



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İLAÇ DİRENCİNDE  
DIŞA ATIM (EFFLÜKS) POMPASININ ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Gumral ALAKBAROVA**

**Samsun  
Temmuz-2017**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İLAÇ DİRENCİNDE  
DIŞA ATIM (EFFLÜKS) POMPASININ ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Gumral ALAKBAROVA**

**Prof. Dr. Belma DURUPINAR**

**Samsun  
Temmuz-2017**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gumral ALAKBAROVA tarafından Prof. Dr. Belma DURUPINAR Danışmanlığında hazırlanan *Mycobacterium tuberculosis* İlaç Direncinde Dışa Atım (Efflüks) Pompasının Etkisinin Araştırılması başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından .... /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Üye:

Üye:

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.../.../2017

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, eğitimime katkıda bulunan tez danışmanım Prof. Dr. Belma Durupınar'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca beni destekleyen ve eğitimime katkıda bulunan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Asuman Birinci ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Yrd. Doç. Dr. Yeliz Tanrıverdi Çaycı'ya, Yrd. Doç. Dr. Kemal Bilgin'e; Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyelerinden Doç. Dr. Aydın Deveci'ye teşekkür ederim. Ayrıca tez sürecinde her aşamasında eğitimime verdiği katkılardan dolayı Prof. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan, doktora, yüksek lisans öğrencileri ve laboratuvar personeline teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan canım annem Tazegül Alakbarova'ya, canım babam İlham Alakbarov'a ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

İzolatlarımızı sağlayarak çalışmamıza katkıda bulunan: Prof. Dr. Ali ALBAY'a, Prof. Dr. Mustafa ÖZYURT'a, Prof. Dr. Meltem UZUN'a, Doç. Dr. Can BİÇMEN'e, Doç. Dr. İsmail CEYHAN'a, Uzm. Dr. Ahmet ASLANTÜRK'e teşekkürlerimizi sunarım.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 3001 – Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı 115S699 proje numarası kapsamında desteklenmiştir.

## ÖZET

### ***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* İLAÇ DİRENCİNDE DIŞA ATIM (EFFLÜKS) POMPASININ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Amaç:** Aktif efflüks pompanın varlığı bakterinin birçok antibiyotiklere direncinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

**Materyal ve metot:** Çalışmada 42 tanesi Çok İlaça Dirençli (ÇİD) ve 50 tanesi primer ilaçlara duyarlı, 5 referans *Mycobacterium tuberculosis* izolatları temin edildi. Çalışmada test edilen bakterilerin direnç profillerinin belirlenmesi rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı. Çalışmanın ilk aşamasında izoniazid (INH), rifampsin (RIF), etambutol (ETM), streptomisin (STM), nikotinamid (NIC), levofloksasin (LEVO), moksfloksasin (MOX), ofloksasin (OFX) ve siprofloksasin (CIPRO) için MİK değerleri tespit edildi. İzolatların duyarlılıkları belirlendikten sonra çalışmanın ikinci aşamasında, MİK değerleri her antibiyotik için efflüks pompa inhibitörleri olan carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), verapamil, rezerpin, tioridazin varlığında da saptandı. Çalışmanın üçüncü aşamasında, efflüks pompa inhibitörleri varlığında MİK değerlerinde düşüş saptanan 6 *M. tuberculosis* izolatında RT-PZR ile efflüks pompa genlerinin ekspresyonu araştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmada primer ilaçlara (INH, RIF, STM, ETM) duyarlı 50 (%55) izolat saptandı. Geriye kalan ÇİD 42 (%45) izolatın tümü INH ve RIF dirençli bulundu. Toplam 11 (%11,9) izolatta florokinolonlara direnç saptandı. Çalışmamızda efflüks pompa inhibitörlerin varlığında ÇİD, florokinolonlara duyarlı 6 izolatta efflüks pompalarının aktif olduğu tespit edildi. 6 izolatın tamamında CCCP, verapamil, rezerpin gibi inhibitörler varlığında florokinolonların (CIPRO, %6,52; LEVO, %6,52; MOX, %6,52; OFX, %6,52) MİK'lerinde düşüş saptandı. Bu 6 izolatın 3'ünde STM; 4'ünde RIF CCCP ve verapamil varlığında (RIF, %4,34 ve STM, %3,26) MİK değerlerinin düştüğü gözlemlendi. Efflüks pompa inhibitörleri varlığında MİK değerlerinde düşüş saptanan 6 izolatta efflüks pompa genlerine ait 15 gen bölgesinin tamamında aşırı ekspresyon görüldü.

**Sonuç:** Dirençli izolatlarda gen bölgelerinin aşırı ekspresyonu efflüks pompalarının direnç gelişimi ile ilişkisini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Efflüks pompası; efflüks pompa inhibitörleri; ilaç direnci; *Mycobacterium tuberculosis*

**Gumral ALAKBAROVA, Doktora Tezi**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, Temmuz-2017**

## ABSTRACT

### INVESTIGATION EFFECT OF EFFLUX PUMPS IN DRUG RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

**Aim:** Active efflux is known to play a major role in the resistance of many bacteria to antibiotics.

**Material Method:** In this study, we included 50 pan-sensitive, 42 Multidrug Resistant (MDR) clinical isolates and 5 *Mycobacterium tuberculosis* control strains. Resistance profiles of bacteria were tested by resazurin microtitre assay (REMA). In the first phase of our study; MIC levels for isoniazid (INH), rifampin (RIF), etambutol (ETM), streptomycin (STM), nicotinamide (NIC), levofloxacin (LEVO), moxifloxacin (MOX), ofloxacin (OFX) and ciprofloxacin (CIPRO) were determined. In the second phase of the study after detection susceptibility of isolates, antibiotics MIC levels were also determined in the presence of efflux pump inhibitors such as carbonyl cyanide, m-chlorophenylhydrazone (CCCP), verapamil, reserpine thioridazine. In the third phase of the study, MIC levels were reduced in 6 *M. tuberculosis* isolates in the presence of efflux pump inhibitors, in these isolates for determining the presence expression of putative efflux pump genes was examined by Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR).

**Results:** In this study, 50 (55%) isolates were identified susceptible to primary drugs (INH, RIF, STM, ETM), 42 (45%) isolates (MDR) were resistant to INH and RIF. 11 (11.9%) isolates were resistant to fluoroquinolones. In our study, in the presence of efflux pump inhibitors active efflux pumps were detected in 6 MDR fluoroquinolones susceptible isolates. In the study MIC levels of fluoroquinolones (CIPRO, 6,52%, LEVO, 6,52%, MOX, 6,52%, OFX, 6,52%) in these 6 isolates decreased in the presence of inhibitors such as CCCP, verapamil and reserpine. MIC of RIF in 4 (4.34%) isolates, MIC of STM in 3 (3.26%) isolates decreased in the presence of efflux pump inhibitors such as CCCP, verapamil. Overexpression of all 15 efflux pump genes was observed in 6 isolate with a reduction in MIC values in the presence of efflux pump inhibitors.

**Conclusion:** Overexpression of gene regions in resistant isolates suggests that efflux pumps are associated with resistance development.

**Keywords:** Drug resistance; efflux pumps; efflux pumps inhibitors *Mycobacterium tuberculosis*

Gumral ALAKBAROVA, Ph. D. Thesis

Ondokuz Mayıs University – Samsun, July –2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>A</b>	: Alfa
<b>β</b>	: Beta
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>ABC</b>	: ATP-binding cassette
<b>AMK</b>	: Amikasin
<b>BCG</b>	: Bacillus Calmette-Guérin
<b>bp</b>	: Base pair (baz çifti)
<b>CCCP</b>	: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
<b>cDNA</b>	: Complementary deoksiribonükleik asit
<b>CFU</b>	: Colony forming unit
<b>CIPRO</b>	: Siprofloksasin
<b>CLSI</b>	: Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>ÇİD-TB</b>	: Çok ilaca dirençli tüberküloz
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotid trifosfat
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>ETH</b>	: Etionamid
<b>ETM</b>	: Etambutol
<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus
<b>INH</b>	: İzoniazid
<b>KAN</b>	: Kanamisin
<b>LJ</b>	: Lowenstein-Jensen
<b>M</b>	: Marker
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Amonyum sülfat
<b>NK</b>	: Negatif Kontrol
<b>NIC</b>	: Nikotinamid
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>OADC</b>	: Oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RİF</b>	: Rifampisin
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>rRNA</b>	: Ribozomal ribonükleik asit
<b>RNAse</b>	: Ribonükleaz
<b>RND</b>	: Resistance nodulation cell division
<b>rpm (g)</b>	: Devir/dakika



<b>rRNA</b>	: Ribozomal ribonükleik asit
<b>RT-PZR</b>	: Revers transcriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
<b>S</b>	: Duyarlı
<b>SMR</b>	: Small multidrug resistance
<b>Sn</b>	: Saniye
<b>STM</b>	: Streptomisin
<b>R</b>	: Dirençli
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TB</b>	: Tüberküloz
<b>TBE</b>	: Tris/Borate/EDTA
<b>TE</b>	: Tris/EDTA
<b>TET</b>	: Tetrasiklin
<b>TRIS</b>	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
<b>U</b>	: Ünit
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>ÜK</b>	: Üreme kontrolü
<b>YİD-TB</b>	: Yaygın ilaç dirençli tüberküloz
<b>PZA</b>	: Pirazinamid

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Tarihçe .....	2
2.2. Epidemiyoloji.....	3
2.3. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.3.1. Mikobakterilerin Sınıflandırılması .....	4
2.3.2. Mikobakterilerin Morfolojik Yapısı .....	6
2.3.3. Hücre Duvarı.....	7
2.3.4. Virülans Faktörleri.....	7
2.4. Tüberkülozun Tanısında Kullanılan Yöntemler .....	8
2.4.1. Mikroskopi.....	8
2.4.2. Kültür .....	8
2.4.3. İlaç Duyarlılık Testleri.....	9
2.4.4. Kolorometrik Yöntemler.....	9
2.5. Tüberkülozun Tedavisi .....	10
2.5.1. Antitüberküloz İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları .....	12
2.6. Efflüks Pompaları ve Direnç Mekanizmaları .....	15
2.6.1. Efflüks Pompa İnhibitörleri .....	20
3. MATERYAL METOT .....	24
3.1. İzolatların Toplanması .....	24
3.2. Bakteri İnokülümünün Hazırlanması .....	24
3.3. Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyeri Hazırlanması.....	24
3.4. Antibiyotiklerin Hazırlanması .....	25

3.5. Rezasurinin Hazırlanması .....	26
3.6. Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi ile MİK Değerlerinin Belirlenmesi için Plakların Hazırlanması.....	26
3.6.1. Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi İle MİK Değerinin Belirlenmesi İçin Testin Uygulanması .....	28
3.7. Moleküler Yöntemler.....	29
3.7.1. RNA Ekstraksiyonu .....	29
3.7.2. RNA'ların Nanodrop 1000 Spectrofotmetre İle Ölçümü .....	30
3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	31
3.8.1. Kullanılan primerler.....	31
3.8.2. PZR Çalışmaları.....	32
3.8.3. PZR Ürünlerinin Elektroföresi .....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerleri.....	35
4.2. Efflüks Pompa İnhibitörleri (Rezerpin, CCCP, Verapamil) Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi ile Elde Edilen MİK Değerleri.....	40
4.2.1. Rezerpin Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Testi ile Elde Edilen MİK Değerleri .....	40
4.2.2. CCCP Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Testi ile Elde Edilen MİK Değerleri .....	41
4.2.3. Verapamil Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Testi ile Elde Edilen MİK Değerleri .....	41
4.2.4. Tioridazin varlığında rezasurin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri .....	43
4.3. Efflüks Pompa Genlerinin Ekspresyonunu RT-PZR Yöntemi ile Belirlenmesi .....	44
4.3.1. <i>Rv1410c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	44
4.3.2. <i>Rv2333c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	45
4.3.3. <i>DrrA</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları.....	46
4.3.4. <i>DrrB</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları.....	47
4.3.5. <i>iniA</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları.....	48
4.3.6. <i>mmpL7</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	49
4.3.7. <i>Rv1258c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	50
4.3.8. <i>Rv1273c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	51

4.3.9. <i>Rv1687c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	52
4.3.10. <i>Rv1250</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	53
4.3.11. <i>Rv1634</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	54
4.3.12. <i>Rv3000</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	55
4.3.13. <i>mmpLA</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	56
4.3.14. <i>Rv0783c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	57
4.3.15. <i>Rv0037c</i> gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları .....	58
5. TARTIŞMA .....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR .....	65
EKLER.....	74
Ek 1. 115S699 nolu 3001 Tübitak ARGE Proje Onay Raporu .....	74
Ek 2. 115S699 nolu 3001 Tübitak ARGE Proje Sonuç Raporu .....	75
ÖZGEÇMİŞ .....	76

## 1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tüm dünyada insan sağlığını tehdit etmekte olan ve Human Immunodeficiency Virus (HIV)'den sonra ikinci sırada yer alan en önemli enfeksiyon hastalığıdır. Dünya nüfusunun 1/3'ünün TB basili ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Yılda yaklaşık iki milyon kişi, TB'den ölmekte ve ölümlerin %98'i gelişmekte olan ülkelerde olmaktadır (7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 2015).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) Küresel Tüberküloz 2016 Raporu'na göre; dünya genelinde TB insidansı, prevalansı ve mortalite oranı düşmektedir; ancak küresel TB yükü halen çok yüksektir. TB insidansının düşme oranı 2014'ten 2015'e kadar sadece %1,5 düzeyinde kalmıştır. DSÖ "End Tuberculosis" stratejisine göre, 2050 yılı için TB ölüm oranının %90, TB oranının %80 azalmasını hedeflemektedir (WHO Report, 2016).

2015 DSÖ raporuna göre, 10,4 milyon yeni TB vakası tespit edilmiş ve bunların 1,2 milyon (%11)'i HIV pozitif hastalardır. TB hastalarının %55'inin HIV pozitif oldukları ve 480.000 yeni çok ilaca dirençli (ÇİD) vakaların görüldüğü raporda belirtilmiştir. Günümüzde TB ilk 10 ölüm nedeni olarak yerini korumaktadır (WHO Report, 2016).

Antitüberküloz ilaçlara karşı direnç ve tolerans TB tedavisinde ciddi bir sorun haline gelmiştir. Tüberküloz ilaçlarının geliştirilmesi ve kullanıma girmesi TB kontrolünde önemli bir basamak olacaktır. Mikobakterilerdeki ilaç direnç mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması hastalığın kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır. Antimikrobiyal ilaçların bakteriyel efflüks pompaları vasıtasıyla atılması, ilaç direncinin ana nedenlerinden biridir. (Song ve Wu, 2016).

Bu çalışmada amacımız, efflüks pompalarının *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) direncine katkısının araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda ilk hedefimiz, *M. tuberculosis* izolatlarında direnç gelişmesinden sorumlu aktif efflüks pompalarının varlığını araştırmaktır. Bu amaçla ilk olarak çeşitli efflüks pompa inhibitörlerinin varlığında birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlarının minimal inhibisyon konsantrasyonlarındaki (MİK) düşüş saptanmış ve daha sonra aktif efflüks pompası saptanan *M. tuberculosis* izolatlarında pompa genlerinin ekspresyonu araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Tüberküloz, *M. tuberculosis*'in etken olduğu, yaşam boyu sürebilen bulaşıcı bir hastalıktır. *M. tuberculosis* kökenleri çok eski olup: 70.000 yıldan fazla sağ kalmış basiller bulunmaktadır. Günümüzde dünya genelinde 2 milyar insana bulaştığı bildirilmektedir (Barberis ve ark., 2017).

*Mycobacterium* cinsinin 150 milyon yıldan daha önce ortaya çıktığı varsayılmaktadır. *Mycobacterium ulcerans* antik çağlardan beri enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (Hayman, 1984).

*M. tuberculosis* kökeni üç milyon yıl önce, Doğu Afrika'da erken hominidlere bulaşmıştır. Modern *M. tuberculosis* suşlarının 20.000-15.000 yıl önce ilk kez ortaya çıktığı düşünülmektedir (Kapur ve ark., 1994; Brosch ve ark., 2002).

M.Ö. 2400 yılına ait Mısır mumyalarında, TB'ye ait iskelet deformiteleri; karakteristik Pott lezyonları bulunmakta ve benzer anormallikler Erken Mısır sanatında da açıkça görülmektedir (Morse ve ark., 1964; Zimmerman ve ark., 1979). Mısır papirüslerinde 3300 ve 2300 yıl öncesine ait TB'yi tanımlayan ilk yazılı belgeler sırasıyla Hindistan'da ve Çin'de bulunmuştur (Cave, 1939; Brown, 1941).

Antik Yunan'da TB iyi tanınmış ve Phtisis olarak anılmıştır. Hipokrat, Phtisis'i özellikle genç yetişkinlerde ölümcül bir hastalık olarak belirtmiştir. Belirtilerini ve karakteristik tüberküler akciğer lezyonlarını da doğru bir şekilde tanımlamıştır. TB araştırması yapan ilk bilim insanlarının mükemmel keşifleri aynı dönemde yapılmıştır: Yunanistan'da, Isocrates, TB'nin bulaşıcı bir hastalık olduğunu varsayan ilk yazardır; Aristo ise, domuz ve öküzlerde "kral kötülüğünün" bulaşıcı nitelikte olduğunu ileri süren ilk bilim adamıdır (Barberis ve ark., 2017).

MS 174 yılında, Roma İmparatoru Marcus Aurelius'un kişisel doktoru olan Yunan Clarissimus Galen, TB belirtilerini ateş, terleme, öksürük ve kan lekeli balgam olarak tanımlamıştır; hastalık için temiz hava, süt ve deniz seferi önermiştir (Daniel, 2006; Bynum, 2012; Pease, 1940).

Roma İmparatorluğu'nun çökmesinden sonra, birçok arkeolojik araştırmalarda, TB'nin VIII ve XIX yüzyıllarda Avrupa'da yaygınlaşmış olduğu görülmektedir. (Roberts, 2003).

Bizans doktorlarının TB'nin pulmoner ve glandüler formlarını tanımladığı bildirilmektedir (Besciu, 2009).

Ünlü bilim adamı Robert Koch, TB basilini ilk kez izole etmiştir. Paul Ehrlich tarafından önerilen metilen mavisi boyama yöntemini kullanarak, bakteriyi tanımlamış, izole ederek ve hayvan serumunda üretmiştir. Daha sonra, laboratuvar ortamında basili hayvanlara inoküle ederek, hastalığı oluşturmuştur (Grandmann, 2001).

Robert Koch, bu bulgularını 1882'de Berlin Fizyoloji Derneği'ne sunmuş, TB ile mücadele yollarını belirtmiştir (Bartolozzi, 2012). Bu keşiften sonraki yıllarda Pirquet ve Mantoux tüberkülin deri testini; Albert Calmette ve Camille Guérin (BCG) aşısını; Selman Waksman ise, streptomisin ve diğer antitüberküloz ilaçlar geliştirmişlerdir (Daniel, 2000; Grandmann, 2001).

1865'te, Jean-Antoine Villemin, TB'nin bulaşıcı bir hastalık olduğunu, insanlardan sığırlara ve sığırlardan tavşanlara geçebileceğini göstermiştir (Palomino ve ark., 2007).

## **2.2. Epidemiyoloji**

DSÖ Küresel Tüberküloz 2016 Raporu'na göre dünya genelinde TB insidans, prevalans ve mortalite oranı düşmektedir; ancak küresel TB yükü halen çok yüksektir. 202 ülkede halen TB prevalansı görülmektedir (WHO Report, 2016).

2015 yılına ait 10,4 milyon yeni TB vakası, 5.9 milyon (%56) erkek, 3.5 milyon (%34) kadın ve 1,0 milyon (%10) çocukta tespit edilmiştir. 6 ülkede (Hindistan, Pakistan, Çin, Nijerya, İndonezya, Kuzey Afrika) ise %60 fazla yeni TB olgusu bildirilmiştir. Dünya çapında, TB insidansındaki düşme oranı 2014'ten 2015'e kadar sadece %1,5 düzeyinde kalmıştır (WHO Report, 2016).

2015 yılında 480.000 yeni ÇİD olgular görülmüştür. 1.4 milyon kişide TB ölümü neden olup ve bu olguların 0,4 milyonun HIV hastaları olduğu bildirilmektedir. 2010-2015 yılları arasında TB'den ölümün %22 oranda azaldığı görülmüştür. 2015 yılında TB'nin ilk 10 ölüm nedeni arasında yerini koruduğu görülmektedir (WHO Report, 2016).

Sağlık Bakanlığı'nın 2016 Verem Savaş Raporuna göre; 2013 yılında toplam 13.409 TB olgusunun verem savaşı dispanserleri kayıtlarına girdiği görülmektedir. Toplam olgu hızı yüz binde 19,4'ten yüz binde 17,5'e (-%10,0) düşüş gösterdiği

bildirilmektedir. Olguların 7.881 (%58,8)'i erkek, 5.528 (%41,2)'i kadındır. Erkek/Kadın oranı 1,4'tür (Verem Savaş Raporu, 2016).

2013 yılın ait akciğer TB'li 8,655 olguda yapılan bakteriyolojik tetkikler incelendiğinde; mikroskopi yapılanlar içinde pozitiflik oranı %65,5; kültür yapılanlar içinde pozitiflik oranı %80,5 ise bulunmuştur (Verem Savaş Raporu, 2016).

İlaç duyarlılık testi (İDT) yapılan toplam 5.539 olgunun sonuçları incelendiğinde; %20'sinde en az bir ilaca direnc saptanmıştır. En yüksek oranda direncin %13,6 ile izoniyazide karşı geliştiği görülmüştür (Verem Savaş Raporu, 2016).

İzoniyazid ve rifampisin için (her ikisine) ilaç duyarlılık testi yapılan 5.529 olgunun %4,1'inin ÇİD- TB olduğu tespit edilmiştir. İDT yapılanlarda ÇİD-TB oranı yeni olgularda %2,5'iken, önceden tedavi görmüş olgularda %17,8 olarak saptanmıştır. Toplam 13.409 TB olgusundan 32 (%0,23)'sinin HIV (+) olduğu tespit edilmiştir (Verem Savaş Raporu, 2016).

### **2.3. Mikobakterilerin Mikrobiyolojik Özellikleri**

#### **2.3.1. Mikobakterilerin Sınıflandırılması**

Mikobakterilerin ilk sınıflandırılmaları, üreme özellikleri ve koloni morfolojilerine göre yapılmaktadır. Mikobakteriler öncelikle *M. tuberculosis* kompleks üyeleri ve TB dışı mikobakteriler olarak ayrılmaktadır. *M. leprae* ise ayrı bir gruba ayrılmaktadır (Pfyffer, 2015; Yüce ve ark., 2016).

*M. tuberculosis* kompleks üyeleri *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. cannetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedi* türlerinden oluşmaktadır (Yüce ve ark., 2016).

*M. tuberculosis* kültür ortamlarında oldukça yavaş üremekte ve her 12-24 saatte bir bölünmektedir. Bu hız, 15 dakika ile bir saat arasında bölünme dağılımı gösteren ve düzenli aralıklarla ikiye bölünen, kültürde üreyebilen çoğu bakteriye kıyasla oldukça yavaştır. *M. tuberculosis* kolonileri pigmentsiz ve açık bir bronz rengindedirler. Kültür ortamında yavaş üreyen mikobakterilerin katı besiyerinde izolasyonu için 3-8 hafta gereklidir (Saniç ve Çoban, 1999; Murray ve ark., 2009; Yüce ve ark., 2016).

Düşük çoğalma hızı, genellikle hastalığın subakuttan kronik duruma dönüşümünü ve in vitro gözle görülebilir üreme elde edilebilmesi için uzun bir zamana



ihtiyaç duyulmasını açıklamaktadır (Saniç ve Çoban, 1999; Murray ve ark., 2009; Yüce ve ark., 2016).

TB dışı mikobakteriler (Runyon Sınıflanması) üreme özellikleri, koloni morfolojileri ve pigment oluşturma özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Mikobakteriler “yavaş üreyen” ve “hızlı üreyen” 2 ana gruba ayrılır. Hızlı üreyen 7 günden daha kısa, yavaş üreyen türlerde ise 7 günden sonra üremiş kolonilerin üremesi görülür. Runyon sınıflanması tablo 1’de sunulmuştur (Saniç ve Çoban, 1999; Yüce ve ark., 2016).

**Tablo 1.** Runyon sınıflaması (Saniç ve Çoban, 1999; Yüce ve ark., 2016)

Grup adı	Pigment	Koloni morfolojisi	Üreme hızı	Türleri	Yaptıkları Hastalık
Fotokromojenler	Karanlıkta renksiz/işıқта pigmentli*	Genellikle R	Yavaş	<i>M.kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M.asiaticum</i> , <i>M.intermedium</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit, deri ve yumşak doku enfeksiyonu
Skotokromojenler	Karanlıkta ve ışıkta pigmentli*	S/R	Yavaş	<i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M.gordonae</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit
Nonkromojenler	Karanlıkta ve ışıkta pigmentsiz	S/R	Yavaş	<i>M. avium intracellulare</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M.haemophilum</i> , <i>M. malmoense</i>	Akciğer enfeksiyonu, lenfadenit
Hızlı üreyenler	Pigmentli veya pigmentsiz	Genellikle S	Hızlı	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. peregrinum</i>	Patojen değil

\*Sarı-portakal renkli

### **2.3.2. Mikobakterilerin Morfolojik Yapısı**

*Mycobacterium* cinsi *Mycobacteriaceae* ailesi içinde tek cinstir. Mikobakteriler aerob, sporsuz, hareketsiz, 0,2-0,6 µm, 1,0-10µm boyutlarında, hafif kıvrık veya düz basillerdir. Koloni morfolojileri düz, kaba veya pürüzlü, pigmentli veya pigmentsizdir (Pfyffer, 2015).

Klinik materyallerden (balgam, trakeal aspirat vb.) yapılan preparatlarda tek ya da ikili üçlü grup halinde X, V, L harfleri şeklinde bulunurlar. *M. tuberculosis*, nadiren pleomorfiktir, filamentlere uzanmaz ve klinik örneklerde veya kültürlerde gözlemlendiğinde zincirler oluşturmazlar. Deneysel makrofaj enfeksiyonunda, hücre içi basiller, besiyerinde üretilmiş basillerle karşılaştırıldığında belirgin şekilde uzamış ve tomurcuk benzeri yapıları sergilemek üzere görülmüştür (Saniç ve Çoban, 1999; Chauhan ve ark., 2007).

Mikobakteriler lipitten zengin karmaşık bir hücre duvar yapısına sahiptirler. Peptidoglikolipitten oluşan hücre duvarı meso-diaminopimelik asit, alanin, glutamik asit, glukozamin, arabinoz ve galaktoz içerir. Mikolik asitler serbest lipidler ile birlikte hidrofobik geçirgen bir bariyer oluştururlar. Diğer önemli yağ asitleri mumlar, fosfolipidler, mikoserozik ve phtienoik asitlerdir (Pfyffer, 2015).

Hücre duvarında zengin lipit tabakasının hidrofobik özellik kazandırması nedeni ile suda çözünen boyalarla zor boyanırlar. Mikobakteriler hücre içine aldıkları asit içeren boyayı bırakmamaları nedeniyle, “asit-dirençli bakteri (ARB)” olarak adlandırılırlar (Ulusal Tüberküloz Tanı rehberi, 2014).

### **Mikobakterilerin Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları**

Mikobakteriler eğer güneş ışığından korunurlarsa, cansız nesnelere üzerinde haftalarca, aylarca canlı kalabilirler. 65°C’de en az 30 dakikada ve UV (güneş) ışınları tarafından kolaylıkla öldürülürlerken, dondurma ve kurutma işleminden etkilenmezler. Asitlere, alkalilere ve diğer bazı kimyasal dezenfektanlara karşı diğer bakterilerin çoğundan daha dirençlidirler (Murray ve ark., 2009).

### 2.3.3. Hücre Duvarı

Kompleks hücre duvarı yapısına sahip olan mikobakterilerin ayırtecdici özelliği, iyi bilinen bir ilaç hedefi olmasıdır. Hücre duvarı hem Gram pozitif hem de Gram negatif tüm bakterilerin hücre duvar yapısı gibidir, ancak biyokimyasal ve yapısal özellikleri önemli farklılıklar göstermektedir. Çift fosfolipid tabakası olan iç tabaka, glikolipidleri içerir ve periplazmik ortamdan oluşmaktadır. Temel hücre duvarı yapısı üç ana komponentden oluşmaktadır: çapraz bağlanmış peptidoglikan polimeri, oldukça dallanmış bir arabinogalaktan polisakkariti ve uzun zincirli mikolik asitler. Mikolat tabakası arasında bulunan glikofosfolipidler, serbest lipidler ve yağ asit mومları dış tabakayı oluşturmaktadır (Saniç ve Çoban, 1999; Abrahams ve Besra, 2016).

Hücre duvarının lipit ve karbonhidrat bakımından zengin tabakaları, sadece hidrofilik bileşiklere karşı koruma sağlayan bir geçirgenlik bariyeri olarak değil, aynı zamanda patogenez ve sağkalımda kritik öneme sahiptir. Hücrenin duvar bileşenlerinin biyosentezi ve toplanması, ilaç hedeflerini çekici hale getiren bir özelliktir (Abrahams ve Besra, 2016).

### 2.3.4. Virülans Faktörleri

Virülans faktörleri fonksiyonları, moleküler özellikleri veya hücrenel lokalizasyonuna göre aşağıdaki kategorilere ayrılmıştır: (i) kolesterol katabolizmasını içeren, lipid ve yağ asidi metabolizması, (ii) hücre zarf proteinleri, hücre duvar proteinleri, lipoproteinler ve salgılama sistemleri (iii) oksidatif ve nitrosatif strese cevap veren, makrofajın antimikrobiyal etkilerini, fagozomunu durduran ve apoptozu inhibe eden proteinler, (iv) protein kinazlar, (v) metalloproteazlar içeren proteazlar, (vi) içe ve dışa geçişi sağlayan metaltaşıyıcı proteinler, (vii) iki komponentli sistemler içeren gen ekspresyon düzenleyicileri, sigma faktörleri ve diğer transkripsiyonel regülatörler, (viii) fonksiyonları bilinmeyen proteinler, (ix) diğer virülans proteinleri (Forellad ve ark., 2012).

*M. tuberculosis* bakteriyel patojenler arasında benzersizdir, hücre yüzeyinde çok çeşitli lipid ve lipoglikanlar sergilemektedir. Peptidoglikandan sonraki ilk makromolekül olan heteropolisakkarit tabaka, arabinan ve galaktandan oluşmaktadır (bu nedenle arabinogalaktan olarak adlandırılır) ve uzun zincirli  $\alpha$ -alkil  $\beta$ -hidroksi yağ asitleri (mikolik asitler) ile esterleştirmektedir. Mikolik asitler uzunluk olarak aynı, yapı

açısından farklıdır. Siklo-propanasyonlara (cis ya da trans) ya da keto ya da metoksi gruplara sahiptirler ve bir takım alt aileler oluşturular. Arabinogalaktana kovalent olarak bağlanarak, mikolik asitlerin gliserola ve trehaloza esterleştirilmesini de sağlarlar. Trehaloza; bir molekül mikolik asit içeren trehaloz monomikolatlar, ya da iki molekül mikolik asit içeren, trehaloz dimikolatlar oluşturabilmektedirler. Her iki bileşen de hücre duvar yapısında bulunmakta ve diğer lipid ile lipoglikanlar ile etkileşim kurmaktadır. Trehaloz dimikolat kord faktör olarak isimlendirilmekte ve polimorf nüveli lökositlerce fagositozu önlediği ve granülüm oluşunu stimule ettiği bilinmektedir (Saniç ve Çoban, 1999; Converse ve ark., 2003; Forellad ve ark., 2012).

## **2.4. Tüberkülozun Tanısında Kullanılan Yöntemler**

### **2.4.1. Mikroskopi**

Mikroskopik inceleme TB basilini belirlemede, ucuz, hızlı ve kolay bir yöntemdir. Yöntemin duyarlılığı klinik örneğin kalitesine, içerdiği bakteri miktarına ve tekniğin uygulanmasına bağlıdır (Garcia ve ark., 2014; Yüce ve ark., 2016).

Mikobakterilerin tanısında 2 farklı boyama yöntemi kullanılır:

#### **i) Karbol fuksin yöntemleri**

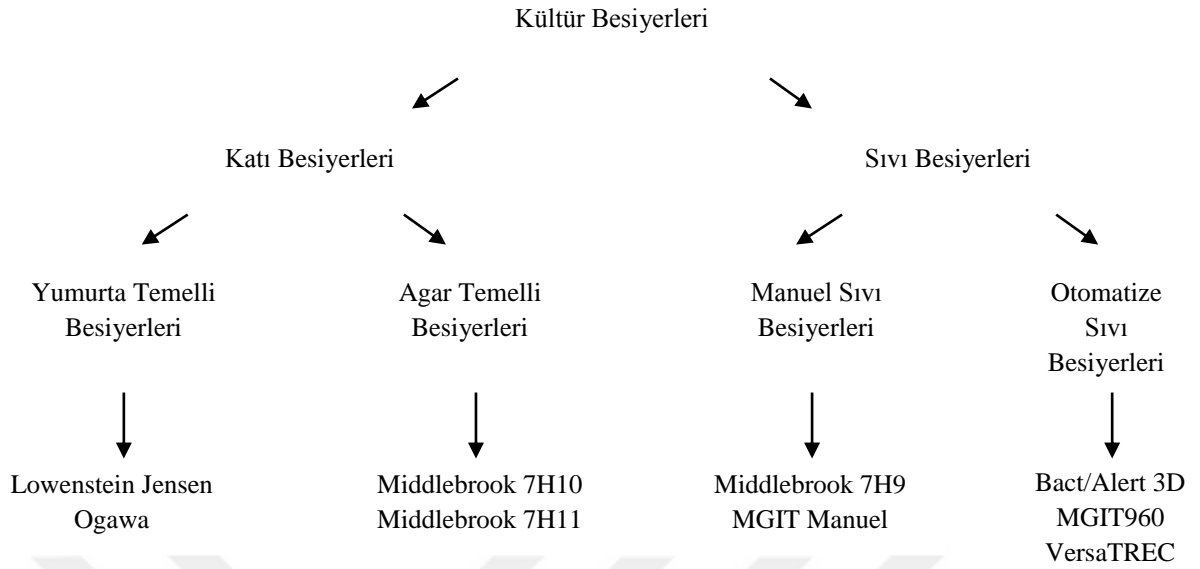
- Erlich Ziehl-Neelsen (EZN)

- Kinyoun

ii) Florokrom (floresan) yöntemleri (Auramin O, auramin-rhodamin) (Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi, 2014).

### **2.4.2. Kültür**

Tüberkülozun kesin tanısı bakterinin kültür ortamında üretilmesi ve tanımlaması esasına dayanır. Kültür altın standarttır. *M. tuberculosis*'in üretilmesi için sıklıkla gliserol ve asparajin içeren yumurta temelli besiyerleri, agar temelli besiyerleri, serum ve sığır albümini ile zenginleştirmiş sıvı besiyerleri kullanılır. Kültür yöntemleri katı ve sıvı kültür sistemleri olmak üzere ikiye ayrılır (Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi, 2014) (Şekil 1).



Şekil 1. *M. tuberculosis* kültür için kullanılan besiyerleri (Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi, 2014)

### 2.4.3. İlaç Duyarlılık Testleri

Antitüberküloz duyarlılık testlerinin amacı; kullanılacak antibiyotiğin, mikroorganizmaya karşı etkisini belirlemek ve mikobakteri popülasyonu içinde herhangi bir ilaca karşı, doğal dirençli olan bakteri sayısını ortaya çıkarmaktır. TB ilaç direncinin doğru ve hızlı tanısı, etkin tedavinin erken başlanmasını sağlayarak ilaç direncinin yayılımını azaltabilir, hastalığın süresini kısaltabilir, iyileştirme oranını artırabilir. TB ve çok ilaca dirençli tüberkülozun erken ve doğru tanısı küresel bir önceliklidir.

Antitüberküloz duyarlılık testleri 2 gruba ayrılır:

- i) Kültüre dayalı yöntemler: Proporsiyon yöntemleri, otomatize sıvı yöntemleri
- ii) Moleküler Yöntemler: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, ters hibridizasyon, dizi analizi (Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi, 2014).

### 2.4.4. Kolorometrik Yöntemler

Kolorometrik yöntemler antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerinin içerisine eklenmiş indikatör boyanın renk değiştirmesi prensibine dayanır. *M. tuberculosis* basili üreme sırasında boyayı metabolize ederek renk değişimine sebep olur. İndikatör olarak tetrazolyum tuzları ve redoks indikatörleri kullanılır (rezasurin ve alamar mavisi). Kolorometrik yöntemler konvansiyonel İDT yöntemleri ile karşılaştırıldıklarında

izoniazid, rifampisin, streptomisin direncinin belirlenmesinde iyi sonuçlar vermektedirler. Ucuz ve pratik bir yöntemdirler (Wilson, 2013).

## 2.5. Tüberkülozun Tedavisi

TB tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki gruba ayrılır. Bunlardan birinci seçenek (primer, majör) ilaçlar; izoniazid (INH), rifampisin (RİF), etambutol (ETM), streptomisin (STM) ve pirazinamid (PZA)'dir. İkinci seçenek (sekonder, minör) ilaçlar; kapreomisin (KAP), amikasin (AMK), kanamisin (KAN), etionamid (ETH), paraaminosalisilik asit (PAS), florokinolonlar (FQ) ve sikloserin'den oluşmaktadır (Palomino ve ark., 2007).

Antitüberküloz ilaç tedavisine streptomisin ve paraaminosalisilik asidin keşfinden sonra, 1944 yılında başlanmıştır. İlk araştırma 1950'de yapılmış ve STM ve PAS monoterapisi ile kombine ilaç tedavisinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Araştırmada, kombine tedavinin daha etkili olduğu, ancak uzun süren kullanımından dolayı her iki ilacın da çoklu ilaç direncine neden olduğu gösterilmiştir. 1952'de, bu kombinasyona üçüncü bir ilaç olan izoniazid de eklenmiş ve tedavi etkinliğini büyük ölçüde arttırdığı gözlenmiş, ancak tedavinin 18-24 ay boyunca uygulanması gerekli olduğu görülmüştür. 1960 yılında PAS'ın yerine geçen etambutol, tedavi süresi 18 aya indirmiştir. 70'li yıllarda, kombinasyona rifampisinin eklenmesiyle, tedavi süresi dokuz ay daha kısalmıştır. Son olarak, 1980 yılında antitüberküloz tedavisine pirazinamidin eklenmesi ile, bu süre altı ay daha azalmıştır (Palomino ve ark., 2007).

*M. tuberculosis*'de plazmid bulunmaması ve genomik DNA transferinin görülmemesi nedeniyle, yatay gen transferi yoluyla ilaç direnci oluşmaz. Bu nedenle, antitüberküloz ilaçlara direnç spontan mutasyon ile ortaya çıkar (Louw ve ark, 2009).

Antitüberküloz ilaçlarla karşılaşmamış olan *M. tuberculosis* izolatları klinik olarak dirençli değildir. İlaça dirençli suşlar antibiyotiklerin hatalı kullanımıyla ortaya çıkmaktadır (Durmaz, 2005).

*Primer direnç:* Spontan mutasyonlar sonucunda gelişen bir dirençtir. Hiç ilaçla karşılaşmamış veya bir aydan daha kısa süre ilaç almış yeni TB hastalarında saptanan dirençtir. Primer direnç; basilin alındığı kaynağa ait olan olup, bir toplumdaki sekonder direnç oranıyla paralellik göstermektedir. Primer direnç oranının yüksek olması o

toplumda uygulanmakta olan TB korunma ve kontrol önlemlerinin yetersizliğini yansıtmaktadır (Durmaz ve ark., 2003; Lynch, 2013).

*Sekonder direnç:* Başlangıçta duyarlı olan basillerle enfekte olan TB hastasında, uygun olmayan tedavi (çoğunlukla hatalı ilaç seçimleri, erken ilaç kesme, tedaviye uyumsuzluk) sonrası ortaya çıkan dirençli mutantların artması sonucu gelişen dirençtir. Artmış sekonder direnç, uygulanmakta olan TB tedavi protokolünün yetersizliğinin göstergesidir (Durmaz ve ark., 2003; Lynch, 2013).

**Çok İlaç Dirençli Tüberküloz (ÇİD-TB):** TB basilinin izoniyazid ve rifampisine birlikte direncinin olduğunu belirtir.

**Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz (YİD-TB):** ÇİD-TB olgusunda bir kinolona ve bir de parenteral kullanılan ilaca (amikasin, kapreomisin ya da kanamisin) direnç olması durumudur (Verem Savaş Raporu, 2016).

DSÖ ÇİD-TB tedavi rejimi oluşturarak, TB ilaçlarını 5 gruba ayırmıştır:

**1 grup:** İzoniazid, rifampisin, etambutol, pirazinamid yer alır; bu ilaçlardan duyarlı olanlar rejime eklenir.

**2 grup:** Parenteral ilaçlar (streptomisin, kanamisin, kapreomisin, amikasin) yer alır; bu ilaçlardan duyarlı 1 ilaç eklenir.

**3 grup:** Kinolonlar (ofloksasin, moksifloksasin, levofloksasin) yer alır; bu ilaçlardan duyarlı 1 ilaç eklenir.

**4 grup:** Oral bakteriostatik olan 2 grup ilaçlar (PAS, sikloserin, protionamid/etionamid) yer alır; bunlardan yeterli rejim oluşturmaya yetecek sayıda ilaç eklenir.

**5 grup:** Yeni ilaçlar ve etkinliği şüpheli ilaçlar (klofazamin, linezolid, bedakulin, delamanid, imipenem ve diğerleri) yer alır; yeterli bir rejim oluşturacak sayıda eklenir.

Bu gruplar içinden etkili en az 4, tercihen 5-8 adet ilaç belirlenir (Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2011).

### 2.5.1. Antitüberküloz İlaçlar ve Direnç Mekanizmaları

#### İzoniazid

İzoniazid, bakteriyel katalaz-peroksidazın işlemini aktif hale gelmesi için gerekli bir ön ilaçtır. İzoniazid, mikobakteri hücresi içerisine pasif difüzyon yoluyla girer ve mikobakteriyel KatG enzimi tarafından aktive edilir. Aktivasyon sonrası üretilen izonikotinic asit hidrazid radikali bir NAD molekülüne kovalent olarak bağlanır ve FASII enoil-ACP redüktaz inhA'yi inhibe eder. Enoil redüktaz enzimi mikolik asit sentezinde rol oynar. Böylece mikobakteri hücre duvarının temel bileşenleri olan mikolik asitlerin biyosentezini inhibe ederek, hücre duvarı sentezini engeller ve hücre ölümüne yol açar. Bu ilaç metabolik açıdan aktif basillere bakterisidal ve dormant basillere ise bakteriyostatik etkilidir. İzoniazid *M. tuberculosis*, *M. bovis* ve *M. kansasii*'ye karşı etkilidir (Marrakchi ve ark., 2000; Timmins ve Deretic 2006; Palomino ve ark., 2007, Vilcheze ve Jacobs, 2007; Fernandes ve ark., 2017).

İzoniazid vücut sıvıları ve dokular arasında geniş bir dağılıma sahiptir. (Ellard ve Gammon, 1976; Weber ve Hein, 1979). İzoniazid yalnız mikrobakteriler üzerinde bakterisidal etkiye sahiptirler (Global Alliance for TB Drug Development, 2008).

İzoniazidin en yaygın direnç mekanizmaları, *M. tuberculosis inhA* geninde ve katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan *katG* geninde olan mutasyonlara bağlıdır. *inhA* geni mikolik asit biyosentezinden sorumludur. *katG* geni mutasyon sonucunda INH'ın InhA kompleksine bağlanması engellenir. *katG* ve *inhA* genlerine ek olarak, *ahpC*, *KasA* ve *ndh* genlerdeki mutasyonların da, INH direnci ile ilişkili oldukları düşünülmektedir (Blanchard, 1996; Jagielski ve ark., 2014; Shekar ve ark., 2014).

#### Rifampisin

Rifampisin TB tedavisinde izoniazitten sonra gelen ikinci en önemli ilaçtır. Aktif bölünen ve bölünmeyen (dormant) mikobakterilere etkilidir. Hücre içi ve hücre dışındaki mikobakterilere bakterisid etki gösterir. Hücre zarından hızla alındıktan sonra, bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimerazına bağlanarak, RNA sentezini inhibe eder. Özellikle RNA polimerazın *rpoB* geni tarafından kodlanan  $\beta$ -alt ünitesine bağlanır. Rifampisin dokulara ve fagositik hücrelere hızla geçer, diğer ilaçların ulaşamadığı intraselüler alanlarda, kavitelere olan bakterilere bakterisidal etki gösterir (Palomino ve ark., 2007; Yüce ve ark., 2016).



Rifampisin dirençli suşların >%95'inde dirençten RNA polimeraz  $\beta$ -ünitesinin *rpoB* geninin 81bp sıcak nokta bölgesindeki (kodon 507-533) mutasyonlar sorumludur (Nasiri ve ark., 2017).

### **Etambutol**

Mikolik asitlerin hücre duvarına transferini engeller. Arabinozil transferaz-3'ü inhibe eder, arabinozdan arabinogalaktan oluşumunu engelleyerek, mikobakteri hücre duvarının bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Arabinozil transferaz geni, *embCAB* ile kodlanır ve bu gende meydana gelen mutasyon sonucunda direnç gelişir (7. Ulusal Mikobakteri Semozyumu, 2015; Yüce ve ark., 2016).

Etambutol yalnız aktif bölünen mikobakterilere etkili olup, bakteriyostatik etkilidir. Etambutol hücre duvarının biyosentezini etkilemesi nedeniyle, *M. tuberculosis*'in diğer ilaçlara karşı duyarlılığını arttırdığı düşünülmektedir. Etkinliği INH ve RİF'e oranla düşüktür. Ancak ETM'ye direncin yavaş gelişmesi teropatik değerini arttırmaktadır (Palomino ve ark., 2007; Yüce ve ark., 2016).

### **Streptomisin**

Antitüberküloz aktivitesi ilk keşfedilen ilaçtır. Genellikle TB tedavisinde kullanılır. Diğer aminoglikozidler gibi bakteride bakteriyel 30S ribozomal subünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe eder ve translasyonda genetik kodun yanlış okunmasına sebep olur. Özellikle S12 proteini ve 16S rRNA üzerinde etkilidir. S12'yi kodlayan *rpsL* genindeki mutasyonlar streptomisin direncin %60'ından, 16S rRNA kodlayan *rrs* genindenki mutasyonlar ise %10 sorumludur (Palomino ve ark., 2007; Lynch 2013).

### **Pirazinamid**

Pirazinamid sadece *M. tuberculosis*'e karşı aktif olan, diğer mikobakterilere ve mikroorganizmalara karşı in vitro hiçbir aktiviteye sahip olmayan bakterisidal bir ilaçtır. Hücre içi aktif ve dormant basillere karşı etkilidir. Monositler ve makrofajlar içindeki mikobakteriler üzerinde bakterisidaletkisi en güçlü olan ilaçtır. Nötral pH'da inaktif, 5,5'da aktiftir. TB tedavi rejimlerine PZA'nın eklenmesi, bu rejimlerin süresinin altı aya indirilmesine yol açmıştır. Pirazinamidin bir ön ilaç olup, etkili olması için pirazinoik

aside dönüşmesi gerekmektedir. Bu dönüşüm *pncA* geni tarafından kodlanan mikobakteriyel pirazinamidazlar tarafından yapılır (Palomino ve ark., 2007).

Pirazinamid direnci, ilacın hücre içerisinde alımındaki bozukluk veya *pncA* genindeki mutasyonlar ile ilişkilidir gelişmektedir (Yüce ve ark., 2016).

### **Florokinolonlar**

Florokinolonlar (FQ) arasında, *M. tuberculosis*'e karşı etkili olan birkaç ilaç bulunmaktadır (Ginsburg ve ark., 2003). *GyrA* ve *gyrB* genleri tarafından kodlanan, DNA giraz enzimini inhibe ederek, antimikrobiyal etkinlik gösterirler. Florokinolonlar DNA giraz enzimine bağlanarak, DNA'nın süpersarmal oluşumunu engellerler (7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 2015).

Norfloksasinin mikobakterilere karşı etkisi bulunmamasına rağmen, siprofloksasin ve ofloksasin, özellikle ilaca dirençli suşların neden olduğu TB'un tedavisinde ve fırsatçı mikobakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Sparfloxacin, gatifloksasin ve moksifloksasin gibi diğer florokinolonların, siprofloksasinden daha etkili oldukları görülmüştür. Moksifloksasin in vitro *M. tuberculosis*'e karşı en etkili florokinolondur. Levofloksasin *M. tuberculosis*'e karşı siprofloksasinden daha fazla etkilidir. Siprofloksasin ise atipik mikobakterilere karşı daha etkilidir (Palomino ve ark., 2007; 7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 2015; Yüce ve ark.,2016).

Birinci seçenek ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlara direnç, hedef genlerdeki spesifik mutasyonlara ve farklı mekanizmalara ( ilaç modifiye edici enzimler) bağlıdır (Louw ve ark., 2009) (Tablo 2).

**Tablo 2.** Çeşitli antitüberküloz ilaçlara direnç gelişiminden sorumlu olan genler

İlaçlar	Yıl	Etki Mekanizması	Gen	Hedef Enzim	Dirençle İlişkili Mutasyonların Sıklığı (%)
INH	1952	Hücre duvarı sentezi inhibisyonu	<i>katG</i>	Katalaz peroksidaz	30-60
			<i>inhA</i>	Yağ asidi enoil asil taşıyıcı protein redüktaz A	70-80
			<i>ahpC</i>	Alkil hidroperoksidaz redüktaz	Bilinmiyor
			<i>kasA</i>	B-ketoasil-ACP sintaz	Bilinmiyor
			<i>Ndh</i>	NADH dehidrojenaz	9.5
RİF	1966	RNA sentezi inhibisyonu	<i>rpoB</i>	RNA polimerazın β alt ünitesi	95
STM	1944	Translasyon inhibisyonu	<i>rpsL, rrs</i>	Ribozomal protein S12 16S rRNA	65-67
			<i>gidB</i>	7-Metilguanosa metiltransferaz	33
ETM	1961	Hücre duvarı sentezi inhibisyonu	<i>embCAB</i>	Arabinozil transferaz	70-90
PZA	1952	Plazma membranını ve enerji metabolizmasını parçalar	<i>pncA</i>	Pirazinamidaz	70
			<i>IS6110</i> insersiyonu		Bilinmiyor
FQ'lar	1963	DNA süpersamalı oluşumunu engeller	<i>gyrA, gyrB</i>	DNA giraz	42-85
KAN, AMK	1957	Translasyon inhibisyonu	<i>rrs</i>	16S rRNA	>60
KAP, VİO*	1957	Translasyon inhibisyonu	<i>Rrs</i>	16S rRNA	40-100
			<i>dyA</i>	rRNA metil transferaz	80
ETH		Hücre duvarı biyosentezini bozar	<i>InhA</i>	Yağ asidi enoil asil taşıyıcı protein redüktaz A	>60
			<i>ethA</i>	Flavin monooksijenaz	>60
			<i>ethB</i>	Transkripsiyonel baskılayıcı	Bilinmiyor

\*VİO-Viomisin

## 2.6. Efflüks Pompaları ve Direnç Mekanizmaları

Mikobakterilerde doğal direnç, mikobakteri hücre duvarı yapısı ve aktif efflüks pompaları ile sağlanmaktadır (De Rossi ve ark., 2006). Hücre zarının, moleküllerin hücre içine girişini sınırlandıran bir yapıya sahip olması, doğal dirençte rol oynayan önemli bir mekanizmadır (Brennan, 2003). Ancak bu mekanizma, mikobakterilerdeki direnci açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu mekanizmaya sinerjistik çalışan diğer bir mekanizma ise dışa atım (efflüks) pompalarıdır. Bu mekanizma, hücre içine giren moleküllerin hücre içi konsantrasyonunu azaltma yönünde çalışmaktadır. Bazı efflüks

pompaları belirli ilaç aileleri için özel olup, onların direnç gelişiminden sorumludur (Yu ve ark., 2013).

*M. tuberculosis* eflüks pompaları, biyoenerji ve yapısal profillerine göre; i) sekonder çok ilaca direnç pompaları; ii) “ATP- binding cassette” tip çok ilaca direnç pompaları olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Borges ve ark., 2001; Pasca ve ark., 2004). Tablo 3’de *M. tuberculosis* eflüks pompaları ve görevleri sunulmuştur (Yu ve ark., 2013).

**Tablo 3.** *M. tuberculosis* eflüks pompaları (Yu ve ark., 2013)

Eflüks Pompaları	Ailesi	Direnç Kazandırdığı İlaçlar
Rv1634	MFS	Florokinolonlar
Tap	MFS	Aminoglikozidler ve Tetrasiklin
P55	MFS	Aminoglikozidler ve Tetrasiklin
Rv2333c (Stp)	MFS	Spektinomisin ve Tetrasiklin
Rv2459 (JefA)	MFS	İzoniazid ve Etambutol
Rv2846c (EfpA)	MFS	Etidyum bromid, Akriflavin, Siprofloksasin, Norfloksasin, Gentamisin
Mmr	SMR	Tetrafenil fosfonyum, Etidyum bromid, Eritromisin, Akriflavin, Safranin O, Pironin Y
MmpL7	RND	İzoniazid
MmpL5	RND	Azoller
DrrAB	ABC	Tetrasiklin, Eritromisin, Etambutol, Norfloksasin, Streptomisin, Kloramfenikol, Atrasiklin
Rv2686c-2687c- Rv2688c	ABC	Florokinolonlar
Rv0194	ABC	Ampisilin, Streptomisin, Vankomisin, Novobiosin, Tetrasiklin, Eritromisin, Kloramfenikol

### **Sekonder Çok İlaç Direnç Pompaları**

Sekonder çok ilaca direnç pompaları, proton motivasyon kuvvetini (PMF) ve transmembran elektrokimyasal yük farkını kullanarak dışa atımı gerçekleştirir. Sekonder tip çok ilaca direnç pompaları: “Major Facilitator Superfamily”, “Small Multidrug Resistance”, “Resistance Nodulation Cell Division”, “Multidrug And Toxic Compound

Extrusion” olarak 4 önemli gruba ayrılmaktadır (Putman ve ark., 2000; Niederweis, 2003).

### **Major Facilitator Superfamily (MFS) Tip Efflüks Pompaları**

MFS'nin en büyük aile olduğu gösterilmiştir. MFS grubundaki efflüks pompaları 12-14 transmembran segmentli proteinlerden oluşmaktadır. Basit şekerler, inositoller, oligosakaritler, aminositler, Krebs siklusunun metabolitleri, inorganik anyon ve aktyonları ve farklı molekülleri hücre dışına atarlar (Pao ve ark., 1998; Saier ve ark., 1999). MFS ailesinin bazı taşıyıcıları ilaç direncinin kazanımından sorumludur. (De Rossi ve ark., 2006). MFS efflüks pompası olan QacA ilk olarak *Staphylococcus aureus*'ta bulunmuştur (Littlejohn ve ark., 1992). *M. tuberculosis*'te MFS ailesine ait farklı taşıyıcılar bulunmaktadır. *M. smegmatis*'te LfrA efflüks pompası florokinolanlara direnç; tet (V) pompası tetrasiklin direncinden sorumludur (Takiff ve ark., 1996; De Rossi ve ark., 1998). *M. fortuitum* Tap efflüks pompasının aminoglikozidler ve tetrasiklinlerin direncinden sorumlu olduğu görülmektedir (Ainsa ve ark., 1998). *M. tuberculosis* genomunda MFS ailesine ait 16 bölgenin efflüks pompalarını kodladığı gösterilmiştir (Yu ve ark., 2013) (Tablo 4). *M. tuberculosis*'de efflüks pompalarının INH, RİF, TET, eritromisin, KAN gibi TB ilaçlarına karşı oluşan dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Örneğin, MFS ailesine ait Rv1634 pompasının florokinolonlara azalmış duyarlılıktan sorumlu olduğu gösterilmiştir (De Rossi ve ark., 2002). Rv1258c geninin tetrasikline ve aminoglikozidlere direnç oranını yükselttiği saptanmıştır. Diğer bir MFS ailesine ait olan P55 efflüks pompası ise ilacın hücre dışına atımından sorumlu bulunmuştur (Silva ve ark., 2001). P55 (Rv1410c) geni homologue, *M. tuberculosis* kompleksin tüm üyelerinde, *M. avium*, *M. leprae*'da da görülmektedir. *M. tuberculosis*'de Rv1410c geninin aktif olduğu durumda aminoglikozid ve TET'e direnç oranının arttığı saptanmıştır (Silva ve ark., 2001).

**Tablo 4.** *M. tuberculosis*'te MFS ailesine ait taşıyıcılar (Yu ve ark., 2013)

MFS taşıyıcıları	Fonksiyonu
Rv0037c	İntegral membran proteini
Rv0191	Muhtemel kloramfenikol direnç proteini
RV0783c(EmrB)	Çok ilaça dirençli efflüks proteini
Rv0849	İntegral membran transport proteini
Rv1250	Muhtemel dirençli efflüks proteini
Rv1258c (Tap)	Çok ilaça dirençli efflüks proteini
Rv1410c (P55)	İlaç efflüks pompa proteini
Rv1634	Florokinolon ilaç efflüks pompa proteini
Rv1877	Muhtemel dirençli efflüks proteini
Rv2333c (Stp)	Spektinomisin-tetrasiklin efflüks pompası
Rv2456c	Muhtemel transmembran transport proteini
Rv2459 (JefA)	Muhtemel dirençli efflüks proteini
Rv2846c (EfpA)	EfpA efflüks pompa proteini
Rv2994	Muhtemel florokinolon efflüks pompa proteini
Rv3239c	Muhtemel ilaç efflüks proteini
Rv3728	Şeker taşıyıcısı

### **Small Multidrug Resistance (SMR) Tip Efflüks Pompaları**

SMR ailesi, sekonder tip efflüks pompalarının en küçük ailesini oluşturmaktadır. 11-120 aminoasitten oluşarak, çeşitli ilaçları ihraç etmektedir (De Rossi ve ark., 2006). SMR ailesi, H<sup>+</sup> antiporter mekanizması ile PMF kuvvetini kullanarak, genellikle doğada katyonik olan çeşitli ilaçların dışarı atılmasını sağlar. *M. tuberculosis*'de SMR ailesine ait yalnız Mmr (Rv3065) efflüks pompalarının varlığı tanımlanmıştır. Kromozomal *mmr* geni tetrafenil fosfoniyum, etidyum bromid, eritromisin, akriflavin, safarin O, pironin Y gibi maddelerin ihraçlarından sorumlu tutulmaktadır (De Rossi ve ark., 1998).

Sekanslanmış mikobakteriyel genomların biyoinformatik analizi yapıldığında, *mmr* homologlarının *M. leprae*, *M. avium* ve *M. smegmatis*'in makrolidlere duyarlı suşlarda da mevcut olduğu görülmüştür (Doucet-Populaire ve ark., 2002). Dolayısıyla, bu genlerin üst düzey makrolid direncinde önemli bir rol oynamadıkları düşünülmektedir. *M. smegmatis*'teki *mmr* homologunun delesyonu sonucunda, katyonik

boyaların ve FQ'ların duyarlılıklarının arttığı, ancak eritromisin duyarlılığında değişiklik olmadığı görülmüştür (Li ve ark., 2004).

### **Resistance Nodulation Cell Division (RND) Tip Efflüks Pompaları**

RND ailesi tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır, ancak yalnız gram negatif bakterilerde ilaç direncinde rol oynamaktadır (De Rossi ve ark., 2006). Bu bakterilerde, çok ilaçlı RND efflüks sistemlerinin dışa atımı iki yardımcı bileşen ile gerçekleşir: i) bir membran füzyon proteini ve ii) bir dış zar proteini. Gram negatif bakterilerde RND çoklu ilaç efflüks pompalarının karmaşık yapısına rağmen, Gram pozitif bakterilerin efflüks pompalarının yapısı daha basit olup ve sitoplazmik membranda sadece bir bileşen bulunur (Brennan, 2003; Niederweis, 2003).

Mikobakteriler, filogenetik olarak Gram pozitif bakterilere benzer olmalarına rağmen, mikolik asitlerden oluşan dış çift lipid tabakası, kovalent olarak bağlı lipidler ve glikolipidlerden oluşan hücre zarı ile yapısal olarak Gram negatif bakterilere daha fazla benzerlik gösterirler. Mikobakterilerde tanımlanan tüm ilaç efflüks pompaları, sitoplazmik membranda bulunurlar (De Rossi ve ark., 2006). *M. tuberculosis* genomunda bu aileye ait proteinleri kodlayan 15 gen bulunmaktadır. Bu proteinler mikobakteri türlerine özgül olmalarından dolayı “*mmpL* (mycobacterial membrane proteins, large) mikobakteri zar proteini” olarak adlandırılmaktadır (De Rossi ve ark., 2006).

Eritromisin, novobiosin, sodyum dodesil sülfat gibi bileşikler bu pompa aracılığıyla hücre dışına atılmaktadır (De Rossi ve ark., 2002). *M. smegmatis*'teki *MmpL7*'nin heterolog üretimi, INH'ye yüksek düzeyde direnç oluşturmaktadır (Riccardi ve ark., 2009).

### **ATP-Binding Cassette (ABC) Tip Efflüks Pompaları**

ABC tip efflüks pompaları ATP hidrolizinde serbest kalan enerjiyi kullanarak molekülleri (iyonlar, aminoasitler, peptidler, ilaçlar, antibiyotikler, lipidler, polisakkaritler, proteinler vb.) hücre dışına atarlar (Schmitt ve Tamp, 2002). İki sitoplazmik alt ünite, iki hidrofobik transmembran alt ünitelerden oluşmaktadır. Substratın yerine göre efflüks ve inflüks olarak görev yapabilirler (Braibant ve ark., 2000; Putman ve ark., 2000). Bu pompalar bakterilerde önemli virülans faktörleri olup, besinlerin alımı,

toksinlerin ve antimikrobik maddelerin dışa atımında rol oynarlar (Davidson ve Chen, 2004).

7q21.1 lokusunda MDR1 geni tarafından kodlanan insan P-glikoproteini ABC taşıyıcısı olup, en etkili antikanser ajanlara karşı direnç kazanımından sorumludur. Bu nedenle P-glikoprotein, ilaç direncini önlenmesinde önemli bir moleküler hedef olmaktadır (Kuwano ve ark., 2002).

ABC tipi efflüks pompalarını kodlayan genler, *M. tuberculosis* genomunun %2.5'ni oluşturmaktadır. *M. tuberculosis*'de 37 tam veya tam olmayan ABC efflüks pompası tanımlanmıştır ve bunlardan bazıları ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (Yu ve ark., 2013).

*DrrABC* *M. tuberculosis*'de ilk ABC efflüks pompa taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır. *DrrABC* *M. smegmatis*'e entegre edildiğinde aşırı eksprese edildiği, TET, ETM, STM, eritromisin, norfloksasin, kloramfenikola direncin arttığı gözlenmiştir (Choudhuri ve ark., 2002). Rv2686c- Rv2687c-Rv2688c operon tarafından kodlanan ABC efflüks pompa taşıyıcısı, norfloksasin, moksifloksasinin *M. tuberculosis*'de direncinin artışına neden olmaktadır (Pasca ve ark., 2004). Diğer ABC efflüks pompa taşıyıcısı olan *iniA* geninin, INH ve ETM direnç gelişiminden sorumlu olduğu ve bu genin delesyonunun INH ve ETM duyarlılığında artışa neden olduğu belirtilmektedir (Colangeli, 2005). Bir başka ABC taşıyıcısı olan *pstB*' nin de RIF, ETM, INH varlığında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2006).

### **2.6.1. Efflüks Pompa İnhibitörleri**

ÇİD, YİD izolatların ortaya çıkması ve antitüberküloz ilaçların sınırlı sayıda olmaları tedavide zorluklara neden olmaktadır. Bu durum yeni ilaçların geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Son zamanlarda efflüks pompa inhibitörlerinin, yeni ilaçlar olarak tanımlanmakta oldukları görülmektedir (Pule ve ark., 2016). Efflüks pompa inhibitörlerinin duyarlı ve dirençli izolatlarda antibiyotik duyarlılıklarını farklı oranlarda etkilediği görülmektedir (Piddock ve Ricchi, 2000; Louw ve ark., 2011). Efflüks pompalarının inhibitörler ile bloke olması, mevcut antitüberküloz ilaçlarının etkilerinden yeniden yararlanılabilmektedir. Efflüks pompa inhibitörlerinin antimikobakteriyel etkilerinin tek başlarına çok az ya da hiç olmadığı görülmektedir. Bu nedenle, ilaçların



etkilerinin geri kazanılması için efflüks pompa inhibitörleri ile kombine kullanılmaları gerekmektedir (Louw ve ark., 2011; Viveiros ve ark., 2012). Farklı türlerde efflüks pompa inhibitörleri mevcuttur.

### **Ca<sup>2+</sup> Kanalını Bloke Edenler (Verapamil, Fenotiyazinler)**

Ca<sup>2+</sup> kanal inhibitörleri (verapamil ve fenotiyazinler), transmembran potansiyelinin azaltılması yoluyla pompanın etkinliğini inhibe ederler (Ramon-Garcia ve ark., 2006; Rodrigues ve ark.,2011). İn vitro ve in vivo çalışmalar, bu inhibitörlerin çoğunlukla mikobakterilerdeki MFS'ye ait pompalarının aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir (Banerjee ve ark., 1996; Singh ve ark., 2011).

Ca<sup>2+</sup> kanalını bloke eden verapamil fenilalkilaminin prototip sınıfına aittir. Klinik olarak, verapamil, çeşitli kardiyak bozuklukları, baş ağrısı ve migreni tedavi etmek için kullanılır (McTavish ve Sorkin, 1989; Beck ve ark., 2005; Andersen ve ark., 2006). Memeli hücrelerinde, veziküler monoamin taşıyıcılarını ve P-glikoproteinini inhibe ederek etki eder (Endicott ve Ling, 1989).

Prokaryot hücrelerde verapamil Ca<sup>2+</sup> kanalını ve ATP'ye bağlı efflüks pompa taşıyıcılarını ve çok ilaca direnç efflüks pompalarını inhibe eder (Rodrigues ve ark., 2012). Verapamilin mikobakteriyel efflüks pompasını önemli oranda bloke ettiği görülmektedir. Özellikle yalnız RİF dirençli ve ÇİD izolatlar da RİF'nin MİK'inde anlamlı düşüş gözlenmektedir (Piddock ve Ricci, 2000). RİF dirençli izolatlarda sıklıkla OFX toleransı ve verapamil varlığında OFX MİK'inin >2 kat azaldığı saptanmaktadır (Louw ve ark., 2011). Verapamil varlığında INH, RİF, STM ve makrolidlere dirençli izolatların duyarlılıklarının arttığı görülmektedir (Rodrigues ve ark., 2009; 2012; 2013; Gupta ve ark., 2013). Son zamanlarda, *M. tuberculosis* ile enfekte olan makrofajlara verapamil eklenmesinin, CFU'da %34 azalmaya neden olduğu vemakrofajların hücre içerisindeki mikobakterileri öldürmek kapasitelerini arttırdığı gösterildi (Adams ve ark., 2014). Adams ve ark. (2011)'de, yaptığı diğer bir çalışmada ise, verapamil ile mikobakteriyel efflüks pompalarının inhibe edildiğini, *M. marinum* ile enfekte olan zebra balığı modelinde makrofaj kaynaklı RİF toleransını 2 kat azaldığını gözlemlemişlerdir.

Fenotiyazinler geniş çapta klinik olarak kullanılan antipsikotik ve antihistaminik trisiklik bileşikler olarak, tioridazin, piperidin, klorpromazin türevlerinden oluşmaktadır (Pule ve ark., 2016). Fenotiyazinler *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* ve *M. avium*

komplekslerinde potansiyel  $K^+$  transport ve  $Ca^{+2}$  kanallarını ve PMF'ye bağılı MFS pompalarını bloke eder (Amaral ve ark., 1996; Ordway ve ark., 2003; Viveiros ve Amaral, 2001). Son yıllarda, yapılan araştırmalarda, tioridazin ve klorpromazinin varlığında, *M. smegmatis* ve *M. avium* kompleksinde etidyum bromür dışa atımının inhibe olunduğu gsterilmektedir (Rodriguez ve ark., 2008; 2009). Ayrıca tioridazin ve klorpromazin varlığında *M. tuberculosis* kompleksinde klaritromisin ve INH direncinin azaldığı gsterilmiştir (Rodriguez ve ark., 2012). Tioridazinin'in fagosite olmuş *M. tuberculosis*'in intrasellüler ölümünü gerçekleştirdiği gsterilmiştir (Kishore ve ark., 2014). Tioridazin in vitro, in vivo, ex vivo, duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* izolatlarının (sitotoksik etki) üremesini engellendiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (Martin ve ark., 2007; Rodriguez ve ark., 2012).

**Protonoforlar (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), 2,4-dinitrophenol (DNP), valinomisin)**

CCCP, DNP, valinomisin transmembran potansiyelini azaltarak, aktif efflüks pompasını inhibe etmektedir (Pasca ve ark., 2004; Ramon Garcia ve ark., 2006; Van Bambeke ve ark., 2006). En sık MFS ailesini inhibe etmektedir (Banerjee ve ark., 1996; Mahamoud ve ark., 2004; Singh ve ark., 2011). Bu maddelerin birçok çalışmada hücrelere toksik etkili oldukları gsterilmiş ve bu nedenle deneysel çalışmalarda subletal konsantrasyonlarda kullanılmışlardır (Mahamoud ve ark., 2004; Bambeke ve ark., 2006). Ayrıca hücrelerde oksidatif fosfarilasyonu, ATP-sentetaz aktivitesini engelleyerek, ABC efflüks pompasını inhibe ettikleri gsterilmiştir (Park ve ark., 1997). Yeni gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda *gyrA* mutasyonu ile OFX dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatlarına CCCP veya DNP varlığında test edildiğinde, OFX MİK'inde 2-8 kat dūřuř saptanmıştır (Singh ve ark., 2011). CCCP'nin özellikle florokinolon direncini önemli oranda azalttığı gsterilmiştir (Gupta ve ark., 2010; Singh ve ark., 2011). Ayrıca INH, STM, RİF, ETM MİK değerlerini dūřürdüęü saptanmıştır (Gupta ve ark., 2006). Bařka bir çalışmada ise, etionamid ve eritromisine dirençli *M. tuberculosis* izolatlarında JefA (Rv2459) ve Mmr (Rv3065) efflüks pompalarında aşırı ekspresiyonunu sağladıktan sonra, CCCP eklediklerinde ETH ve eritromisinin MİK değerlerinin dūřtüęünü saptamışlardır (Gupta ve ark., 2011; Rodrigues ve ark., 2013). CCCP ve DNP'nin P55 efflüks pompasının inhibe ettiğini gstermişlerdir (Ramon Garcia ve ark., 2006; Silva ve ark., 2001).

## Rezerpin

Rezerpin doğal bir madde olup, *Rauwolfia vomitoria* bitki köklerinden izole edilen bir efflüks pompa inhibitörüdür (Plummer ve ark., 1954; İwu ve Cort, 1977; Stavri ve ark, 2007). Veziküler monoamin taşıyıcılarını inhibe ederek sinaptik vezikülleri içine dopaminin alınmasını ve depolanmasını geri dönüşümsüz olarak bloke eder (Plummer ve ark., 1954). Hipertansiyon ve psikiyatrik bozukluklarda 25 mg'ı aşmayan günlük dozlarda kullanılır (Plummer ve ark., 1954; İwu ve Cort, 1977). Rezerpinin MFS ve RND efflüks pompaları üzerindeki bu etkisi gelecek vadeden bir inhibitör olacağını düşündürmektedir. *Bacillus subtilis*'teki MFS pompasının taşıyıcısı olan Bmr proteini TET'in atılımından sorumludur ve rezerpin varlığında TET MİK'ini 4 kat azaldığı gözlenmiştir (Neyfakh ve ark., 1991).

Rezerpinin, mikobakterilerdeki birçok antitüberküloz ilaçların direnç seviyesini etkilediği gösterilmiştir. Özellikle INH duyarlılığını arttırdığı gözlenmektedir. INH dirençli suşların *M. tuberculosis*'in *mmpL7* geninin *M. smegmatis* 'te aşırı ekspresyonu yapıldıktan sonra, rezerpin eklendiğinde, üst düzey INH direncin tersine çevrildiği gözlemlenmiştir (Pasca ve ark., 2005). Ayrıca rezerpin varlığında, *M. bovis BCG* suşlarında INH ve etidyum bromid, *M. tuberculosis* suşlarında ise INH duyarlılığının arttığı gözlemlenmiştir (Viverious ve ark., 2002; Colangeli ve ark., 2005).

Rezerpin pirazinoik asit efflüks pompasını bloke ederek, PZA dışarı atılmasına neden olmakta, *M. tuberculosis*'teki PZA duyarlılığını artırmaktadır (Zhang ve ark., 1999; 2002).

### 3. MATERYAL METOT

#### 3.1. İzolatların Toplanması

Bu çalışmada izolatlar Türkiyenin farklı bölgelerinden temin edildi (34 izolat, Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı; 17 izolat, Haydarpaşa Sultan Abdülhamit Han Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 17 izolat, İstanbul Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 13 izolat, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı; 8 izolat, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Referans Laboratuvarı; 3 izolat, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı).

Çalışmaya, ÇİD 42, primer ilaçlara duyarlı 50 ve 5 referans izolat olmak üzere toplam 97 *M. tuberculosis* izolatları dahil edildi. İzolatlar -80°C saklandı. Çalışmada kullanılan referans izolatlar: *M. tuberculosis H37Rv* (Antitüberküloz ilaçlara duyarlı), *ATCC35822* (INH dirençli), *ATCC35838* (RIF dirençli), *ATCC35820* (STM dirençli), *ATCC35837* (ETM dirençli), *ATCC 35828* (PZA dirençli)'dir. Çalışma öncesinde tüm izolatlar saklama besiyerinden Lowenstein-Jensen (LJ) besiyerine ekilerek 2-3 hafta inkübe edildi ve üremeleri sağlandı. Elde edilen taze bakteri kültürleri çalışmada kullanıldı.

#### 3.2. Bakteri İnokülümünün Hazırlanması

LJ besiyerindeki taze kültürlerden alınan koloniler, içerisinde 5-10 adet cam boncuk ve 5 ml serum fizyolojik bulunan vidalı kapaklı tüplere aktarıldı. Tüplerin ağzı iyice kapatılarak yaklaşık 30 sn vortekslendi. Tüpler dik konumda en az 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Böylece hem büyük partiküllerin hem de aerosollerin çökmesi sağlandı. Daha sonra süpernatant alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve bulanıklık McFarland1 olarak ayarlandı. 1:10 dilüe edildikten sonra mikroplaklara dağıtıldı.

#### 3.3. Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyeri Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen liyofilize toz besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Besiyeri içerisine litresinde 1 ml olacak şekilde gliserol eklendi. Otoklavda steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve OADC %10

konsantrasyonda olacak şekilde eklendi. Hazırlanan besiyeri 96-kuyucuklu düztabanlı mikroplaklara dağıtıldı.

### 3.4. Antibiyotiklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan antibiyotikler; izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin, nikotinamid, levofloksasin, moksifloksasin, ofloksasin, siprofloksasin ve ayrıca efflüks pompa inhibitörü olarak kullanılan CCCP, rezerpin, verapamil ve tioridazin Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)'dan satın alındı. Çalışmada pirazinamid yerine pH ayarlanmasında yaşanan zorluk nedeniyle, nikotinamid (NIC) kullanıldı. Pirazinamid, nikotinamidin yapısal analogu ve türevidir (Suzuki ve ark., 2002).

Çalışmada tüm antibiyotiklerin toz formları kullanıldı. Antibiyotik stok çözeltileri, final konsantrasyonlar, her bir antibiyotiğin potensine göre toz ilaç miktarı ve çözücülerin miktarı belirlenerek hazırlandı. Bu amaçla hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

Veya

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens } (\mu\text{g/mg})}{\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}$$

Antibiyotik stok çözeltileri her bir antibiyotik için final konsantrasyon 10.000  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde hazırlandı. Yalnız NIC için final konsantrasyon 40.000  $\mu\text{g/ml}$  olarak alındı. Stokların hazırlanmasında her bir antibiyotik için belirtilen çözücüler kullanıldı. Çözücü olarak INH, ETM, STM, MOX, NIC için steril distile su; RIF için dimetilsülfoksit; LEVO, OFX, CIPRO için 0.1 M NaOH kullanıldı. Çözülen antibiyotikler filtre edilerek sterilize edildi, küçük miktarlar halinde ve kullanılıncaya kadar  $-40^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.5. Rezasurinin Hazırlanması

Rezasurin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) %0,02 konsantrasyonda olacak şekilde, toz distile suda çözülerek, hazırlandı. +4 °C saklandı.

#### Çalışmanın aşamaları;

- i) Rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile izolatların duyarlılıkları belirlenmesi.
- ii) Efflüks pompa inhibitörlerinin antitüberküloz ilaçlarının duyarlılıkları üzerine etkilerinin araştırılması.
- iii) Efflüks pompa varlığında, MİK değerlerinde düşüş saptanan izolatlarda efflüks pompa genlerinin ekspresyonunun, Revers-Trasnkriptaz Polimeraz Zirncir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile saptanması.

### 3.6. Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi ile MİK Değerlerinin Belirlenmesi için Plakların Hazırlanması

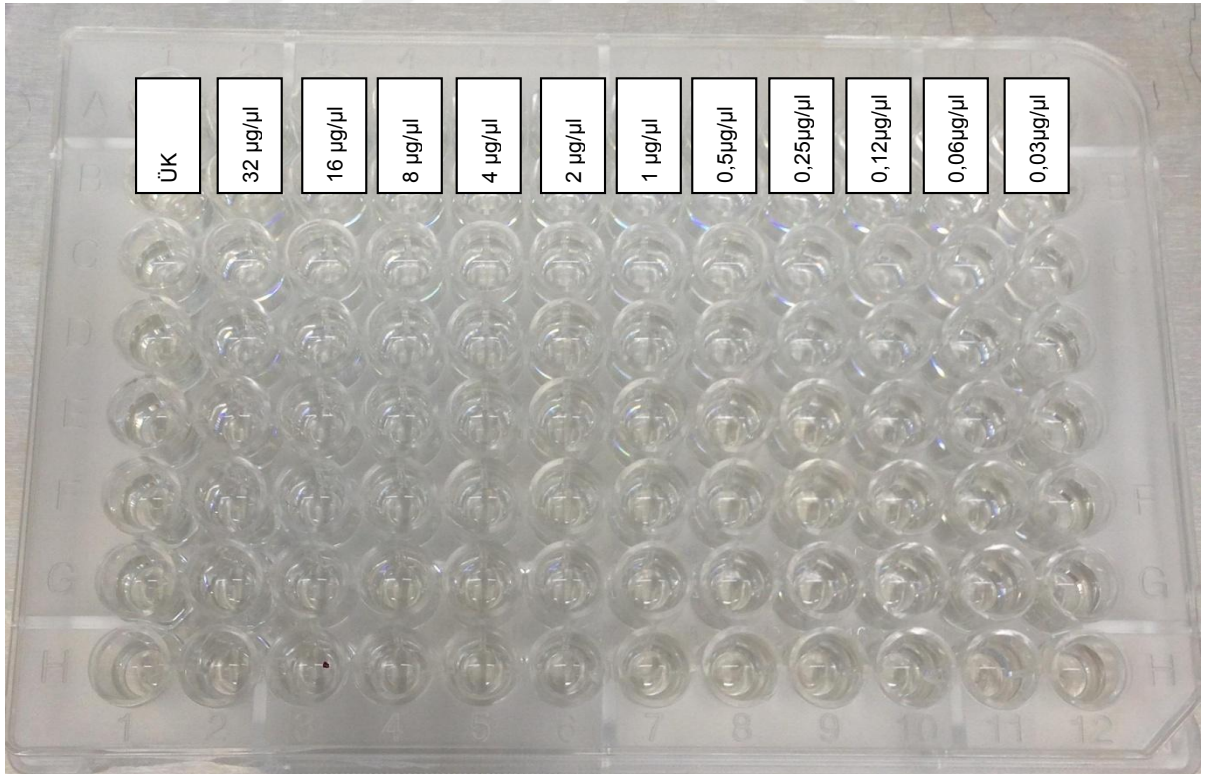
Çalışmanın ilk aşamasında izoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin, nikotinamid, levofloksasin, moksfloksasin, ofloksasin, siprofloksasin için MİK değerleri tespit edildi. Test edilen bakterilerin direnç profillerinin belirlenmesi rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla antibiyotikler aşağıda belirtilen 11 farklı konsantrasyonda test edildi. INH ve MOX, 8-0.005 µg/ml; RIF, STM ve LEVO, 16-0.01 µg/ml; CIPRO ve OFX, 32-0.03 µg/ml; ETM, 80-0.1 µg/ml (Tablo 5). *M. tuberculosis* izolatlarının Middlebrook 7H9 sıvı besiyerindeki düztabanlı mikrodilüsyon test plagi örneği Şekil 2’de sunulmuştur. Antibiyotiklerin kritik konsantrasyonları (breakpoint) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M24-A2 dokümanı temel alınarak belirlendi. CLSI (2011)’e göre belirlenen kritik konsantrasyon değerleri Tablo 6’de verildi. Çalışmada diğer antibiyotiklerden farklı olarak NIC, 7 farklı konsantrasyon (2000-32 µg/ml)’da çalışıldı (Martin ve ark., 2006).

İzolatların duyarlılıkları belirlendikten sonra çalışmanın ikinci aşamasında, MİK değerleri her antibiyotik için efflüks pompa inhibitörleri varlığında da saptandı. CCCP 12 µg/ml, verapamil 60 µg/ml, rezepin 8 µg/ml (Sun ve ark., 2014); Tioridazin ise, 0,2 µg/ml konsantrasyonunda test edildi.

**Tablo 5.** Çalışılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

STM (µg /µl)	INH (µg /µl)	RİF (µg /µl)	ETM (µg /µl)	CIPRO (µg /µl)	LEVO (µg /µl)	MOX (µg /µl)	OFX (µg /µl)	NIC (µg /µl)
16	8	16	80	32	16	8	32	2000
8	4	8	40	16	8	4	16	1000
4	2	4	20	8	4	2	8	500
2	1	2	10	4	2	1	4	250
1	0,5	1	5	2	1	0,5	2	125
0,5	0,25	0,5	2,5	1	0,5	0,25	1	62,5
0,25	0,12	0,25	1,25	0,5	0,25	0,12	0,5	32
0,12	0,06	0,12	0,6	0,25	0,12	0,06	0,25	ÜK
0,06	0,03	0,06	0,3	0,12	0,06	0,03	0,12	
0,03	0,01	0,03	0,15	0,06	0,03	0,01	0,06	
0,01	0,005	0,01	0,075	0,03	0,01	0,005	0,03	
ÜK*	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	ÜK	

\*ÜK- Üreme kontrolü



**Şekil 2.** *M. tuberculosis* izolatlarının Middlebrook 7H9 Sıvı besiyerindeki düztabanlı mikrodilüsyon test plağı örneği. ÜK-Üreme Kontrolü

**Tablo 6.** Çalışılan antibiyotiklerin belirlenen kritik konsantrasyonları

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Kritik konsantrasyonlar (<math>\mu\text{g} / \mu\text{l}</math>)</b>
<b>STM</b>	$\leq 1$ (S) $> 1$ (R)
<b>INH</b>	$\leq 0,5$ (S) $> 0,5$ (R)
<b>RİF</b>	$\leq 1$ (S) $> 1$ (R)
<b>ETM</b>	$\leq 5$ (S) $> 5$ (R)
<b>NIC</b>	$\leq 250$ (S) $> 250$ (R)
<b>CIPRO</b>	$\leq 2$ (S) $> 2$ (R)
<b>LEVO</b>	$\leq 1$ (S) $> 1$ (R)
<b>MOX</b>	$\leq 0,5$ (S) $> 0,5$ (R)
<b>OFX</b>	$\leq 2$ (S) $> 2$ (R)

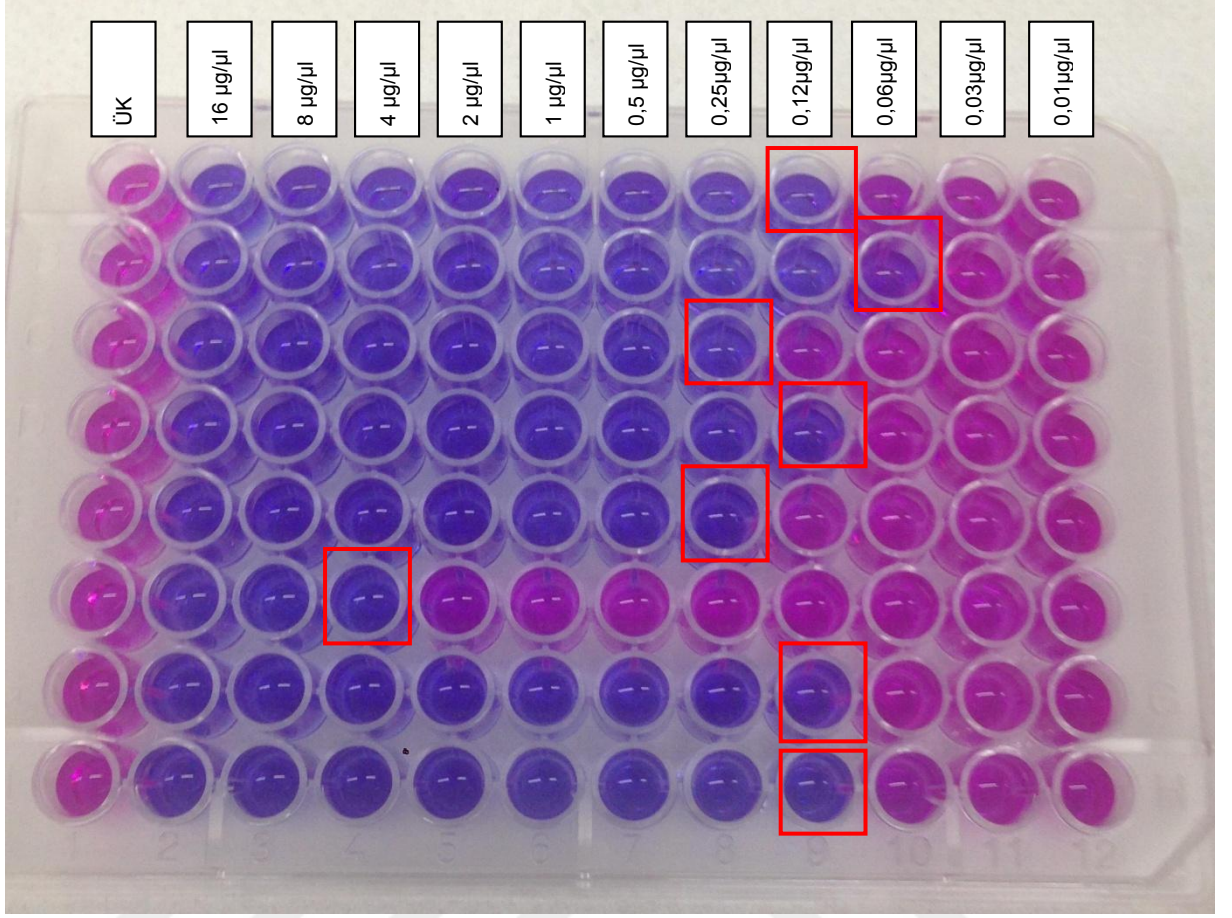
\*S-duyarlı, R-dirençli

### **3.6.1. Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi İle MİK Değerinin Belirlenmesi İçin Testin Uygulanması**

MİK değerleri her izolat için efflüks pompa inhibitörü varlığında ve yokluğunda ayrı ayrı çalışıldı.

Testler 7H9-S sıvı besiyerinde yapıldı. Test için, hazırlanan bakteri inokülümü, 7H9-S sıvı besiyeri ile 1:10 oranında dilüe edilerek her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  olacak şekilde dağıtıldı. Plaklar 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 7. gününde %0.02’lik rezasurin solüsyonundan plakların tüm kuyucuklarına 15  $\mu\text{l}$  konuldu ve plaklar 37°C’de tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreme kontrol kuyucuğunda mavi rengin kırmızıya dönmesi kuyucukta üreme olduğunun göstergesi olarak kabul edildi ve testler sonlandırdı. Rengin maviden kırmızıya dönmediği, üremenin olmadığı son kuyucuk, MİK değeri olarak raporlandı (Şekil 3).





**Şekil 3.** *M. tuberculosis* izolatlarının rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile levofloksasine ait duyarlılık test sonuçları örneği. ÜK-Üreme kontrolü; mor renkli kuyucuklar: üreme yok; pembe kuyucuklar: üreme var; kırmızı renk ile işaretlenmiş kuyucuklar: MİK değerleri

### 3.7. Moleküler Yöntemler

Çalışmanın üçüncü aşamasında, efflüks pompa inhibitörleri varlığında MİK değerlerinde 2-16 kat düşüş saptanan 6 *M. tuberculosis* izolatında RT-PZR ile efflüks pompa genlerinin ekspresyonu araştırıldı.

#### 3.7.1. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu, Middlebrook 7H9 Sıvı besiyerinde üremiş taze kültürlerden RNA Ekstraksiyon kiti (GeneJET RNA Purification Kit, Thermo Scientific) protokolü kullanılarak yapıldı. Protokolde bazı değişiklikler yapıldı ve test aşağıda belirtilen şekilde uygulandı.

1. Middlebrook 7H9 Sıvıbesiyerinde üremiş olan *M. tuberculosis* taze kültüründen 1.5 mL olacak şekilde 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.  $\geq 12000 \times g$ 'de 2 dk santrifüj edildi. Pelleti mümkün olduğunca kuru bırakılarak, süpernatant dikatli bir şekilde boşaltıldı.
2. 100  $\mu$ l 40  $\mu$ g/ $\mu$ l lizozim içeren TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) tamponu eklendi. Karıştırmak için tüp birkaç kez çalkalandı.
3. 15-25 ° C'de 20 dk inkübe edildi.
4. 300  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol içeren lizis solüsyonu (1ml lizis buffer +20  $\mu$ l 14.3 M  $\beta$ -mercaptoethanol) eklendi. 15 dk homojenizasyon sağlayana kadar vortekslendi.
5. 180  $\mu$ l (96-100%) etanol eklendi ve pipetleme yapıldı.
6. 700  $\mu$ l karışım toplama tüpünün içerisine yerleştirmiş spin kolona aktarıldı.  $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dk santrifüj edildi. Sıvı içeren alttaki tüp atılarak, kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
7. 700  $\mu$ l etanol içeren yıkama solüsyonu 1'den eklendi.  $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. 600  $\mu$ l etanol içeren yıkama solüsyonu 2'den eklendi.  $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atılarak ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9. 250  $\mu$ l etanol içeren yıkama solüsyonu 2'den eklendi.  $\geq 12000 \times g$ 'de 2 dk santrifüj edildi. Spin kolon, steril 1.5 ml'lik RNase free bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
10. Spin kolona 100  $\mu$ l nuclease free H<sub>2</sub>O eklendi.  $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Elde edilen RNA'lar -20°C saklandı.

### **3.7.2. RNA'ların Nanodrop 1000 Spectrofotmetre İle Ölçümü**

İzolatlara RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra, RNA konsantrasyonlarının ölçümü 260 ve 280 nm dalga boylarında yapıldı ve yeterli miktarda RNA'ların elde edildiği görüldü.

### 3.7.3. cDNA Sentezi

Ez-First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) kullanarak izole edilmiş bakteriyel RNA'lerden cDNA sentezi yapıldı.

1. Her bir izolat için RNA miktarı hesaplandı. Üzerine 1 µl oligo(dt)<sub>18</sub> primer eklenerek, RNase free H<sub>2</sub>O ile tamamlayarak, toplam hacim 12 µl olacak şekilde ayarlandı. Hafif karıştırıldıktan ve kısa santrifüjlemeden sonra kuru ısıtma bloğunda 65°C 5 dk bekletildi.
2. Sonra buz kalıbına kondu.
3. Üzerine 4 µl 5X Reaksiyon Tamponu, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL 10 mM dNTP, 1 µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) miks eklendi. Hafif karıştırıldı ve kısa santrifüj yapıldı. Termal cykler'a yerleştirildi ve programlandı. 42°C de 60 dk, 70°C 5 dk bekletildi.
4. Elde edilen cDNA -20°C' de saklandı.

### 3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Efflüks pompa genlerinin ekspresyonu, Çalgın ve ark. (2012)'nin çalışmalarındaki protokol optimize edilerek araştırıldı.

#### 3.8.1. Kullanılan primerler

Efflüks pompa genlerin tespiti için araştırmamızda kullanılan primerler tablo 7'de verildi. Pozitif kontrol olarak 16S rRNA geni kullanıldı (Çalgın ve ark., 2012).

**Tablo 7.** PZR'da kullanılan oligonükleotid primer dizileri (Çalgın ve ark., 2012)

Gen	Sekans	PCR ürünü
Rv1410c	5'TCT TGG ACT TCC GGT TCA TC-3' 5'TAC CGG TTC AAC CAG ATC CTG-3'	221
Rv2333c	5'ATA TGA CTA ACC GCG CAC TC-3' 5'TTG CGG AGG AGG ATT TCA TC-3'	178
DrrA	5'ATG GTG GAC ATC TTG TCG AC-3' 5'AGG TTC TGC TCA CCG GAA AG-3'	158
DrrB	5'AAT ACA TCA CGC CGT TGG TC-3' 5'AAC GGA ATC CGA TGA CGT AG-3'	224
İniA	5'TGA TCT AGT ACA GCG GTT GAC G-3' 5'TGT AGC TTA CGA CGG TGA TC-3'	187
mmpL7	5'TAC CCA AGC TGG AAA CAA CC-3' 5'AAG GTC CAG TTG TCC GTC AG-3'	227

**Tablo 7.** PZR’da kullanılan oligonükleotid primer dizileri (Çalgın ve ark., 2012)

Gen	Sekans	PCR Ürünü
Rv1258c	5'AGT TAT AGA TCG GCT GGA TGG-3' 5'AAT ACT TCA CCG ACC ACC AGC AAC-3'	255
Rv1273c	5'TCC GAG AAG GTG ATG ATG TG-3' 5'TAT ACC TCC CGA CGG TCA AC-3'	214
Rv1687c	5'ACA GAA ACG CTT CCT CCA GTG-3' 5'ATT GCG CGT CGA ATT ATG G-3'	200
Rv1250	5'TGT CTG GTG CGG GAA TGT TTC-3' 5'TTG AAG ACC TCC AGT GGG ATC-3'	172
Rv1634	5'TAT CTG GGC ACC TCC ATA GTG-3' 5'AAC ATC GTA TTG ACG GTG G-3'	182
Rv3000	5'TCT GGA TGT GCT CGT GTT AC-3' 5'AAC GAC TTT CGT GGA GTC GAT C-3'	238
mmpL4	5'TTG CAC GTG CTT CTT ATC GG-3' 5'TGC GTC GTT GTC ACC GTA TTT G-3'	246
Rv0783c	5'TAT GAG CGG ATG TTC TGT GC-3' 5'AAC TTC GAC TAC ATG GG CCT C-3'	186
Rv0037c	5'AAA GGA AGC CGC ATA CCA CCA TC-3' 5'TCA CTG CTG ATC TTG CTC CTG-3'	244
16S rRNA (kontrol)	5'CTT AAC ACA TGC AAG TCG AAC-3' 5'GTA TCT CAG TCC CAG TGT G-3'	280

### 3.8.2. PZR Çalışmaları

Efflüks pompa genlerinin ekspresyonunun araştırılması, RT – PZR yöntemi ile yapıldı. Genlerin tespiti için amplifikasyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon karışımı hazırlamak için PZR tamponuna 1,5 µM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U Taq DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplan miktarda distile su eklendi. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde ayarlandı (Tablo 8). 20 sn vorteksledi ve spin santrifüj edildi. Amplifikasyon karışımı tüplere 45 µl dağıtıldı. Her PZR tüpünün üzerine çalışılacak DNA örneğinden 5 µl eklendi ve Termal cyler'a yerleştirildi ve programlandı. Amplifikasyon programı 94°C de 2 dk ilk denatürasyon takiben, bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla, 94°C 50 sn denatürasyon, 60°C 50 sn primer bağlanma (annealing), 72°C 1 dk uzama olacak şekilde 44 siklüs çalıştırıldı.

Son olarak, 72°C de 10 dk (son uzama) bekletilerek PZR sonlandırıldı. Amplifikasyon programı tablo 9'da sunuldu.

**Tablo 8.** Amplifikasyon karışımı

Stok çözeltisi	Final Konsantrasyon	Miktar
PZR tamponu	10X(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x N	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µM x N	3 µl
10 mM dNTP karışımı	200 µM x N	1 µl
5U/µl Taq DNA polimeraz	2,5 U x N	3,5 µl
16s rRNA-Forward primeri	25 pmol x N	1 µl
16s rRNA -Reverse primeri	25 pmol x N	1 µl
Primer Forward	25 pmol x N	1 µl
Primer Reverse	25 pmol x N	1 µl
DNA	1 µg x N	5 µl
Distile su	x N	31,5 µl
Toplam	50 µl x N	50 µl

**Tablo 9.** PZR amplifikasyon programı

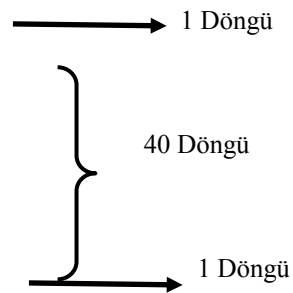
94°C' de 2 dk başlangıç denatürasyonu

94°C' de 50 sn DNA denatürasyonu aşaması

60°C' de 50 sn primer yapışması (annealing)

72°C' de 1 dk sentez (uzama) aşaması

72°C' de 10 dk son uzama



### 3.8.3. PZR Ürünlerinin Elektrofözezi

Elde edilen PZR ürünlerine agaroz jel elektrofözezi yapıldı. Bu amaçla, 1X TBE tamponu ile %1,5 jel hazırlandı. 10 µl PZR ürünü 2 µl 6X DNA yükleme solüsyonu ile karıştırılarak, jel kuyucuklarına yüklendi. “GeneRuler 100 bp DNA, Ladder Plus” marker olarak kullanıldı. 1 saat 170 volt elektrik akımında jel elektrofözezinde DNA’lar yürütüldü. Daha sonra 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dk jel boyandı. Sonuçlar UV transilüminatör kaynağı altında jel görüntüleme cihazında incelendi. DNA bantlarının görülməsi ile hedef bölgenin amplifiye olduğu görüldü.



#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada, 97 izolat (92 klinik, 5 referans)'ın INH, RİF, STM, ETM, NIC, CIPRO, LEVO, MOX, OFX ilaçlara duyarlılıkları rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi.

##### 4.1. Rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerleri

Çalışmada test edilen tüm izolatların primer ve sekonder ilaçlar için elde edilen MİK değerleri tablo 10'da sunuldu. Tabloda ayrıca efflüks pompası aktif olan ÇİD 6 izolat da işaretlendi.

**Tablo 10.** 7H9 Sıvı besiyerinde rezasurin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri

İzolatlar	STM (µg/ml)	INH (µg/ml)	RİF (µg/ml)	ETM (µg/ml)	NIC (µg/ml)	CIPRO (µg/ml)	LEVO (µg/ml)	MOX (µg/ml)	OFX (µg/ml)
<i>H37Rv</i>	0,25 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	2,5 (S)	62,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
<i>ATCC35820</i>	≥16 (R)	0,12 (S)	0,03 (S)	5 (S)	-	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
<i>ATCC35822</i>	0,25 (S)	≥8 (R)	0,03 (S)	1,25 (S)	-	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
<i>ATCC35838</i>	0,25 (S)	0,12 (S)	≥16 (R)	1,25 (S)	-	0,12 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
<i>ATCC35837</i>	0,25 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	40(R)	-	0,25 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
<i>ATCC 35828</i>	-	-	-	-	2000 (R)	-	-	-	-
1	0,5 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
2	0,12 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
3	0,25(S)	0,25 (S)	0,25 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
4	0,5 (S)	0,25 (S)	0,03 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
5	0,25 (S)	0,25 (S)	0,03 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
6	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,6 (S)	≤32 (S)	4 (R)	2 (R)	1 (R)	8 (R)
7	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
8	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,6 (S)	≤32 (S)	4 (R)	2 (R)	1 (R)	8 (R)
9	1 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	0,5 (S)
10	0,5 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	0,5 (S)
11	0,25 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32(S)	0,12 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
12	0,5 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)	0,6 (S)	≤32 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
13	0,25 (S)	0,06 (S)	0,5 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
14	0,25 (S)	0,06 (S)	0,5 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
15	0,25 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	8 (R)	4 (R)	2 (R)	8 (R)

**Tablo 10 (Devam).** 7H9 Sıvı besiyerinde rezasurin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri

İzolatlar	STM (µg/ml)	INH (µg/ml)	RİF (µg/ml)	ETM (µg/ml)	NIC (µg/ml)	CIPRO (µg/ml)	LEVO (µg/ml)	MOX (µg/ml)	OFX (µg/ml)
16	0,25 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
17	0,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
18	0,5 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)
19	0,5 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
20	0,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
21	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
22	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
23	0,12 (S)	0,25 (S)	0,03 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
24	0,5 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
25	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	125 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
26	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
27	1 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
28	0,25 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
29	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
30	1 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
31	1 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	16 (R)	4 (R)	1 (R)	16 (R)
32	1 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
33	1 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)
34	1 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
35	1 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	125 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
36	1 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	125 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
37	1 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	125 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
38	1 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	62,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
39	1 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
40	1 (S)	0,12 (S)	0,03 (S)	2,5 (S)	62,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
41	0,5 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,12 (S)
42	0,5 (S)	0,5 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	1 (S)
43	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
44	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	1 (S)
45	0,5 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,6 (S)	≤32 (S)	4 (R)	4 (R)	2 (R)	8 (R)
46	0,5 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)








**Tablo 10 (Devam).** 7H9 Sıvı besiyerinde rezasurin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri

İzolatlar	STM (µg/ml)	INH (µg/ml)	RİF (µg/ml)	ETM (µg/ml)	NIC (µg/ml)	CIPRO (µg/ml)	LEVO (µg/ml)	MOX (µg/ml)	OFX (µg/ml)
47	0,5 (S)	0,12 (S)	0,03 (S)	5 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)
48	0,5 (S)	0,25 (S)	0,03 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)
49	0,25 (S)	0,25 (S)	0,06 (S)	2,5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
50	0,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	1,25 (S)	125 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
51	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	0,6 (S)	62,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
52	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	0,6 (S)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
53	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	1,25 (S)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
54	0,25 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
55	0,12 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	1,25 (S)	62,5 (S)	0,5 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
56	0,12 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	62,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
57	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
58	0,25 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	1,25 (S)	≤32 (S)	4 (R)	2 (R)	0,25 (S)	4 (R)
59	≥16 (R)	≥8 (R)	8 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	4 (R)	4 (R)	1 (R)	8 (R)
60	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	2 (S)
61	≥16 (R)	4(R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	2 (S)
62	0,5 (S)	4 (R)	4 (R)	1,25 (S)	62,5 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
63	4 (R)	4 (R)	4 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	8 (R)	2 (R)	1 (R)	8 (R)
64	0,12 (S)	4 (R)	≥16 (R)	5 (S)	125 (S)	0,5 (S)	0,06 (S)	0,03 (S)	0,25 (S)
65	≥16 (R)	4 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	4 (R)	2 (R)	1 (R)	4 (R)
66	≥16 (R)	4 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
67	0,5 (S)	≥8 (R)	16 (R)	1,25 (S)	≤32 (S)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
68	1 (S)	≥8 (R)	16 (R)	1,25 (S)	≤32 (S)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
69	4 (R)	4 (R)	≥16 (R)	5 (S)	≤32 (S)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
70	1 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	5 (S)	≥2000 (R)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
71	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
72	4 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≤32 (S)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
73	8 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	2000 (R)	8 (R)	2 (R)	1(R)	8 (R)
74	0,5 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	5 (S)	125 (S)	1 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
75	0,5 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	5 (S)	125 (S)	1 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
76	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)
77	0,5 (S)	4 (R)	≥16 (R)	10 (R)	2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)

**Tablo 10 (Devam).** 7H9 Sıvı besiyerinde rezasurin mikrodilüsyon testi ile elde edilen MİK değerleri

İzolatlar	STM (µg/ml)	INH (µg/ml)	RİF (µg/ml)	ETM (µg/ml)	NIC (µg/ml)	CIPRO (µg/ml)	LEVO (µg/ml)	MOX (µg/ml)	OFX (µg/ml)
78	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	2000 (R)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,06 (S)	0,12 (S)
79	0,25 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	2,5 (S)	2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,03 (S)	0,12 (S)
80	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	20 (R)	2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
81	≥16 (R)	≥8 (R)	4 (R)	10 (R)	2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)
82	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	20 (R)	≥2000(R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)
83	8 (R)	4 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,5 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	1 (S)
84	4 (R)	4 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)
85	4 (R)	4 (R)	≥16 (R)	1,25 (S)	2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,5 (S)
86	0,5 (S)	4 (R)	4 (R)	2,5 (S)	≤32 (S)	2 (S)	1 (S)	0,25 (S)	1 (S)
87	4 (R)	4 (R)	≥16 (R)	10 (R)	2000 (R)	0,25 (S)	0,5 (S)	0,12 (S)	1 (S)
88	2 (R)	4 (R)	≥16 (R)	5 (S)	≤32 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)
89	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,25 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,25 (S)
90	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10(R)	62,5 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,12 (S)
91	1 (S)	≥8 (R)	≥16 (R)	2,5 (S)	≥2000 (R)	4 (R)	2 (R)	0,5 (S)	4 (R)
92	≥16 (R)	≥8 (R)	≥16 (R)	10 (R)	≥2000 (R)	0,12 (S)	0,12 (S)	0,06 (S)	0,25 (S)

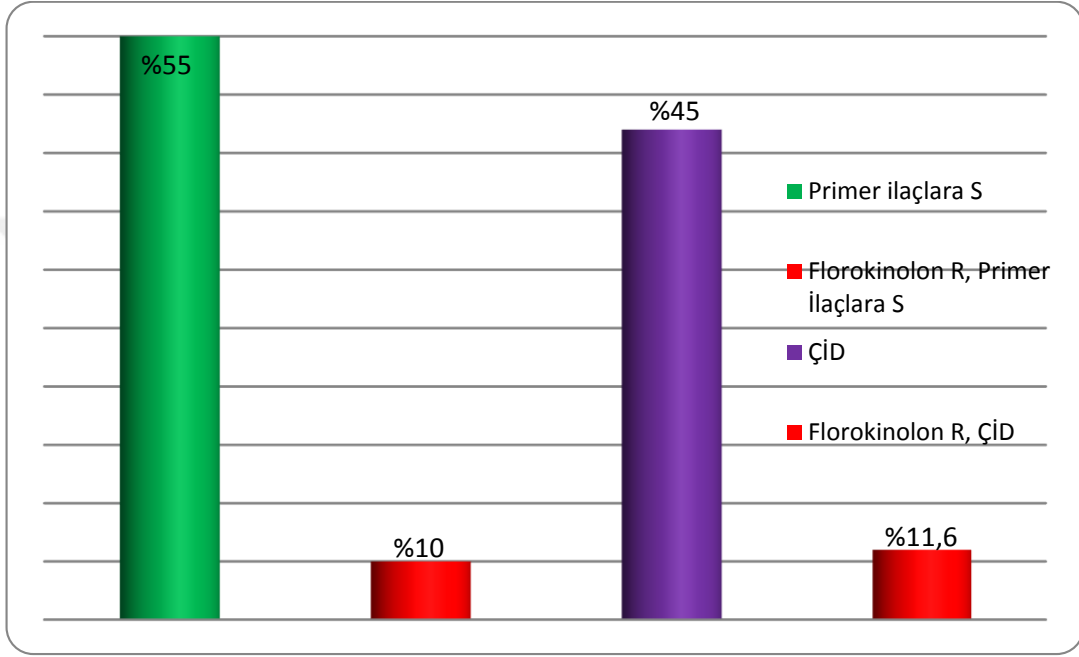
\*S-duyarlı, \*\*R- dirençli

-  1-50 - Primer ilaçlara duyarlı izolatlar (n:50);
-  51-92 - Çok İlaça Dirençli izolatlar (n:42);
-  florokinolanlara dirençli izolatlar (n:11; 5 primer ilaçlara duyarlı + 6 ÇİD izolatlar);
-  aktif eflüks pompası saptanan ÇİD izolatlar (n:6);
-  referans izolatlar

Çalışmada primer ilaçlara (INH, RİF, STM, ETM) duyarlı 50 (%55) izolat saptandı. Geriye kalan ÇİD 42 (%45) izolatın tümü INH ve RİF dirençli bulundu. ÇİD 42 izolatın 28 (%30)'ünün STM'ye, 24 (%26)'unun ise ETM'ye dirençli olduğu saptandı.

Çalışmada NIC duyarlılığın belirlenmesinde internal kontrol olarak *M. tuberculosis ATCC 35828*: PZA dirençli izolat kullanıldı ve MİK değerinin 2000 µg/ml (dirençli) olduğu görüldü. Toplam 92 kinik izolatın, 28 (%30)'i NIC dirençli, 64 (%70)'ü NIC 'e duyarlı olduğu saptandı.

Tabloda 10’da florokinolon direnci saptanan izolatlar sarı renk ile işaretlendi. Toplam 11 (5 primer ilaçlara duyarlı + 6 ÇİD) (% 11,9) izolatta florokinolonlara (CIPRO, LEVO, OFX) direnç saptandı. Primer ilaçlara duyarlı izolatlardan 5 (%10)’inde florokinolonların hepsine direnç görüldü. Ancak ÇİD izolatlardan florokinolonların tümüne dirençli 4 (% 9,5) izolat; florokinolonların MOX hariç üçüne (CIPRO, LEVO, OFX) dirençli 2 (%2,1) izolat saptandı (Şekil 4).



Şekil 4. 92 izolatın primer ilaçlar ve florokinolonlara duyarlılık ve direnç oranları

Çalışmamızda internal kalite kontrolü olarak 5 adet *M. tuberculosis* referans izolatı kullanıldı. **H37Rv** izolatı, test edilen tüm ilaçlara duyarlı bulunurken, **ATCC35822**: INH dirençli izolatın, MİK değeri  $\geq 8$  (dirençli), **ATCC35838**: RIF dirençli izolatın MİK değeri  $\geq 16$  (dirençli), **ATCC35820**: STM dirençli izolatın MİK değeri  $\geq 16$  (dirençli), **ATCC35837**: ETM dirençli izolatın ise MİK değeri 40 (dirençli) olarak saptandı. Çalışılan antibiyotiklerin duyarlılık/direnç oranları tablo 11’de sunuldu.

**Tablo 11.** Antitüberküloz ilaçlarının duyarlılık/direnç oranları

<b>Antibiyotikler</b>	<b>Duyarlı n (%)</b>	<b>Dirençli n (%)</b>
<b>STM</b>	64 (70)	28 (30)
<b>INH</b>	50 (54,3)	42 (45,6)
<b>RİF</b>	50 (54,3)	42 (45,6)
<b>ETM</b>	68 (74)	24 (26)
<b>NIC</b>	64 (70)	28 (30)
<b>CIPRO</b>	81 (88)	11 (12)
<b>LEVO</b>	81 (88)	11 (12)
<b>MOX</b>	83 (90,2)	9 (9,8)
<b>OFX</b>	81 (88)	11 (11,9)

n\*:izolat sayısı

#### **4.2. Efflüks Pompa İnhibitörleri (Rezerpin, CCCP, Verapamil) Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Yöntemi ile Elde Edilen MİK Değerleri**

##### **4.2.1. Rezerpin Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Testi ile Elde Edilen MİK Değerleri**

Çalışmada efflüks pompa inhibitörü olarak rezerpin, 8 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı. Rezerpin varlığında 6 (%6,5) izolatta florokinolonların MİK değerlerinde düşüş saptandı. Tablo 12-15’de, her kinolon için inhibitörsüz/inhibitörlü olarak elde edilen MİK değerleri 6 izolat için sunulmuştur.

CIPRO için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 2 µg/ml iken, rezerpin varlığında 4 izolatta 8 kat, 2 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 12).

LEVO için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 1 µg/ml iken, rezerpin varlığında 5 izolatta 4 kat, 1 izolatta 2 kat düşüş göstermiştir (Tablo 13).

MOX için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 0,5 µg/ml iken, rezerpin varlığında 1 izolatta 8 kat, 4 izolatta 4 kat, 1 izolatta 2 kat düşüş göstermiştir (Tablo 14).

OFX için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 2 µg/ml iken, rezerpin varlığında, 6 izolattta tümünde 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo15).

#### **4.2.2. CCCP Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Testi ile Elde Edilen MİK Değerleri**

Çalışmada efflüks pompa inhibitörü olarak CCCP 12 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı. CCCP varlığında 6 (%6,5) izolatta florokinolonların MİK değerlerinde düşüş saptandı. Tablo 12-15’de, her kinolon için inhibitörsüz/inhibitörlü olarak elde edilen MİK değerleri 6 izolat için sunulmuştur.

CIPRO için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 2 µg/ml iken, CCCP varlığında, 4 izolatta 16 kat, 1 izolatta 8 kat, 1 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 12).

LEVO için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 1 µg/ml iken, CCCP varlığında 4 izolatta 8 kat, 2 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 13).

MOX için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 0,5 µg/ml iken, CCCP varlığında 4 izolatta 8 kat, 2 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 14).

OFX için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 2 µg/ml iken, CCCP varlığında, 5 izolatta 8 kat, 1 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 15).

STM ve RİF için inhibitörsüz/inhibitörlü MİK değerleri;

STM için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 3 izolatta 16 µg/ml iken, CCCP varlığında 2 izolatta 4 kat, 1 izolatta 8 kat düşüş göstermiştir.

RİF için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 4 izolatta 16 µg/ml iken, CCCP varlığında 2 izolatta 4 kat, 2 izolatta 8 kat düşüş göstermiştir.

#### **4.2.3. Verapamil Varlığında Rezasurin Mikrodilüsyon Testi ile Elde Edilen MİK Değerleri**

Çalışmada efflüks pompa inhibitörü olarak Verapamil 60 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı. Verapamil varlığında 6 (%6,5) izolatta florokinolonların MİK değerlerinde düşüş saptandı. Tablo 12-15’de, her kinolon için inhibitörsüz/inhibitörlü olarak elde edilen MİK değerleri 6 izolat için sunulmuştur.

CIPRO için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 2 µg/ml iken, verapamil varlığında, 4 izolatta 16 kat, 1 izolatta 8 kat, 1 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 12).

LEVO için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 1 µg/ml iken, verapamil varlığında 4 izolatta 8 kat, 2 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 13).

MOX için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 0,5 µg/ml iken, verapamil varlığında 4 izolatta 8 kat, 2 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 14).

OFX için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 2 µg/ml iken, verapamil varlığında, 5 izolatta 8 kat, 1 izolatta 4 kat düşüş göstermiştir (Tablo 15).

STM ve RİF için inhibitörsüz/inhibitörlü MİK değerleri;

STM için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 3 izolatta 16 µg/ml iken, verapamil varlığında 2 izolatta 4 kat, 1 izolatta 8 kat düşüş göstermiştir.

RİF için inhibitörsüz MİK değeri rezasurin mikrodilüsyon yöntemi ile; 4 izolatta 16 µg/ml iken, verapamil varlığında 2 izolatta 4 kat, 2 izolatta 8 kat düşüş göstermiştir.

**Tablo 12.** Efflüks pompa inhibitörleri varlığında siprofloksasinin MİK değerleri

No	İnhibitörsüz MİK değeri (µg/ml)	Rezerpin varlığında MİK değeri (µg/ml)	CCCP varlığında MİK değeri (µg/ml)	Verapamil varlığında MİK değeri (µg/ml)
1	2	0,25	0,12	0,12
2	2	0,25	0,12	0,12
3	2	0,5	0,12	0,12
4	2	0,25	0,25	0,25
5	2	0,5	0,5	0,5
6	2	0,25	0,12	0,12

**Tablo 13.** Efflüks pompa inhibitörleri varlığında levofloksasinin MİK değerleri

No	İnhibitörsüz MİK değeri (µg/ml)	Rezerpin varlığında MİK değeri (µg/ml)	CCCP varlığında MİK değeri (µg/ml)	Verapamil varlığında MİK değeri (µg/ml)
1	1	0,25	0,12	0,12
2	1	0,25	0,12	0,12
3	1	0,25	0,12	0,12
4	1	0,25	0,25	0,25
5	1	0,5	0,25	0,25
6	1	0,25	0,12	0,12

**Tablo 14.** Efflüks pompa inhibitörleri varlığında moksifloksasinin MİK değerleri

No	İnhibitörsüz MİK değeri (µg/ml)	Rezerpin varlığında MİK değeri (µg/ml)	CCCP varlığında MİK değeri (µg/ml)	Verapamil varlığında MİK değeri (µg/ml)
1	0,5	0,06	0,06	0,06
2	0,5	0,12	0,12	0,12
3	0,5	0,12	0,12	0,12
4	0,5	0,12	0,06	0,06
5	0,5	0,25	0,06	0,06
6	0,5	0,12	0,06	0,06

**Tablo 15.** Efflüks pompa inhibitörleri varlığında ofloksasinin MİK değerleri

No	İnhibitörsüz MİK değeri (µg/ml)	Rezerpin varlığında MİK değeri (µg/ml)	CCCP varlığında MİK değeri (µg/ml)	Verapamil varlığında MİK değeri (µg/ml)
1	2	0,5	0,25	0,25
2	2	0,5	0,25	0,25
3	2	0,5	0,5	0,5
4	2	0,5	0,25	0,25
5	2	0,5	0,25	0,25
6	2	0,5	0,25	0,25

#### 4.2.4. Tioridazin varlığında rezasurin mikrodilüsyon testi ile elde edilen

##### MİK değerleri

Tioridazin 0,2 µg/ml konsantrasyonunda test edilerek, antibiyotikler üzerinde inhibitör etkisi olmadığı görüldü.

### 4.3. Efflüks Pompa Genlerinin Ekspresiyonunu RT-PZR Yöntemi ile Belirlenmesi

Aktif efflüks pompa saptanan 6 izolatta PZR ile efflüks pompa genlerinin ekspresiyonu araştırıldı. 16S rRNA pozitif kontrol olarak kullanıldı. 6 izolatın tamamında 16S rRNA geni 280 bp fragment uzunluğunda tespit edildi. Araştırılan efflüks pompa gen bölgeleri tespit edildi.

#### 4.3.1. *Rv1410c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv1410c* geni ise 221 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 5).

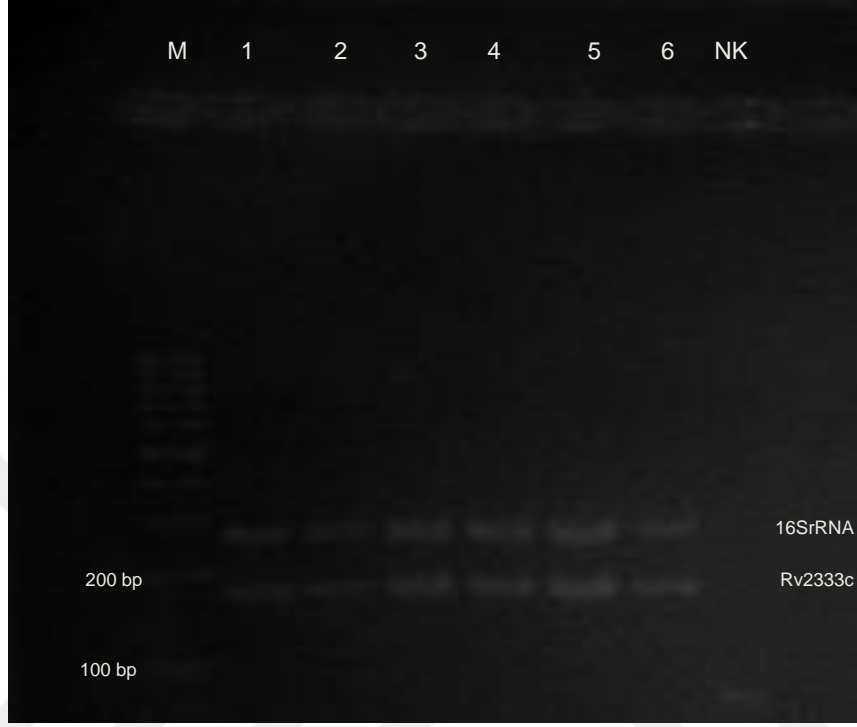


Şekil 5. *Rv1410c* geninin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları



#### 4.3.2 *Rv2333c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv2333c* geni ise 178 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 6).



**Şekil 6.** *Rv2333c* geninin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

### 4.3.3. *DrrA* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *DrrA* geni ise 158 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 7).

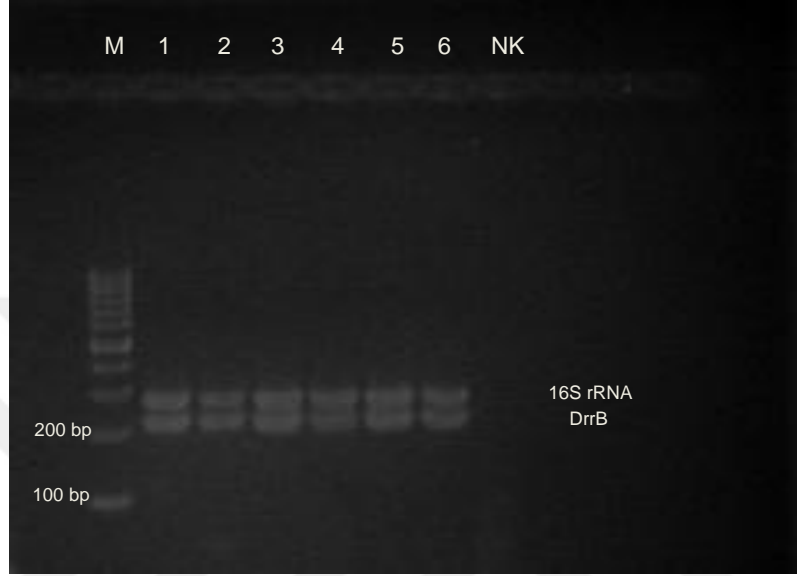


Şekil 7. *DrrA* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6:

*M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.4 *DrrB* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

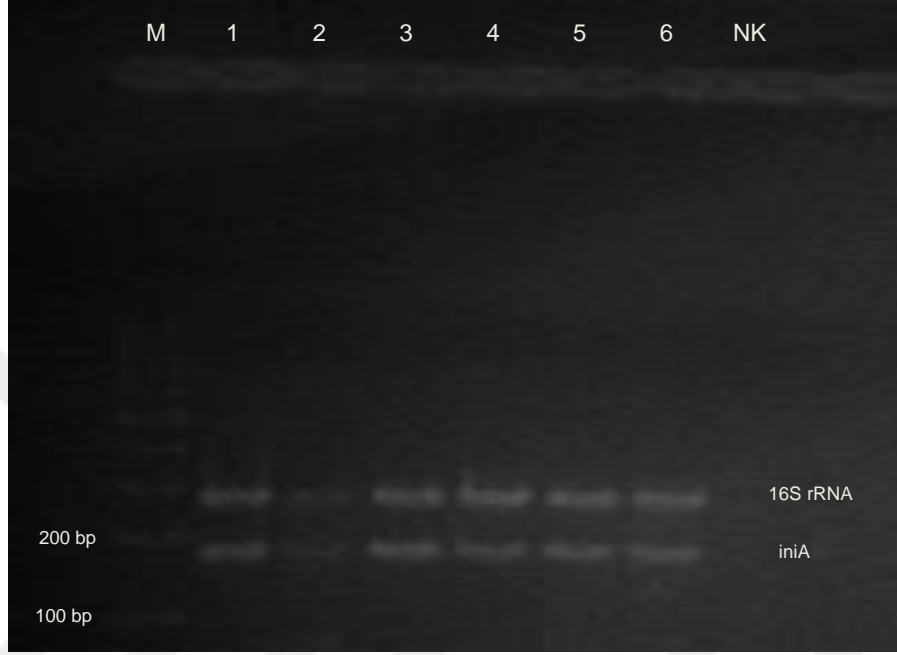
Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *DrrB* geni ise 224 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 8).



**Şekil 8.** *DrrB* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.5. *iniA* gen bölgesi için PZR işlemleri sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *iniA* geni ise 187 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 9).



**Şekil 9.** *iniA* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.6. *mmpL7* gen bölgesi için PZR işlemleri sonuçları

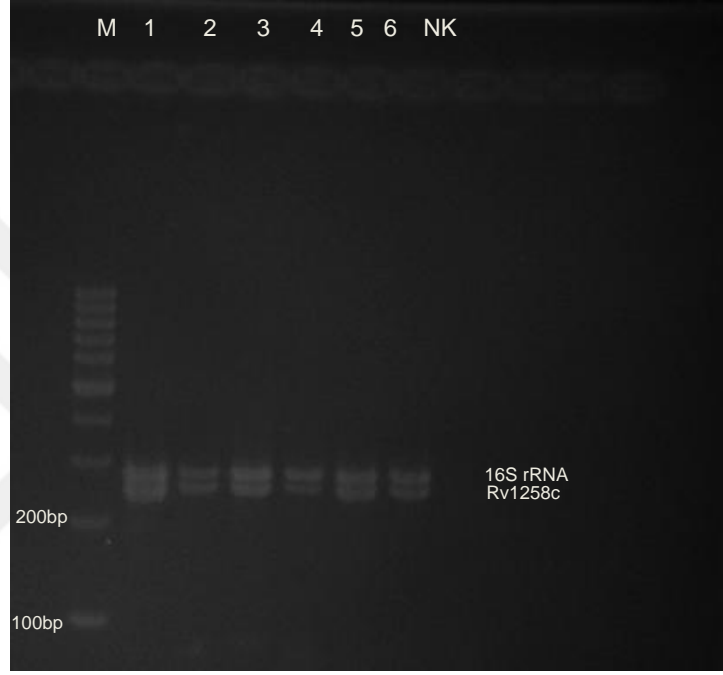
Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *mmpL7* geni ise 227 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 10).



**Şekil 10.** *mmpL7* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.7. *Rv1258c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

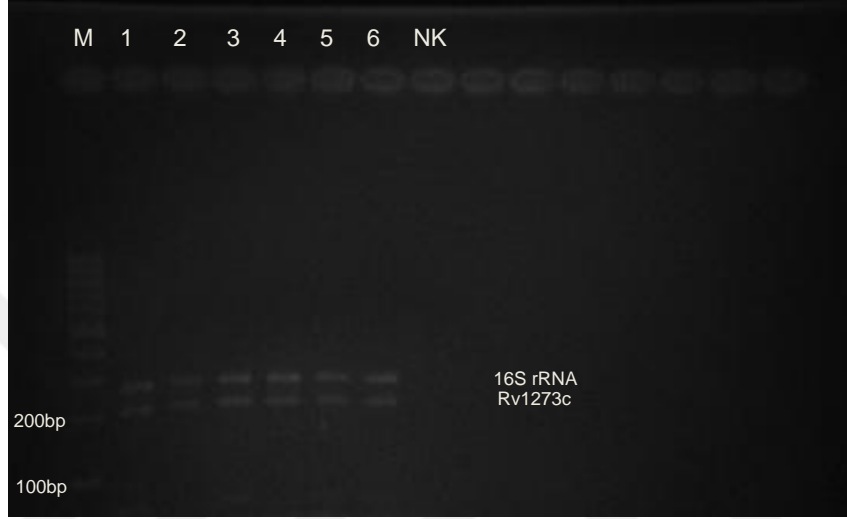
Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv1258c* geni ise 255 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 11).



**Şekil 11.** *Rv1258c* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.8. *Rv1273c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

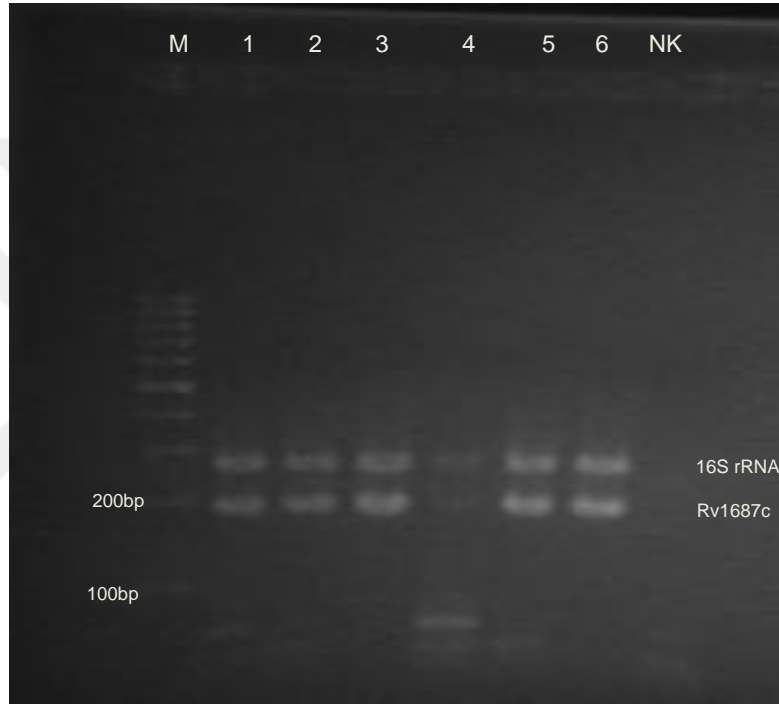
Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv1273c* geni ise 214 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 12).



**Şekil 12.** *Rv1273c* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.9. *Rv1687c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv1687c* geni ise 200 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 13).

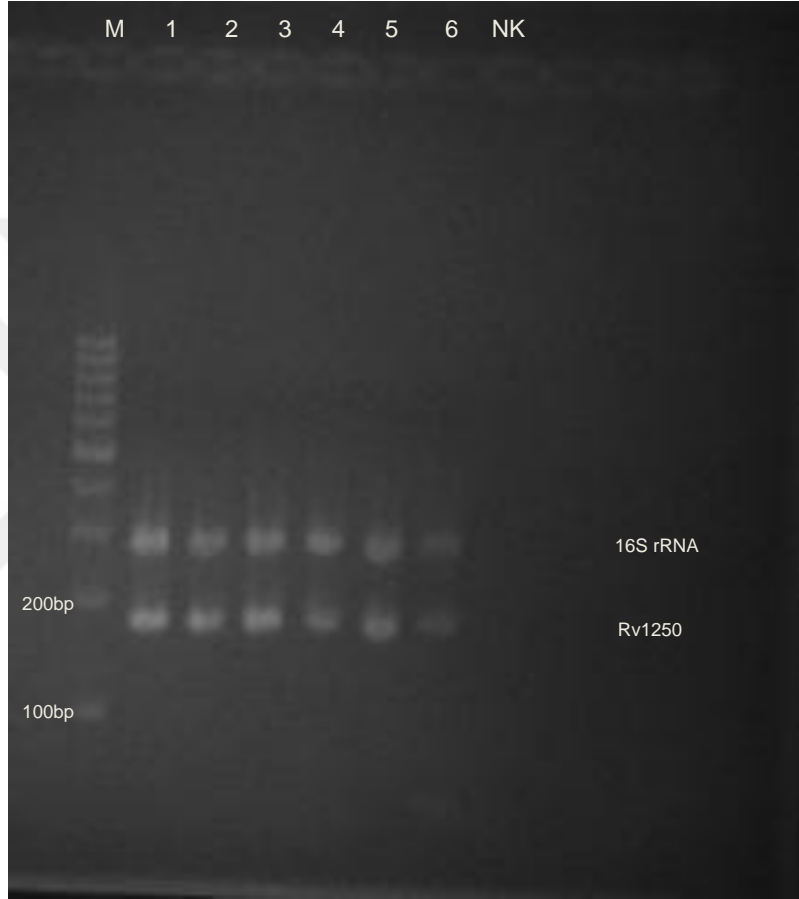


**Şekil 13.** *Rv1687c* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları



#### 4.3.10. *Rv1250* gen bölgesi için PZR işlemleri sonuçları

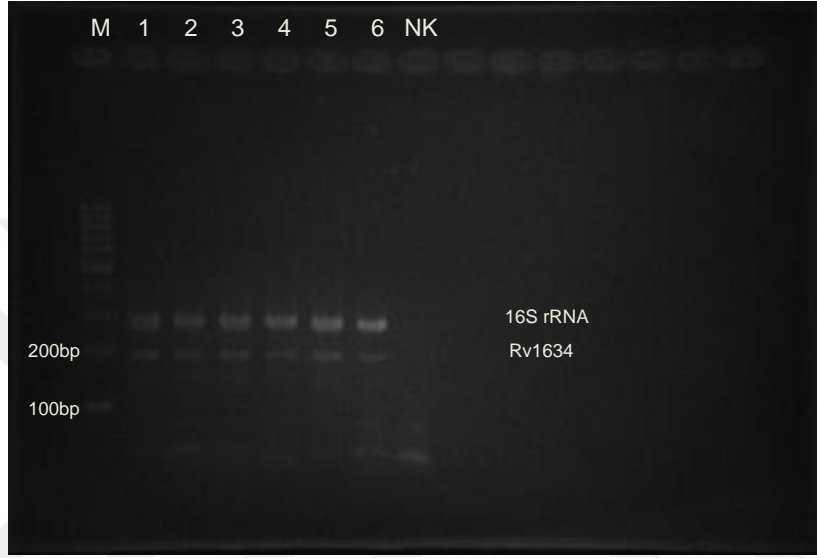
Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv1250* geni ise 172 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 14).



**Şekil 14.** *Rv1250* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.11. *Rv1634* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

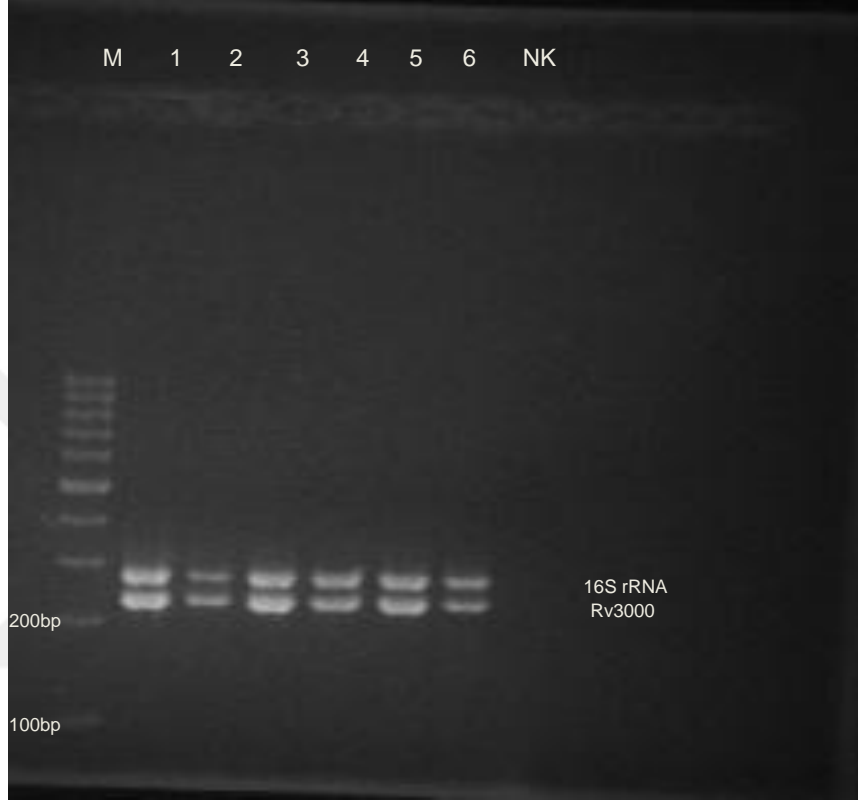
Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv1634* geni ise 182 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 15).



Şekil 14. *Rv1634* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.12. *Rv3000* gen bölgesi için PZR işlemleri sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv3000* geni ise 238 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 16).



**Şekil 16.** *Rv3000* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.13. *mmpL4* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *mmpL4* geni ise 246 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 17).



Şekil 17. *mmpL4* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.14. *Rv0783c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *mmpL4* geni ise 186 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 18).



**Şekil 18.** *Rv0783c* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

#### 4.3.15. *Rv0037c* gen bölgesi için PZR işlemi sonuçları

Değerlendirmede 16S rRNA geni 280 bp, *Rv0037c* geni ise 244 bp fragment uzunluğunda bant aralıklarında bulundu (Şekil 19).



**Şekil 19.** *Rv0037c* genin PZR ile elde edilen görüntüsü. M: Marker (100 bp), NK: Negatif Kontrol, 1-6: *M. tuberculosis* izolatları

## 5. TARTIŞMA

*M. tuberculosis*'in antitüberküloz ilaçlara direnci, tüberküloz tedavisinin en önemli problemlerinden biridir. Direnç mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da halen araştırılmakta olan birkaç olası mekanizma bulunmaktadır:

- (i) *M. tuberculosis* enzimleri veya transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı direnç,
- (ii) *M. tuberculosis* efflüks pompalarının aşırı ekspresyonu (overexpression),
- (iii) *M. tuberculosis* hücre duvarı geçirgenliğindeki değişiklikler,
- (iv) *M. tuberculosis* adaptasyonunu düzenleyen intraselüler ve ekstraselüler ortamlara iki bileşenli sistemin yüksek ekspresyonu.

İlaç direnci, intrensek (doğal) direnç ve kazanılmış direnç içeren iki gruba ayrılabilir. İntrensek dirençte, antibiyotiklerin veya toksik maddelerin atılması bakteriyel genler veya plazmidler tarafından kodlanan efflüks pompalar ile gerçekleşir. İntrensek direnç, türe özgü olup bakterinin olumsuz ortamlar da canlı kalmasına yardımcı olur. Bir bakteri popülasyonunda çeşitli efflüks pompalarının ekspresyonu, geniş bir spektrumdaki antimikrobiyal ajanların ilaca direncine yol açarak çok ilaca dirençle sonlanabilir (Song ve Wu, 2016).

Efflüks pompa inhibitörleri efflüks pompalarına bağlanan moleküller olup, onların fonksiyonunu engellemektedirler. Efflüks pompalarına bağlandıktan sonra antitüberküloz ilaçların hücre içinden atılmasının engellemesine (i), TB basilinin ölümünün artmasına (ii), ilaç direncinin tersine çevrilmesine(dirençliden duyarlıya) (iii), antitüberküloz ilaçlarla sinerjik etki oluşmasına (iv) yol açmaktadır (Song ve Wu,2016).

Çalışmamızda efflüks pompa inhibitörlerin varlığında ÇİD florokinolonlara duyarlı 6 izolatta efflüks pompalarının aktif olduğu tespit edildi. 6 izolatin tamamında CCCP, verapamil, rezepin gibi inhibitörler varlığında florokinolonlara (CİPRO, %6,52; LEVO, %6,52; MOX, %6,52; OFX, %6,52) duyarlı izolatların MİK'lerinde düşüş saptandı. Bu 6 izolatin 3'ünde STM; 4'ünde RİF CCCP ve verapamil varlığında (RİF, %4,34 ve STM, %3,26) MİK değerlerinin düştüğü gözlemlendi.

Huang ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, CIPRO duyarlı 10 izolatin 3 (%30)'ünde, 4 CIPRO dirençli izolatin 2 (%50)'sinde rezepin varlığında MİK değerlerinde düşüş saptamışlardır.

Escribano ve ark. (2007), CIPRO, OFX, LEVO, MOX'ne dirençli 6, duyarlı 12 izolatin rezepin varlığında OFX, LEVO, MOX MİK değerlerinin izolatların %57'sinde 2 kat, CIPRO için ise %100 düştüğünü saptamışlardır.

Sun ve ark. (2013), çalışmalarında OFX dirençli 102 izolatta MİK değerlerinin rezepin varlığında %55, verapamil varlığında %74, CCCP varlığında %83 oranında 2-8 kat düştüğünü saptamışlardır.

Louw ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada 15 ÇİD-TB izolatında rezepin varlığında OFX duyarlılığının kısmen geri kazanıldığını gözlemlemişlerdir.

Piddock ve Richi (2001), yaptıkları çalışmada CCCP ve rezepinin varlığında florokinolonlara duyarlı izolatlarda MİK değerlerinin düşürmediğini saptamışlardır.

Diğer bir çalışmada ise, OFX dirençli 45 izolatta, duyarlı 10 izolatta CCCP ve verapamilin inhibitör etkileri araştırılmışlardır. OFX duyarlı izolatların MİK değerlerinde CCCP ve verapamil düşüş gözlenmezken, dirençli izolatların %35,5 CCCP varlığında, %53,3 verapamil varlığında varlığında düşüş saptamışlardır (Singh ve ark., 2009).

Efflüks pompa inhibitörleri ile yapılan çalışmaların büyük bir kısmı florokinolonlara dirençli *M. tuberculosis* izolatlarla çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak florokinolonlara dirençli izolat sayısı (%11,9) daha düşük olduğu için, ilişki olarak direnç oranı da daha düşük olmuştur. Çalışmamızda florokinolon dirençli izolat sayısı toplam 11 olup, efflüks pompa inhibitörlerinin florokinolon dirençli izolatlarda etkili olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda efflüks pompa inhibitörü olarak kullanılan CCCP ve verapamilin, rezepine göre efflüks pompaları üzerinde inhibitör etkilerinin daha güçlü olduğu görülmüştür.



Spies ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada STM MİK değerlerinin verapamil varlığında %48, CCCP varlığında %10 düştüğünü, her iki inhibitör varlığında ise MİK değerlerinin %10 oranında azaldığını gözlemişlerdir.

Li ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada ÇİD 9 izolatın CCCP varlığında 6 (%66,7)'sında; rezerpin varlığında 4 (%44,4)'ünde RİF MİK değerlerinde düşüş saptamışlardır. Ayrıca RİF dirençli izolatların RİF duyarlı hale geldiklerini gözlemlemişlerdir.

Bizim bulgularımız mevcut literatür bulgularından farklı görülmektedir. Bu farklılıkta; (i) izolat sayısındaki farklılıklar (çalışmamızda kullandığımız izolat sayısı daha yüksektir), (ii) çalışılan izolatların seçimi (bizim çalışmamızda 50 primer ilaçlara duyarlı + 42 ÇİD), (iii) çalışmalarda özellikle florokinolon dirençli izolatların kullanılmış olması (bizim çalışmamızda 81 florokinolon duyarlı + 11 dirençli), (iv) bölgesel (izolatlarımız Türkiye genelini temsil etmektedir) farklılıklar düşünülmektedir.

Çalışmamızda efflüks pompa inhibitörü olan tioridazin 0,2 µg/ml konsantrasyonunda test edilmiş ve efflüks pompası üzerinde inhibitör etkisi görülmemiştir. Tioridazinin antimikobakteriyal etkisi kanıtlanmış ve Bactec MGİT'te kritik konsantrasyonu 2 µg/ml saptanmıştır (Kiran ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda ise inhibitör etkisinin gözlenebilmesi için tioridazin 0,2 µg/ml gibi 10 kat düşük konsantrasyonunda çalışılmış ve inhibitör etkisi saptanmamıştır.

Çalışmamızda efflüks pompa inhibitörlerin INH, ETM, NIC üzerinde etkilerinin olmadığı görüldü.

Çalışmamızda ayrıca efflüks pompa inhibitörleri varlığında MİK değerlerinde düşüş saptanan 6 izolatta efflüks pompa genlerine ait 15 gen bölgesinin ekspresyonu araştırıldı. Araştırılan genlerin tamamında aşırı ekspresyon görüldü. Bu bulgu, INH, RİF, STM, ETM ve NIC dirençli izolatlarda gen bölgelerinin aşırı ekspresyonu efflüks pompalarının direnç gelişimi ile ilişkisini düşündürmektedir. Özellikle RİF dirençli 4; STM dirençli 3; CIPRO, MOX, OFX, LEVO duyarlı ÇİD 6 izolatta efflüks pompa inhibitörleri varlığında MİK değerlerinin 2-16 kat düşmüş olması, direncin aktif efflüks pompaları ile ilişkisini kanıtlamaktadır.

Eflüks pompalarıyla ilişkili ilk çalışma Siddiqi ve ark. (2004) tarafından, klinik ÇİD *M. tuberculosis* izolatında yapılmıştır. Bu izolatın INH, OFX, RİF dirençli olduğu belirtilmiştir. RT-PZR ile araştırdıklarında *Rv1258c* geninin aşırı eksprese olduğunu saptamışlardır. *Rv1258c* geninin ekspresiyonunun RİF varlığında 10 kat, OFX varlığında ise 6 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Jiang ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada, 1499 *M. tuberculosis* izolatında, eflüks pompalarının kodladığı genlerinin ekspresyonu ve ilaç direncini göstermişlerdir. Eflüks pompasını kodladığı bilinen *Rv1258c*, *Rv1410c*, *Rv1819c* geni INH direnci varlığında aşırı eksprese olduğu bildirmişlerdir. Rifampisin varlığında bu pompaların ekspresyonlarının 3 kat, INH varlığında ise 5 - 6 kat arttığını saptamışlardır.

De Rossi ve ark. (2002), *M. smegmatis*'te *M. tuberculosis*'in *Rv1258c* genini aşırı eksprese ederek tetrasiklinlere ve aminoglikozidlere direnç oranının yükseldiğini saptamışlardır. Ayrıca *M. smegmatis*'te MFS dışı atım pompasının kodladığı *Rv1634* geninin aşırı eksprese ederek norfloksasin, siprofloksasin duyarlılığını azalttığını gözlemişlerdir.

Silva ve ark. (2001), *M. bovis* ve *M. smegmatis*'te *Rv1410c* genini aşırı eksprese ederek aminoglikozid ve tetrasiklin direnç oranının arttığını saptamışlardır.

*M. tuberculosis*'in Mmr proteinini *E.coli*'de aşırı eksprese ederek, etidyum bromide, akriflavine, metil viyolone direncin kazanıldığını gözlemişlerdir (Ninio ve ark., 2001).

Pasca ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c* operon tarafından kodlanan ABC eflüks pompa taşıyıcısını, *M. smegmatis*'te aşırı ekspresiyonu sağladıklarında norfloksasin, moksifloksasin direnç saptamışlardır. CCCP, rezepin varlığında ise MİK'lerinde düşüş gözlemişlerdir.

Pasca ve ark. (2005), çalışmalarında *M. smegmatis*'te *M. tuberculosis mmpL7* genini aşırı eksprese ederek INH birikimini ölçmüşlerdir. İsoniazid direncinin gelişmesine *mmpL7* genin neden olduğunu saptamışlar ve direncin eflüks pompa inhibitörleri olan rezepin ve CCCP varlığında azaldığını gözlemişlerdir.

Colangeli ve ark. (2005), çalışmalarında *M. bovis* BCG'de *M. tuberculosis iniA* genini aşırı eksprese ederek, *iniA* aşırı ekspresiyonunun INH ve ETM karşı direnç artışı ile

sonuçlandığını saptamışlardır. Ayrıca *iniA* geni delesyona sahip olan *M. tuberculosis* izolatlarının INH'a daha duyarlı olduklarını ve rezerpin inhibitörü varlığında INH duyarlılığında artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Silva ve ark. (2001), *Rv1410c* geni aşırı eksprese olan *M. tuberculosis* izolatlarında CCCP, verapamil ve rezerpin varlığında, STM ve TET'in direnç seviyelerini azalttığını saptamışlardır.

Li ve ark. (2015), *Rv1250*, *Rv1634*, *DrrA*, *DrrB*, *Rv1410c* efflüks pompa genlerinin ÇİD 8 izolatta aşırı eksprese olduğunu, CCCP ve rezerpin varlığında INH ve RİF MİK'lerinde düşüş saptamışlardır.

Cho ve ark. (2014), efflüks pompa genlerinin ekspresiyonunu 35 *M. tuberculosis* klinik izolatlarında araştırmışlar ve 34 izolatta aşırı ekspresyonu saptamışlardır.

Günümüzde ilaçlara dirençli TB olguları artmaktadır. Primer TB ilaçlarına yanıt vermeyen bu olgularda tedavi oldukça güç olup yeni bir tedavi rejimi düzenlenmesi gerekmektedir. Yan etki ve intoleransın arttığı bu olgularda tedavi maliyetleri de artmaktadır.

Son yıllarda *M. tuberculosis*'de de efflüks pompalarının varlığı ve ilaç direncindeki etkileri gösterilmeye çalışılmaktadır. Çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmaktadır. Bazı çalışmalarda efflüks pompa inhibitörleri varlığında dirençli bir ilacın duyarlıya dönmesi geliştirilecek antitüberküloz ilaçlarının yeni hedefi olabilir. Ülkemizde bu konuda yapılmış olan çalışmalarda eksikliklerin olduğu gözlenmiştir. Türkiye'de efflüks pompa genlerinin antitüberküloz ilaçların direncindeki rolü ile ilgili yapılmış yeterince çalışmanın olmadığı görülmektedir. Özellikle efflüks pompa inhibitörleri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Efflüks pompa inhibitörlerinin maliyetlerinin daha düşük ve toksik etkilerinin daha az olması göz önüne alındığında, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- (i) İzolatlarımızın %55 primer ilaçlara duyarlı, %45 ÇİD bulundu.
- (ii) 11 (%11,9) izolatta florokinolonlara direnç saptandı.
- (iii) Çalışmada efflüks pompa inhibitörleri olarak kullanılan rezerpin, CCCP, verapamil varlığında 6 ÇİD florokinolonlara duyarlı (%6,52) izolatta florokinolonların, 4 (%4,34) izolatta RİF'in, 3 (%3,26) izolatta STM'nin MİK değerlerinde düşüş saptandı.
- (iv) Tiorodazinin inhibitör etkisi saptanmadı.
- (v) Efflüks pompa inhibitörleri varlığında MİK değerlerinde düşüş saptanan 6 izolatta efflüks pompa genlerine ait 15 gen bölgesinin tamamında aşırı ekspresyon görüldü.

Efflüks pompa ekspresyon artışının, çoklu ilaç direnç gelişiminde önemli katkı sağladığı bilinmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar efflüks pompalarının, gelecekte yeni geliştirilecek antitüberküloz ilaçlarının hedefi olacağını düşündürmektedir.

Günümüzde ilaçlara dirençli tüberküloz olgularındaki artış dikkati çekmektedir. Primer tüberküloz ilaçlarına yanıt vermeyen bu olgularda tedavi oldukça güç olup yeni bir tedavi rejimi düzenlenmesi gerekmektedir. Yan etki ve intoleransın arttığı bu olgularda tedavi maliyetleri de artmaktadır. Efflüks pompa inhibitörleri antitüberküloz tedavisinde primer ve sekonder ilaçlar ile kombine kullanılarak, özellikle dirençli olgularda yeni bir tedavi yaklaşımı olacaktır.

## **KAYNAKLAR**

- Abrahams KA, Besra GS. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology* 2016; 1-18.
- Adams KN, Takaki K, Connolly LE, Wiedenhoft H, Winglee K, Ramakrishnan L. Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* 2011; 145: 39–53.
- 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; 210: 456–66.
- Aínsa JA, Blokpoel MC, Otal I, Young DB, De Smet KA, Martín C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*. 1998; 180(22):5836-5843.
- Amaral L, Kristiansen JE, Abebe LS, Miilet W. Inhibition of the respiration of multi-drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by thioridazine: potential use for initial therapy of freshly diagnosed tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 1049–53.
- Andersen CL, Holland IB, Jacq A. Verapamil, a Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor acts as a local anesthetic and induces the sigma E dependent extracytoplasmic stress response in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1587–95.
- Banerjee SK, Bhatt K, Rana S, Misra P, Chakraborti PK. Involvement of an efflux system in mediating high level of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 362–8.
- Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 2017; 58(1), E9.
- Bartolozzi G. *Vaccini e vaccinazioni*. Terza edizione. Milano: Elsevier 2012.
- Beck E, Sieber WJ, Trejo R. Management of cluster headache. *Am Fam Physician* 2005; 71: 717–24.
- Besciu M. The Byzantine physicians. *Bulletin of the Transilvania University of Braşov. Medical Sciences* 2009; 6(51):33-8.
- Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. The structure and function of drug pumps: an update. *Trends Microbiol* 2001; 9:71-9.
- Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24:449-67

- Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2003; 83(1):91-97.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, and Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3684-9.
- Brown L. The story of clinical pulmonary tuberculosis. Baltimore MD: 1941.
- Bynum H. Spitting Blood. Oxford: Oxford University Press 2012; 13, 17, 18, 33-39, 56-62, 104, 106, 107, 110.
- Cave AJE. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *Br J Tuberc* 1939; 33:142-52.
- Chauhan A, Madiraju MV, Fol M. *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol* 2006; 188: 1856-65.
- Cho SY, Nam YS, Yang H, Soh YS, Kim MJ, Lee HJ. A study of efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates." *Ann. Clin. Microbiol.* 2014; 17(2):65–68.
- 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 *drxA* and *drxB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*. 2002; 367(1):279-285.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. (2nd Edition). 2011; 34-36.
- Colangeli R, Helb D, Sridharan S, Sun, J, Varma-Basil M, Hazbón MH, Sacchettini JC. The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Molecular microbiology*. 2005; 55(6):1829-1840.
- Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, Leary JA, Bertozzi CR, Cox JS. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6121-6.
- Daniel TM. *Pioneers in Medicine and their Impact on Tuberculosis*. Rochester, NY: University of Rochester Press. 2000; 4,29, 46-48, 50-51, 74-76.
- Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* 2006; 100(11):1862-70.
- Davidson AL, Chen J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:241–268.
- De Rossi E, Blokpoel MC, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young DB, Ciferri O. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel Tetracycline Resistance

- Determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998; 42(8):1931-1937.
- 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. *Journal of bacteriology*. 1998; 180(22):6068-6071.
- De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martín C, Aínsa JA, Riccardi G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular medicine*. 2002; 8(11):714.
- De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS microbiology reviews*. 2006; 30(1): 36-52.
- Duggal S, Kaur N, Duggal AK, Bhatia MS. Phenothiazines: hope against MDR-TB”, *Delhi Psychiatry Journal*. 2008; 11(1).
- Doucet-Populaire F, Buriankova K, Weiser J, Pernodet JL. Natural and acquired macrolide resistance in mycobacteria. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002; 2:355–370.
- Durmaz R, Ozerol IH, Durmaz B, Gunal S, Senoglu A, Evliyaoglu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey, *Microb Drug Resist* 2003; 9(4):361-6.
- Ellard GA, Gammon PT. Pharmacokinetics of Isoniazid Metabolism in Man. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1976; 4(2):83–113
- Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:137–71.
- Escribano I, Rodríguez JC, Liorca B, García-Pachon E, Ruiz M, Royo G. Importance of the Efflux Pump Systems in the Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Fluoroquinolones and Linezolid. *Chemotherapy*. 2000; 53:397–401.
- Fernandes GFDS, Salgado HRN, Santos JLD. Isoniazid: A Review of Characteristics, Properties and Analytical Methods. *Critical reviews in analytical chemistry*, 2017: 1-11.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y Garcia J, Morbidoni HR, Santangelo MDLP, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 2013; 4(1):3-66.
- Garcia LS, Isenberg HD, Başustaoglu A, Yıldırım ŞT, (Çeviri Baş Editörleri) *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, Üçüncü Baskı*, Ankara, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti, 2014.
- Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 432-42.

- Global Alliance for TB Drug Development. Handbook of Anti-Tuberculosis Agents. Tuberculosis 2008; 88 (2): 85–170.
- Gradmann C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. Medical History 2001; 45(1):1-32.
- Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization, 2011.
- Gupta AK, Chauhan DS, Srivastava K, Das R, Batra S, Mittal M, Hasnain SE. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. Journal of Communicable Diseases. 2006; 38(3):246.
- Gupta AK, Reddy VP, Lavania M, Chauhan DS, Venkatesan K, Sharma VD, Katoch VM. *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. Indian J Med Res 2010; 132:176–88.
- Gupta S, Tyagi S, Almeida DV, Maiga MC, Ammerman NC, Bishai WR. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. American journal of respiratory and critical care medicine. 2013; 188(5), 600-607.
- Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time Lancet 1984;2(8410):1015-6.
- Huang TS, Kunin CM, Wang HM, Yan BS, Huang SP, Chen YS, Lee SS, Syu WJ. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* reserpine-sensitive efflux pump augments intracellular concentrations of Ciprofloxacin and enhances susceptibility of some clinical isolates. J.Formos Med. Assoc 2013; 112(12).
- Iwu MM, Court WE. Root alkaloids of *Rauwolfia vomitoria* Afz. Planta Med 1977; 32: 88–99.
- 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. Microbial Drug Resistance. 2008; 14(1): 7-11.
- Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old. J Infect Dis. 1994;170(5):1348-9.
- Kishore KK, Ramakanth GSH, Chandrasekhar N, Kishan PV, Kumar CU, Usharani P. Thioridazine: a potential adjuvant in pharmacotherapy of drug-resistant tuberculosis. International Journal of Basic and Clinical Pharmacology. 2014; 3(6):928-930.
- Li G, Zhang J, Guo Q, Jiang Y, Wei J, Zhao L, Zhao X, Lu J, Wan K. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. PLoS ONE. 2015; 10(2).



- Littlejohn TG, Paulsen IT, Gillespie MT, Tennent JM, Midgley M, Jones IG, Skurray RA. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*. 1992; 95(2-3): 259-265.
- Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2415–2423.
- Louw GE, Warren RM, Van Pittius NG, McEvoy CRE, Van Helden, PD, Victor TC. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(8):3181-3189.
- Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius CN, Leon R, Jimenez A, Pando RH, McEvoy CRE, Grobbelaar M, Murray M, Helden PD, Victor TC. Rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* through Efflux. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(2): 269–276.
- Lynch JB. Multidrug-resistant tuberculosis. *Medical Clinics of North America* 2013; 97(4): 553-579.
- Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern W, