

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS KLİNİK
İZOLATLARINDA İZONİAZİD DİRENCİNE NEDEN OLAN
DIŞA ATIM POMPALARININ SAPTANMASI**

Dr. Özlem TUNCER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Zeynep SARIBAŞ**

ANKARA

2016

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş'a, anlayışını ve desteğini esirgemeyen anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Cumhur Özkuyumcu'ya ve anabilim dalımızın tüm öğretim üyelerine yürekten teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Geçirdiğimiz dört yılın unutulmaz ve özlenecek olmasını sağlayan tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Kısa bir süre birlikte çalışma fırsatı bulduğum, tecrübelerinden, bilgisinden ve hayat görüşünden çok şey öğrendiğim sayın Doç. Dr. Orhan Kaya Köksalan hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince her türlü çalışmamda yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen anabilim dalımız çalışanları Nejla Kılıç, İrfan Atmaca ve Coşkun Erdem'e çok teşekkür ederim.

Desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Özsoy ve Tuncer ailelerine, her zaman yanımda olan ve sevgisiyle destek olan sevgili eşime ve varlığıyla mutluluk saçan biricik kızıma teşekkür ederim.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Saygılarımla

Dr. Özlem Tuncer

ÖZET

***Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik izolatlarında izoniazid direncine neden olan dışa atım pompalarının saptanması**

Mycobacterium tuberculosis'te izoniazid direnci sıklıkla *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh* gibi gen bölgelerindeki spontan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar izoniazid dirençli izolatların yaklaşık %70-80'inde saptanmaktadır. Son yıllarda, dışa atım pompalarının *M. tuberculosis*'te izoniazid direncine neden olabileceği ve özellikle spontan mutasyon saptanmayan izolatlarda pompa ekspresyon genlerinin araştırılması gerektiği vurgulanmaktadır. Bu çalışmada, 50 adet izoniazid dirençli *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatında, izoniazid minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri agar dilüsyon yöntemiyle belirlendikten sonra pompa inhibitörleri (klorpromazin, verapamil, rezerpin) varlığında izoniazid MİK değerleri tekrar çalışılmış ve MİK değerlerindeki değişim araştırılmıştır. Eş zamanlı olarak izoniazid direncine sebep olduğu bilinen *katG* ve *inhA* gen bölgeleri mutasyonları DNA dizi analizi ile araştırılmıştır. Son olarak pompa inhibitörü varlığında etidyum bromür boyasının hücre içi yoğunluğu araştırılarak dışa atım pompalarının varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada, klinik izolatların %76'sında herhangi bir pompa inhibitörü varlığında izoniazid MİK değerlerinin en az bir dilüsyon ve üzerinde azalma gösterdiği saptanmıştır. Tek başına değerlendirildiğinde izolatların klorpromazin ile %68, verapamil ile %36 ve rezerpin ile %36'sının izoniazid MİK değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. İzolatların %86'sında *katG*, %42'sinde ise *inhA* bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir. Pompa inhibitörü varlığında en az 2 dilüsyon değişiklik saptanan 21 izolatın inhibitör varlığında ve yokluğunda hücre içindeki etidyum bromür yoğunluğu araştırılmış ve 11 izolatta pompa inhibitörü varlığında etidyum bromüre ait floresansın belirgin olarak daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızın sonuçları, izoniazid dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatlarında özellikle pompa inhibitörleri kullanılarak izoniazid gibi temel bir ilacın tedavide tekrar kullanılabilme ihtimalini desteklemektedir. Konu ile ilgili olarak daha fazla sayıda izolat içeren çalışmaların yapılmasının dirençli *M. tuberculosis* izolatlarının tedavisinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, dışa atım pompaları, izoniazid, klorpromazin, , rezerpin, verapamil

ABSTRACT

Determination of efflux pumps that cause isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates

Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* develops due to spontaneous mutations in the gene regions *katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* and *ndh*. Mutations in these genes can be detected in approximately 70-80% isoniazid resistant isolates. In recent years, it is emphasized that efflux pumps may cause isoniazid resistance in *M. tuberculosis* and pump expression should be investigated in isolates, especially in which the spontaneous mutations are not detected. In this study, we investigated the minimum inhibitory concentration (MIC) values of isoniazid for the 50 isoniazid resistant *M. tuberculosis* complex clinical isolates by agar dilution method then changes in isoniazid MIC values in the presence of efflux pump inhibitors (chlorpromazine, verapamil, reserpine). *katG* ve *inhA* gene mutations which were associated INH resistance were investigated by DNA sequence analysis. Finally the presence of efflux pumps were shown by observing decrease in accumulation of ethidium bromide in the cell at the presence of efflux pump inhibitor.

In this study, isoniazid MICs decreased 1 dilution and over in %76 of clinical isolates in the presence of efflux pump inhibitors. When considered alone, isoniazid MIC values decreased at least one fold dilution with chlorpromazine, verapamil and reserpine in 68%, 36% and 36% of the isolates respectively. *katG* gene mutations were detected in 86% of isolates whereas *inhA* mutations were detected in 42% of them. Twenty one isolates with at least decrease of 2 fold dilutions in isoniazid MIC values with an efflux pump inhibitor, were chosen and ethidium bromide concentrations inside the cell were detected in the presence and absence of efflux pump inhibitor. It was clearly observed that fluorescence due to the ethidium bromide was higher at the presence of pump inhibitor in 11 isolates. Our results support the possibility of reusing of isoniazid in treatment by adding efflux pump inhibitors. It is thought that studies containing more resistant isolates should be done in order to guide treatment of resistant *M. tuberculosis* clinical isolates.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, efflux pumps, isoniazid, chlorpromazine, reserpine, verapamil

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Epidemiyoloji	4
2.2.1. Dünyada Tüberküloz	4
2.2.2. Türkiye’de Tüberküloz	6
2.3. Mikrobiyoloji	7
2.3.1. Mikobakterilerin Sınıflandırılması	7
2.3.2. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri	9
2.3.3. Hücre Duvarı	9
2.4. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	11
2.4.1. İzoniazid	11
2.4.2. Rifampisin	12
2.4.3. Etambutol	12
2.4.4. Pirazinamid	13
2.5. İzoniazid Direnci	13
2.6. Dışa Atım (Effluks) Pompaları	14
2.7. <i>M. tuberculosis</i> ’te Dışa Atım Pompaları İlişkili İzoniazid Direnci	16
2.8. Atım Pompası İnhibitörleri	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. İncelenen Örnekler	22
3.1.1. Etik Kurul Onayı	22
3.2. Gereçler	22
3.2.1. Besiyerleri	22

3.2.2. Antibiyotik ve Pompa İnhibitörleri	22
3.2.3. Kimyasal Maddeler	22
3.3. İzolatların Canlandırılması	23
3.4. İzoniazid Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin Agar Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi	23
3.5. Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Agar Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi	24
3.6. Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin, İzoniazid Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerlerine Etkisinin Agar Dilüsyon Yöntemi ile Gösterilmesi	26
3.7. Etidyum Bromür Kullanılarak Dışa Atım Pompalarının Varlığının Gösterilmesi	26
3.8. DNA Dizi Analizi ile <i>katG</i> ve <i>inhA</i> Genlerindeki Mutasyonların Gösterilmesi	27
4. BULGULAR	32
4.1. İzoniazid Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları	32
4.2. Klorpromazin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları	33
4.3. Verapamil Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları	33
4.4. Rezerpin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları	35
4.5. İzoniazid ve Klorpromazin Kombinasyonunun MİK Sonuçları	36
4.6. İzoniazid ve Verapamil Kombinasyonunun MİK Sonuçları	36
4.7. İzoniazid ve Rezerpin Kombinasyonunun MİK Sonuçları	38
4.8. Etidyum Bromür Kullanılarak Dışa Atım Pompası Varlığının Gösterilmesi	39
4.9. DNA Dizi Analizi Sonuçları	40
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇLAR	53
KAYNAKÇA	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	ATP-Binding Cassette
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BCG	Bacillus Calmette Guerin
CCCP	Carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
ÇİD-TB (MDR-TB)	Çok ilaca dirençli tüberküloz (Multi drug resistant tuberculosis)
DNP	Dinitrofenol
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTCS	Dye terminator cycle sequencing
ETZ	Elektron transport zinciri
EZN	Ehrlich Ziehl Neelson
HIV	Human immunodeficiency virus
INH	İsoniazid
MFS	Major Facilitatör Super Family
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NDH2	NADH dehidrojenaz 2
OADC	Oleic acid albumine dextrose catalase
ORF	Open Reading Frame
PPD	Pürifiye protein derivesi
RND	Resistance Nodulation Division
SDH	Süksinat dehidrojenaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SMR	Small Multidrug Resistance
UV	Ultraviyole
YİD-TB (XDR-TB)	Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (Extensively drug resistant tuberculosis)

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Atım pompası aileleri, enerji kaynakları ve substratları	20
Şekil 4.1. İzolatların izoniazid MİK dağılımları	32
Şekil 4.2. İzolatların klorpromazin MİK dağılımları	33
Şekil 4.3. İzolatların verapamil MİK dağılımları	34
Şekil 4.4. İzolatların rezepin MİK dağılımları	35
Şekil 4.5. İzolatların klorpromazin varlığında izoniazid MİK değişimleri	36
Şekil 4.6. İzolatların verapamil varlığında izoniazid MİK değişimleri	37
Şekil 4.7. İzolatların rezepin varlığında izoniazid MİK değişimleri	38
Şekil 4.8. İzolatların inhibitör varlığında izoniazid MİK değişimleri	39
Şekil 4.9. Pompa varlığı yönünden pozitif kabul edilen iki izolatın görüntüsü	39
Şekil 4.10. <i>katG</i> gen bölgesinde Ser 315 Thr mutasyonu	40
Şekil 4.11. <i>katG</i> gen bölgesinde Ser 315 Asn mutasyonu	41
Şekil 4.12. <i>inhA</i> gen bölgesinde 15C-T mutasyonu	41
Şekil 4.13. <i>inhA</i> gen bölgesinde 8T-A mutasyonu	42
Şekil 4.14. <i>inhA</i> gen bölgesinde 8T-C mutasyonu	42
Şekil 4.15. İzoniazid MİK değerleri ve dirençle ilişkili mutasyonların birlikteliği	43

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. DSÖ Bölgelerine Göre Tahmini Tüberküloz Hastalık Yüğü, 2014	6
Tablo 2.2. Woods ve Washington sınıflandırması	8
Tablo 2.3. Tüberküloz tedavi rejimi	11
Tablo 2.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'te ilaç direnciyle ilişkili dışa atım pompaları	18
Tablo 4.1. Klinik izolatların MİK değerleri ve DNA dizi analizi sonuçları	44

1. GİRİŞ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis kompleks* olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan kronik bir enfeksiyondur. Hastalığın oluşumundan %97-99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri *M. tuberculosis* ile enfekte olup, bunların %5-10'unda hastalık gelişmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2015 raporuna göre 2014 yılında 9,6 milyon yeni olgu bildirilmektedir ve tüberküloz 1,5 milyon kişinin ölümüne sebep olmasıyla hala önemli bir halk sağlığı problemidir. Tüm dünyadaki hastaların yaklaşık %95'i ve ölümlerin %98'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Tüberküloz vakalarının çoğu Güney-Doğu Asya, Afrika ve Batı Pasifik bölgelerinde yer almaktadır. DSÖ 2015 raporuna göre Türkiye'deki tüberküloz prevalansı 22/100.000'dir. Tüberküloz önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen tüm dünyada enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölümlerin AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) hastalığından sonra ikinci en sık sebebidir ve ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini korumaktadır (1-2).

Tüberküloz tedavi edilebilir bir hastalıktır. Ancak tedavisi birden fazla ilacın birlikte ve uzun süre kullanılmasını gerektirir. Kullanılan ilaçlar primer ve sekonder ilaçlar olarak gruplandırılmaktadır. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M24A2 dökümanına göre primer ilaçlar izoniazid (INH), rifampisin, pirazinamid ve etambutol olup sekonder ilaçlar streptomisin, etiyonamid, sikloserin, kanamisin, siprofloksasin, ofloksasin, moksifloksasindir (3). Genellikle tedavi ilk iki ay INH, rifampisin, pirazinamid ve etambutolün birlikte başlanıp sonraki en az altı ay boyunca INH ve rifampisinle devam edilmesi şeklindedir. Uygun kombinasyonda ve uygun dozlarda verilen tedavi ile hastaların büyük kısmı tedavi edilebilmektedir. Ancak daha önce hiç tedavi almamış hastalarda ilaçlara karşı (primer) direnç görülebildiği gibi, uzun süreli tedaviye hasta uyumunun tam olmaması, ilaçların düşük dozlarda düzensiz kullanılması gibi sebeplerle tedavi alan hastalarda da zamanla (sekonder) direnç geliştiği bilinmektedir. İlaça dirençli tüberküloz, INH, rifampisin, pirazinamid ve etambutol gibi primer ilaçlardan en az birine karşı görülen direnç varlığını tanımlar. Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB, multiple drug resistant tuberculosis=MDR-TB) ise INH ve rifampisine birlikte direnç görülmesidir (başka ilaca direnç de eklenebilir). Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD-TB, extensive drug resistant tuberculosis=XDR-TB), çok ilaca dirençli tüberküloza ek

olarak sekonder ilaçlardan bir kinolona ve enjeksiyonla kullanılan ilaçlardan (amikasin, kapreomisin, kanamisin) birine direncin eklenmesidir (4). Ülkemizde belirlenen direnç oranları; yeni olgularda INH'e %6,6, rifampisine %0,7 ve etambutole %1,3 olup önceden tedavi görmüş olgularda bu oranlar sırasıyla %7,8, %1,9 ve %0,6 şeklindedir. ÇİD-TB oranları ise yeni olgularda %0,5 iken önceden tedavi görmüş olgularda %4,7'dir (5).

İzoniazid, özellikle erken dönemde hızlı çoğalan basiller üzerinde bakterisidal etki gösterir. *M. tuberculosis* dışındaki bakterilere etkisiz olduğundan oldukça dar spektrumludur. Antitüberküloz etkinliği 1950'li yıllarda anlaşılan INH'a karşı direnç gelişmesinde temel olarak *katG* ve *inhA* genlerindeki mutasyonlar sorumlu tutulmakla birlikte, çeşitli çalışmalarda *kasA*, *ahpC*, *ahpC-oxvR* ve *ndh* gibi farklı bölgelerdeki mutasyonların da daha az miktarda da olsa dirençte rollerinin olduğu gösterilmiştir (6). Bununla birlikte, tüm INH dirençli izolatların yaklaşık %20-30 kadarında dirençle ilgili bilinen gen bölgelerinde mutasyonlara rastlanılmamaktadır (7). Bu durum dirence sebep olabilecek başka mekanizmaların varlığını düşündürmüştür. Üzerinde son yıllarda sıklıkla çalışılan mekanizmalar dışa atım (efflux) pompalarıdır. Dışa atım pompaları varlığında ilaç, hücre içinden dışarıya atılmakta ve hedefine ulaşmamaktadır (7, 8).

1990'ların sonları ve 2000'li yıllarda *M. tuberculosis*'te dışa atım pompalarının varlığı gösterilmiştir (9-10-11). *M. tuberculosis*'te şimdiye kadar "major facilitator superfamily (MFS), "ATP-binding cassette" (ABC), "small multidrug resistance" (SMR) ve "resistance-nodulation-division" (RND) ailelerine ait dışa atım pompalarının varlığı gösterilmiştir. *M. tuberculosis* izolatları çeşitli tüberküloz ilaçlarına maruz kaldıklarında dışa atım pompalarını kodlayan genlerin ekspresyonu artmaktadır.

Dışa atım pompaları *M. tuberculosis*'te tanımlandıktan sonra, izoniazid ile indüklenebilen dışa atım pompa adayları da belirlenmeye başlanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda başlıca, MFS ailesinden *Tap* ve *JefA*, ayrıca *iniA* membran proteinleri ve RND ailesinden *MmpL7*, izoniazid direnciyle ilişkilendirilmiştir. Bu pompaları kodlayan genlerin (sırasıyla, *rv12758c*, *rv2459*, *iniA* ve *mmpL7*) ekspresyonu izoniazid varlığında artmaktadır. Böylece izoniazide tolerans gelişmektedir (8, 12-14).

Dışa atım pompa inhibitörleri kullanıldığında izolatların direncinde azalma olmaktadır. Dışa atım pompa inhibitörleri, yeni tedavi seçeneği olabilmesi açısından

önemlidir. Tüberküloz ilaçlarına ek olarak pompa inhibitörlerinin kullanılması tedavi etkinliğini artıracaktır. Verapamil, klorpromazin, rezerpin başlıca dışa atım pompa inhibitörleridir (15-17). Verapamil, bir kalsiyum kanal blokürüdür. Anjina, hipertansiyon, kardiyak aritmi tedavisinde kullanılmaktadır. *M. tuberculosis*'te dışa atım pompalarını inhibe etmekte ve INH minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) değeri düşmektedir. Klorpromazin bir fenotiyazindir. Antipsikotik olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum transportunu inhibe eder. Rezerpin kalsiyum kanal blokörü olarak etki gösteren antihipertansif olarak kullanılan alkaloid bir maddedir (15-18). Dışa atım pompa inhibitörlerinin ilaçların MİK değerini düşürmesi, bu inhibitör moleküllerin tüberküloz tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatları ile ilgili olarak dışa atım pompa inhibitörlerinin etkinliğini belirlemeye yönelik çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır.

Bu çalışmada, 50 adet INH dirençli *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatının dışa atım pompa inhibitörleri (verapamil, klorpromazin ve rezerpin) varlığında INH MİK değerlerindeki değişimin incelenmesi ve INH MİK değerleri düşen izolatlardaki dışa atım pompalarının varlığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Almanya'da bulunan insan iskeletlerinde (M.Ö 5000) aside dirençli basil saptanması ve Mısır mumyalarında (M.Ö 3500-3000) tüberkülozu akla getiren bulgulara (Pott hastalığı) rastlanması, tüberküloz hastalığının çok eski zamanlardan beri var olduğunu göstermiştir (19).

Hipocrates (M.Ö 460-375) tüberküloz için elden ayaktan düşme, erime, tükenme anlamına gelen 'phthisie' tabirini kullanmıştır. Galenus veremli bir hasta ile birlikte yaşamının tehlikeli olduğunu ileri sürmüştür, İbni Sina da hastalığın insandan insana bulaşabileceğini yazmıştır. Rönesans döneminde (15. ve 17. yy) anatomik çalışmalara izin verilmesiyle birlikte Andres Vesalius tüberkülozlu hastaların otopsilerinde kaviter lezyonların varlığını bildirmiştir (19-20).

İnsandan insana bulaşabileceği anlaşılan tüberküloz hastalığının etkeni 1882'de Robert Koch tarafından gösterilmiştir. Koch aynı zamanda 1884'de basilin saf kültürünü elde etmiş, deneysel olarak hayvanları enfekte ettikten sonra bu hayvanlardan tekrar basili izole etmiştir. Başlangıçta *Bacterium tuberculosis* adıyla anılmasına karşın yavaş üremesi ve koloni görünümüyle mantarlara benzetilmesinden dolayı 1866'da *Mycobacterium tuberculosis* olarak adlandırılmıştır (19,21,22).

