Sonuçları

İzolat No	Direnç Paterni	PZAz	<i>pncA</i> Mutasyonu	<i>rpsA</i> Mutasyonu	<i>panD</i> Mutasyonu	Spoligotip Kladları	“Spoligo-International-Type (SIT)”
1	SM/PZA	Negatif				Beijing	1
2	EMB/PZA	Negatif				LAM9	50
3	PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			T1	53
4	PZA	Pozitif				T5-RUS1	1255
5	INH/PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			T1	53
6	SM/PZA	Negatif				Beijing	265
7	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)	G1318A (Ala/Thr)		Beijing	1651
8	PZA	Negatif	G145A (Asp/Asn)			T1	1105
9	PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			T1	53
10	PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			T1	284
11	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)	G1318A (Ala/Thr)		T1	53
12	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)			H3	50
13	PZA	Negatif	A29G (Glu/Arj)		C66G (Tyr/Stop)	LAM7	41
14	PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			T1	284
15	SM/PZA	Negatif				LAM9	50
16	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)	G1318A (Ala/Thr)		LAM TUR	284
17	PZA	Negatif				TUR	41
18	INH/SM/ PZA	Negatif	A152C (His/Pro)			T1	53
19	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)	G1318A (Ala/Thr)		Beijing	1651
20	SM/PZA	Pozitif				T1	284
21	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)	G1318A (Ala/Thr)		T1	53
22	PZA	Negatif				LAM9	50
23	PZA	Pozitif				LAM9	50
24	SM/PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			T1	53
25	PZA	Negatif	A152C (His/Pro)		A145G (Ile/Val)	T2	2144
26	PZA	Negatif	C169G (His/Asp)	G1318A (Ala/Thr)		H3	50

**Tablo V. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları, Pirazinamidaz (PZAz) Enzim Testi, Mutasyon Analizi ve Spoligotipleme Sonuçları (devamı)**

İzolat No	Direnç Paterni	PZAz	<i>pncA</i> Mutasyonu	<i>rpsA</i> Mutasyonu	<i>panD</i> Mutasyonu	Spoligotip Kladları	"Spoligo-International-Type (SIT)"
27	PZA	Pozitif	A152C (His/Pro)			H3	50
28	INH/ EMB/PZA	Negatif	A422C (Gln/Pro)			Beijing	269
29	PZA	Pozitif				Beijing	1
30	PZA	Pozitif	A226C (Thr/Pro)			T1	1105
31	PZA	Pozitif	A226C (Thr/Pro)			T1	53
32	PZA	Pozitif				LAM2	17
33	ÇİD	Negatif		A636C (Arg/Arg)		H3	277
34	ÇİD*	Negatif	T464G (Val/Gly)	A636C (Arg/Arg)		TUR	41
35	ÇİD	Negatif	A152C (His/Pro)			T1	284
36	ÇİD	Negatif	A152C (His/Pro)			T1	284
37	ÇİD	Negatif	A422C (Gln/Pro)	A636C (Arg/Arg)		Beijing	265
38	ÇİD	Negatif	G145A (Asp/Asn)	A636C (Arg/Arg)		H3	277
39	ÇİD	Negatif	A424G (Thr/Ala)	A636C (Arg/Arg)		T1	1105
40	ÇİD	Negatif	A29G (Glu/Arg)	A636C (Arg/Arg)		TUR	41
41	ÇİD*	Negatif	A152C (His/ Pro)			ORPHAN	1261
42	EMB/SM/ PZA	Pozitif				TUR	41
43	ÇİD	Negatif	A422C (Gln/Pro)			T1	53
44	ÇİD	Negatif	A152C (His/Pro)			TUR	41
45	INH/PZA	Negatif	A226C (Thr/Pro)			H3	277
46	PZA	Negatif	A152C (His/Pro)			ORPHAN	926

PZA: Pirazinamid, SM: Streptomisin, INH: İzoniyazid, RIF: Rifampisin, EMB: Etambutol ÇİD: Çok ilaca dirençli (INH/RIF/SM/EMB/PZA), ÇİD\*: Çok ilaca dirençli (INH/RIF/SM/PZA) PZAz: Pirazinamidaz, Ala: Alanin, Arg: Arjinin, Asp: Aspartik asit, Asn: Asparajin, Gln: Glutamin, His: Histidin, Ile: İzolosin, Leu: Lösin, Pro: Prolin, Stop: Stop kodon, Thr: Treonin, Tyr: Tirozin, Val: Valin.

ğimiz C169G mutasyonu PZAz enzim aktivitesi olmayan PZA mono-rezistans yedi adet *M.tuberculosis* izolatında tespit edilmiştir. *pncA* geninde C169G mutasyonu İran'da<sup>25</sup> %12.5 (3/24) ve İsveç'te<sup>9</sup> %5.9 (1/17) oranlarında PZA dirençli *M.tuberculosis* izolatlarında tespit edilirken; Amerika'da<sup>26</sup> *M.bovis* ve *M.bovis* BCG suşlarında tespit edilmiştir. Kanada'da PZA dirençli 64 izolatta *pncA* ve *rpsA* mutasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, *rpsA* geninde G1318A (Ala/Thr) mutasyonu *M.bovis* BCG suşunda saptanmış ve *M.bovis*'te gözlenen intrinsik PZA direncinde C169G mutasyonundan farklı bir mekanizma olabileceği öne sürülmüştür<sup>8</sup>. Çalışmamızda C169G mutasyonuna sahip izolatların tamamının *rpsA* geninde G1318A (Ala/Thr) mutasyonu *M.tuberculosis* izolatlarında gözlenmiştir.

Ülkemizde PZA direncine neden olan mutasyonlarla ilgili yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Edirne'de 2005 yılında yapılan doktora tez çalışmasında; PZA dirençli izolatların %70 (7/10)'ünde *pncA* mutasyonu tespit edilmiştir. *pncA* mutasyonu tespit edilen izolatlarda G71A (2), C479A (1), A152C (1) mutasyonları ve üç izolatta CTG-AAT (102-269) delesyonu saptanmıştır<sup>27</sup>. Çalışmamızda da *pncA* geninde A152C mutasyonu %24.2 (n= 8) oranında ikinci sıklıkta görülmüştür. Samsun'da 2019 yılında yapılan doktora tez çalışmasında, PZA dirençli 15 izolatın %86.7 (n= 13)'sinde *pncA* gen mutasyonu tespit edilmiştir<sup>28</sup>. PZA direncine neden olan *pncA* mutasyonları, sonuçlarımıza benzer şekilde tek nükleotit değişimi şeklinde gerçekleşmiştir.

Yapılan çalışmalarda *pncA* mutasyonu olmayan PZA dirençli suşların (%3-97) varlığı bildirilmiştir<sup>2,4</sup>. Shi ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada<sup>5</sup>, *pncA* mutasyonu olmayan PZA dirençli izolatlarda alternatif bir mekanizma olarak *rpsA* gen mutasyonları bulunmuştur. Çin'de 142 ÇİD-TB izolatı ile yapılan çalışmada ise %57.7 (82/142) oranında PZA direnci tespit edilmiştir. PZA dirençli izolatlarda %79.3 (65/82)'ünde *pncA* mutasyonu ve %31,7 (26/82)'sinde *rpsA* mutasyonu saptanmıştır<sup>4</sup>. Bizim çalışmamızda 13 izolatta (%28.2) *rpsA* mutasyonu tespit edilmiştir. *rpsA* mutasyonu tespit edilen sadece bir örnekte *pncA* mutasyonu saptanmazken, geri kalan 12 izolatta *pncA/rpsA* mutasyon birlikteliği görülmüştür. *rpsA* mutasyonu saptanan izolatlarda %42.9 ile en sık tespit edilen A636C ve G1318A mutasyonları sırasıyla Çin<sup>29</sup> ve Kanada'da<sup>8</sup> yapılan çalışmalarda saptanırken; %7.1 ile daha az sıklıkta görülen A76T ve C96A mutasyonları daha önce yapılan çalışmalarda tespit edilmemiştir.

Bununla birlikte Zhang ve arkadaşlarının 174 PZA dirençli *M.tuberculosis* izolatı ile yaptıkları çalışmada<sup>10</sup>, PZAz aktivitesine sahip beş *M.tuberculosis* izolatında PZA direnci ile ilişkili yeni bir mekanizma olarak *panD* gen mutasyonunu tespit etmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada, PZAz aktivitesine sahip olmayan iki izolatta *panD/pncA* mutasyon birlikteliği saptanmıştır. *panD* mutasyonuna sahip iki izolatta tespit edilen A145G ve C66G direnç profilleri de daha önce yapılan çalışmalarda saptanmamıştır.

