

Etambutole Dirençli ve Duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* Kompleksi Klinik İzolatlarında *embA*, *embB* ve *embC* Gen Bölgesi Mutasyonları

The Mutations on *embA*, *embB* and *embC* Gene Region in Ethambutol-Resistant and Susceptible Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates

Nurbanu YAŞAR¹(ID), Seda TEZCAN ÜLGER¹(ID), Mahmut ÜLGER²(ID), Ahmet ARSLANTÜRK³(ID), Gönül ASLAN¹(ID), Fatih KÖKSAL⁴(ID)

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Türkiye.

² Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Türkiye.

³ T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

³ TR Ministry of Health General Directorate of Public Health, Tuberculosis Reference Laboratory, Ankara, Türkiye.

⁴ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

⁴ Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Türkiye.

*Bu çalışmanın bir bölümü, Uluslararası Mikobakteri Sempozyumu (29-30 Kasım 2019, Mersin)'nda sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018-3-TP3-3089).

Makale Atfı: Yaşar N, Tezcan Ülger S, Ülger M, Arslantürk A, Aslan G, Köksal F. Etambutole dirençli ve duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi klinik izolatlarında *embA*, *embB* ve *embC* gen bölgesi mutasyonları. *Mikrobiyol Bul* 2023;57(1):45-59.

ÖZ

Etambutol (EMB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTC)'nin neden olduğu tüberküloz (TB) hastalığının standart kombinasyon tedavisinde kullanılan birinci seçenek ilaçlardan biridir ve tedavide anahtar rol oynayan ilaçlara karşı direnç dünya genelinde artmaktadır. EMB direncinden, *embCAB* operonundaki dirençle ilişkisi doğrulanmış mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır. Bu çalışmada, fenotipik olarak EMB'ye dirençli ve duyarlı olduğu saptanan klinik MTC izolatlarında *embA*, *embB* ve *embC* gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonların sıklığının ve paternlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya geleneksel fenotipik ilaç duyarlılık testi ile EMB dirençli 44 ve EMB, izoniyazid, rifampisin ve streptomisine duyarlı 20 olmak üzere toplamda 64 adet MTC izolatu dahil edilmiştir. DNA izolasyonu sonrası, EMB direnci ile ilişkili *embA*, *embB* ve *embC* gen bölgeleri özgül primer dizileri ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri, 'Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit' (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak döngü dizileme yapılmıştır. Reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi verileri çoklu dizi analiz programlarında hizalanarak mutasyona uğramış gen bölgeleri belirlenmiştir. Çalışmada EMB dirençli izolatların %68.2 (30/44)'sinde *embCAB* operonunda genomik mutasyonlar

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Seda Tezcan Ülger, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, Yenişehir 33343-Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 (324) 361 0684-29100, **E-posta (E-mail):** tezcanseda@yahoo.com

saptanmıştır. Dirençli izolatların %66 (29/44)'sında *embB* gen bölgesinde mutasyon saptanmış olup, bu mutasyonların %76 (22/29)'ünün 306. kodon pozisyonunda olduğu ve bu kodonda en yaygın saptanan mutasyon paternlerinin ATG→GTG (M306V; %58.6; 17/29), ATG→ATA, ATC veya ATT (M306I; %17.2; 5/29)'ye dönüşüm şeklinde olduğu belirlenmiştir. *embB* gen bölgesinde saptanmış diğer mutasyonlar; Y334H (%3.4; 1/29), D354A (%6.9; 2/29), E378A (%3.4; 1/29), G406C (%3.4; 1/29), M423I (%3.4; 1/29) ve E521A (%3.4; 1/29) olarak belirlenmiştir. EMB dirençli 44 izolatın birinde (%2.3) *embA* gen bölgesinde (L330L) ve ikisinde (%4.5) *embC* gen bölgesinde (bir izolatta T270I ve diğer izolatta T270I ve E305E) mutasyon saptanmıştır. Fenotipik olarak EMB duyarlı izolatların ise sadece birinde (%5) *embA* gen bölgesinde (E180G) mutasyon saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada EMB dirençli MTC izolatlarında mutasyonların sıklıkla *embB* geni 306. kodonda olduğu tespit edilmiştir ve EMB direncinin gelişmesinde bu mutasyonun potansiyel rolü bulunmaktadır. Ancak mutasyonların olmamasının fenotipik EMB direncini dışlamayacağı sonucuna varılmıştır. Sonuçlar, ülkemizde EMB direncine neden olan *embCAB* operonu mutasyonlarının moleküler epidemiyolojisinin aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*; Etambutol; *embCAB*; mutasyon; dizi analizi.

ABSTRACT

Ethambutol (EMB) is one of the first-line drugs used in the standard combination therapy for tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), and resistance to drugs that play a key role in treatment is increasing worldwide. Mutations in the *embCAB* operon that have been confirmed to be associated with resistance are responsible for EMB resistance. In this study, it was aimed to determine the frequency and patterns of mutations in *embA*, *embB* and *embC* gene regions in clinical MTC isolates found to be phenotypically resistant and susceptible to EMB. A total of 64 MTC isolates, 44 of resistant to EMB and 20 of susceptible to EMB, isoniazid, rifampicin, and streptomycin by conventional phenotypic drug susceptibility test, were included in the study. Following the DNA isolation, *embA*, *embB* and *embC* gene regions associated with EMB resistance were amplified with specific primer sequences. The PCR products were cycle sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) and electrophoretically separated on the ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Mutated gene regions were identified by aligning sequence analysis data in multiple sequence analysis programs. In the study, genomic mutations in the *embCAB* operon were detected in 68.2% (30/44) of the EMB resistant isolates. Mutations in the *embB* gene region were detected in 66% (29/44) of the resistant isolates, 76% (22/29) of these mutations were at codon 306 and the most common mutation patterns in this codon were determined as ATG→GTG (M306V; 58.6%; 17/29), ATG→ATA, ATC or ATT (M306I; 17.2%; 5/29). Other mutations in the *embB* gene region were determined as Y334H (3.4%; 1/29), D354A (6.9%; 2/29), E378A (3.4%; 1/29), G406C (3.4%; 1/29), M423I (3.4%; 1/29) and E521A (3.4%; 1/29). Of the 44 EMB-resistant isolates, mutations were detected in one (2.3%) of the isolate in the *embA* gene region (L330L) and in two (4.5%) of the isolates in the *embC* gene region (T270I in one isolate and T270I and E305E in the other isolate). Of the phenotypically EMB susceptible isolates, mutation was detected in only one (5%) of the isolates in the *embA* gene region (E180G). In our study, it was determined that mutations frequently occur in codon 306 of the *embB* gene in EMB-resistant MTC isolates and this mutation has a potential role in the development of EMB resistance. However, it was concluded that the absence of mutations does not exclude phenotypic EMB resistance. Our results will shed light on the molecular epidemiology of *embCAB* operon mutations that cause EMB resistance in our country.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Ethambutol; *embCAB*; mutation; sequence analysis.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis kompleksinin (MTC) neden olduğu tüberküloz (TB), dünyanın pek çok yerinde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre, 2020 yılında 9.9 milyon yeni TB olgusunun olduğu ve bu enfeksiyöz hastalıktan 1.3 milyon kişinin öldüğü tahmin edilmektedir¹. İmmün sistemi baskılanmış hasta sayısının artması, yaşanan nüfus ve çok ilaca dirençli suşlar gibi çeşitli faktörler nedeniyle tüm dünyada TB olguları artmaktadır².

Etambutol (EMB), DSÖ ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından doğrudan gözetimli TB tedavi stratejisinde önerilen, streptomisine (SM) alternatif olarak izoniyazid (INH), rifampisin (RIF) ve pirazinamid (PZA) ile birlikte kullanılan³, bakteriostatik özellikte birinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlardandır⁴. Antibiyotik kullanımından kaynaklanan seçici baskı, *M.tuberculosis*'te ilaç direnci gelişimi ile ilişkili en önemli risk faktörlerinden biridir. Bununla birlikte, MTC'de ilaç direncinin altında yatan ana moleküler mekanizma, ilaç hedefini veya tedaviye yanıtı yöneten diğer genleri değiştiren kromozomal mutasyonların ortaya çıkmasıdır⁵.

Küresel olarak tüm *M.tuberculosis* klinik izolatlarının neredeyse %4'ünün EMB'ye karşı direnç göstermesi büyük endişe oluşturmaktadır⁴. Bu nedenle, direnç oranını yavaşlatmaya yardımcı olacak EMB'nin ilaç direnç mekanizmasını anlamak büyük öneme sahiptir. EMB, mikobakteriyel hücre duvarının yapısal bileşenlerinden olan arabinogalakattan ve lipoarabinomannan biyosentezine katılan ve *embCAB* operonu tarafından kodlanan membranla ilişkili arabinosil transferazları inhibe ederek serbest mikolik asitlerin birikimine ve sonunda da *M.tuberculosis*'in ölümüne neden olur^{4,6}. Ardışık olarak *embC*, *embA* ve *embB* genlerini içeren *embCAB* operonundaki mutasyonlar, EMB dirençli klinik *M.tuberculosis* izolatlarının yaklaşık %50-70'inin oluşmasından sorumlu tutulmaktadır^{7,8}. Nükleotit değişimlerinin en yaygın olarak *embB* geninin 306. kodon pozisyonunda olduğu ve EMB dirençli izolatların yaklaşık %90'ında saptandığı bildirilmiştir⁹⁻¹¹. Klinik olarak EMB dirençli izolatlarda 306. kodon pozisyonunda gözlemlenen tek bir nükleotit değişikliğinin, farklı bir amino asidi kodlayan bir kodona dönüşümü ile sonuçlanan nokta mutasyonlarının en sık olarak ATG (Met)'den GTG (Val), CTG (Leu), ATA (Ile), ATC (Ile) veya ATT (Ile)'ye dönüşüm şeklinde olduğu belirtilmektedir⁹. Bununla birlikte EMB direnci ile ilişkili mutasyonların rastlandığı diğer *embB* gen pozisyonları ise kodon 406 ve 497 olarak bildirilmiştir^{12,13}. EMB direncinden sorumlu diğer gen bölgeleri ise *embR*, *ubiA* ve *iniA* olarak bildirilmektedir^{8,14}.

Klinik izolatlarda ilaç direncinin hızlı tespitinin, daha fazla direnç oluşmasının ve ayrıca ilaca dirençli izolatların yayılmasının önlenmesi amacıyla uygun tedaviyi başlatmasında büyük önemi vardır⁷. *M.tuberculosis* yavaş üreyen bir organizmadır ve izolasyon, tanımlama ile ilaç duyarlılık testi birkaç hafta veya daha uzun sürebilmektedir. İlaç duyarlılık testi için geleneksel BACTEC MGIT 960 sistemi gibi daha hızlı yöntemlere ek olarak¹⁵, son yıllarda mikobakterilerin hızlı tespiti, tür tanımlaması ve ilaç duyarlılık testi için direnç gösteren genomik mutasyonların saptanmasına yönelik tasarlanan polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ve ters hibridizasyona dayalı line prob moleküler testler giderek daha fazla kullanılmaktadır^{16,17}. Ancak bu tekniklerin, ilaç direncinden sorumlu olduğu bilinen mutasyonları saptaması gibi sınırlılıkları vardır. Ayrıca ilaç direncinin genetik mekanizmalarını araştırmak için çeşitli moleküler teknikler de kullanılabilir. Bu yöntemler, PCR ürünlerinin doğrudan dizi analizi, tek iplikli konformasyon polimorfizm analizi [single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP)], parça uzunluk polimorfizmi [restriction fragment length polymorphism (RFLP)], gerçek zamanlı PCR [real-time PCR (Rt-PCR)] analizi ve DNA microarray'i içerir¹⁸. Son zamanlarda fenolo-

tipik değişikliklerden sorumlu yeni fonksiyonel mutasyonları tanımlayabildiğinden, tam genom dizi analizi giderek daha fazla kullanılmaktadır¹⁵.

Genom düzeyinde saptanan mutasyon veya polimorfik bölgeler EMB'ye dirençli *M.tuberculosis* izolatlarının hızlı tespiti için testlerin geliştirilmesinde, moleküler epidemiyolojik bir biyobelirteç olarak da bilgi verme potansiyeline sahiptir^{7,19,20}. Çalışmada fenotipik olarak EMB'ye dirençli ve duyarlı MTC klinik izolatlarında EMB direnci ile ilişkili *embA*, *embB* ve *embC* gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonların sıklığının ve patternlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylandı (Tarih: 23/11/2017 ve Karar no: 20/329).

Klinik İzolatlar

Çalışmaya geleneksel ilaç duyarlılık testi ile fenotipik olarak en az EMB direnci saptanan 44 ve EMB, INH, RIF ve SM'ne duyarlı 20 olmak üzere toplamda 64 adet klinik MTC izolatı dahil edildi (Tablo I). İzotların 43 (23 dirençli ve 20 duyarlı)'ü Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarından, geri kalan 21 dirençli izolatın 11'i Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Merkezi Mikobakteri Laboratuvarından, 10'u Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Referans Laboratuvarından temin edildi.

İzolatların primer izolasyonu, kültürü ve tür tanımlaması, standart mikobakteriyolojik prosedürlere göre yapıldı²¹. İzolatların anti-TB ilaç duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 cihazında üretici firmanın önerdiği standart prosedüre göre gerçekleştirildi. İlaç konsantrasyonları; SM 1.0 µg/mL, INH 0.1 µg/mL, RIF 1.0 µg/mL ve EMB için 5.0 µg/mL'dir. İlaç duyarlılık profili belirlenen izolatlar +4°C'de saklandı.

Tablo I. EMB Dirençli İzolatların Anti-TB İlaç Duyarlılık Testi Sonuçlarına Göre Sınıflandırılması

EMB Dirençli İzolatlar	İzolat Sayısı
EMB Monorezistan	4
Birden Çok İlaça Dirençli	12
EMB+S	5
EMB+INH	6
EMB+S+INH	1
Çok İlaça Dirençli	28
EMB+INH+RIF	1
EMB+S+INH+RIF	27
Toplam	44

EMB: Etambutol, SM: Streptomisin, INH: İsoniazid, RIF: Rifampisin.

Bakteriyel DNA İzolasyonu

İzolatları canlandırmak için Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanıldı. Katı besiyerine saklanan izolatlardan bir öze dolusu, sıvı besiyerine saklanan izolatlardan da 100 µl hacim alınarak Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine aktarıldı ve 37°C'de 2-3 hafta inkübe edildi. LJ besiyerinde üreyen MTC izolatlarına ait kolonilere hızlı DNA ekstraksiyon protokolü uygulandı²². Bir öze dolusu koloni 1 ml steril distile su içinde süspansiyon edildikten sonra 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı. Bakteri hücreleri 12 000x g devirde 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su eklenerek karıştırıldı. Karışım 12 000x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve oluşan süpernatant PCR'de kalıp DNA olarak kullanıldı.

embCAB Operonunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu

EMB direncinin belirlenmesi için, MTC genomunun *embCAB* operonundaki *embA* gen bölgesinin *embA1* (nt. 203-906) ve *embA2* (nt. 858-1196) primerleri, *embB* gen bölgesinin *embB1* (nt. 640-1002), *embB2* (nt. 898-1423) ve *embB3* (nt. 1405-1747) primerleri ve *embC* gen bölgesinin ise *embC* (nt. 655-988) primerleri ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Tablo II)¹⁴.

Her bir örneğin PCR amplifikasyonu, 50 µl'lik reaksiyon hacimlerinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı; 5 µl 10X PCR tamponu, 2 µmol/µl MgCl₂, 0.2 µmol/µl dNTP karışımı, 0.25 pmol/µl her bir primer (sense ve antisense), 1.25 U Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, EPO402, Litvanya) ve 5 µl örnek DNA'sı içermektedir. Örneklerin ısı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Almanya) amplifikasyon koşulları ise, 95°C'de yedi dakika başlangıç denatürasyonu, ardından 35 döngü 95°C'de bir dakika denatürasyon, *embA1*, *embB1* ve *embC* için 63°C, *embB3* için 64°C ve *embA2* ve *embB2* için 68°C'de bir dakika bağlanma ve 72°C'de beş dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de beş

Tablo II. EMB Direncinden Sorumlu *embCAB* Gen Bölgelerini Belirlemek için Kullanılan Özgül Primer Dizileri¹⁴

Gen Bölgesi	Primer Dizileri (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Hedef Bölge (nt)	Hedef Bölge Uzunluğu (bp)
<i>embA</i>	<i>embA1F</i> : GCCGGCTATGTAGCCAACCTA <i>embA1R</i> : GACCGTTCCACCAACACC	63	203-906	338
	<i>embA2F</i> : GCGCGCTGGACATCTCGAT <i>embA2R</i> : CGCCTCCGTGCGCCGAAATA	68	858-1196	704
	<i>embB1F</i> : CCGACCACGCTGAAACTGC <i>embB1R</i> : GTAATACCAGCCGAAGGGATCCT	63	640-1002	364
	<i>embB2F</i> : GACGGCTACATCCTGGGCATG <i>embB2R</i> : TGCCGACCAGCCGATGACG	68	898-1423	525
<i>embB3</i>	<i>embB3F</i> : CGTCATCGCCTGGTCCGGCAC <i>embB3R</i> : ACATGGTGCCGAAGATGACCG	64	1405-1747	342
	<i>embCF</i> : GATACCCGCTACAGCAGCA <i>embCR</i> : GGTCGTAGTACCAGCCGAAA	63	655-988	334

dakika son uzama basamağı şeklinde uygulandı. PCR ürünleri, 0.5 µg/mL etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 120 voltta 30 dakika elektroforeze tabi tutulduktan sonra UV görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa) görüntüledi. PCR ürünlerinden *embA* geni; 338 ve 704 bp, *embB* geni; 364, 525 ve 342 bp ve *embC* geni; 334 bp uzunluğunda bant elde edilen örnekler pozitif olarak değerlendirildi (Tablo II).

PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi

İlaç direncinden sorumlu olan *embCAB* gen bölgesinin PCR amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, elde edilen ürünler işaretli dideoksinükleotitleri içeren 'Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit' (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanarak, 'sense' ve 'antisense' zinciri PCR'de kullanılan primerler ile döngü dizileme PCR'si yapıldı. Döngü dizileme sonrası reaksiyon ürünlerine saflaştırma işlemi uygulandı. Saflaştırma işlemi sonrasında, 'ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer' (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin kapiler elektroforez işlemi gerçekleştirilerek dizi verileri kromatogram şeklinde elde edildi. Dizi analizi sonrası her zincir komplementeri ile birlikte kromatogram dalgalarının pik uzunluklarının karşılaştırılması ile kontrol edildi ve gerekli düzeltmeler yapıldı. CLUSTAL X versiyon 1.83 yazılım programında her iki zincir karşı karşıya getirilerek hizalandı ve daha sonra GENDOC versiyon 2.6.002 (Multiple Sequence Alignment Editor&Shading Utility) DNA dizi analizi yazılım programında son konsensus dizi şeklinde kayıt edildi. Her bir izolata ait dizisi çıkarılmış olan gen bölgeleri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında yayınlanmış referans H37Rv dizi verileri ile karşılaştırılarak *embCAB* gen bölgesindeki özgül nükleotit değişiklikleri ve olası diğer polimorfik bölgeler belirlendi. Mutasyonlar sense ve antisense dizinin her ikisinde tespit edildiğinde kayıt edildi.

BULGULAR

embCAB operonu gen bölgelerinin DNA dizi analizi sonrası fenotipik olarak EMB dirençli 44 izolatın 30 (%68.2)'unda genomik düzeyde mutasyon saptanmıştır. Fenotipik olarak dirençli izolatlardan 14 (%31.8)'ünde ise bu üç gen bölgesinde mutasyon saptanmamıştır. Mutasyon saptanan izolatların 28 (%93.3, n= 30)'inde sadece *embB* gen bölgesinde, birinde (%3.3) *embA*, *embB* ve *embC* gen bölgelerinde ve bir (%3.3) izolatta da sadece *embC* gen bölgesinde EMB direnci ile ilişkili olabilecek nükleotit değişikliği saptanmıştır (Tablo III).

Fenotipik olarak EMB dirençli MTC izolatlarının %66 (29/44)'sında *embB* bölgesinde mutasyon saptanmış olup, bu mutasyonların %76 (22/29)'sının bu bölgede sık karşılaşılan 306. kodon pozisyonunda olduğu görülmüştür. 306. kodon pozisyonundaki en yaygın saptanan mutasyon paterninin ATG→GTG (M306V; %58.6; 17/29), ATG→ATA, ATC veya ATT (M306I; %17.2; 5/29)'ye dönüşüm şeklinde olduğu belirlenmiştir. *embB* gen bölgesinde saptan diğer mutasyonlar; Y334H (%3.4; 1/29), D354A (%6.9; 2/29), E378A (%3.4; 1/29), G406C (%3.4; 1/29), M423I (%3.4; 1/29) ve E521A (%3.4; 1/29) olarak belirlenmiştir (Tablo IV). Çalışmaya dahil edilen fenotipik olarak EMB'ye duyarlı 20 izolatın hiçbirinde *embB* gen bölgesinde mutasyon saptanmamıştır.

Tablo III. Fenotipik Olarak EMB'ye Dirençli İzolatlarda *embB*, *embA* ve *embC* Gen Bölgelerindeki Mutasyon Paternleri

Nükleotit ve Aminoasit Değişimi			İzolat Sayısı, n= 44 (%)
<i>embB</i>	<i>embA</i>	<i>embC</i>	
M306V (ATG→GTG)	Sokak tipi	Sokak tipi	17 (%38.6)
M306I (ATG→ATA)	Sokak tipi	Sokak tipi	2 (%4.5)
M306I (ATG→ATC)	Sokak tipi	Sokak tipi	2 (%4.5)
M306I (ATG→ATT)	Sokak tipi	Sokak tipi	1 (%2.3)
Y334H (TAC→CAC)	Sokak tipi	Sokak tipi	1 (%2.3)
D354A (GAC→GCC)	Sokak tipi	Sokak tipi	2 (%4.5)
E378A (GAG→GCG)	L330L (CTG→TTG)	T270I (ACC→ATC)	1 (%2.3)
G406C (GGC→TGC)	Sokak tipi	Sokak tipi	1 (%2.3)
M423I (ATG→ATA)	Sokak tipi	Sokak tipi	1 (%2.3)
E521A (GAG→GCG)	Sokak tipi	Sokak tipi	1 (%2.3)
Sokak tipi	Sokak tipi	T270I (ACC→ATC) E305E(GAG→GAA)	1(%2.3)
Sokak tipi	Sokak tipi	Sokak tipi	14 (%31.8)

*M: Metiyonin (Met), V: Valin (Val), D: Aspartat (Asp), A: Alanin (Ala), I: İzolösin (Ile), L: Lösin (Leu), E: Glutamat (Glu), Y: Tirozin (Tyr), H: Histidin (His), C: Sistein (Cys), T: Treonin (Thr).

Tablo IV *embB* 306. Kodon Pozisyonundaki En Yaygın Saptanan Mutasyon Paternleri

İzolat Sayısı, n= 29 (%)	Nükleotit ve Aminoasit Değişimi
	<i>embB</i>
17 (%58.6)	M306V (ATG→GTG)
2 (%6.9)	M306I (ATG→ATA)
2 (%6.9)	M306I (ATG→ATC)
1 (%3.4)	M306I (ATG→ATT)
1 (%3.4)	Y334H (TAC→CAC)
2 (%6.9)	D354A (GAC→GCC)
1 (%3.4)	E378A (GAG→GCG)
1 (%3.4)	G406C (GGC→TGC)
1 (%3.4)	M423I (ATG→ATA)
1 (%3.4)	E521A (GAG→GCG)

*M: Metiyonin (Met), V: Valin (Val), D: Aspartat (Asp), A: Alanin (Ala), I: İzolösin (Ile), E: Glutamat (Glu), Y: Tirozin (Tyr), H: Histidin (His), C: Sistein (Cys), T: Treonin (Thr).

Çalışmaya dahil edilen 44 dirençli izolatın birinde (%2.3) *embA* gen bölgesinde EMB direnci ile ilişkili olabilecek mutasyon saptanırken, kalan 43 (%97.7)'ünde mutasyon saptanmamıştır. Bu mutasyonun *embA* gen bölgesinde sık karşılaşılan 330. kodonda CTG→TTG (L330L) sessiz (nonsinonim) mutasyonu olduğu görülmüştür (Tablo III). EMB duyarlı 20 izolatın birinde (%5) ise 180. kodonda GGA→GGC (E180G) mutasyonu saptanmıştır.

embC gen bölgesinde ise EMB dirençli 44 izolatın ikisinde (%4.5) EMB direnci ile ilişkili mutasyon saptanırken, kalan 42 izolatta (%95.5) ise herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Direnç saptanan izolatların birinde 270. kodonda ACC→ATC (T270I)'ye dönüşüm şeklinde mutasyon saptanırken, diğerinde hem 270. kodonda ACC→ATC (T270I) mutasyonu hem de 305. kodonda GAG→GAA (E305E) sessiz mutasyonu saptanmıştır (Tablo III). Fenotipik olarak EMB duyarlı izolatlarda ise *embC* gen bölgesinde mutasyon saptanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen izolatların direnç paternlerine göre ise, ÇİD izolatların %93 (26/28)'ünde *embB* gen bölgesinde mutasyon saptandığı görülmüştür. EMB, INH, RIF ve SM'ye dirençli 27 izolatın ikisinin; EMB direnci ile birlikte SM direncine sahip beş izolatın dördünün; EMB ve INH direncine sahip altı izolatın dördünün ve sadece EMB dirençli olan dört izolatın üçünün *embCAB* mutasyonu taşımadığı görülmüştür (Tablo V).

Tablo V. EMB'ye Dirençli İzolatlarda *embB*, *embA* ve *embC*'deki Mutasyonlar

Direnç Paterni	İzolat Sayısı	Nükleotit ve Aminoasit Değişimi		
		<i>embB</i>	<i>embA</i>	<i>embC</i>
EMB+SM+INH+RIF	17	M306V (ATG→GTG)	Sokak tipi	Sokak tipi
	2	M306I (ATG→ATC)	Sokak tipi	Sokak tipi
	1	M306I (ATG→ATT)	Sokak tipi	Sokak tipi
	1	M306I (ATG→ATA)	Sokak tipi	Sokak tipi
	1	Y334H (TAC→CAC)	Sokak tipi	Sokak tipi
	2	D354A (GAC→GCC)	Sokak tipi	Sokak tipi
	1	G406C (GGC→TGC)	Sokak tipi	Sokak tipi
	2	Sokak tipi	Sokak tipi	Sokak tipi
EMB+INH+RIF	1	M306I (ATG→ATA)	Sokak tipi	Sokak tipi
EMB+SM+INH	1	Sokak tipi	Sokak tipi	Sokak tipi
EMB+SM	4	Sokak tipi	Sokak tipi	Sokak tipi
	1	Sokak tipi	Sokak tipi	T270I (ACC→ATC) E305E (GAG→GAA)
EMB+INH	1	E378A (GAG→GCG)	L330L (CTG→TTG)	T270I (ACC→ATC)
	1	E521A (GAG→GCG)	Sokak tipi	Sokak tipi
	4	Sokak tipi	Sokak tipi	Sokak tipi
EMB	1	M423I (ATG→ATA)	Sokak tipi	Sokak tipi
	3	Sokak tipi	Sokak tipi	Sokak tipi

*EMB: Etambutol, SM: Streptomisin, INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin, M: Metiyonin (Met), V: Valin (Val), D: Aspartat (Asp), A: Alanin (Ala), I: İzolösin (Ile), L:Lösin (Leu), E: Glutamat (Glu), Y: Tirozin (Tyr), H: Histidin (His), C: Sistein (Cys), T: Treonin (Thr).

TARTIŞMA

EMB, birinci seçenek anti-TB tedavi rejiminin önemli bir bileşenidir ve ayrıca duyarlılığı gösterilebildiğinde çok ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) için ikinci seçenek rejimlere dahil edilen önemli bir ilaçtır²³. EMB direnci ile ilgili geleneksel görüşler EMB mutasyonlarının ilaç-protein etkileşimini değiştirmesi sonucu direnç geliştiğine odaklanmıştır¹⁴. MTC'de EMB'ye direnç sıklıkla *embCAB* operonunda meydana gelen mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir²⁴. *embB* geninin 298-318 kodonlarını kapsayan ve EMB direnç belirleme bölgesi olarak adlandırılan bu bölgedeki mutasyonlar, EMB'ye dirençli izolatlarda yaygın olarak gözlenmektedir²⁵. Direncin moleküler mekanizmasının anlaşılması, tedavi kararlarını kolaylaştırabilecek ve alternatif tedavi stratejilerine yönelik yaklaşımların oluşturulmasını sağlayacak hızlı moleküler tanı testleri geliştirmek için oldukça önemlidir²⁶.

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, EMB'ye dirençli klinik MTC izolatlarının yaklaşık %37-90'nunun *embB* gen bölgesinde mutasyon taşıdığı gösterilmiştir^{4,6,11,20,27,28}. Ülkemizde Sağlık tarafından yapılan tez çalışmasında²⁹ dirençli izolatlarda bu oran %66.6 (14/21) olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda da EMB dirençli izolatların %66 (29/44)'sında *embB* gen bölgesinde mutasyon saptanmıştır.

En sık mutasyon oranı *embB* geni 306. kodonda gözlenmekte olup; bu güçlü korelasyon nedeniyle, *embB* geni 306. kodondaki mutasyonlar, EMB direncinin hızlı tespiti için bir belirteç olarak önerilmiştir¹⁹. Yapılan çalışmalarda *embB* geni 306. kodondaki mutasyon oranı, Kuveyt'te³⁰ %100 (15/15), Almanya'da²⁵ %98.5 (68/69), Çin'de^{6,14} %89.7 (25/39) ile %68 (63/93), Polonya'da⁴ %69.2 (9/13), Gürcistan'da²⁷ %68.5 (85/124), Güney Kore'de²⁸ %67.9 (57/84), Lizbon'da²⁴ %55 (33/60), Hindistan'da³¹ %44 (17/39) ve İran'da³² %20 (1/10) olarak bildirilmiştir. Görüldüğü gibi *embB* geni 306. kodon mutasyonlarının dünyanın birçok coğrafi bölgesinden farklı oranlarda bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada da fenotipik olarak EMB dirençli MTC izolatlarında mutasyonların %76 (22/29)'sının literatürde bildirilen çalışmalarla uyumlu olarak en sık 306. kodonda olduğu tespit edildi. Sonuçlarımız, *embB* geni 306. kodon mutasyonlarının EMB direncini tahmin etmek için yararlı bir moleküler belirteç olabileceği sonucunu doğrulamaktadır.

Literatürde yer alan çalışmalarda, *embB* geni 306. kodonda meydana gelen özgül ve sessiz mutasyonların en fazla ATG (Met)'den GTG (Val) ile ATA (Ile), ATC (Ile) ve ATT (Ile)'ye değişim ile sonuçlanan sessiz mutasyon şeklinde olduğu bildirilmiş ve ATG'den GTG'ye değişim oranlarının %41-66^{4,6,14,25,27,28,30,31}, ATA'ya %12.8-33^{4,6,14,25,27,28,30,31}, ATC'ye %1-18^{4,14,25,28,31} ve ATT'ye %1.8-5.8^{6,14,25,28} oranında olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda bu verilerle uyumlu olarak *embB* 306. kodonda meydana gelen mutasyonların en sık ATG'den GTG (%58.6)'ye olmak üzere, sırasıyla ATA (%6.9), ATC (%6.9) ve ATT (%3.4) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde Sağlık²⁹ tarafından sadece 306. kodon ATG→GTG mutasyonu %28.6 (4/14) oranında bildirilmiştir. Ülkemizde Yazısız ve arkadaşlarının daha fazla sayıda izolat üzerinde yaptıkları bir çalışmada³³, sınırlı sayıda mutasyonu hedefleyen ters hibridizasyona dayalı line prob moleküler yöntemi ile 306. kodon Met→Val mutasyon oranı %78.7 (59/75) ve Met→Ile %13.3 olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada, genom düzeyinde mutasyonlar gösterilmediği için özgül nükleotid değişiklikleri belirtilmese de çalışma ile yakın mutasyon oranları elde edilmiştir. Diğer yandan 306. kodonda rastlanılan diğer mutasyonlar ise ATG→CTG (%3.5-12.6)^{14,27,28,30,31} ve TTG (%3.2 ve %6)^{14,31} olarak bildirilmiştir.

embB gen bölgesinde dirençle ilişkili sık rastlanan 306. kodon mutasyonlarından sonra en sık 406. kodon (%7-23.5)^{4,6,14,27,28,34}, 497. kodon (%3-14)^{14,28,34}, 354. kodon (%3.6-7.2)^{14,27,28} ve 328. kodonda (%0.8 ve %3.3)^{4,27} mutasyon saptandığı bildirilmiştir. Yapılan iki çalışmada 354. kodon (%7.2)²⁷ ve 296. kodonda (%2.5 ve %4.2)^{6,34} nispeten yüksek oranda mutasyon saptandığı bildirilmiştir. Çalışmamızda ise 306. kodon dışında 354 (n= 2, %6.9), 334 (n= 1, %3.4), 378 (n= 1, %3.4), 406 (n= 1, %3.4), 423 (n= 1, %3.4) ve 521. kodonda (n= 1, %3.4) dirençle ilişkili mutasyonlar görülmüştür (Tablo IV). Çalışmamızda 521. kodonda (GAG→GCG) saptanan mutasyonun ise daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmediği görülmüştür ve ilk kez çalışmamızda yeni mutasyon olarak saptanmıştır. Diğer yandan *embB* 406. ve 497. kodonlarda görülen bazı mutasyonların yüksek düzey EMB direnci ve geniş anti-TB ilaç direnci spektrumlarını gösterdiği bildirilmiş olup¹⁴, *embB* gen bölgesinde saptanan bu diğer mutasyonların direnç spektrumları ile birlikte göz önünde bulundurulması faydalı olabilir.

embA ve *embC* gen bölgelerindeki mutasyonları araştıran nispeten sınırlı sayıda çalışmaya rastlanılmış olup, *embB* mutasyonlarına göre daha az sıklıkta saptandığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda fenotipik olarak EMB dirençli MTC izolatlarında *embC* gen bölgesi mutasyonlarının coğrafi olarak değişkenlik gösterdiği görülmüştür. *embC* gen bölgesinde mutasyon Kuveyt'te³⁵ %0 (0/50), Çin'de¹⁴ %2.8 [3/109, 305. kodon (GAG→GAA, 2 izolat; GAG→GAC)], İran'da³² %10 [1/10, 270. kodon (ACC→ATC)] ve Hindistan'da³⁶ %13 [3/23, 270. kodon (ACC→ATC)] oranında bildirilmiştir. Yine Hindistan'da Srivastava ve arkadaşları³⁷ tarafından yapılan bir çalışmada EMB dirençli izolatların %32 (14/44)'inde *embC* gen bölgesinde 270. kodon (ACC→ATC) ve %25 (11/44)'inde 297. kodon (ATT→ACC/CTG)'da oldukça yüksek oranda mutasyon saptandığı bildirilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada fenotipik olarak EMB dirençli izolatların %4.5 (2/44)'inde *embC* gen bölgesinde mutasyon saptanmış olup, direnç saptanan izolatların birinin diğer çalışmalarda da ağırlıklı olarak bildirilen 270. kodonda ACC→ATC mutasyonu ve diğerinin ise 270. kodonda ACC→ATC ile 305. kodonda GAG→GAA (E305E) sessiz mutasyonu ile sonuçlanan ikili mutasyon taşıdığı saptanmıştır (Tablo III).

embA gen bölgesi mutasyonları ise fenotipik olarak EMB dirençli MTC izolatlarında; Kuveyt³⁵ ile Hindistan'da³⁶ %0 (0/50 ve 0/23) ve Çin'de¹⁴ %3.7 [4/109, 125. kodon (GTG→GGG), 343. kodon (GTG→TTG), 105. kodon (CTG→GTG), 380. kodon (CTG→CCT)] oranında bildirilmiştir. Bu çalışmada da fenotipik olarak EMB dirençli MTC izolatlarının %2.3 (1/44)'ünde *embA* gen bölgesinde 330. kodonda CTG→TTG (L330L) sessiz mutasyonu taşıdığı saptanmıştır. Bu sonuçlara göre EMB dirençli MTC izolatlarının *embA* gen bölgesi mutasyonlarını *embC*'ye göre daha az sıklıkta taşıdığı görülmektedir.

Dünyanın çeşitli yerlerinde giderek artan sayıda gözlemlenen ilaca dirençli ve ÇİD-TB suşları, TB eradikasyon programlarının ilerlemesini engelleyen küresel bir sağlık sorunudur¹³. Bu sebeple *M.tuberculosis*'in ÇİD ve yaygın ilaca dirençli suşlarının hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanması için yeni araçlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır³⁸. Önceki çalışmalar, EMB direnci ve özellikle *embB* 306. kodon mutasyonunun INH veya RIF direnci veya ÇİD-TB gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir^{5,20,39,40}. Yapılan çalışmalar ÇİD ancak EMB duyarlı izolatlar göre EMB dirençli ÇİD suşlarda daha yüksek oranda *embB* 306. kodonda mutasyon saptandığını bildirmiş olup, EMB dirençli ÇİD suşlarda bu oran %35.3-86.9 arasında değişmektedir^{13,38,40-42}. Yaptığımız çalışmada ise EMB dirençli izolatların %64 (28/44)'ü ÇİD olarak belirlenmiş olup, ÇİD izolatların %93 (26/28)'ünde oldukça yüksek oranda *embB* gen bölgesinde ve %75 (21/28)'inde *embB* 306. kodonda mutasyon saptanmıştır. Çalışmada literatürde bildirilen verilerle uyumlu olarak ÇİD izolatlarında EMB direncinden sorumlu *embB* geni mutasyonlarının daha sık görüldüğü tespit edilmiş olup, sonuçlar ÇİD-TB'un hızlı tespiti için *embB* geni ve 306. kodon mutasyonlarının kullanılmasının potansiyel bir rolü olduğunu göstermektedir. Görüldüğü gibi *embB* 306. kodondaki mutasyonların tanımlanması, EMB direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacak ve bu mutasyonun ÇİD-TB için potansiyel öngörücü değerinin değerlendirilmesine yardımcı olacaktır.

Çalışmada, fenotipik olarak EMB dirençli izolatların büyük bir bölümünde, ilaç direnci ile ilişkili genlerin farklı kodonlarında çok sayıda mutasyon taşıdığı gösterilmiş olsa da fenotipik olarak EMB direnci saptanan izolatların %31.8'inde çalışılan *embCAB* bölgelerinde herhangi bir mutasyon saptanmadı. Fenotipik ve genotipik ilaç duyarlılığı arasındaki bu farklılığın birden fazla sebebi olabilir. Bunlar; bakteri popülasyonun heterorezistan izolatları içermesi, EMB'nin inkübasyon koşullarında stabilitesinin bozulması, mevcut geleneksel fenotipik ilaç duyarlılık testinin uygulamadaki kısıtlılıkları²³ ve bu operon dışında *embR*, *ubiA* ve *iniA* gibi diğer genlerde başka mutasyonların veya başka mekanizmaların dahil olabilmesidir^{8,14}. Bu durum EMB'ye karşı direncin öngörülmesi için moleküler bir biyobelirteç olarak *embB* 306. kodon mutasyonlarının kullanılmasını sınırlamakta ve EMB'ye dirençli izolatların daha ileri moleküler karakterizasyonunun önemini göstermektedir⁶. Bu nedenle, bu tür mutasyonların tanımlanmasına dayanan moleküler analiz yararlıdır, ancak tüm ilaç dirençli olguları tahmin etmek için tam olarak yeterli değildir. Bu sonuçlara dayanarak, moleküler olarak ilaç direncinin saptanması, geleneksel kültüre dayalı yöntemlere ek olarak kullanılabilir. Diğer yandan, mutasyon saptanmayan fenotipik olarak EMB direnci bulunan klinik MTC izolatlarında *embCAB* operonu dışında farklı gen bölgelerinde olası direnç mekanizmalarını araştıran daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

embB geni 306. kodon mutasyonları, klinik MTC izolatlarında EMB direncini saptamak için potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilse de yakın zamanlarda, fenotipik olarak EMB duyarlı izolatlarda da *embB* gen bölgesi 306. kodonda %2-31.2 oranında direnç ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar görüldüğü rapor edilmiştir^{14,20,27,30,43}. Çalışmamızda duyarlı izolatlarda *embB* gen bölgesinde mutasyon saptanmadı. Benzer sonuçlar Almanya ve

Hindistan'da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir^{25,31}. Bu bulgular, dirençli izolatlarda *embB* gen bölgesi özellikle 306. kodonda meydana gelen mutasyonların EMB direnci ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan Park ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada²⁸, duyarlı MTC izolatlarının iki tanesinde *embB* geni 360. kodon ve 459. kodonda mutasyon bildirmiştir. Çalışmamızda duyarlı izolatlarda *embC* gen bölgesinde de mutasyon saptanmamıştır. Bu bulgular ışığında dirençli bir izolatta saptadığımız *embC* gen bölgesi 270. kodonda meydana gelen mutasyon EMB direnci ile ilişkilendirilebilir. Diğer yandan çalışmamızda duyarlı bir izolatın *embA* gen bölgesi 180. kodonda (GGA→GGC) mutasyon taşıdığı saptanmıştır. Khosravi ve arkadaşları tarafından İran'da yapılan bir çalışmada³² da EMB duyarlı bir izolatta *embA* gen bölgesi 330. kodonda (CTG→TTG, Leu→Leu) sessiz mutasyon saptandığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar *embA* gen bölgesinde meydana gelen mutasyonların EMB direnci ile ilişkili olmayabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ülkemizde *embCAB* operonu mutasyonlarının araştırıldığı ilk çalışmadır. Fenotipik olarak EMB dirençli MTC izolatlarının %68.2'sinde bu operondaki *embA*, *embB* ve *embC* gen bölgelerinin üçünde de mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların EMB dirençli izolatların %66'sında *embB* gen bölgesinde bulunduğu ve en sık karşılaşılan mutasyon olan *embB* geni 306. kodon mutasyonu %76 oranında gösterilmiş olup, bu sonuçlar çalışma popülasyonunda *embB* geni 306. kodon mutasyonları ile EMB direnci arasında oldukça önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar *embB* 306. kodon mutasyonlarının EMB direncinin izlenmesinde önemli bir moleküler belirteç olarak kullanılabilmesi hipotezini desteklemektedir. Ancak mutasyonların olmamasının fenotipik EMB direncini dışlamayacağı sonucuna varılmıştır. Elde edilen veriler ülkemizde EMB direncine neden olan *embCAB* operonu mutasyonlarının moleküler epidemiyolojisinin aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018-3-TP3-3089).

ETİK KURUL ONAYI

Çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 23/11/2017, Sayı: 20/329).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021> (Accessed date: 16.09.2022).
2. Caraux-Paz P, Diamantis S, de Wazières B, Gallien S. Tuberculosis in the elderly. J Clin Med 2021; 10(24): 5888. <https://doi.org/10.3390/jcm10245888>

3. Ahmad S, Mokaddas E, Jaber AA. Rapid detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by PCR-RFLP targeting *embB* codons 306 and 497 and *iniA* codon 501 mutations. *Mol Cell Probes* 2004; 18(5): 299-306. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.04.001>
4. Bakula Z, Napiorkowska A, Bielecki J, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Jagielski T. Mutations in the *embB* gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 167954. <https://doi.org/10.1155/2013/167954>
5. Sun L, Zhang L, Wang T, Jiao W, Li Q, Yin Q, et al. Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* induced by anti-tuberculosis treatment result in metabolism changes and elevation of ethambutol resistance. *Infect Genet Evol* 2019; 72: 151-8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.027>
6. Li Y, Wang Y, Zhang Z, Gao H, Wang H, Cao J, et al. Association between *embB* codon 306 mutations, phenotypic resistance profiles, and genotypic characterization in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(12): 7295-302. <https://doi.org/10.1128/AAC.00532-16>
7. Zhao LL, Sun Q, Liu HC, Wu XC, Xiao TY, Zhao XQ, et al. Analysis of *embCAB* mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(4): 2045-50. <https://doi.org/10.1128/AAC.04933-14>
8. Xiang X, Gong Z, Deng W, Sun Q, Xie J. Mycobacterial ethambutol responsive genes and implications in antibiotics resistance. *J Drug Target* 2021; 29(3): 284-93. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1853733>
9. Mohammadi B, Ramazanzadeh R, Nouri B, Rouhi S. Frequency of codon 306 mutations in *embB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to ethambutol: A systematic review and meta-analysis. *Int J Prev Med* 2020; 11: 112. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_114_19
10. Nguyen TNA, Anton-Le Berre V, Bañuls AL, Nguyen TVA. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis; a literature review. *Front Microbiol* 2019; 10: 794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00794>
11. Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan AM, Lahlou O, Elouad R, et al. Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(4): 278-84. <https://doi.org/10.3855/jidc.125>
12. Sun Q, Xiao TY, Liu HC, Zhao XQ, Liu ZG, Li YN, et al. Mutations within *embCAB* are associated with variable level of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 62(1): e01279-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01279-17>
13. Bwalya P, Solo ES, Chizimu JY, Shrestha D, Mbulo G, Thapa J, et al. Characterization of *embB* mutations involved in ethambutol resistance in multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Zambia. *Tuberculosis (Edinb)* 2022; 133: 102184. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102184>
14. Xu Y, Jia H, Huang H, Sun Z, Zhang Z. Mutations found in *embCAB*, *embR*, and *ubiA* genes of ethambutol-sensitive and -resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 951706. <https://doi.org/10.1155/2015/951706>
15. Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, et al. Advances in diagnosis of tuberculosis: An update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Rep* 2020; 47(5): 4065-75. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05413-7>
16. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, et al. The new Xpert MTB/RIF Ultra: Improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio* 2017; 8(4): e00812-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00812-17>
17. Viñuelas-Bayón J, Vitoria MA, Samper S. Rapid diagnosis of tuberculosis. Detection of drug resistance mechanisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35(8): 520-8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.015>
18. Parsons LM, Somoskövi A, Urbanczik R, Salfinger M. Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis. *Front Biosci* 2004; 9: 2086-105. <https://doi.org/10.2741/1290>
19. Plinke C, Walter K, Aly S, Ehlers S, Niemann S. *Mycobacterium tuberculosis embB* codon 306 mutations confer moderately increased resistance to ethambutol in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6): 2891-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.00007-10>

20. Cuevas-Córdoba B, Juárez-Eusebio DM, Almaraz-Velasco R, Muñiz-Salazar R, Laniado-Laborin R, Zenteno-Cuevas R. Mutation at *embB* codon 306, a potential marker for the identification of multidrug resistance associated with ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(9): 5455-62. <https://doi.org/10.1128/AAC.00117-15>
21. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Yayın No: 1129, 2. Baskı Ankara, Mayıs 2019.
22. Sajduda A, Brzostek A, Poplawska 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>
23. Plinke C, Cox HS, Kalon S, Doshetov D, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Tuberculosis ethambutol resistance: Concordance between phenotypic and genotypic test results. *Tuberculosis (Edinb)* 2009; 89(6): 448-52. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.09.001>
24. Perdigão J, Macedo R, Ribeiro A, Brum L, Portugal I. Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: Prevalence and significance of *embB*306 mutations. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(4): 334-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.021>
25. Plinke C, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(5): 1900-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1900-1902.2006>
26. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol* 2006; 8(2): 97-111.
27. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(5): 2032-41. <https://doi.org/10.1128/AAC.01550-10>
28. Park YK, Ryoo SW, Lee SH, Jnawali HN, Kim CK, Kim HJ, et al. Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with *embB* gene mutations in Korea. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 4): 529-34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.037614-0>
29. Sağlam S. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında anti-tüberküloz ilaçlara direncin moleküler yöntemlerle araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, 2016.
30. Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; 87(2): 123-9. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.05.004>
31. Das R, Katoch K, Jadaun GPS, Gupta P, Sharma VD, Malhotra B, et al. Studies on mutations in *embB* locus in Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* having high degree of ethambutol resistance. *Current Science* 2006; 91(7): 923-5.
32. Khosravi AD, Sirous M, Abdi M, Ahmadkhosravi N. Characterization of the most common *embCAB* gene mutations associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iran. *Infect Drug Resist* 2019; 12: 579-84. <https://doi.org/10.2147/IDR.S196800>
33. Yazısız H, Hırçın Cenger D, Uçarman N, Altın S. The molecular patterns of resistance to anti-tuberculosis drugs: An analysis from Istanbul, Turkey. *J Chemother.* 2020; 32(2): 66-74. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1716477>
34. Brossier F, Sougakoff W, Bernard C, Petrou M, Adeyema K, Pham A, et al. Molecular analysis of the *embCAB* locus and *embR* gene involved in ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(8): 4800-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.00150-15>
35. Jaber AA, Ahmad S, Mokaddas E. Minor contribution of mutations at *iniA* codon 501 and *embC-embA* intergenic region in ethambutol-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 2. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-2>

36. Jadaun GP, Das R, Upadhyay P, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Role of *embCAB* gene mutations in ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(5): 483-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.10.017>
37. Srivastava S, Ayyagari A, Dhole TN, Nyati KK, Dwivedi SK. *emb* nucleotide polymorphisms and the role of *embB306* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Int J Med Microbiol* 2009; 299(4): 269-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.07.001>
38. Luo T, Zhao M, Li X, Xu P, Gui X, Pickerill S, et al. Selection of mutations to detect multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1075-81. <https://doi.org/10.1128/AAC.00964-09>
39. Hazbón MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, et al. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: A novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9): 3794-802. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3794-3802.2005>
40. Shen X, Shen GM, Wu J, Gui XH, Li X, Mei J, et al. Association between *embB* codon 306 mutations and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7): 2618-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01516-06>
41. Gupta A, Singh SK, Anupurba S. Mutations at *embB306* codon and their association with multidrug resistant *M. tuberculosis* clinical isolates. *Indian J Med Microbiol* 2015; 33(3): 387-92. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.158560>
42. Tulyaprawat O, Chaiprasert A, Chongtrakool P, Suwannakarn K, Ngamskulrunroj P. Distribution of *embB* mutations of Thai clinical isolates of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; 18: 115-7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.033>
43. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: Implications for genotypic resistance testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40(10): 3810-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3810-3813.2002>