Koch tarafından basilin bulunmasını takiben 1921 yılında Albert Calmette ve Camille Guerin tüberküloz aşısını (BCG) geliştirmişler, 1939'da ise Florence Seibert ve Glenn tüberkülini (PPD) saflaştırmışlardır. Tanı ve korunmaya yönelik bu hızlı ilerlemeleri 1944'de Waksman'ın streptomisini keşfetmesi izlemiştir ve tüberkülozda antimikrobiyal tedaviye geçilmiştir. Tedaviye ilk giren streptomisini 1952'de izoniazid, 1954'te pirazinamid, 1962'de etambutol ve 1966'da rifampisinin bulunması takip etmiş ve tedavi süresi 18-24 aydan 6 aya kadar indirilmiştir (19, 23).

2.2. Epidemiyoloji

2.2.1. Dünyada Tüberküloz

İnsanların tüberküloz etkeni mikobakterilerle ilk karşılaşmalarının toplu yaşama geçmeleri ve hayvanları evcilleştirmelerinin sonucu olarak M.Ö 8000'li yıllarda olduğu tahmin edilmektedir. Çok eski zamanlardan beri bilinen ve büyük

oranda ölümlere sebep olan tüberkülozun etkeni ancak 1882’de bulunmuştur. Basilin gösterilmesinden sonra gelişmeler hızlanmış ve çok kısa bir zaman diliminde PPD ve BCG aşılı ile tüberkülozun tanı ve korunması yolunda önemli adımlar atılmıştır. Streptomisin ve diğer antitüberküloz ilaçların tedaviye girmesi ile de tüberkülozun önlenebilir, tedavi edilebilir bir hastalık olduğu anlaşılacak eradike edilebileceği umutları doğmuştur.

Tanı ve tedavideki gelişmeler sayesinde 20. yy ortalarında mortalite oranlarında belirgin bir azalma saptanmıştır. Yirminci yy. sonlarında AIDS pandemilerinin ve dirençli tüberküloz olgularının ortaya çıkmasıyla tüberküloz tekrar gündeme gelmiştir. Bunun üzerine 1993’te DSÖ ‘Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi’ni belirleyerek tüberkülozun eradikasyonu için harekete geçmiştir. Ancak 2000 yılında ulaşılması planlanan hedefler tam olarak gerçekleştirilememiş ve DSÖ 2006-2015 yılları için Tüberkülozu Durdurma Stratejisi (The Stop TB Strategy) programını hazırlamıştır. Tüberkülozu Durdurma Stratejisi programı ile 2015 yılı için prevalans ve tüberküloza bağlı ölümlerin %50 oranında azaltılması (1990 yılı verileri baz alınarak) hedeflenmiştir. 2050 yılında ise tüberkülozu bir halk sağlığı problemi olmaktan çıkarıp yıllık vaka sayısının 1/1000000 nüfusun altına düşürülmesi amaçlanmıştır.

DSÖ’nün 2015 yılı raporuna göre, 2014 yılında dünyada 9,6 milyon yeni tüberküloz vakası olduğu tahmin edilmektedir. Bu vakaların 5,4 milyonunu erkekler, 3,2 milyonunu kadınlar ve geri kalan 1 milyonunu ise çocuklar oluşturmaktadır. Yeni tüberküloz vakalarının %58’inin Güney-Doğu Asya ve Batı Pasifik bölgelerinde, %28’inin ise Afrika bölgesinde olduğu bildirilmektedir. Ülkeler bazında incelendiğinde ise Hindistan olguların %23’ünü, Endonezya ve Çin ise %10’arlık bölümünü barındırmaktadır. Tahminen 2014 yılındaki yeni olguların %3,3’ü ve daha önce tüberküloz tedavisi almış vakaların %20’si çok ilaca dirençli tüberküloz vakalarıdır. ÇİD-TB enfeksiyonuna bağlı olarak 2014 yılı süresince yaklaşık 190.000 kişinin hayatını kaybettiği sanılmaktadır. Aynı yıl içinde 111.000 kişi de ÇİD-TB tedavisi almaya başlamıştır. Bir başka önemli problem olan yaygın ilaç dirençli tüberküloz açısından 105 ülkeden bildirim yapılmış olup ÇİD-TB olanların %9,7’sinin YİD-TB olduğu düşünülmektedir (1).

2014 yılında tüberkülozdan ölenlerin sayısı, 1,1 milyonu HIV (Human immunodeficiency virus) negatif ve 0,4 milyonu ise HIV pozitif olmak üzere 1,5 milyon kişidir. Tüberküloza bağlı tüm ölümlerinin yaklaşık %90’ı ve HIV negatif

bireylerdeki ölümlerin de %80'i Afrika ve Güney-Doğu Asya bölgelerinde meydana gelmiştir. Dünyadaki tüberküloz ölümlerinin 1/3'ünün Hindistan ve Nijerya'da olduğu sanılmaktadır. 2014 yılındaki HIV negatif ölümlerin %7'sini ve HIV pozitif ölümlerin ise %14'ünü çocuk hastaların oluşturduğu bildirilmiştir (1).

9,6 milyon olgunun %12'si aynı zamanda HIV pozitif hastalardır ve bu hastaların %74'ü Afrika bölgesindedir. HIV ilişkili tüberkülozdan ölenlerin sayısı 2004 yılında 570.000 olup 2014'te bu sayı 390.000 olarak bildirilmiştir.

2000-2014 yılları arasında tüberküloz tedavisiyle 35 milyon HIV negatif hasta, tüberküloz ve antiretroviral tedaviyle de ek olarak 8 milyon HIV pozitif hasta tedavi edilmiştir (1).

2.2.2. Türkiye'de Tüberküloz

DSÖ'nün yayınladığı ‘‘Küresel Tüberküloz 2015 Raporu’’nda Türkiye'nin 2014 yılı insidans hızı yüz binde 18, nokta prevalans hızı yüz binde 22 ve tüberküloz mortalite hızı (HIV pozitif TB hariç) yüz binde 0,61 olarak belirtilmiştir (1) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: DSÖ Bölgelerine Göre Tahmini Tüberküloz Hastalık Yükü, 2014 (Yüz bin Nüfusta)

BÖLGE	İnsidans* (100.000'de)	Prevalans* (100.000'de)	Mortalite* (100.000'de)
Afrika Bölgesi	281	330	46
Güney Doğu Asya Bölgesi	211	286	24
Doğu Akdeniz Bölgesi	117	160	14
Batı Pasifik Bölgesi	85	116	4,8
Avrupa Bölgesi	37	48	3,7
TÜRKİYE**	18	22	0,61
Amerika Bölgesi	28	36	1,7
DÜNYA GENELİ	133	174	16

*Hızlar, nokta tahmin değerlerini göstermektedir.

**Türkiye, DSÖ Avrupa bölgesinde yer almaktadır.

“Türkiye’de Verem Savaşı 2014 Raporu’’na göre toplam 14.691 kayıtlı tüberküloz hastası bulunmaktadır. Bu hastaların %59,4’ünü erkekler, %40,6’sını ise kadınlar oluşturmaktadır (5).

Toplam olguların (14.691) %92,1’ini yeni olgular oluştururken geri kalanını önceden tedavi görmüş olgular oluşturmaktadır (5).

Hastaların %59,6’sı akciğer, %36,1’i akciğer dışı organ tutulumu, geri kalan %4,3’ü ise akciğer ve akciğer dışı organ tutulumu göstermiştir. Akciğer tutulumu olup mikroskopi yapılan olgulardaki mikroskopi pozitiflik oranı %64,1 kültür yapılanlarda kültür pozitiflik oranı ise %80,3 olarak saptanmıştır (5).

İlaç duyarlılık testi yapılan 5.399 hastanın %22,1’inde en az bir ilaca direnç saptanırken en yüksek direnç (%15,4) izoniazide karşı saptanmıştır. Çok ilaca dirençli olgu oranı ise yeni hastalarda %3,2 iken önceden tedavi görmüşlerde %21,8’dir (5).

DSÖ 2015 raporuna göre ülkemizde 2014 yılındaki tüm olguların %70’inin (9344 olgu) HIV durumu bilinmektedir. Bu hastalardaki HIV pozitiflik oranı ise < %1 olup toplam 45 olgudur (1,5).

2.3. Mikrobiyoloji

2.3.1. Mikobakterilerin Sınıflandırılması

Alem : Prokaryot

Bölüm : Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım : Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Cins : Mycobacterium

Tür : *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium, Actinomycetales takımı içinde incelenen ve Mycobacteriaceae ailesinde yer alan tek cinstir. Günümüzde 150’den fazla *Mycobacterium* türü tanımlanmıştır ve sıklıkla insanlarda enfeksiyon yapan kompleks ya da türler; *M. tuberculosis*, *M. avium* kompleks, *M. leprae*, *M. kansaasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. abscessus*’dur (24).

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri açısından birbirleriyle çok yakın ilişkili türler ‘kompleks’ adı altında incelenmektedir. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. africanum* ve *M. microti* türleri de *M. tuberculosis* kompleks başlığı altında değerlendirilmektedir. Bu kompleks içinden *M. tuberculosis* insanlardaki tüberküloz hastalığının en sık saptanan etkenidir (%97-99) ve tüberküloz basili dendiğinde akla gelen türdür (25).

M. tuberculosis kompleks dışındaki türler tüberküloz dışı mikobakteriler [Nontuberculosis mycobacteriaceae (NTM)] veya atipik mikobakteriler olarak sınıflandırılmaktadırlar (24-25). Doğada yaygın olarak bulunan ve insanlarda nadiren hastalık yapan bu bakteriler, özellikle immunsupresif bireylerde yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara sebep olabilirler.

Atipik mikobakteriler Runyon tarafından üreme hızları, koloni morfolojileri ve pigmentasyon özelliklerine göre dört grupta sınıflandırılarak incelenmişlerdir. Ancak bu sınıflama tüm mikobakteriler için yeterli olmamış ve 1987’de Woods ve Washington tarafından ilk olarak Wolinski’nin bahsettiği klinikle uyumlu bir sınıflandırma önerilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Woods ve Washington sınıflandırması

Klinik önemi olan mikobakteriler	<i>M. tuberculosis</i> kompleks		
İnsanda potansiyel patojen olan mikobakteriler	<i>M. avium-intracellulare</i> kompleks <i>M. kansasii</i> <i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks <i>M. scrofuloecum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. marinum</i> <i>M. celatum</i>	
İnsanda nadiren hastalık yapan saprofit türler	Yavaş üreyenler <i>M. gordonae</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. terrae-triviale</i> kompleks <i>M. shimoidei</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. paratuberculosis</i>	Orta hızda üreyenler <i>M. flavescens</i>	Hızlı üreyenler <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. phlei</i> <i>M. parafortuitum</i> kompleks

2.3.2. Mikobakterilerin Bakteriyolojik Özellikleri

Mycobacteriaceae ailesinin tek cinsi olan mikobakteriler, aerop, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, katalaz pozitif, 0,2–0,6 µm eninde, 1,0–10 µm boyunda, hafif kıvrık veya düzgün basiller şeklinde görülen mikroorganizmalardır. Balgam ve farklı klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda tek tek, birbirlerine paralel dizilim gösteren ikili üçlü gruplar halinde ya da uçlarından birbirlerine yaklaşarak X, V, L harfleri oluşturacak şekilde bir görüntü oluşturabilirler. Eski kültürlerinde veya uygunsuz koşullarda üreyen bakteriler daha uzun, filamentöz yapılar oluşturmuş veya kokoid formlarda da görülebilirler (25-26).

Mikobakterilerin üremesi için gerekli inkübasyon CO₂ oranı % 5–10'dur. Üremeleri için uygun ısı ortalama 37 °C olup, türler arasında 30–45 °C arasında değişebilmektedir. Katı besiyerinde kolonilerin gözle görünür hale gelmesi için, hızlı üreyen mikobakterilerde yedi gün yeterli olurken yavaş üreyen mikobakterilerde bu süre sekiz haftaya kadar uzayabilmektedir. Bazı türler pigment oluşturabilirken, koloni görünüşleri de türler arasında değişkenlik göstererek “smooth” veya “rough” koloniler gözlenebilmektedir. Işık varlığında pigment oluşturan türler ‘fotokromojen’, aydınlıkta da olmakla beraber özellikle karanlıkta pigment oluşturanlar ‘skotokromojen’, her iki ortamda da pigment oluşturmayanlar ise ‘kromojen olmayan’ türler olarak adlandırılırlar. *M. tuberculosis* suşları ise katı besiyerlerinde genellikle 14-21 günde, üstü ve kenarları girintili çıkıntılı, kuru, sert, kirli beyaz ve deve tüyü renginde ancak pigmentsiz koloniler oluşturur. (26,27,28,29).

Mikobakterilerin hücre duvar yapısının büyük bölümünü lipidler oluşturmaktadır. Bu duvar yapıları mikobakterilerin, asit, alkol, alkali ve kuru ortamlara karşı dirençli olmalarını sağlamaktadır. Aynı zamanda yoğun lipid varlığından dolayı klasik bakteriyolojik boyalarla boyanmazlar ve gram boyanma özelliklerinden bahsedilmez. Bazik fuksin boyası ile boyandıklarında da [Kinyoun veya Ehrlich-Ziehl-Neelson (EZN) yöntem] % 3'lük asit alkol ile dekolorizasyon aşamasından etkilenmezler ve mavi zeminde kırmızı basiller şeklinde gözlenirler. Mikobakterilerin aside dirençli boyanma özellikleri mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında kullanılan en önemli özelliklerinden biridir (21, 30).

2.3.3. Hücre Duvarı

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı diğer gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalardan oldukça farklı ve kompleks bir yapıdır. Bu yapının en iç

tabakasını diğer bakterilere benzer şekilde plazma membranı oluşturur. Orta tabakasında ağırlıklı olarak peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asitler yer alır. En dış tabakayı ise kord faktör, türe özgü peptidoglikolipitler ve oligoliposakkaritler, serbest lipitler ve hücrel immun yanıtın gelişmesini tetikleyen polipeptitler oluşturur (30-32).

2.3.3.1. Plazma Membranı

Mikobakterilerin plazma membranları diğer bakterilerdeki gibi çift katlı fosfolipid ve protein yapılarından oluşmaktadır. Periplazmik boşluk ile peptidoglikan tabakadan ayrılır (30-32).

2.3.3.2. Peptidoglikan Yapı

Mikobakteri hücre duvarının temel yapıtaşlarından olan peptidoglikan yapısı diğer bakterilerin peptidoglikan yapısından farklı olarak N-asetilglukozamin ve N-glikozilmuramik asid'in beta-glikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasıyla oluşan bir heteropolimerdir. Başka bir deyişle mikobakterilerdeki peptidoglikan yapısının iki temel farkı vardır. Bu farklar; muramik asidin diğer bakterilerdeki gibi asetillenmiş yapısı yerine glikozillenmiş şeklinin bulunması ve fosfodiester bağına katılan tetrapeptid yan zincirlerde diaminopimelik asidin yer almasıdır (30-32).

2.3.3.3. Arabinogalaktan

Arabinogalaktanın yapısını oluşturduğu bilinen D-galaktofranoz ve D-arabinofuranoz polisakkarit polimerlerine doğada oldukça az rastlanılmakta ve yapısal olarak diğer bakterilerdeki polisakkaritlerden oldukça farklılık göstermektedirler. Arabinogalaktanın yaklaşık otuz üiteden oluşan homogalaktan rezidüleri peptidoglikan yapısındaki muramik asidin C-6 pozisyonuna bağlanırlar. Aynı zamanda farklı mikolik asit türleri de mikolilarabinogalaktanı oluşturmak üzere dördü gruplar halinde arabinan zincirinin son pentarabinofuranozil ünitesinin üzerindeki uçlara bağlanırlar (32).

2.3.3.4. Mikolik Asitler

Mikolik asitler, mikobakterilerdeki hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini ve hücre lipidlerinin de % 60'ını oluşturan alfa dallanma gösteren beta hidroksillenmiş büyük yağ asitleridir. Arabinogalaktan yapısının arabinan parçası üzerinde

tetramikopentarabinofuranozil esteri şeklinde yerleşim gösterirler. Mikolilarabinogalaktan peptidoglikan kompleksinde iki farklı mikolik asit bulunmaktadır. Bunlardan en sık bulunanı oksitlenmiş grupları içermeyen ve 60 karbon büyüklüğünde olup yapısında bir çift bağ veya siklopropan halka içeren D-mikolik asitlerdir. D-mikolik asitler tüm mikolik asitlerin % 25'inden fazlasını oluşturmaktadırlar. Diğer mikolik asit türü ise oksitlenmiş gruplar içeren meromikolik asitlerdir (28, 30-32).

2.4. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar birinci seçenek ve ikinci seçenek ilaçlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır.

Birinci seçenek (major, primer) ilaçlar: İzoniazid, rifampisin, pirazinamid ve etambutol.

İkinci seçenek (minör, sekonder) ilaçlar: Etiyonamid, streptomisin, protiyonamid, para-amio salisilik asit, amikasin, kanamisin, kapreomisin, levofloksasin, moksifloksasin, gatifloksasin ve tiasetazon (3, 33).

Tablo 2.3: Tüberküloz Tedavi Rejimi (34)

OLGU TANIMI	BAŞLANGIÇ DÖNEMİ	İDAME DÖNEMİ
Yeni olgu	2 ay HRZE ya da HRZS	4 ay HR
Çocuk TB	2 ay HRZ	4 ay HR
Menenjit, miliyer, kemik-eklem TB	2 ay HRZE ya da HRZS	7-10 ay HR
Tedaviyi terkten dönen olgu/Nüks olgu	2 ay HRZES 1 ay HRZE	5 ay HR
Tedavi başarısızlığı	Uzmanlaşmış merkezlerde ikinci seçenek ilaçlarla tedavi	

TB: Tüberküloz H: İzoniazid R: Rifampisin Z: Pirazinamid E: Etambutol S:Streptomisin

2.4.1. İzoniazid

M. tuberculosis üzerine etkili olan izoniazid, makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, ucuz olması ve iyi absorbe edilmesi ile tedavi rejimlerinin tüm

basamaklarında kullanılan önemli bir antitüberküloz ilaçtır. Piridin halkası ve hidrazid grubu içeren oldukça basit bir yapısı olmasının yanında uzun zamandır kullanımda olan izoniazidin *M. tuberculosis*'e gösterdiği etkisi oldukça karmaşıktır. Oral ve parenteral şekilde alınabilen izoniazid bir ön ilaçtır ve özellikle erken dönemdeki hızlı çoğalan basiller üzerine bakterisidal etkilidir. Tüberküloz basili içine alınan izoniazid *katG* tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enzimi varlığında aktif formu olan izonikotinic aside dönüştürülür. İzonikotinic asid, nikotinic asidin antimetaboliti olarak etki yapar ve koenzim A sentezini bozar. Bunun sonucu olarak hücrede toksik özellikteki hidrojen peroksit yıkılamaz ve yüksek düzeyde toksik metabolit birikmesine bağlı olarak DNA, karbonhidratlar ve lipitler olmak üzere pek çok hedefte hasar oluşur ve hücre ölümü gerçekleşir. İzonikotinic asid temel olarak mikolik asid sentezini de inhibe etmektedir. İzonikotinic asid NAD ile birleşerek *inhA* tarafından kodlanan enoil-ACP redüktaz enziminin aktif bölgesine bağlanmaktadır. Mikolik asit yapımında görevli yağ asidi sentaz II (FASII) enziminin bir komponenti olan enoil-ACP redüktaz enzimi, doymamış açil-ACP bileşiklerini açil-ACP bileşiklerine redükte etmektedir (35-37).

Karaciğerde metabolize olan izoniazid vitamin B6 (piridoksin) bileşiklerinin biyolojik fonksiyonlarını etkilediğinden periferik nöropatiye ve anemiye yol açabilir. (36, 37).

2.4.2. Rifampisin

Streptomyces mediterranei'den izole edilen ve 1972'de antitüberküloz etkinliği fark edilen rifampisin, INH ile birlikte tüberküloz tedavi rejiminin ana iskeletini oluşturur. Hem hızlı çoğalan hem de dormant basillere etkilidir. DNA-bağımlı RNA polimeraz enziminin β -altünitesine bağlanarak transkripsiyonun başlamasını ve zincir uzamasını engelleyerek bakteri ölümüne sebep olmaktadır.

Rifampisin karaciğerde mikrozomal enzimleri indükleyerek pek çok ilacın yıkılımını artırır ve hepatotoksisite en önemli yan etkisidir. Rifampisine karşı antikor gelişmesi durumunda ise alerjik trombositopeniye neden olabilmektedir. Bunlara ek olarak idrar, ter, gözyaşı ve lensleri portakal rengine boyar (36, 37).

2.4.3. Etambutol

Sentetik olarak elde edilen ve bakteriyostatik özellik gösteren etambutolün kimyasal yapısı dietilendiamin hidroklorürün deoksi şeklidir. Etki mekanizması tam

olarak bilinmemektedir. Arabinoz analogudur ve arabinozil transferaz enzimi için hedef niteliğindedir. Etambutol, arabinozil transferaz enzimini inhibe ederek arabinogalaktan ve lipoarabinomannanın hücre duvarına taşınmasını engellemektedir. Çok nadir olarak retrobulber nörit, hiperürisemi ve gut artriti gibi yan etkileri olabilmektedir (37, 38).

2.4.4. Pirazinamid

Tüberküloza karşı etkisi 1952 yılında fark edilen ve nikotinamidin yapısal bir analogu olan pirazinamid kısa süreli tedavi protokollerine geçilmesine olanak sağlayan bir ilaçtır. Asidik şartlarda makrofajlar içinde yavaş çoğalan basillere en etkili bakterisidal ajandır. Pirazinamid INH gibi bir ön ilaç olup aktif formuna geçebilmesi mikobakteri tarafından sentezlenen pirazinamidaz varlığına bağlıdır. Pirazinamidin pirazinamidaz varlığında fagolizozomlar içinde aktif formu olan pirazinoik aside dönüşerek etkili olduğu bildirilmektedir (39-41).

Pirazinamid karaciğerde metabolize edilir ve böbrekler yoluyla vücuttan atılır. Hepatotoksik etki gösterebilmesinin yanı sıra ürik asit retansiyonu, fotosensitivite ve döküntü de yapabilmektedir (39-41).

2.5. İzoniazid Direnci

Bir piridin halkası ve hidrazid grubu içermesiyle basit bir yapıya sahip olan izoniazid tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçların başında gelmektedir. İzoniazid bir ön ilaç olup etki gösterebilmesi için *katG* geni tarafından kodlanan katalaz/peroksidaz enzimi tarafından aktif formu olan izonikotininik aside dönüştürülmesi gereklidir (42). Aktif hale gelen izoniazid, *inhA* tarafından kodlanan NADH bağımlı enoil-ACP redüktazı inhibe ederek mikolik asit sentezini engeller (43).

İzoniazid direncine sebep olarak gösterilen ve en sık karşılaşılan direnç mekanizmaları da; *katG* gen mutasyonları, *inhA* geni veya promoter bölge mutasyonlarıdır (44-45). İzoniazid dirençli *M.tuberculosis* kompleks izolatlarında sıklıkla saptanan mutasyonlar; *katG* geni için S315T ve *inhA* promoter bölgesinde ise -15C→T mutasyonudur. *katG* geninin 315. kodonunda sıklıkla Ser315Thr mutasyonu görülmekle birlikte nadir de olsa Asp63Glu, His108Gln, Thr262Arg, Ala350Ser ve Gly628Ser mutasyonları da dirençle ilişkili olarak saptanmıştır. *katG* geni S315T mutasyonu çok ilaca dirençli izolatlarda daha sık tespit edilirken, *inhA*

promoter bölgesi -15C→T mutasyonu ile tek başına izoniazid dirençli suşlarda daha sık karşılaşıldığı gösterilmiştir (46-48).

İzoniazid direncine sıklıkla *katG* ve *inhA* mutasyonları sebep olmakla birlikte *ahpC*, *kasA*, *ndh*, *oxyR-ahpC* ve *furA-katG* intergenik bölge mutasyonlarının da dirençle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bölgelerden *ahpC* bir alkil hidroperoksidaz redüktazı kodlar ve mikobakterinin reaktif oksijen moleküllerine karşı korunmasını sağlar. *ahpC* aşırı ekspresyonunun, katalaz/peroksidaz aktivitesini kaybeden mikroorganizma açısından kompensatuvar bir mekanizma olduğu kabul edilmektedir (41).

İlk kez *M. smegmatis*'te tanımlanan *ndh* mutasyonu NADH dehidrojenaz aktivitesini azaltmakta ve izoniazid ile birlikte etiyonamid direncine neden olmaktadır. *M. tuberculosis*'te *ndh* mutasyonu tek başına veya diğer bölge mutasyonları ile birlikte izoniazid direncine sebep olmaktadır.

İzoniazid direnci ile ilişkilendirilen farklı gen bölgelerinde mutasyonlar bildirilmesine karşın, tüm izoniazid dirençli izolatlarının yaklaşık %20-30 kadarında dirençle ilgili bilinen genlerde mutasyonlara rastlanılmamıştır (15). Bu durum da dirençle ilgili başka mekanizmaların olabileceğini düşündürmüştür. Son yıllarda *M. tuberculosis* kompleks izolatları için üzerinde en çok çalışılan mekanizma ise dışa atım pompaları olmuştur.

2.6. Dışa Atım (Effluks) Pompaları

Bakteriler antibiyotiklere karşı genel olarak üç yolla direnç kazanırlar. Bunlar, antibiyotiğin hedefi olan yapının değişikliğe uğratılması, antibiyotiği etkisiz hale getiren enzimlerin üretilmesi veya antibiyotik konsantrasyonunun bakteri hücresi içinde etkin düzeye ulaşmasının engellenmesidir (7, 49). Bu yöntemlerden antibiyotik konsantrasyonunun bakteri hücresi içinde düşük düzeyde kalması, ya hücre membranından geçirgenliğin azaltılması ya da hücre içine giren antibiyotiğin dışa atım pompaları ile etkin bir şekilde hücre dışına atılması ile sağlanmaktadır.

Prokaryotlardan ökaryotlara kadar pek çok hücrede bulunan dışa atım pompaları, bir kısmı primer çoğunluğu ise sekonder aktif transport yoluyla endojen veya ekzojen kaynaklı çeşitli maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan membran transport proteinleridir (49).

İlk defa 1976 yılında memeli kanser hücrelerinde bulunan P glikoproteininin kanser ilaçlarına karşı dirence neden olduğunun saptanmasıyla, bir direnç

mekanizması olan dışa atım pompalarının farkına varılmıştır. Kısa bir süre sonra *Escherichia coli*'de tetrasiklin direncine sebep olan bir pompa proteininin saptanmasıyla, bakterilerde dışa atım pompası aracılı direnç üzerine çalışmalar hızla artmıştır. Günümüzde gram negatif bakterilerde daha sık olmakla birlikte gram pozitif bakterilerde de artan oranlarda çoklu ilaç direnciyle ilişkili dışa atım pompalarına rastlanılmaktadır (7, 50).

Pek çok bakteride bulunan dışa atım pompaları aslında hücre için gerekli besin ve moleküllerin içeri alınmasından, toksik ve zararlı bileşiklerin ise hücre dışına atılmasından sorumlu olan, böylece hücre homeostazını düzenleyen ve extraselüler ortamla dengede olunmasını sağlayan büyük bir protein ailesinin üyeleridir (50). Bazı atım pompaları belirli bir substrata özgüllük gösterirken çoğu polispesifiktir ve yapısal olarak birbirinden farklı pek çok antibiyotiği de hücre dışına atma yeteneğine sahiptirler (12). Genel olarak dışa atım pompaları, yapıları, enerji kaynakları, substratları ve gen dizisi benzerliklerine göre beş büyük süper aileye ayrılırlar.

1. 'ATP-Binding Cassette (ABC)' super family,
2. 'Major Facilitator super family' (MFS),
3. 'Multidrug and Toxic compound Extrusion' (MATE) family,
4. 'Resistance-Nodulation-Division' (RND) family,
5. 'Small Multidrug Resistance' (SMR) family.

ABC süper ailesi atım pompaları iyonlar, amino asitler, peptidler, ilaçlar, boyalar, lipitler, polisakaritler ve proteinler gibi pek çok molekülün geçişini ATP hidrolizi ile sağladıkları enerjiyi kullanarak gerçekleştirirler (12, 31).

MFS, SMR, RND ve MATE ailesi üyeleri çoklu ilaç atım pompaları, protonların veya sodyum iyonlarının transmembran elektrokimyasal akımından faydalanarak sekonder aktif transport ile ilaçları hücre dışına atmaktadırlar (31). RND tipi proteinler çoğunlukla gram negatif bakterilerde saptanmışken SMR ailesinden olan pompa proteinleri genellikle katyonik özellikteki ilaçları hücre dışına atmaktadırlar (12, 31).

M. tuberculosis için varlığı saptanan pompa proteinleri sıklıkla MFS ve ABC ailesi üyeleri olup, SMR ve RND ailelerine ait daha az oranda pompa proteininin varlığı gösterilmiştir (51-57). ABC taşıyıcılarını kodlayan genler *M. tuberculosis*

genomunun %2,5'ini oluşturmaktadır ve hem sitoplazmadan hücre dışına hem de ekstraselüler ortamdan hücre içine transport yapabilmektedirler. Biyoinformatik analizler *M. tuberculosis* genomunun MFS ailesine ait 16 open reading frame (ORF) bölgesi içerdiğini göstermiştir (58).

2.7. *M. tuberculosis*'te Dışa Atım Pompaları İlişkili İzoniazid Direnci

M. tuberculosis, lipitten zengin hücre duvar organizasyonunun sağladığı düşük permeabilite ile pek çok antibiyotiğe karşı doğal direnç göstermektedir. Bu özel durumun yanı sıra, farklı organizmalarda varlığı ve aktiviteleri gösterilmiş dışa atım pompalarının da, tüberküloz tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı dirençte önemli bir katkısının olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

İzoniazid tüberküloz tedavisinin hem başlangıç hem de idame aşamasında kullanılan primer bir ilaçtır. Ancak yıllar içinde izoniazide dirençli izolatların sayısı artmıştır. İzoniazid direncinin başta gelen sebepleri ise hedef genlerde meydana gelen spontan mutasyonlardır. Başlıca bilinen mutasyonlar *katG* ve *inhA* gen bölgesi mutasyonları olmakla birlikte *ahpC*, *kasA*, *ndh*, *oxyR-ahpC* ve *furA-katG* gibi bazı gen bölgesi mutasyonları da izoniazid direncinden sorumlu tutulmaktadır. İzoniazid direncinden sorumlu gen bölgeleri bugün için, büyük oranda tanımlanmış olsa da hala izoniazid dirençli *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının %20-30 kadarında bilinen mutasyonlara rastlanılmamaktadır. Özellikle 2000'li yıllarda dirence sebep olabilecek dışa atım pompaları üzerinde çalışılmaya başlanmıştır.

İzoniazid direnci ile ilişkili olan atım pompaları üzerindeki çalışmalar hızla artmaktadır. Şu ana kadar pek çok gen bölgesi tanımlanmış olup bunlardan en bilinenleri; MFS ailesinden *Rv1258c*, *Rv1410c*, *jefA* (*Rv2459*), *efpA* (*Rv2846c*), ABC ailesinden *Rv1747*, *pstB* (*Rv0933*), SMR ailesinden *mmr* (*Rv3065*), RND ailesinden *mmpL7* (*Rv2942*) ve izoniazid tedavisiyle indüklenen *iniA* (*Rv0342*), *iniB* (*Rv03419*) ile *iniC* (*Rv0343*) genleridir (13, 18) (Tablo 2.4).

Dışa atım pompaları ile yapılan çalışmalar, genellikle izoniazide duyarlı laboratuvar izolatının seri pasajlarla izoniazidle karşılaştırılması ve dirençli hale gelmesi sonrası gen bölgelerinin araştırılmasına dayanmaktadır (9, 15). Klinik izolatlarla yapılan çalışmalar ise oldukça kısıtlı sayıdadır (17, 31). Dışa atım pompalarının varlığı genellikle, moleküler yöntemlerle gen bölgelerinin araştırılması, mRNA ekspresyonlarının incelenmesi, etidyum bromür boyasının hücre dışına atılımının gösterilmesi ya da atım pompası inhibitörleri kullanılarak bu pompaların

antitüberküloz ilaçların MİK değerleri üzerine etkisinin incelenmesi ile gösterilmektedir (9, 31, 59, 60).

Tablo 2.4: *Mycobacterium tuberculosis*'te ilaç direnciyle ilişkili dışa atım pompaları (18)

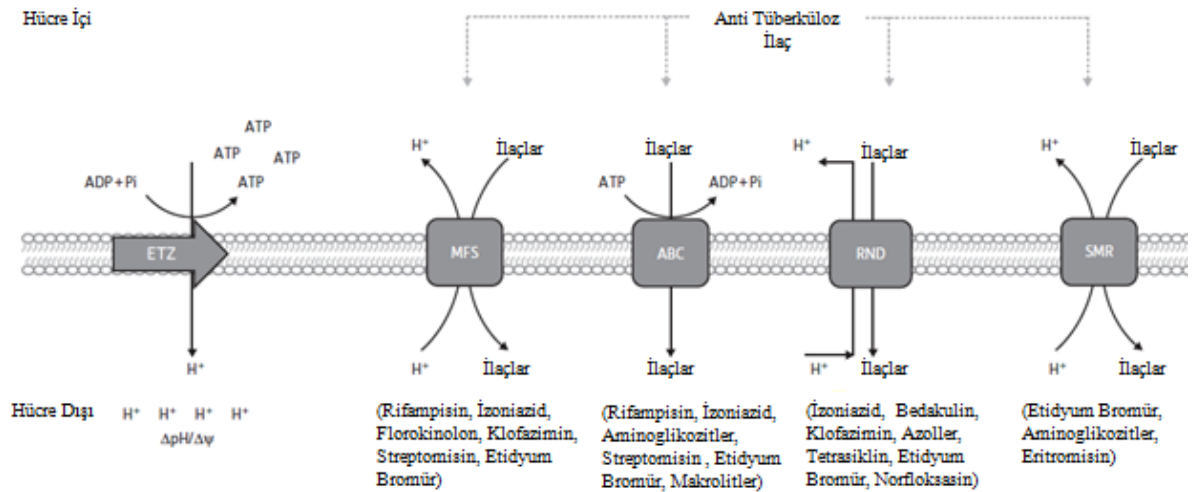
Gen	Tanımlama	Taşıyıcı ailesi	Enerji kaynağı	Dışa atılan muhtemel ilaçlar
<i>Rv0037c</i>	Muhtemel korunmuş integral membran proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv0194</i>	İlaç transport transmembran ATP bağlayıcı protein	ABC	ATP	-
<i>mmpS5 (Rv0677c)</i>	Membran proteini MmpS5	RND	PMF	TET
<i>Rv0849</i>	Muhtemel korunmuş integral membran proteini	MFS	PMF	β -laktamlar
<i>Rv1218c</i>	Muhtemel tetronasin transport ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	β -laktamlar
<i>Rv1250</i>	Muhtemel ilaç transport integral membran proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv1258c</i>	Korunmuş membran transport proteini	MFS	PMF	INH, RIF, EMB, OFL, β -laktamlar
<i>Rv1272c</i>	Muhtemel ilaç transport transmembran ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	-
<i>Rv1273c</i>	Muhtemel ilaç transport transmembran ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	--
<i>itrA (Rv1348)</i>	Muhtemel ilaç transport transmembran ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	--
<i>itrB (Rv1349)</i>	Muhtemel ilaç transport transmembran ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	-
<i>Rv1410c</i>	Aminoglikozid/tetrasiklin transport integral membran proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv1456c- Rv1458c</i>	İntegral membran proteinleri	ABC	ATP	-
<i>Rv1463</i>	Korunmuş transmembran ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	-
<i>Rv1634</i>	İlaç eflüks membran proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv1686c</i>	Muhtemel korunmuş ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	-
<i>Rv1687c</i>	Muhtemel korunmuş ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	-
<i>Rv1747</i>	Korunmuş transmembran ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	INH
<i>Rv1877</i>	Korunmuş membran proteini	MFS	PMF	TET, KAN, eritromisin
<i>bacA (Rv1819c)</i>	İlaç transport transmembran ATP bağlayıcı proteini, vitamin B12 alımı	ABC	ATP	-
<i>Rv2209</i>	Muhtemel korunmuş integral membran proteini	-	-	-
<i>Rv2333c</i>	Korunmuş membran transport proteini	MFS	PMF	TET, spektinomisin
<i>jefA (Rv2459)</i>	Korunmuş integral membran transport proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv2477c</i>	Muhtemel makrolid transport ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	-

<i>Rv2686c</i>	Antibiyotik transport membran l�sin- ve alanin- ve valin- zengin protein	ABC	ATP	CIP
<i>Rv2687c</i>	Antibiyotik transport membran l�sin- ve valin- zengin protein	ABC	ATP	CIP
<i>Rv2688c</i>	Antibiyotik transport ATP bağlayıcı proteini	ABC	ATP	CIP
<i>Rv2994</i>	Korunmuş membran proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv3000</i>	Muhtemel korunmuş transmembran proteini	ABC	ATP	-
<i>Rv3239c</i>	Korunmuş integral membran transport proteini	MFS	PMF	-
<i>Rv3728</i>	Korunmuş iki-analoglu membran proteini	MFS	PMF	-
<i>drxA (Rv2936)</i>	Daunorubisin-dim (dimycocerosate) transport ATP bağlayıcı protein ABC taşıyıcı DrrA	ABC	ATP	TET, STR, EMB, RIF
<i>drxB (Rv2937)</i>	Daunorubisin-dim transport membran protein ABC taşıyıcı DrrB	ABC	ATP	TET, STR, EMB
<i>drxC (Rv2938)</i>	Daunorubisin-dim transport membran protein ABC taşıyıcı DrrC	ABC	ATP	TET, STR, EMB
<i>efpA (Rv2846c)</i>	İntegral membran efluks proteini	MFS	PMF	Muhtemel INH
<i>emrB (Rv0783)</i>	Muhtemel �oklu ila� direnci integral membran efluks proteini EmrB	MFS	PMF	RIF
<i>iniA (Rv0342)</i>	İzonazid-ind�klenebilir gen proteini IniA	Membran proteini	-	INH, EMB
<i>iniB (Rv0341)</i>	İzonazid-ind�klenebilir gen proteini IniB	Membran proteini	-	INH
<i>iniC (Rv0343)</i>	İzonazid-ind�klenebilir gen proteini IniC	Membran proteini	-	INH
<i>mmpL3 (Rv0206c)</i>	Muhtemel korunmuş transmembran transport proteini MmpL3	RND	PMF	-
<i>mmpL4 (Rv0450c)</i>	Muhtemel korunmuş transmembran transport proteini MmpL4	RND	PMF	-
<i>mmpL5 (Rv0676c)</i>	Muhtemel korunmuş transmembran transport proteini MmpL5	RND	PMF	TET
<i>mmpL7 (Rv2942)</i>	Muhtemel korunmuş transmembran transport proteini MmpL7	RND	PMF	INH
<i>mmpL11 (Rv0202c)</i>	Muhtemel korunmuş transmembran transport proteini MmpL11	RND	PMF	-
<i>mmr (Rv3065)</i>	İntegral membran efluks proteini	SMR	PMF	Eritromisin, �-laktamlar
<i>pstB (Rv0933)</i>	Fosfat transport ATP bağlayıcı protein	ABC	ATP	INH, RIF, EMB, CIP

(CIP, siprofloksasin; EMB, etambutol; KAN, kanamisin; OFL, ofloksasin; PMF, proton itici g c (proton motive force); RIF, rifampisin; STR, streptomisin; TET, tetrasiklin)

2.8. Dışa Atım Pompa İnhibitörleri

Günümüzde farklı çalışmalarda dışa atım pompalarını inhibe ettiği gösterilmiş pek çok doğal veya sentetik kaynaklı moleküller mevcuttur. Bu moleküller, etki ettikleri atım pompasının enerji kaynağını keserek ya da doğrudan pompayı bloke ederek (pompaya özgü substratların yarışmalı veya yarışmasız inhibisyonu) işlev gösterirler. Farklı moleküllerin etki ettiği atım pompaları ailesi değişkenlik gösterirken bazı moleküllerin hala hangi atım pompaları üzerine etki ettiği netlik kazanmamıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Atım pompası aileleri, enerji kaynakları ve substratları
(Kaynak 61'den uyarlanmıştır)

Çok ilaca dirençli ve yaygın ilaç dirençli *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının artışı oldukça endişe verici boyutlardadır. Özellikle uzun zamandır antitüberküloz tedavi için yeni antibiyotik geliştirilememesi araştırmacıları yeni hedef arayışlarına yönlendirmiştir. Bu bağlamda son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan atım pompası inhibitörleri umut verici görünmektedir. Mikobakteriler ve diğer bakterilerde yoğun olarak çalışılan başlıca atım pompası inhibitörleri; verapamil, klorpromazin, piperidin, tioridazin, karbonil siyanid m-klorfenilidrazon (CCCP), dinitrofenol (DNP), valinomisin, rezepin ve piperindir.

Verapamil, klinik olarak kardiyak hastalıklarda, baş ağrısı ve migren tedavisinde kullanılan bir kalsiyum kanal blokörüdür. İn vitro çalışmalar, mikobakterilerde özellikle MFS ailesi atım pompalarına etkili olduğunu göstermiştir.

Aynı zamanda verapamilin, *M. tuberculosis* ve *M. avium* izolatlarında izoniazid, rifampisin gibi bazı ajanların direnç fenotipi üzerine etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (15, 52, 62 - 64).

Fenotiyazinler (klorpromazin, piperidin, tiyoridazin), sıklıkla antipsikotik ve antihistaminik olarak kullanılan ilaçlardır. Bu moleküller potasyum transportunu ve kalsiyum kanallarını inhibe ederek etki ederler. Özellikle klorpromazin ve tiyoridazinin in vitro olarak klaritromisin, izoniazid ve etidyum bromür transportunu inhibe ettiği farklı çalışmalarda görülmüştür (65 - 68).

Karbonil siyanid m-klorfenilidrazon, valinomisin ve DNP'yi içeren protonoforlar transmembran potansiyeli üzerinden atım pompalarını inhibe eden moleküllerdir. Bu grup mikobakterilerde sıklıkla MFS ailesine karşı etkinlik gösterirler (69 - 71).

Atım pompası inhibitörü olarak üzerinde sıklıkla çalışılan alkaloidler rezerpın ve piperindir. Ancak bu moleküllerin mikobakterilerdeki etkinliği ile ilgili in vitro çalışmalar kısıtlı sayıdadır (9, 72 - 74).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan bütün primer ilaçlara direnç geliştiği ve yeni antibiyotik bulunmasının zorluğu ile birlikte bedakulin gibi yeni antibiyotiklere de çok hızlı bir şekilde direnç geliştiği düşünüldüğünde, pek çok araştırmacı bilinen antibiyotik hedeflerinin dışında yeni tedavi stratejileri geliştirmenin gerekliliği konusunda hemfikir durumdadır (75-77). Bu açıdan atım pompalarının inhibitör özellikli moleküllerle susturulmaları ve tedavide kullanılan antitüberküloz ilacın daha düşük konsantrasyonda etkin hale gelmesi yönünde çalışmalar tüberküloz tedavisinde oldukça umut vaat edici yeni bir tedavi stratejisi olarak görünmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. İncelenen Örnekler

Bu çalışmaya, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı'nda izole edilen ve -80 °C'de %15 gliserollü Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde saklanan 50 adet izoniazid dirençli *M. tuberculosis* kompleks izolatu dahil edildi.

3.1.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26.08.2015 tarih ve GO15/563 kayıt numarasıyla değerlendirilerek onaylanmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Besiyerleri

Löwenstein-Jensen besiyeri (Salubris AŞ., Türkiye)

Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Middlebrook 7H11 katı besiyeri (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Oleik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Katalaz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dekstroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

3.2.2. Antibiyotik ve Pompa İnhibitörleri

İzoniazid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Verapamil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Klorpromazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Rezerpin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.2.3. Kimyasal Maddeler

Etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Etidyum bromür (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 Lizozim (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 Sodyum dodesil sülfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 Proteinaz K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 N cetyl-N, N, N-trimethyl amonyum bromür (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 İzoamilalkol (Merck, Darmstadt, Germany)
 İsopropanol (Merck, Darmstadt, Germany)

3.3. İzolatların Canlandırılması

Bu amaçla Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanıldı. Middlebrook 7H9 besiyeri 2,35 g tartılarak 450 ml distile su içinde karıştırıldıktan sonra 2 ml gliserol eklendi ve otoklavlandı. Eş zamanlı olarak Middlebrook 7H9 besiyerine eklenmek üzere oleik asit, albumin, dekstroz, ve katalazdan (OADC katkı çözeltisi) oluşan katkı çözeltisi hazırlandı. Elli ml OADC katkı çözeltisi için; 50 mg oleik asit, 5 gr albumin, 2 gr dekstroz, 4 mg katalaz, 850 mg NaCl tartıldı, 100 ml su içinde eritildi ve 0,22 µm por çaplı filtreden geçirmek suretiyle sterilize edildi. Otoklavdan çıkan Middlebrook 7H9 besiyeri yaklaşık 45-50 °C'ye geldikten sonra 1/10 oranında olacak şekilde OADC katkı çözeltisinden eklendi. Oda ısısında çözünen izolatların her birinden 100 µl hacim alınarak, steril 50 ml'lik tüplerde 5 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine ekildi. Hazırlanan kültürler 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 14-21 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra her bir kültür vortekslenerek 100'er µl hacim Löwenstein-Jensen katı besiyerine aktarıldı. On dört-yirmi bir gün 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilen katı besiyeri üzerinde yeterli üreme gözlenmesi üzerine izoniazid minimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmesi basamağına geçildi.

3.4. İzoniazid Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin Agar Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmamızda *M. tuberculosis* kompleks izolatlarında izoniazid MİK değerini saptamak için standart metod olarak kabul edilen agar dilüsyon yöntemi çalışıldı. Bu amaçla ilk olarak toz halindeki 100 mg izoniazid 10 ml steril distile su içinde çözülerek 10000 µg/ml konsantrasyonunda stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu

solüsyondan 1/10 sulandırılmalar yapılarak 10000 ve 100 µg/ml izoniazid konsantrasyonunda solüsyonlar hazırlandı.

Agar plaklarının hazırlanması için 13 farklı şişede eşit miktarlarda Middlebrook 7H11 katı besiyeri hazırlanıp otoklavlandı. Eş zamanlı olarak Middlebrook 7H11 besiyerine eklenmek üzere OADC katkı çözeltisi hazırlandı. Otoklavdan çıkan Middlebrook 7H11 besiyerleri yaklaşık 45-50 °C'ye geldikten sonra 1/10 oranında olacak şekilde OADC katkı çözeltisinden eklendi. Son olarak şişelere son konsantrasyonu sırasıyla 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 µg/ml olacak şekilde izoniazid solusyonundan eklendi. Farklı konsantrasyonlarda izoniazid içeren Middlebrook 7H11 besiyerleri steril petrilere dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı.

Tip 2 biyogüvenlik kabininde, steril cam tüplere 5 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri eklendi ve yuvarlak uçlu öze yardımıyla Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş suşlardan alınıp karıştırıldı, iyice vortekslendikten sonra katı partiküllerin çökmesi ve homojenizasyonun sağlanması için 15 dk bekledi. Üst kısımdaki homojen kısım başka bir tüpe aktararak 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınarak izoniazid içermeyen kontrol plağına ve farklı konsantrasyonlarda izoniazid içeren plaklara ekimler gerçekleştirildi. Plaklar 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda 21 gün boyunca inkübe edildi.

Yirmi bir günlük inkübasyon sonrasında üremenin >%99 inhibe olduğu en düşük izoniazid konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi.

3.5. Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Agar Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Dışa atım pompa inhibitörlerinin, izoniazid dirençli *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatlarının izoniazid MİK değerlerini nasıl etkilediğini incelemeye önce, her bir dışa atım pompa inhibitörünün MİK değeri agar dilüsyon yöntemi ile çalışıldı.

Verapamil, Klorpromazin ve Rezerpin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Toz halindeki verapamilden 75 mg tartılarak 3 ml etanol içinde çözüldü ve 25.000 µg/ml stok solüsyonu hazırlandı.

Toz halindeki klorpromazin'den 30 mg tartılıp 5 ml sıvıda (1 ml etanol ve 4 ml steril distile su) çözülerek 6.000 µg/ml stok solüsyonu hazırlandı.

Toz halindeki rezerpin'den 60 mg tartılıp 5 ml kloroform içinde çözülerek 12.000 µg/ml stok solüsyonu hazırlandı.

Verapamil, Klorpromazin ve Rezerpin İçeren Plakların Hazırlanması

Agar plaklarının hazırlanması için 15 farklı şişede eşit miktarlarda Middlebrook 7H11 besiyeri hazırlanıp otoklavlandı. Eş zamanlı olarak Middlebrook 7H11 besiyerine eklenmek üzere OADC katkı çözeltilisi hazırlanıp filtreden geçirmek suretiyle sterilize edildi. Otoklavdan çıkan Middlebrook 7H11 besiyerleri yaklaşık 45-50 °C'ye geldikten sonra 1/10 oranında olacak şekilde OADC katkı çözeltilisinden eklendi. Son olarak şişelere son konsantrasyonu verapamil için sırasıyla 62.5, 125, 250, 500 µg/ml, klorpromazin için sırasıyla 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/ml ve rezerpin için sırasıyla 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml olacak şekilde her bir pompa inhibitöründen eklendi. Farklı konsantrasyonlarda pompa inhibitörleri içeren ve pompa inhibitörü içermeyen Middlebrook 7H11 besiyerleri steril petrilere dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı.

Verapamil, Klorpromazin ve Rezerpin İçeren Plaklara Ekimlerin Gerçekleştirilmesi

Tip 2 biyogüvenlik kabininde, steril cam tüplere 5 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri eklendi ve yuvarlak uçlu öze yardımıyla Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş suşlardan alınıp karıştırılarak iyice vortekslendikten sonra katı partiküllerin çökmesi ve homojenizasyonun sağlanması için 15 dk beklendi. Üst kısımdaki homojen kısım başka bir tüpe aktarılarak 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınarak farklı konsantrasyonlarda verapamil, klorpromazin, rezerpin içeren ve herhangi bir pompa inhibitörü içermeyen plaklara ekimler gerçekleştirildi. Plaklar 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda 21 gün boyunca inkübe edildi.

Yirmi bir günlük inkübasyon sonrasında üremenin >%99 inhibe olduğu en düşük konsantrasyon ilgili pompa inhibitörü için MİK değeri olarak kabul edildi.

3.6. Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin, İzoniazid Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerlerine Etkisinin Agar Dilüsyon Yöntemi ile Gösterilmesi

İzoniazid, Verapamil, Klorpromazin ve Rezerpin İçeren Plakların Hazırlanması

Her bir izolatın izoniazid, verapamil, klorpromazin ve rezerpin için MİK değerleri ayrı ayrı çalışıldı. Dışa atım pompa inhibitörlerinin, *M. tuberculosis*'i öldürmeyecek, ancak izoniazid MİK değerlerine etki edebilecek konsantrasyonda besiyerine eklenmesi amaçlandı. Bölüm 3.3'te anlatıldığı gibi 0.25 ile 512 µg/ml konsantrasyon aralığında izoniazid içeren Middlebrook 7H11 besiyerleri hazırlandı. Her bir pompa inhibitörü, farklı konsantrasyondaki izoniazid plaklarına MİK değerlerinin ¼'ünü içerecek şekilde ayrı ayrı eklendi. Kontrol plağı olarak izoniazid ve pompa inhibitörü içermeyen Middlebrook 7H11 plağı hazırlandı.

İzoniazid, Verapamil, Klorpromazin ve Rezerpin İçeren Plaklara Ekimlerin Gerçekleştirilmesi

Tip 2 biyogüvenlik kabininde, steril cam tüplere 5 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri eklendi ve Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş her bir izolatın 0.5 McFarland yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınarak dışa atım pompa inhibitörleri ile izoniazid içeren ve herhangi bir ilaç içermeyen kontrol besiyerlerine ekimleri gerçekleştirildi. Plaklar 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda 21 gün boyunca inkübe edildi.

Yirmi bir günlük inkübasyon sonrasında üremenin >%99 inhibe olduğu en düşük konsantrasyon, çalışılan dışa atım pompa inhibitörü ve izoniazid kombinasyonunun MİK değeri olarak kabul edildi.

3.7. Etidyum Bromür Kullanılarak Dışa Atım Pompalarının Varlığının Gösterilmesi

Dışa atım pompaları, ilaçların yanısıra, toksik molekülleri, boyaları da hücre dışına atarlar. Lechner ve arkadaşlarının (2008) çalışması temel alınarak, izoniazid dirençli izolatlarda etidyum bromür boyasının ultraviyole (UV) altında floresansı değerlendirilerek dışa atım pompalarının varlığı araştırıldı (78). Bu amaçla herhangi bir inhibitör varlığında izoniazid MİK değeri 2 dilüsyon ve üzerinde azalma gösteren 21 izolat değerlendirmeye alındı. Her izolat için 4 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren iki adet steril tüp hazırlandı. Tüplerde 0,5 MacFarland yoğunluğunda bakteri

süspansiyonu hazırlandıktan sonra son konsantrasyonu sırasıyla 1 µg/ml ve %0,4 olacak şekilde etidyum bromür ve glukoz eklendi. Tüplerden birine, INH MİK değerinde en fazla düşmeye yol açan inhibitörün MİK değerinin ½'si olacak şekilde pompa inhibitörü (19 izolat için klorpromazin, 2 izolat için verapamil) ilave edildi ve tüpler 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10 dakika 5000 g'de santrifüj edilen tüplerin üst fazları dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra 2 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri eklendi. Bütün izolatlar için inhibitör içeren ve içermeyen tüpler UV (UVP Biospectrum, USA) altında yan yana incelendi ve fotoğraflandı. İnhibitör içeren tüpte belirgin şekilde daha fazla floresans gözlenmesi dışı atım pompası varlığı lehine kabul edildi.

3.8. DNA Dizi Analizi ile *katG* ve *inhA* Genlerindeki Mutasyonların Gösterilmesi

DNA dizi analizi Sanger yöntemi ile yapıldı. Öncelikle tüm klinik izolatların DNA ekstraksiyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş *M. tuberculosis* kolonileri eküvyonlu çubukla bolca toplanarak 500 µl TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH:8) tamponu içinde süspanse edildi ve 80°C de 30 dakika su banyosunda bekletilerek bakterinin ölmesi sağlandı.
2. Mikrosantrifüj tüpleri 6000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
3. Üst faz dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra 300 µl TE tamponu eklendi.
4. 10-15 tane 2 mm çaplı ve bir miktar 0.3 mm çaplı steril cam boncuk eklendikten sonra 10 dk. vorteks yapıldı.
5. 300 µl lizozim (10 mg/ml) eklendikten sonra 1 dk vorteks yapılan tüpler 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı ve bu süre boyunca 4-5 defa vorteks yapıldı.
6. Tüpler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
7. Toplam 20 saat inkübasyon sonrası tüpler inkübatörden çıkarıldı.
8. 120 µl %5 SDS ve 120 µl proteinaz K (1 mg/ml) eklenip vortekslendikten sonra 50 °C'lik su banyosunda 10 dk inkübe edildi ve bu süre zarfında da 2 defa vorteksleme işlemi yapıldı.
9. 120 µl 3 M NaCl eklenip vorteks yapıldı.

10. 60 µl CTAB eklendi ve 50 °C'lik su banyosunda 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında 2 defa vorteksleme işlemi yapıldı.
11. Tüplere eşit miktarda (1020 µl) kloroform/izoamilalkol (24/1; v/v) eklendi ve ters düz edilmek suretiyle karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.
12. Yüzeğe yakın tüp üst kısmından 600 µl alınıp yeni bir tüpe aktarıldı.
13. 1200 µl soğuk isopropanol eklenerek nazikçe karıştırıldı.
14. Tüpler -20 °C'de 30 dk bekletildi.
15. Oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilen tüplerdeki üst faz atıldı.
16. Tüpte kalan DNA 1 ml soğuk %70'lik etanol ile yıkanarak CTAB kalıntıları uzaklaştırıldı.
17. Tüp içeriği nazik vuruşlarla karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
18. Üst faz atıldıktan sonra 37 °C ısı bloğunda 1-2 saat bekletilerek örneklerin kuruması sağlandı.
19. 100 µl TE tamponu eklenen örnekler hafifçe vurularak homojenize edildikten sonra sonraki işleme kadar -20 °C'de bekletildi.

M. tuberculosis kompleks klinik izolatlarının ekstraksiyon işleminden sonra *katG* ve *inhA* genlerindeki mutasyonların saptanması amacıyla sırasıyla aşağıdaki basamaklar gerçekleştirildi.

1. PCR ile ilgili gen bölgelerinin çoğaltılması: İzolatların hem *katG* hem *inhA* gen bölgeleri için ayrı ayrı PCR reaksiyonu yapıldı.

***katG* için PCR karışımının hazırlanması:** 50 µl karışım için 19 µl dH₂O, 25 µl PCR karışımı (Fermentas, Thermo Scientific), 5 µl ekstraksiyon ürünü ve 0.5'er µl "forward" ve "reverse" primer eklendi. *katG* gen bölgesi için kullanılan primerler şu şekildedir.

Forward : 5'-TGG CCG CGG CGG TCG ACA TT-3'

Reverse : 5'-CCA GCA GGG CTC TTC GTC AG-3'

***inhA* için PCR karışımının hazırlanması:** 50 µl karışım için 19 µl dH₂O, 25 µl PCR karışımı (Fermentas, Thermo Scientific) 5 µl ekstraksiyon ürünü ve 0.5'er µl "forward" ve "reverse" primer eklendi. *inhA* gen bölgesi için kullanılan primerler şu şekildedir.

Forward : 5'-GCCTCGCTGGCCCAGAAAGG-3'

Reverse : 5'-CTCCGGATCCACGGTGGGT-3'

Her iki bölge için aşağıdaki döngü kullanıldı.

- a) 94 °C de 4 dk
- b) 95 °C de 30 sn
- c) 60 °C de 30 sn
- d) 72 °C de 30 sn
- e) B basamağına gidip 34 döngü tekrarı
- f) 72 °C de 5 dk
- g) 12 °C de ∞

2. PCR ürünlerinin saflaştırılması: PCR reaksiyonu sonrası saflaştırma işlemi "Agencourt AMPure XP" (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter, Beverly, MA) saflaştırma kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem, üretici firmanın kit kullanım kılavuzunda belirttiği sırayla yapıldı.

- a. PCR ürününden 20 µl alınarak 36 µl "Agencourt AMPure XP" solusyonu ile 10 defa pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- b. PCR tüpleri 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- c. Tüpler "Agencourt SPRIPlate 96 Super" manyetik plak üzerine yerleştirildi ve manyetik boncukların ayrılması için 2 dk beklendi.
- d. Tüplerin boncukların yapıştığı kenar kısımlarına değmeden berrak sıvı kısmı uzaklaştırıldı.
- e. Tüplere 200 µl % 70'lik etanol eklendi ve 30 sn beklendi. Ardından eklenen etanol tekrar aspire edilerek uzaklaştırıldı.

- f. Tüpler manyetik plak üzerinden alındı ve 40 µl uzaklaştırma tamponu eklendikten sonra 10 defa pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlandı.
- g. Tüpler tekrar manyetik plak üzerine alındı, boncukların solusyon içinden ayrılıp tüp kenarlarına yerleşmelerinden sonra orta kısımdan şeffaf sıvı aspire edilerek yeni bir tüpe aktarıldı.
- h. Elde edilen saflaştırılmış PCR ürünleri -20 °C’de saklandı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

2. DTCS (Dye terminator cycle sequencing; Beckman Coulter, Fullerton, CA) **aşaması:** Saflaştırma sonrası *katG* ve *inhA* gen bölgeleri için DNA dizi analizine yönelik reaksiyon solüsyonu hazırlandı.

***katG* için DNA dizi analizi karışımının hazırlanması:** 10 µl karışım için 5 µl nükleaz içermeyen su, 4 µl PCR karışımı (Fermentas, Thermo Scientific), 0.25 µl saflaştırılmış PCR ürünü ve 0.75 µl “reverse” primer eklendi. *katG* gen bölgesi için kullanılan “reverse” primer şu şekildedir.

5'-CCA GCA GGG CTC TTC GTC AG-3'

***inhA* için DNA dizi analizi karışımının hazırlanması:** 10 µl karışım için 5 µl nükleaz içermeyen su, 4 µl PCR karışımı (Fermentas, Thermo Scientific), 0.25 µl saflaştırılmış PCR ürünü ve 0.75 µl “reverse” primer eklendi. *inhA* gen bölgesi için kullanılan “reverse” primer şu şekildedir.

5'-CTCCGGATCCACGGTGGGT-3'

Her iki bölge için aşağıdaki döngü kullanıldı.

- a) 94 °C de 2 dk
- b) 96 °C de 20 sn
- c) 50 °C de 20 sn
- d) 60 °C de 4 dk
- e) B basamağına gidip 29 döngü tekrarı
- f) 12 °C de ∞

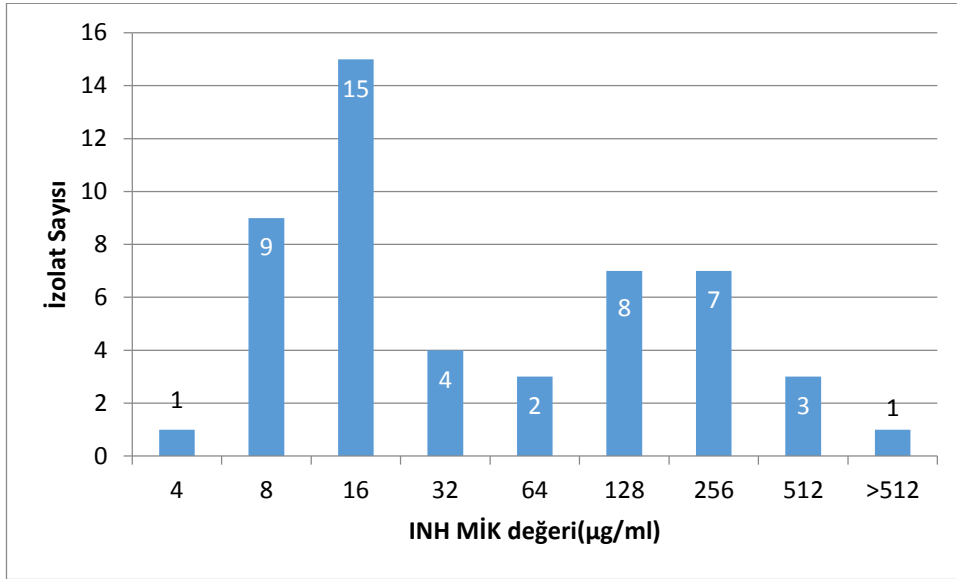
3. Sekans öncesi saflaştırma aşaması: Sekans öncesi son saflaştırma aşaması “Agencourt CleanSEQ” (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter, Beverly, MA) saflaştırma kiti ile aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- a. 10 µl PCR ürünü içeren tüplere 5,5 µl durdurma solusyonu eklendi.
- b. İyice karıştırılarak homojen görünüm sağlanan “Agencourt CleanSEQ” solusyonundan 10 µl alınarak tüplere ilave edildi.
- c. Hemen ardından 55 µl %70’lik etanol eklendi ve 10 defa pipetaj yapıldı.
- d. Tüpler oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- e. Tüpler “Agencourt SPRIPlate 96 Super” manyetik plak üzerine alınıp 3-5 dk beklenerek boncukların kenarlara çekilmesi ve sıvının berraklaşması görüldü.
- f. Berrak sıvı aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- g. 200 µl %70 etanol eklendi ve 3 dk inkübasyon sonrası aspire edildi.
- h. Örneklerin aşırı kurumasına fırsat vermeden tüpler manyetik plak üzerinden alındı, 40 µl örnek yükleme solusyonu eklendi ve 10-12 defa pipetaj yapıp homojen bir görünüm sağlandı.
- i. Tüpler tekrar manyetik plak üzerine alındı, 3-5 dk beklenerek solusyonun berraklaşması gözlemlendi.
- j. Tüplerin kenarlarında toplanan boncuklara dokunmadan berrak sıvı kısımdan 35 µl alındı ve 96 çukurlu plak üzerine aktarıldı.
- k. Örneklerin üzeri mineral yağ ile kaplandıktan sonra sekans analizi için “GenomeLab GeXP, Beckman coulter” cihazına yüklendi.
- l. Elde edilen sonuçlar chromas 1.45 programı kullanılıp *M. tuberculosis* Rv tüm genom AL123456 ile karşılaştırılarak *katG* ve *inhA* mutasyonları açısından değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. İzoniazid Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları

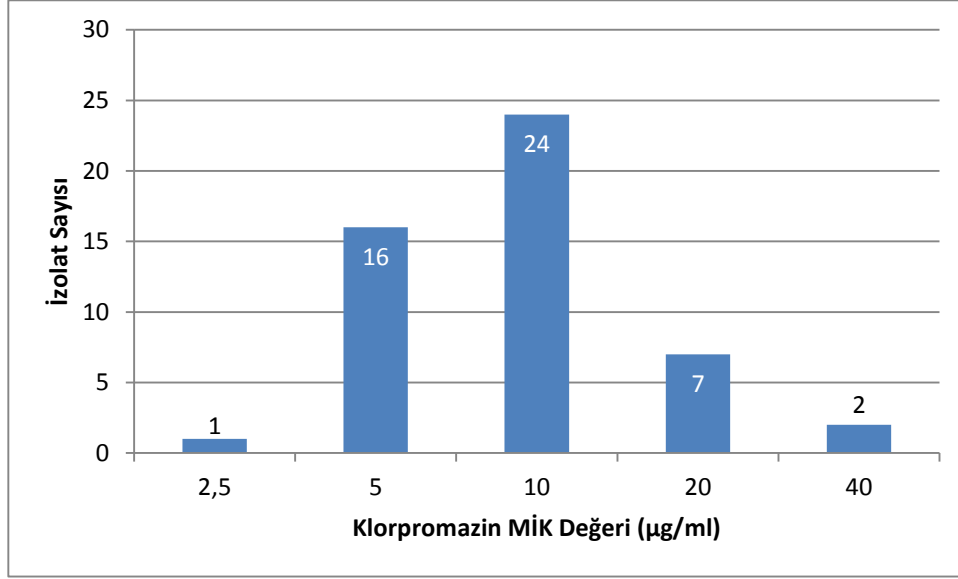
M. tuberculosis izolatlarının en düşük MİK değeri 4 µg/ml, en yüksek MİK değeri ise > 512 µg/ml olarak saptanmıştır. Tüm izolatların izoniazid MİK değerleri dağılımı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: İzolatların izoniazid MİK dağılımları

4.2. Klorpromazin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları

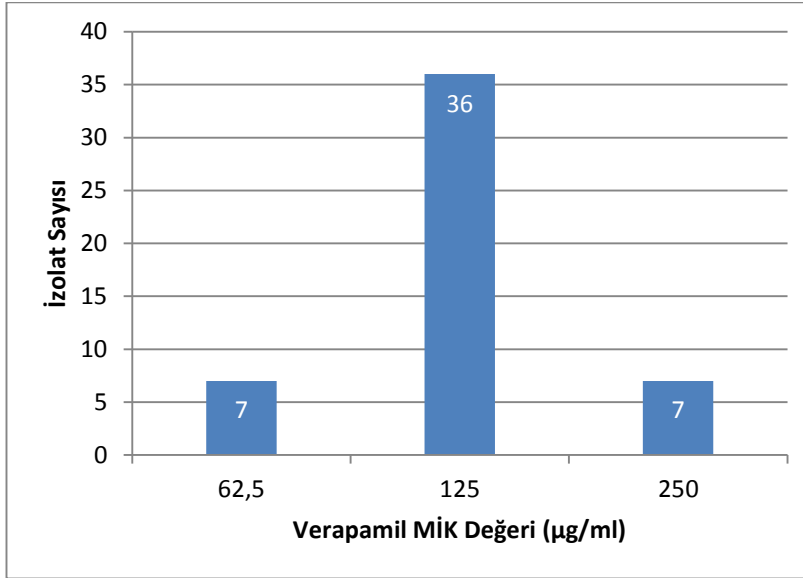
Çalışmaya dahil edilen izolatlarda klorpromazin için saptanan en düşük MİK değeri 2.5 µg/ml, en büyük MİK değeri ise 40 µg/ml'dir. İzolatların 24'ünde (%48) klorpromazin MİK değeri 10 µg/ml olarak bulundu. Tüm izolatların klorpromazin MİK değeri dağılımları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2: İzolatların klorpromazin MİK dağılımları

4.3. Verapamil Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları

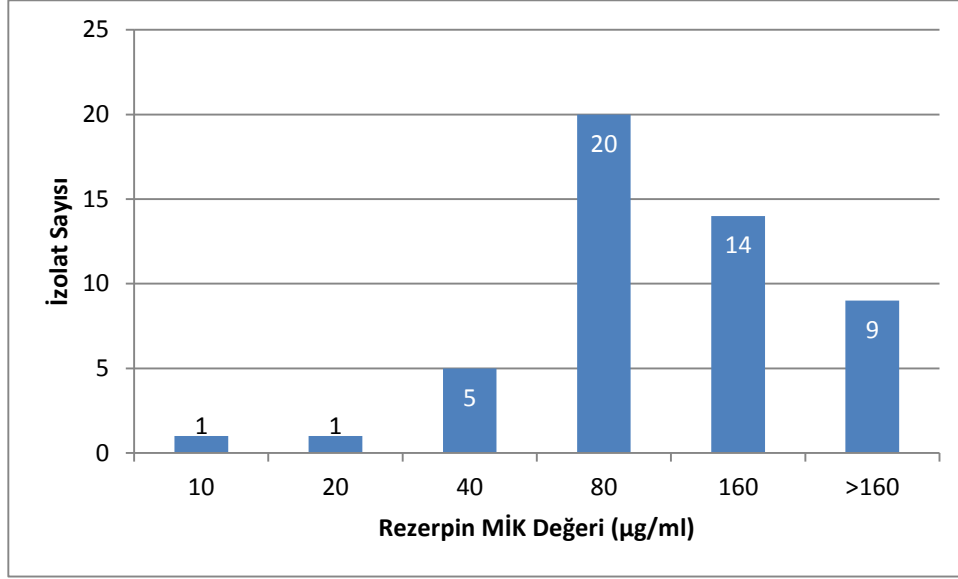
Çalışmamızda *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatlarında saptanan en düşük verapamil MİK değeri 62,5 µg/ml iken en yüksek MİK değeri 250 µg/ml 'dir. İzolatların 36 tanesinde (%72) MİK değeri 125 µg/ml olarak bulundu. Toplam 50 izolatın verapamil MİK dağılımları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3: İzolatların verapamil MİK dağılımları

4.4. Rezerpin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Sonuçları

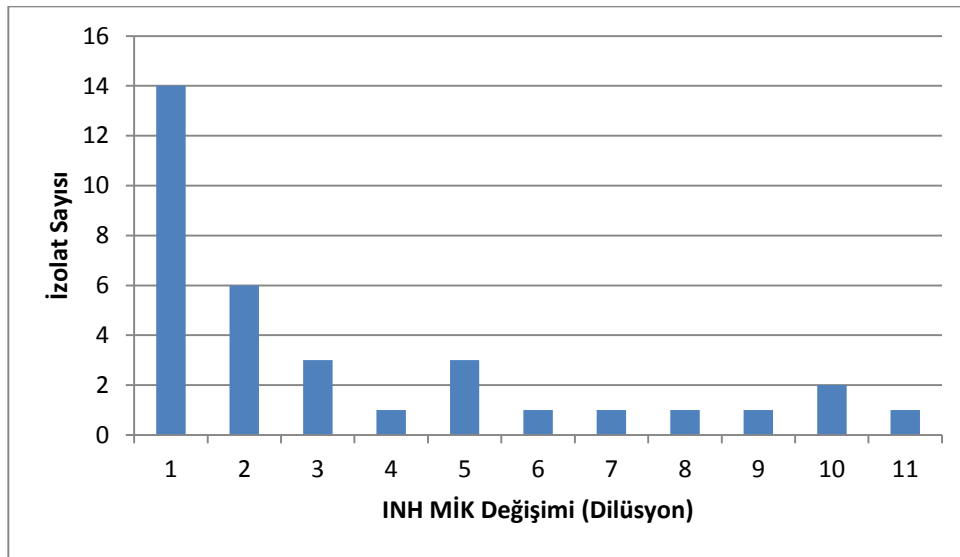
Çalışma kapsamındaki *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatları için saptanan en düşük rezerpin MİK değeri 10 µg/ml iken en yüksek MİK değeri > 160 µg/ml'dir. İzolatların 20'sinde (%40) rezerpin MİK değeri 80 µg/ml olarak tespit edildi. Tüm izolatlardaki rezerpin MİK dağılımları Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: İzolatların rezerpin MİK dağılımları

4.5. İzoniazid ve Klorpromazin Kombinasyonunun MİK Sonuçları

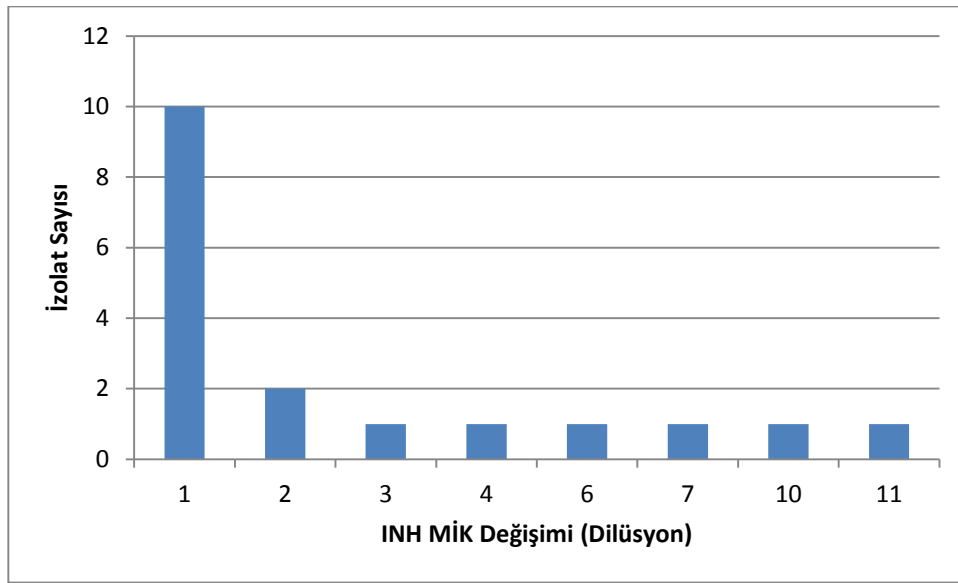
İzolatlardan izoniazid ve klorpromazin MİK değerleri ayrı ayrı saptandıktan sonra, farklı konsantrasyonda izoniazid içeren plaklara klorpromazin MİK değerinin $\frac{1}{4}$ 'ü oranında klorpromazin eklenerek elde edilen izoniazid MİK değerleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Elli izolattan 34'ünün (%68) izoniazid MİK değerinde ≥ 1 dilüsyon düşüş saptandı.



Şekil 4.5: İzolatlardan klorpromazin varlığında izoniazid MİK değişimleri (dilüsyon değişimi)

4.6. İzoniazid ve Verapamil Kombinasyonunun MİK Sonuçları

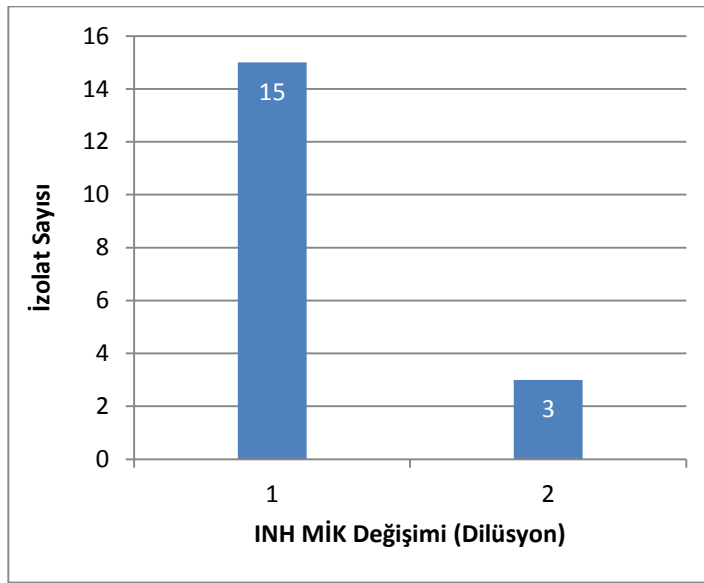
İzolatlardan izoniazid ve verapamil MİK değerleri ayrı ayrı saptandıktan sonra, farklı konsantrasyonda izoniazid içeren plaklara verapamil MİK değerinin $\frac{1}{4}$ 'ü oranında verapamil eklenerek elde edilen izoniazid MİK değerleri Şekil 4.5'te özetlenmiştir. Elli izolattan 18'sinin (%36) izoniazid MİK değerinde ≥ 1 dilüsyon düşüş saptandı.



Şekil 4.6: İzolatlardan verapamil varlığında izoniazid MİK değişimleri (dilüsyon değişimi)

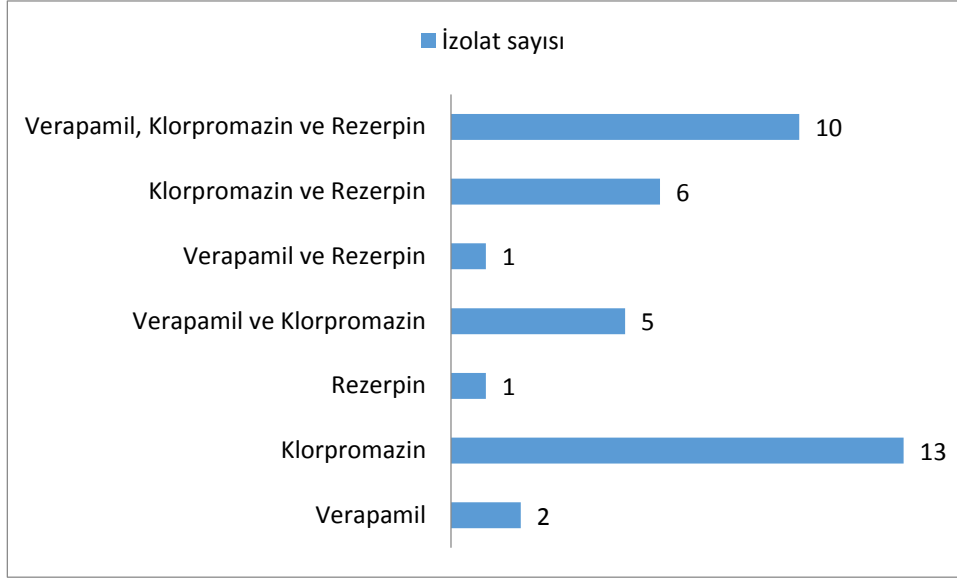
4.7. İzoniazid ve Rezerpin Kombinasyonunun MİK Sonuçları

İzolatlardan izoniazid ve rezerpin MİK değerleri ayrı ayrı saptandıktan sonra, farklı konsantrasyonda izoniazid içeren plaklara rezerpin MİK değerinin $\frac{1}{4}$ 'ü oranında rezerpin eklenerek elde edilen izoniazid MİK değerleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Elli izolattan 18'inin (%36) izoniazid MİK değerinde ≥ 1 dilüsyon düşüş saptandı.



Şekil 4.7: İzolatlardan rezerpin varlığında izoniazid MİK değişimleri (dilüsyon değişimi)

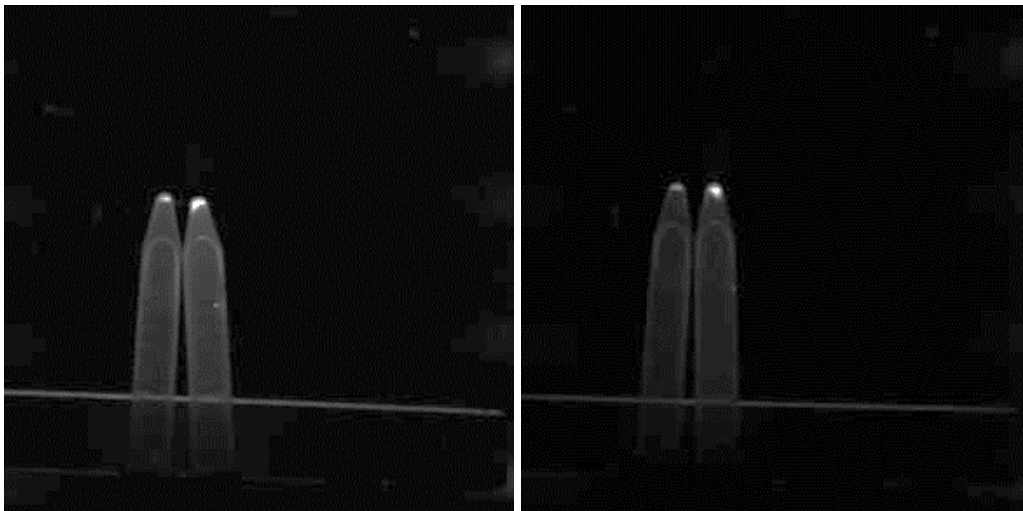
Elli izolattan 12 (%24) tanesinin izoniazid MİK değeri her üç pompa inhibitörü ilavesi ile de düşme göstermedi. Otuz sekiz izolattan (%76) izoniazid MİK değerleri ise herhangi bir pompa inhibitörü ile en az bir dilüsyon ve üzeri oranlarda düşme gösterdi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: İzolatların inhibitör varlığında izoniazid MİK değişimleri (dilüsyon değişimi)

4.8. Etidyum Bromür Kullanılarak Dışa Atım Pompası Varlığının Gösterilmesi

Herhangi bir pompa inhibitörü varlığında izoniazid MİK değeri en az iki dilüsyon azalma gösteren 21 izolatta atım pompası varlığı, etidyum bromüre ait floresans yoğunluğu incelenerek tespit edilmeye çalışıldı. İki izolat için inhibitör içeren ve içermeyen tüplerin fotoğrafı aşağıda görülmektedir (Şekil 4.9). Gözle inceleme yapıldı ve 11 izolatta belirgin olarak, inhibitör içeren tüpte içermeyen tüpe göre, daha yoğun floresans gözlemlendi ve pompa varlığı açısından pozitif olarak kabul edildi.

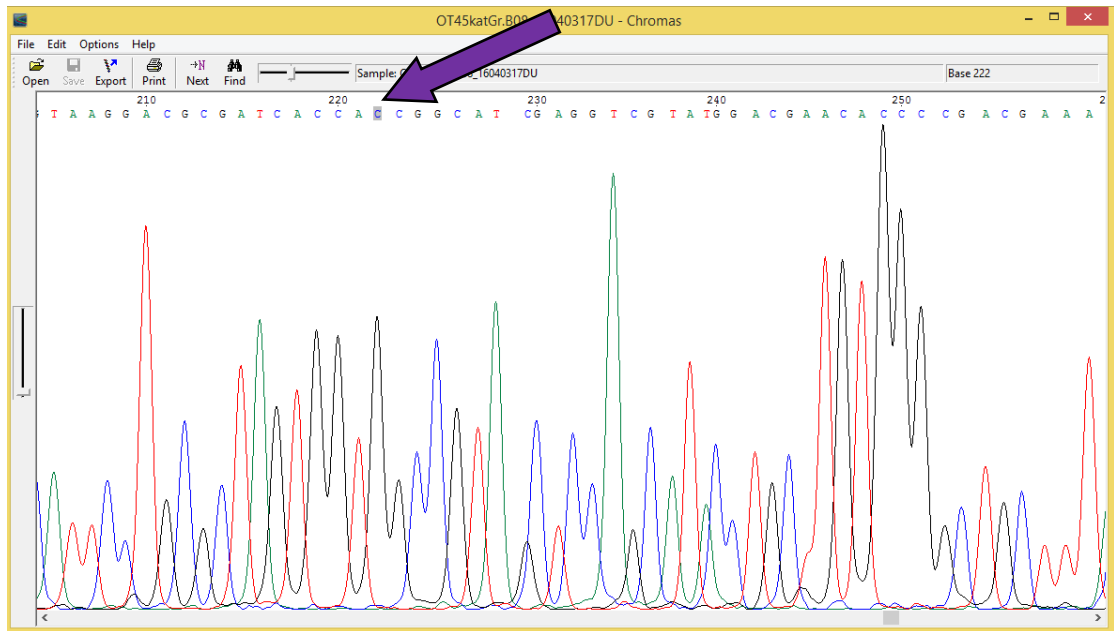


Şekil 4.9: Pompa varlığı yönünden pozitif kabul edilen iki izolatın görüntüsü (her iki şekilde de sağdaki tüpler pompa inhibitörü içermektedir)

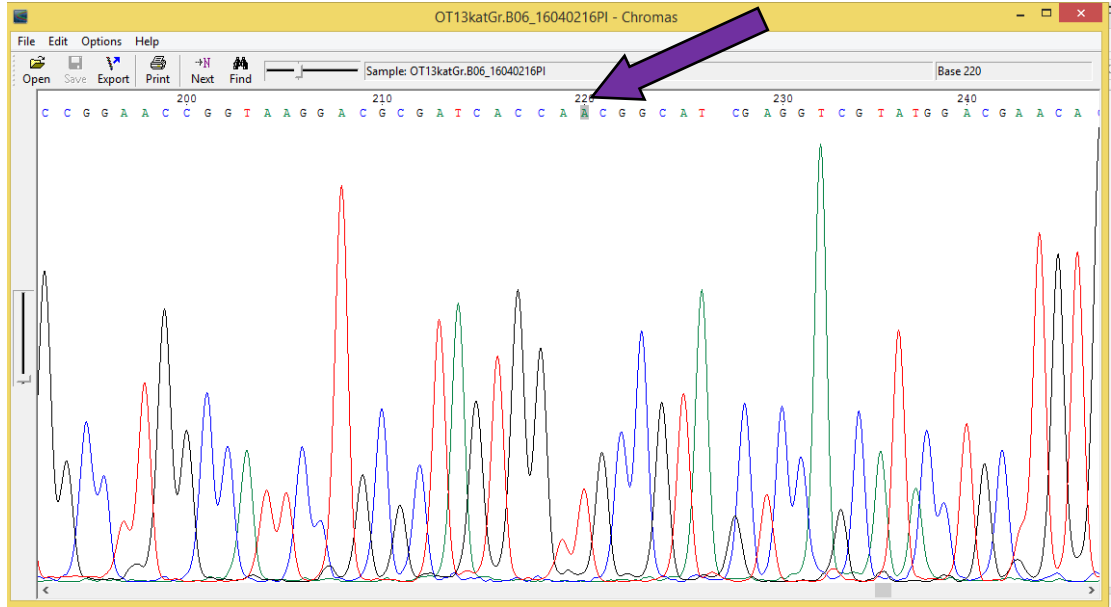
4.9. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Tüm izolatların izoniazid MİK değerleri belirlendikten sonra izoniazid direncine sebep olduğu bilinen ve mutasyonların en sık saptandığı 2 gen bölgesi (*katG* ve *inhA*) DNA dizi analizi yapılarak araştırıldı. Tüm izolatlarda *katG* ve/veya *inhA* gen bölgesinde mutasyon saptandı. Yirmi dokuz izolatta sadece *katG*, 7 izolatta sadece *inhA*, 14 izolatta ise hem *katG* hem *inhA* gen bölgesinde mutasyon saptandı.

katG gen bölgesi incelenen 50 izolattan 7'si sokak tipi olarak tespit edildi. 43 izolattan 42'sinde bu bölgede en sık karşılaşılan mutasyon olan Ser315Thr mutasyonu olduğu görüldü, 1 izolatta ise daha nadir karşılaşılan Ser315Asn mutasyonu saptandı (sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.10: *katG* gen bölgesinde Ser315Thr mutasyonu

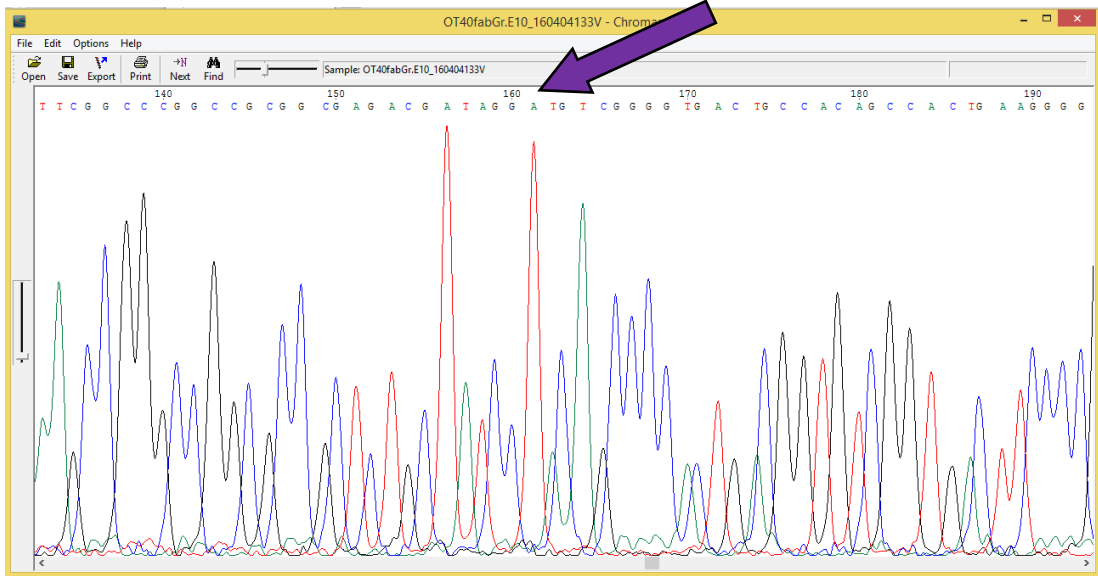


Şekil 4.11: *katG* gen bölgesinde Ser315Asn mutasyonu

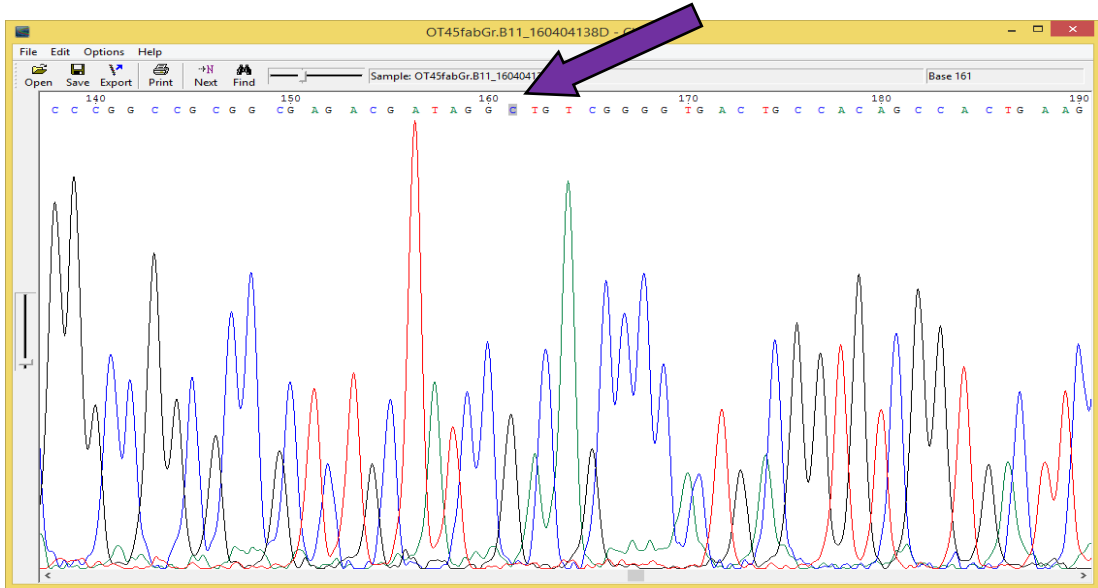
Elli izolatın 21'inde *inhA* bölgesinde mutasyon saptanırken 29 izolat sokak tipi olarak tespit edildi. Mutasyon saptanan 21 izolat değerlendirildiğinde en sık karşılaşılan mutasyon tipinin $-15C \rightarrow T$ mutasyonu (19 izolatta) olduğu görüldü. 1 izolatta $-8T \rightarrow A$, 1 izolatta ise $-8T \rightarrow C$ mutasyonu saptandı (sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).



Şekil 4.12: *inhA* gen bölgesinde $-15C \rightarrow T$ mutasyonu

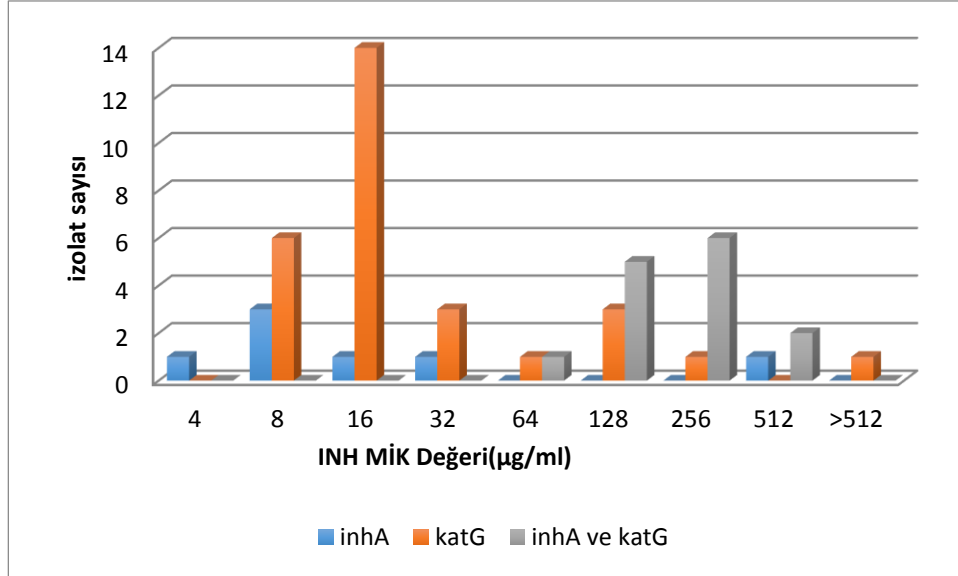


Şekil 4.13: *inhA* gen bölgesinde -8T→A mutasyonu



Şekil 4.14: *inhA* gen bölgesinde -8T→C mutasyonu

Tek başına *katG* mutasyonu olan izolatlardaki izoniazid MİK değeri 8 - >512 µg/ml arasında iken tek başına *inhA* mutasyonu olan izolatların izoniazid MİK değerleri 4 - 512 µg/ml arasında değişmektedir. Tüm izolatların izoniazid MİK değerleri ve dirençle ilişkili mutasyonları Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15: İsoniazid MİK değerleri ve dirençle ilişkili mutasyonların birlikteliği

Pompa inhibitörleri varlığında izoniazid MİK değerleri 2 dilüsyon ve üzerinde düşme gösteren 21 izolata DNA dizi analizi sonuçlarına bakıldığında, 10 izolatta sadece *katG* (9 izolatta Ser315Thr, 1 izolatta Ser315Asn mutasyonu), 4 izolatta sadece *inhA* (-15C→T) ve 7 izolatta *katG* ve *inhA* bölgesi (*katG* için Ser315Thr ve *inhA* için -15C→T) mutasyonları birlikte saptandı.

Tablo 4.1 : Klinik izolatların MİK değerleri ve DNA dizi analizi sonuçları

Örnek no	INH MİK (µg/ml)	INH+Klorp. (µg/ml)	INH+Ver. (µg/ml)	INH+Rzp. (µg/ml)	<i>inhA</i>	<i>katG</i>
*1	16	4	16	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
2	16	1	0,25	4	15C-T	sokak tipi
3	16	8	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
4	128	128	128	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
5	16	8	16	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
6	16	8	16	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
7	4	4	2	4	15C-T	sokak tipi
8	256	128	256	256	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
*9	256	32	256	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
10	128	64	128	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
11	128	32	128	32	sokak tipi	Ser 315 Asn AGC →AAC
12	256	128	256	128	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
13	16	8	16	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
14	8	8	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
*15	16	0,25	16	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
*16	256	64	256	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
17	128	64	128	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
*18	8	2	2	2	15C-T	sokak tipi
19	256	1	128	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
20	16	16	16	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
21	16	8	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
22	16	16	16	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
*23	256	0,25	0,25	256	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
24	128	0,25	32	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
25	512	0,25	0,25	256	15C-T	sokak tipi
26	32	16	32	32	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
27	32	0,25	0,25	32	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
28	16	16	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
29	8	2	0,5	4	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
30	16	8	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
31	>512	64	256	512	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
32	128	64	128	128	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
33	16	8	8	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
*34	32	8	32	32	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
35	8	8	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
36	32	32	32	32	8T-A	sokak tipi
37	512	64	256	256	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
38	64	64	64	64	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
39	16	16	16	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
40	64	64	64	64	8T-C	Ser 315 Thr AGC →ACC
41	512	256	256	256	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
*42	256	0,25	256	256	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
43	8	8	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
44	16	16	2	16	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
45	64	128	128	128	15C-T	Ser 315 Thr AGC →ACC
46	128	128	128	128	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
*47	8	0,25	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
*48	8	0,25	8	8	15C-T	sokak tipi
*49	8	0,25	8	8	sokak tipi	Ser 315 Thr AGC →ACC
50	8	8	8	4	15C-T	sokak tipi

*İzolat etidyum bromür boyası ile incelemede pompa varlığı açısından pozitif değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Tüberküloz, tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, yüksek mortalite ve morbidite oranlarıyla toplum sağlığını tehdit etmeye devam eden oldukça eski ve önemli bir hastalıktır. DSÖ'nün raporuna göre 2014 yılında 1,5 milyon insan tüberküloz nedeniyle kaybedilmiştir (1). 1950'li yılların ortalarından itibaren tüberküloza karşı etkili ilaçların bulunması ve aşı geliştirilmesi tüberküloz tedavisinde ve önlenmesinde büyük umutları beraberinde getirmiştir. Ancak tüberküloz basili zaman içinde birinci seçenek ilaçlara ve çoğu ikinci seçenek ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir. Günümüzde de ÇİD-TB ve YİD-TB sayılarındaki artış oldukça endişe verici boyutlardadır. Bunlara ilaveten HIV pozitif hastaların sayısındaki artış da tüberküloza bağlı mortalite ve morbiditenin önemli nedenleri arasında sayılmaktadır.

Günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki en önemli sorun antibiyotiklere karşı artan direnç oranlarıdır. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanması genellikle 3 yolla olmaktadır: 1) ilacın modifikasyonu, 2) hedef molekülün yapısının değişmesi, 3) ilacın hücre içine alınımının kısıtlanması veya dışa atım pompaları aracılığı ile hücre dışına atılması. İlk 2 mekanizma uzun zamandır bilinmektedir. Ancak ilacın hücre dışına atılımını sağlayan atım pompaları ile ilgili çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır ve alternatif tedavi yöntemleri olabileceği düşünüldüğünden oldukça umut vaat eden bir araştırma alanıdır (7, 49, 50).

İlk kez 1976'da memeli hücre membranında bulunan P glikoproteininin kanser ilaçlarına karşı dirence sebep olduğunun gösterilmesiyle dışa atım pompalarının dirençle ilişkisi üzerine çalışmalar artmıştır. Zaman içinde pek çok mikroorganizmada farklı ailelerden atım pompalarının dirençle ilişkisi olduğu gösterilmiştir (7, 49, 50).

Mikobakterilerin diğer bakterilerden farklı olarak sahip oldukları lipitten zengin ve karmaşık hücre duvar yapısı, antibiyotiklere karşı dirençte oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu duvar yapısı ile toksik bileşiklerin hücre içine girişi sınırlandırılırken farklı antibiyotiklerin de hücre içine girerek etkin düzeylere gelmesi engellenmektedir.

Mikobakterilerde hücre duvar yapısı dışında dirençten sorumlu tutulan ve en sık karşılaşılan mekanizma spontan mutasyonlardır. Özellikle izoniazid direnci ile

ilişkili pek çok mutasyon tanımlanmış olup bunların en bilineni *katG* ve *inhA* gen bölgesi mutasyonlarıdır. *ahpC*, *kasA*, *ndh*, *oxyR-ahpC* ve *furA-katG* intergenik bölge mutasyonları da dirençten sorumlu tutulmuş olup bazılarının mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır (75). Ayrıca izoniazid direnci gözlenen bazı izolatlarda bilinen gen bölgelerinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

Son yıllarda pekçok dirençli mikroorganizmada tanımlanan dışa atım pompaları mikobakterilerde de araştırılmaya başlanmıştır. İlk olarak *M. smegmatis*'te LfrA pompası ile florokinolon direnci gösterilmiş, ardından *M. smegmatis*'in prototip olarak seçildiği çalışmalarda farklı ilaçlarla ilgili dirence sebep olabilecek atım pompaları araştırılmıştır. *M. tuberculosis* izolatları ile yapılan çalışmalarda genellikle laboratuvar ortamında dirençli hale getirilen mutant *M. tuberculosis* suşları kullanılmış, tüberküloza etkili primer ve sekonder grup ilaç direnciyle ilişkili atım pompalarının varlığı incelenmiştir. Mikobakterilerde atım pompalarına bağlı ilaç direnciyle ilgili pek çok çalışma yapılmasına rağmen dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatlarıyla yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Mikobakterilerde saptanan atım pompalarının varlığı genellikle pompa inhibitörleri ile ilacın MİK değerindeki azalmanın gösterilmesi, etidyum bromür atılımının inhibisyonu veya moleküler yöntemlerle pompa genlerinin gösterilmesine dayanmaktadır (17, 79, 80).

Çalışmamıza izoniazid dirençli olduğu bilinen 50 *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatı dahil edilmiştir. Bütün izolatların izoniazid ve atım pompası inhibitörlerine (verapamil, klorpromazin ve rezerpin) ait MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. Sonrasında her bir pompa inhibitörünü, MİK değerinin ¼'ü oranında içerecek şekilde yeniden plaklar hazırlanarak izoniazid MİK değerlerinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Ayrıca izoniazid direncine sıklıkla sebep olduğu bilinen *katG* ve *inhA* gen bölgesi mutasyonları DNA dizi analizi ile araştırılmıştır. Son olarak atım pompası varlığı, etidyum bromürün pompa inhibitörü varlığında hücre içinde kalarak, inhibitörsüz koşullardakine kıyasla daha fazla floresans vermesi araştırılarak gösterilmeye çalışılmıştır. Bunun sonucunda, izolatların %68'inde (34 izolat) klorpromazin ile izoniazid MİK sonuçlarında 1 dilüsyon ve üzerinde azalma olduğu saptanmıştır. Verapamil ve rezerpin ile aynı oranda izolatta (%36, 18 izolat) 1 dilüsyon ve üzeri oranlarda düşme gözlenmiştir. İnhibitör varlığında izoniazid MİK değerinde 2 dilüsyon ve üzerinde azalma saptanan 21 izolat, etidyum bromür transportu açısından değerlendirilmiş ve 11 izolatta inhibitör varlığında görsel olarak belirgin şekilde etidyum bromür floresansının daha fazla olduğu saptanmıştır. Aynı

zamanda, izoniazid direnciyle ilişkili olarak izolatların 29'unda *katG*, 7'sinde *inhA* ve 14'ünde hem *katG* hem de *inhA* bölgesi mutasyonunun varlığı gösterilmiştir.

İzoniazid MİK değerleri ile dirence sebep olan gen bölgelerindeki mutasyonlar karşılaştırılmıştır. *katG* gen bölgesi mutasyonlarının yüksek izoniazid MİK değerleri ve çoklu ilaç direnciyle korele olduğu bilinmektedir. *inhA* gen bölgesi mutasyonlarını içeren izolatların ise daha düşük izoniazid MİK değerine sahip olduğu bilinmektedir (46, 48).

Çalışmamızda değerlendirilen klinik izolatların izoniazid MİK değerleri 4 µg/ml'den başlayıp >512 µg/ml'ye kadar çıkmaktadır. İzolatların %90'ınının MİK değeri ≥ 16 µg/ml olarak saptanmıştır. İzoniazid direnci ile ilişkili gen mutasyonları araştırıldığında %58'inde *katG*, %14'ünde *inhA*, %28'inde ise *inhA* ve *katG* mutasyonunun birlikte olduğu saptanmıştır.

Silva ve arkadaşları (2001), *p55 (RV1410c)* genini *M. smegmatis*'e klonlayarak bu bakterinin aminoglikozid ve tetrasiklinlere karşı direnç geliştirdiğini göstermişlerdir. Aynı bakteri için bir protonofor olan CCCP ile pompa inhibitörleri olan verapamil ve rezerpin varlığında streptomisin ve tetrasikline karşı direnç seviyelerinin azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak *p55*'in mikobakterilerde aminoglikozid ve tetrasiklin transportuyla ilişkili bir membran proteini olduğu belirtilmiştir (10).

Choudhuri ve arkadaşları (2002), fonksiyonel doksorubisin atım pompası (ABC taşıyıcı ailesine ait bir pompa) yapısında yer alan ATP bağlayıcı protein *DrrA* ve integral membran proteini *DrrB* genlerini plazmid aracılığıyla *E. coli* ve *M. smegmatis*'e aktarmışlar ve bu pompanın aşırı ekspresyonu sonucu *E. coli*'de etidyum bromür, doksorubisin, daunorubisin, kloramfenikol ve puromisine karşı direncin arttığını saptamışlardır. *M. smegmatis* için ise eritromisin, tetrasiklin, etambutol, norfloksasin, streptomisin ve kloramfenikole direncin arttığı gösterilmiş, bu direncin de pompa inhibitörü rezerpin ile azaldığı bildirilmiştir (11).

Pasca ve arkadaşları (2005), *M. tuberculosis mmpL7* geninin *M. smegmatis*'te aşırı ekspresyonunu sağladıktan sonra izoniazid, etambutol, rifampin ve siprofloksasin başta olmak üzere farklı ilaçların MİK değerlerini sokak tipi izolatla karşılaştırmışlardır. *mmpL7* aşırı ekspresyonu ile sokak tipi izolata kıyasla izoniazid MİK'inin 16 kat, etambutol MİK'inin ise 4 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu direncin pompa inhibitörleri varlığında (rezerpin, CCCP ve verapamil) nasıl

etkilendiği de araştırılmış ve rezerpin ile CCCP varlığında INH MİK değerinin 8 kat azaldığı, ancak verapamilin herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (13).

Rodrigues ve arkadaşları, *M. smegmatis* izolatlarında (sokak tipi, MspA – MspcC porin mutantları ve LfrA – LfrR atım pompası mutantları) etidyum bromür transportunu araştırdıkları çalışmalarında, önemli bir atım pompası olan LfrA mutantının (XZL1675) ve sokak tipi izolatının etidyum bromür için optimal akümüasyonlarının sırasıyla 0,25 ve 1 µg/ml konsantrasyonlarında gerçekleştiğini saptamışlardır. Bu sonuç etidyum bromür konsantrasyonunun pompa mutasyonu olan izolatta daha düşük miktarlarda gerçekleştiğini göstermiştir. Aynı çalışmada LfrA mutantının rifampisin, etambutol ve streptomisine karşı daha duyarlı olduğu da gösterilmiştir (60).

Viveiros ve arkadaşları (2002) *M. tuberculosis* H37Rv ve tedavi edilmemiş hastalardan izole edilen ve primer ilaçlara duyarlı olduğu gösterilen 8 adet *M. tuberculosis* izolatu kullanarak atım pompalarının varlığını göstermeye çalışmışlardır. Tüm izolatların BACTEC 460 sisteminde izoniazid ile seri olarak karşılaştırılmalarından sonra MİK değerleri 40 mg/L'ye yükseltilmiştir. Aynı yöntemle verapamil, klorpromazin ve rezerpin MİK değerleri saptandıktan sonra izoniazid ile her bir inhibitör kombine edilerek izoniazid MİK değişimleri gözlemlenmiştir. Sonuçta rezerpinin izoniazid MİK değerlerini 100 kat azalttığı ancak verapamil ve klorpromazinin anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (9).

Colangeli ve arkadaşları (2005), *M. tuberculosis iniA* geninin *M. bovis* BCG suşunda aşırı ekspresyonu sonrası izoniazid ve etambutole karşı daha dirençli hale geldiğini saptamışlardır. Benzer olarak *iniA* delesyonu olan *M. tuberculosis* suşunun izoniazid duyarlılığında ise artış saptanmıştır. Aynı zamanda *iniA* aşırı ekspresyonu ile BCG suşu etidyum bromüre direnç geliştirirken, *iniA* delesyonu olan *M. tuberculosis* suşunda hücre içi artmış etidyum bromür akümüasyonu olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, pompa inhibitörü olan rezerpin varlığında BCG suşunda izoniazid toleransının ve etidyum bromür direncinin tersine döndüğü saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında, *iniA* gen ürününün inhibisyonuna yönelik ilaç çalışmalarının, tüberküloz tedavi sürecini kısaltmak ve çoklu ilaç direnci gelişimini önlemek açısından faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır (74).

Jiang ve arkadaşları (2008), *Rv1410c* ve *Rv1258c* genlerinin ekspresyonlarını 1499 ÇİD *M. tuberculosis* klinik izolatında gerçek zamanlı PCR yöntemi ile

araştırmışlardır. Herhangi bir ilaçla karşılaştırmadan önce ve izoniazid ile rifampisinle muamele sonrası saptanan gen ekspresyonları karşılaştırıldığında, rifampisin maruziyeti sonrası 3 kat, izoniazid maruziyeti sonrası ise 5 - 6 kat artış saptanmıştır. Sonuç olarak *M. tuberculosis* izolatında direnç gelişiminin bazı pompa genlerinin aşırı ekspresyonları ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (81).

Ramon Garcia ve arkadaşları (2009), *M. bovis* BCG izolatını model alarak, p55 atım pompasını kodlayan *Rv1410c* gen delesyonunun, bu suşu aralarında rifampisin ve klofazimin gibi birinci ve ikinci seçenek tüberküloza etkili ilaçların olduğu bir grup toksik bileşiklere karşı daha duyarlı hale getirdiğini göstermişlerdir. Pompa inhibitörlerinden CCCP ve valinomisinine ise enerji kaynağı olarak membran elektrokimyasal gradiyent farkını kullanan bu aktif atım sistemini inhibe ettiği bildirilmiştir. Ek olarak aynı çalışmada p55 mutant suşunun hücre içi detoksifikasyon sürecinin bozulduğu ve bu atım pompasının suşun oksidatif strese karşı cevabında oldukça etkin olduğu ortaya konmuştur (71).

Sharma ve arkadaşları (2010), piperinin, *M. tuberculosis* H37Rv, rifampisin dirençli (rif^r) laboratuvar suşu ve ÇİD *M. tuberculosis* izolatı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, piperin ile kombinasyon sonrası, rifampisin dirençli (rif^r) laboratuvar suşunun MİK değerinde 8 kat, diğer suşlarda ise 4 kat oranında azalma olduğunu saptamışlardır. Buna ek olarak rifampisin dirençli (rif^r) laboratuvar suşu ile *M. tuberculosis* H37Rv izolatının rifampisin varlığında ve yokluğunda *Rv1258c* genine ait mRNA seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ile ölçülmüş ve rifampisin dirençli (rif^r) laboratuvar suşunun rifampisin varlığında *Rv1258c* gen ekspresyonunun belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda piperinin antimikobakteriyel aktivitesinin ilerleyen zamanlarda mikobakteri tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (82).

Rodrigues ve ark. 2012 yılındaki çalışmalarında *M. bovis* BCG Pasteur suşu 1173P2, H37Rv ve 2 adet izoniazide duyarlı *M. tuberculosis* klinik izolatını izoniazide maruz bırakarak pasajlamışlar ve laboratuvar koşullarında izoniazid MİK değerinin 0,05 mg/L'den 40 mg/L'ye yükselmesini sağlamışlardır. Verapamil, klorpromazin ve tiyridazin eklenerek BACTEC MGIT 960 sisteminde izolatların izoniazid MİK tayini yapıldığında verapamil ile MİK değerlerinin 4 katın üzerinde azaldığı tespit edilmiştir. Klorpromazin ve tiyridazin ile 1 dilüsyon eşdeğeri bir azalma saptamışlardır. Yine *M. bovis*'in sokak tipi ve izoniazid ile indüklenmiş suşu, EtBr (etidyum bromür) ile muamele edildikten sonra pompa inhibitörleri eklenerek

inhibitörsüz koşuldaki EtBr floresansı ölçülmüş ve indüklenmiş formda inhibitörlerin sokak tipine kıyasla EtBr transportunu belirgin olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Atım pompalarına ait gen bölgelerinin (*mmpL7*, *tap*, *efpA*, *p55* ve *mmr*) kantitatif gerçek zamanlı PCR sonuçları, izolatların izoniazid ile indüklenen formlarında sokak tipine kıyasla gen ekspresyonlarının göreceli olarak yüksek olduğunu göstermiştir (15).

Ülkemizden *M.tuberculosis* klinik izolatlarında atım pompaları üzerine yapılan Çalgın'ın tez çalışmasında, 10'ar adet çoklu ilaç dirençli ve tüm birinci seçenek tüberküloza etkili ilaçlara duyarlı olduğu bilinen izolatlar değerlendirmeye alınmıştır. Bu izolatlarda multipleks PCR yöntemi ile *Rv1410c* (*p55*), *Rv2333c*, *rrrA*, *rrrB*, *mmpL4*, *mmpL7*, *Rv1258c*, *iniA* (*Rv0342*), *Rv0037c*, *Rv0783c*, *Rv1250*, *Rv1273c*, *Rv1634*, *Rv1687c* ve *Rv3000* genlerinin ekspresyon miktarları araştırılmış, duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* izolatları arasında belirgin fark bulunmamıştır (31).

Zhang ve arkadaşları (2015) 29 adet izoniazid ve etambutol dirençli *M. tuberculosis* izolatında izoniazid ve etambutol MİK değerleri üzerine tetrandrin ve verapamilin etkinliğini rezasurin kolorimetrik yöntemiyle araştırmışlardır. Verapamil ile izolatların yaklaşık %50'sinin izoniazid ve etambutol MİK değerlerinin düştüğünü saptamışlardır. Benzer şekilde tetrandrinin ise izoniazid ve etambutol dirençli izolatların %82'sinde MİK değerlerini düşürerek direnç fenotipine etki ettiği gösterilmiştir (83).

Li ve arkadaşları (2015) 10 adet duyarlı, 9 adet izoniazid ve rifampisin dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatında izoniazid ve rifampisin MİK değerlerini saptadıktan sonra pompa inhibitörleri (CCCP ve rezerpin) varlığında bu iki ilacın MİK değişimlerini incelemişlerdir. Aynı çalışmada izoniazid ve rifampisin direnciyle ilişkili gen bölgelerinde (*katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *rpoB*) mutasyon varlığı ve 20 farklı atım pompasının ekspresyonları da araştırılmıştır. Dokuz izolatın 8'inde izoniazid ile ilişkili bölgelerden en az birinde mutasyon saptanmış, 4 izolatta CCCP ile 6 izolatta ise rezerpin ile izoniazid MİK değerlerinde belirgin düşüş olduğu tespit edilmiştir. Dirençli izolatlarda izoniazid indüksiyonu ile rifampisine kıyasla daha fazla sayıda izolatta pompa geni ekspresyon artışı olduğu, CCCP veya rezerpin ile izoniazid MİK değeri 4 kat ve üzeri düşme gösteren izolatlarda da daha fazla sayıda pompa geninin eksprese olduğu saptanmıştır (17).

Machoda ve arkadaşları (2016) çalışmalarında, 8 adet *M. tuberculosis* izolatının izoniazid, rifampisin, amikasin, ofloksasin ve pompa inhibitörlerinden

verapamil, haloperidol, tiyridazin, klorpromazin ve flupentiksol için MİK değerlerini BACTEC MGIT 960 sistemi ile ayrı ayrı saptamışlardır. Pompa inhibitörleri ile kombinasyon yapılarak MİK değerleri çalışıldığında, verapamil, klorpromazin, haloperidol ve flupentiksol ile izoniazid yüksek düzey direnç saptanan 8 izolatın 4'ünde düşük düzey izoniazid direnci saptanmıştır. Tiyridazin ile ise 2 izolatta yüksek düzey direnç fenotipinin düşük düzey direnç fenotipine gerilediği gözlenmiştir (65).

M. tuberculosis ve atım pompaları üzerine yapılan çalışmalar sıklıkla laboratuvar ortamında dirençli hale getirilen izolatlarla yapılmaktadır. Klinik izolatlarla yapılan araştırmalar oldukça kısıtlı sayıdadır ve az sayıda izolat içermektedir. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında, bu çalışma, izoniazid dirençli 50 adet *M. tuberculosis* klinik izolatu içermesiyle izolat bakımından değerli bir çalışmadır. Pompa inhibitörlerinin izoniazid MİK değerlerine etkisi araştırıldığında, diğer çalışmalardan farklı olarak, klorpromazinin verapamil ve rezerpine kıyasla klinik izolatların izoniazid MİK değerleri üzerine belirgin şekilde daha etkili olduğu saptanmıştır. Herhangi bir ilaç maruziyeti olmayan duyarlı mikobakteriler ile uzun süre tedavi alan hastalardaki dirençli mikobakterilerin enerji metabolizmaları incelendiğinde, antibiyotik tedavisi altında zorlu ve anaerobik koşullar hakim olduğundan, elektron transport zincirinde (ETZ) NADH dehidrojenaz 2 (NDH2) ve süksinat dehidrojenazın (SDH) elektron transferinde daha aktif rol aldıkları belirtilmektedir. Aynı şekilde fenotiyazinler (klorpromazin, tiyridazin gibi) ve valinomisin gibi bazı ilaçların, anaerobik koşullarda aktif olan bu yapılar üzerine etkili olduğu da bildirilmektedir (18). Bu açıdan değerlendirildiğinde, çalışmamızda yer alan izolatlarda daha aktif olduğu düşünülen NDH2 ve SDH aktivitesi varlığında, klorpromazinin izoniazid MİK değerleri üzerine daha etkili bulunması aslında beklenen bir sonuç olarak yorumlanabilir.

Çalışmamızda, Li ve arkadaşlarının (17) çalışmasına benzer şekilde, izoniazid dirençli 50 *M. tuberculosis* izolatının tamamında *katG* veya *inhA* gen bölgelerinden en az birinde mutasyon olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, kullanılan izolatlar ya laboratuvar ortamında dirençli hale getirilen ya da az sayıda dirençli klinik izolatları içermektedir. Bu aşamada, ilaçla yeni karşılaşan, henüz tolerans gelişmesi aşamasında olan izolatlar ile mutasyonlara bağlı olarak direnç gelişmiş izolatlardaki atım pompası etkinliğiyle ilgili bilgiler yetersiz kalmaktadır. Ancak laboratuvar mutanti olan yani ilaçla muamele edilerek dirençli hale getirilen

ve dirençli klinik izolatlarla yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, dışa atım pompalarının ilaca tolerans gelişmesinden itibaren etkili olduğu ve mutasyon geliştiği saptanan dirençli izolatlarda da etkinliğinin devam ettiği düşünülmektedir. Konuyla ilgili olarak daha fazla klinik izolat içeren ayrıntılı çalışmaların, dışa atım pompa inhibitörlerinin tedavide kullanılmalarına ışık tutması açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı'nda izole edilen 50 adet izoniazid dirençli *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatu dahil edilmiştir.

İzolatların izoniazid, verapamil, klorpromazin, rezerpin MİK değerleri ayrı ayrı saptanmıştır. Bütün izolatların izoniazid MİK değerleri, her bir pompa inhibitörünü MİK değerinin 1/4'ü oranında içeren plaklarda tekrar çalışılmıştır.

Toplam 50 klinik izolatu %76'sında (38 izolat) herhangi bir pompa inhibitörü varlığında izoniazid MİK değerinde düşme olduğu gözlenmiştir.

Klorpromazin varlığında izolatların %68'inde (34 izolat) izoniazid MİK değerleri 1 dilüsyon ve üzeri oranlarda düşüş göstermiştir.

Verapamil varlığında izolatların %36'sında (18 izolat) izoniazid MİK değerleri 1 dilüsyon ve üzeri oranlarda düşüş göstermiştir.

Rezerpin varlığında izolatların %36'sında (18 izolat) izoniazid MİK değerleri 1 dilüsyon ve üzeri oranlarda düşüş göstermiştir.

İzolatların 21 tanesinde (%42) herhangi bir inhibitör varlığında izoniazid MİK değerlerinin 2 dilüsyon ve üzerinde düşme gösterdiği saptanmıştır. Bu izolatlarda izoniazid direncine neden olabilecek *katG* ve *inhA* diğer bölge mutasyonlarının ve olası dışa atım pompa genlerinin araştırılmasının, bu konudaki eksiklikleri açığa kavuşturacağı düşünülmektedir.

Tüm izolatların, izoniazid direncine sebep olduğu bilinen *katG* ve *inhA* gen bölgesi mutasyonları araştırıldığında; 29'unda (%58) *katG* mutasyonu, 7'sinde (%14) *inhA* mutasyonu, 14'ünde ise (%28) *inhA* ve *katG* mutasyonunun birlikte var olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda izoniazid dirençli klinik izolatlarda in vitro ortamda dışa atım pompa inhibitörleri kullanılarak yüksek izoniazid MİK değerlerinin azaldığı saptanmıştır. *M.tuberculosis* izolatlarında dışa atım pompaları üzerine yapılan çalışmalarda genellikle laboratuvar ortamında izoniazide maruz bırakılarak dirençli hale getirilen izolatlar kullanılmış ve bu izolatlarda özellikle verapamilin etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak klinik izolatlarla ilgili çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Çalışmamız, izoniazid dirençli olduğu fenotipik ve moleküler olarak gösterilmiş 50 adet *M. tuberculosis* klinik izolatu içermesi, klorpromazinin verapamil

ve rezerpine kıyasla klinik izolatlarda izoniazid MİK değerlerini belirgin olarak daha fazla düşürdüğünü göstermesi açısından oldukça önemli sonuçlar içermektedir.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, in vitro ortamda, izoniazid dirençli klinik izolatlarda, özellikle klorpromazin başta olmak üzere dışa atım pompa inhibitörlerinin kullanılması yüksek izoniazid MİK değerlerinin düşmesini sağlamakta ve uzun tedavi sürecinde izoniazid gibi primer bir ilacın tekrar kullanılabilmesi ile ilgili umutları kuvvetlendirmektedir.

KAYNAKÇA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report: WHO report 2015. Geneva, Switzerland
2. World Health Organization. World health statistics. Geneva: WHO Press, 2015.
3. CLSI. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia and other Aerobic Actinomycetes. Approved standard second edition. CLSI document M24A2, Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2011.
4. World Health Organization. Outcomes and Recommendations. WHO Global Task Force on XDR-TB, October 2006, Genter.
5. Türkiye’de Verem Savaşı 2014 raporu. Ankara, 2015.
6. Ramaswamy S, Musser JM,. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber Lung Dis, 1998;79(1):3-29
7. Kumar A., Schweiser HP. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev, 2005; 57: 1486–1513
8. Louw G.E., Warren R.M., van Pittius N.C., McEvoy C.R., Van Helden P.D., Victor T.C. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 3181–3189.
9. Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, Victor TC, Jordaan AM, Leandro C, Ordway D, Amaral L. Isoniazid-Induced Transient High-Level Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Sep;46(9):2804-10.
10. Silva PE, Bigi F, Santangelo MP, Romano MI, Martín C, Cataldi A, Aínsa JA. Characterization of P55, a Multidrug Efflux Pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Mar;45(3):800-4.
11. Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis* Biochem J. 2002 Oct 1;367(Pt 1):279-85.

12. De Rossi, E., Aínsa, J.A., Riccardi, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance. an unresolved question. FEMS Microbiol. Rev. 2006; 30: 36–52.
13. Pasca, M.R., Gugliera, P., De Rossi, E., Zara, F., Riccardi, G. MmpL7 gene of Mycobacterium tuberculosis is responsible for isoniazid efflux in Mycobacterium smegmatis. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49, 4775–4777.
14. Siddiqi, N., Das, R., Pathak, N., Banerjee, S., Ahmed, N., Katoch, V.M., Hasnain, S.E. Mycobacterium tuberculosis isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. Infection 2004; 32, 109–111.
15. Rodrigues L., Machado D., Couto I., Amaral L., Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. Infection, Genetics and Evolution 2012; 12: 695-700.
16. Machado D., Couto I., Abel, Perdiga J. Et al. 2012. Contribution of Efflux to the Emergence of Isoniazid and Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2012;7(4):e34538.
17. Li G., Zhang J., Guo Q., et al. 2015. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. PLoS One 2015 Feb 19;10(2):e0119013.
18. Black PA., Warren RM., Louw GE., van Helden PD., Victor TC., Kana BD. Energy Metabolism and Drug Efflux in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2014; 58:2491-2503.
19. Seber E. Tüberkülozun dünü. ANKEM Derg 2010;24(Ek 2):52-60
20. Haas DW. Mycobacterial Diseases, In. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2000: 2576-2607.
21. Kıyan M. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. *Mycobacteriaceae*. Ustaçelebi Ş. (ed). Güneş Kitabevi; Ankara, 1999, s. 419-436.
22. Barış İ.Y. Çağlar Boyu Tüberküloz. 21.Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Ofset Basım. Samsun. 2003: 1-7.
23. WHO/HTM/TB 2009.420 Treatment of tuberculosis: guidelines-4th edition

24. Albay A. Mycobacterium. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. Us D, Başustaoglu A. (ed.) Pelikan Kitabevi; Ankara, 2013, s. 235-247.
25. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji Kitabı. Meta Basım. Bornova, İzmir. 2005.
26. Bilgehan H. Mycobacteriumlar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Meta Basım. Bornova, İzmir. 2009 s:571-594.
27. Bailey and Scott's Diagnostic microbiology 2014; Mycobacteria and other bacteria with unusual growth requirements s: 484-512.
28. Köksal F. Tüberküloz basilinin kaynak ve evrimi. Tüberküloz Sempozyum kitapçığı, Malatya: 2003; 34-47.
29. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Charecteristics, Laoratory detection and staining procedures. Murray PR, (ed.) *Manual of Clinical Microbiology* Nolte., FS, Metchock, B. 9th edition Asm Press Washington D.C. 2007; 543-572.
30. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1(4):579-88.
31. Çalgın MK. *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Eflüks Pompasını Oluşturan Gen Ekspresyonlarının Çoklu İlaç Direnç Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara. 2012
32. Brennan P.J. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2003; 83: 91-7.
33. Baylan O. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32(3):788-804.
34. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. TC Sağlık Bakanlığı 2011.
35. Vilchèze C, Jacobs WR Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr.* 2014 Aug;2(4):MGM2-0014-2013.
36. Iseman MD. Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu. Özkara Ş (Çeviren). Nobel Matbaacılık, İstanbul 2002.
37. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:update 2015. *Int J Tubercle Lung Dis.* 2015; 19:1276-1289.

38. Zhang N, Torelles JB, McNeil MR et al. The EMB proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal reconnection region and C-terminal synthetic region. *Mol Microbiol* 2003; 50:69-76.
39. Zhang Y, Shi W, Zhang W et al. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol spectrum* 2:MGM2:0023-2013.
40. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, van Helden PD, van Rie A. A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Jul 28;10(7):e0133869.
41. Palomino JC, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotics (Basel). 2014 Jul 2;3(3):317-40.
42. Zhang Y, Heym B, Allen B et al. The catalase/peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; 358: 591–3.
43. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13881–6.
44. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO et al. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4471–4.
45. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1241–50.
46. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2640–9
47. van Doorn HR, de Haas PE, Kremer K et al. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of *katG*: a decade of experience in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 769–75.

48. Leung ET, Ho PL, Yuen KY et al. Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in *inhA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1075–8.
49. Aygül A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance. *Mikrobiyol Bul.* 2015 Apr;49(2):278-91.
50. Hasdemir U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. *Mikrobiyol Bul.* 2007 Apr;41(2):309-27.
51. Dinesh N, Sharma S, Balganes M. Involvement of efflux pumps in the resistance to peptidoglycan synthesis inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57:1941–1943.
52. Gupta AK, Chauhan DS, Srivastava K, Das R, Batra S, Mittal M, Goswami P, Singhal N, Sharma VD, Venkatesan K, Hasnain SE, Katoch VM. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *J. Commun. Dis.* 2006; 38:246–254.
53. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000; 24:449–467.
54. Pang Y, Lu J, Wang Y, Song Y, Wang S, Zhao Y. Study of rifampicin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57:893–900.
55. De Rossi E, Branzoni M, Cantoni R, Milano A, Riccardi G, Ciferri O. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J. Bacteriol.* 1998; 180:6068–6071.
56. Pasca MR, Gugliera P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E, Riccardi G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:3175–3178.
57. Domenech P, Reed MB, Barry CE, III. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* 2005; 73:3492–3501.

58. De Rossi, E., Arrigo P., Bellinzoni M., Silva P.A., Martín C., Aínsa J.A., Guglierame P., Riccardi G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Medicine*, 2002; 8: 714-24.
59. Caleffi-Ferracioli KR, Amaral RC, Demitto FO, Maltempe FG, Canezin PH, Scodro RB, Nakamura CV, Leite CQ, Siqueira VL, Cardoso RF. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 Mar;97:65-72.
60. Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiol*. 2011 Feb 18;11:35.
61. Pule CM, Sampson SL, Warren RM, Black PA, van Helden PD, Victor TC, Louw GE. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jan;71(1):17-26.
62. Adams KN, Szumowski JD, Ramakrishnan L. Verapamil, and Its Metabolite Norverapamil, Inhibit Macrophage-induced, Bacterial Efflux Pump-mediated Tolerance to Multiple Anti-tubercular Drugs. *J Infect Dis*. 2014 Aug 1;210(3):456-66.
63. Gupta AK, Reddy VP, Lavania M, Chauhan DS, Venkatesan K, Sharma VD, Tyagi AK, Katoch VM. *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *Indian J Med Res*. 2010 Aug;132:176-88.
64. Rodrigues L, Villellas C, Bailo R et al. Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 751–7.
65. Machado D, Pires D, Perdigão J, Couto I, Portugal I, Martins M, Amaral L, Anes E, Viveiros M. Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2016 Feb 26;11(2):e0149326.
66. Viveiros M, Amaral L. Enhancement of antibiotic activity against poly-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by phenothiazines. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 Mar;17(3):225-8.

67. Rodrigues L, Sampaio D, Couto I et al. The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 529–33.
68. Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M et al. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1076–82.
69. Singh M, Jadaun GPS, Ramdas et al. Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* 2011; 133: 535–40.
70. Sun Z, Xu Y, Sun Y et al. Ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with efflux pump activity independent of resistance pattern and genotype. *Microb Drug Resist* 2014; 20: 525–32.
71. Ramon-Garcia S, Marti'n C, Thompson CJ et al. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3675–82.
72. Louw GE, Warren RM, van Pittius NCG et al. Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 269–76.
73. Sharma S, Kalia NP, Suden P et al. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2014; 94: 389–96.
74. Colangeli R, Helb D, Sridharan S et al. The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol* 2005; 55: 1829–40.
75. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jul;66(7):1417-30.
76. Andries K, Villellas C, Coeck N et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *Plos One* 2014; 9: e102135.
77. Almeida D, , Ioerger T, Tyagi S et al. Mutations in *pepQ* confer low-resistance to bedaquiline and clofazimine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 4590-4599.
78. Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Aug;62(2):345-8.

79. Song L, Wu X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Jun;47(6):421-9.
80. Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, Salazar L, Bloom BR, Jacobs WR Jr. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):362-6.
81. Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, Wang H. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist*. 2008 Mar;14(1):7-11.
82. Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargotra A, Koul S, Khan IA. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Aug;65(8):1694-701.
83. Zhang Z, Yan J, Xu K, Ji Z, Li L. Tetrandrine reverses drug resistance in isoniazid and ethambutol dual drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *BMC Infect Dis*. 2015 Mar 25;15:153.