Fenotipik PZA ilaç duyarlılık testlerinde; ortamın asiditesinin, inokulum miktarının ve kullanılan kritik konsantrasyonun yanlış pozitifliğe neden olabileceğinden dolayı bu testler DSÖ tarafından onaylanmamıştır<sup>16</sup>. Renk değişimine dayanan PZAz enzim testi

gibi alternatif teknikler geliştirilmiştir. PZAz enzim testi ile ilgili 33 çalışmayı kapsayan bir meta-analiz çalışmasında, testin duyarlılığının ve özgüllüğünün sırasıyla %89 ve %97 olduğu tespit edilmiştir<sup>3</sup>. Çalışmamızda BACTEC MGIT 960 sisteminin PZA sonuçları veya mutasyon analizi referans olarak alındığında PZAz enzim testinin duyarlılığı sırasıyla %80.4 (37/46) ve % 91.2 (31/34) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca PZAz enzim aktivitesine sahip izolatların %33.3 (3/9)'ünde PZA direnci ile ilişkili mutasyonlar saptanmıştır. PZAz enzim testinin; düşük maliyet, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olması nedeniyle PZA duyarlılığının belirlenmesinde kullanılabilir bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *M.tuberculosis* izolatlarının sıklıkla LAM7 TUR ve T1 ailesine ait olduğu, ÇİD-TB olgularının Beijing grubuyla ilişkilendirildiği bildirilmiştir<sup>30-32</sup>. Durmaz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada<sup>31</sup>, Türkiye'nin dört farklı bölgesinden izole edilen ilaca dirençli toplam 200 izolatın, en sık %22.5 ile LAM7-TUR (ST41) ve %19.5 ile T (ST53) aileleri altında kümelendiği tespit edilmiştir. Gaziantep ilinde çoklu ilaç dirençli 55 izolatın dahil edildiği çalışmada, en yaygın görülen ailelerin T1 ve LAM7 TUR (sırasıyla, %64 ve %18) olduğu saptanmıştır<sup>32</sup>. Ülkemizde PZA dirençli izolatların ait olduğu ailelerin belirlendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Zambiya'da 2013-2015 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada, *pncA* geninde C195T mutasyonuna sahip izolatların %94.1'inin CAS1\_KILI (SIT 21), %5.9'unun CAS\_DELHI soyuna ait olduğu tespit edilmiş ve bu mutasyonun CAS ailesinin bazı üyeleri için genetik belirteç olabileceği öne sürülmüştür<sup>33</sup>. Çalışmamızda *pncA* geninde %27.3'lük oran ile en sık tespit edilen A226C mutasyonuna sahip izolatların %88.9'unun T1, %11.1'nin H3 soyuna ait olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonun yüksek oranda T1 kümesinde yer almasından dolayı, A226C mutasyonunun T1 kümesinin bazı üyeleri için genetik belirteç olabileceğini ve bu öneriyi içeren başka bir çalışmayla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız, Türkiye'de PZA direnciyle ilişkili *pncA*, *rpsA* ve *panD* gen mutasyonlarının tamamının araştırıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca PZA direncini belirlemede PZAz enzim testinin etkinliği, PZA dirençli izolatların ilaç duyarlılıkları ve ait oldukları aileler spoligotiplendirme yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilerin, PZA direnç mekanizmasının ve epidemiyolojisinin aydınlatılması konusunda önemli katkılar sağlayacağı umulmaktadır.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 27.07.2017 ve Karar No: 2017/223).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Akhmetova A, Kozhamkulov U, Bismilda V, Chingissova L, Abildaev T, Dymova M, et al. Mutations in the *pncA* and *rpsA* genes among 77 *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kazakhstan. Int J Tuberc Lung Dis 2015; 19(2): 179-84. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0305>

2. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew W, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Adv Med Sci* 2016; 61(1): 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.09.007>
3. Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(10): 4499-505. <https://doi.org/10.1128/AAC.00630-11>
4. Gu Y, Yu X, Jiang G, Wang X, Ma Y, Li Y, et al. Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates in a national referral center of China and its correlations with pncA, rpsA, and panD gene mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84(3): 207-11. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.017>
5. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE 3<sup>rd</sup>, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011; 333(6049): 1630-2. <https://doi.org/10.1126/science.1208813>
6. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol Spectr* 2014; 2(4): 2-4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013>
7. Bhujra S, de Souza Fonseca L, Marsico AG, de Oliveira Vieira GB, Sobral LF, Stehr M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the pncA gene. *Infect Genet Evol* 2013; 19: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.008>
8. Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL, Blair J, Chedore P, Jamieson FB. Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a role for pncA but not rpsA. *J Clin Microbiol* 2012; 50(11): 3726-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.00620-12>
9. Juréen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and pncA gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(5): 1852-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.00110-08>
10. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* 2013; 2(1): 1-5. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.38>
11. Hameed HMA, Islam MM, Chhotaray C, Wang C, Liu Y, Tan Y, et al. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8: 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00114>
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes. Approved Standard, 2<sup>nd</sup> ed. CLSI Document M24-A2, 2011. Wayne, PA.
13. Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(9): 5267-77. <https://doi.org/10.1128/AAC.00204-15>
14. Özkütük N, Ecemiş T, Sürücüoğlu S. Manisa bölgesinde pirazinamid-monorezistan *Mycobacterium tuberculosis*. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 585-90.
15. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109(1): 147-51.
16. Issues in *Mycobacterium tuberculosis* complex (mtbc) drug susceptibility testing: Pyrazinamide (PZA) *Aphl Issues In Brief Infectious Diseases* 2016.
17. Sajduda A, Brzostek A, Popławska M, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Niemann S, et al. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2425-31. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2425-2431.2004>
18. Louw GE, Warren RM, Donald PR, Murray MB, Bosman M, Van Helden PD, et al. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(7): 802-7.
19. Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, Stavrum R, Mannsåker T, Muthivhi T, et al. Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3459-64. <https://doi.org/10.1128/JCM.00973-08>



20. Lee KW, Lee JM, Jung KS. Characterization of pncA mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. J Korean Med Sci 2001;16(5): 537-43. <https://doi.org/10.3346/jkms.2001.16.5.537>
21. Pandey S, Newton S, Upton A, Roberts S, Drinković D. Characterisation of pncA mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in New Zealand. Pathology 2009; 41(6): 582-4. <https://doi.org/10.1080/00313020903071587>
22. Bishop KS, Blumberg L, Trollip AP, Smith AN, Roux L, York DF, et al. Characterisation of the pncA gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Gauteng, South Africa. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5(10): 952-7.
23. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. J Antimicrob Chemother 2007; 59(5): 866-73. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm054>
24. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, et al. A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. PLoS One 2015; 10(7): e0133869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133869>
25. Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P. *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity in pyrazinamide-resistant isolates of Iran. Microb Drug Resist 2009; 15(4): 251-6. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0066>
26. Denkin S, Volokhov D, Chizhikov V, Zhang Y. Microarray-based pncA genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 12): 1127-31. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46129-0>
27. Yüksel P. Pirazinamid dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinde pncA genindeki mutasyonların araştırılması. Yayımlanmış doktora tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005, Edirne.
28. Akbal AU. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında pirazinamid direncinin hızlı tespitinde kolorimetrik yöntemlerin etkinliğinin araştırılması. Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018, Samsun.
29. Xia Q, Zhao LL, Li F, Fan YM, Chen YY, Wu BB, et al. Phenotypic and genotypic characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Zhejiang, China. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(3): 1690-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.04541-14>
30. Zeytinli UO, Köksal F. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from pulmonary tuberculosis patients in Çukurova region, Turkey by spoligotyping and MIRU-VNTR methods. Mikrobiyol Bul 2012; 46(2): 202-10.
31. Durmaz R, Zozio T, Günel S, Yaman A, Çavuşoğlu C, Güney C, et al. Genetic diversity and major spoligotype families of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from different regions of Turkey. Infect Genet Evol 2007; 7(4): 513-19. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.03.003>
32. Karşılığ T, Bayram A, Ekşi F. Determination of genotypic varieties and genotyping of multiple drug-resistant tuberculosis by the RFLP and spoligotyping methods. Turk J Med Sci 2016; 46(5): 1502-11. <https://doi.org/10.3906/sag-1412-5>
33. Bwalya P, Yamaguchi T, Mulundu G, Nakajima C, Mbulo G, Solo ES, et al. Genotypic characterization of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Lusaka, Zambia. Tuberculosis 2018; 109: 117-22. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.007>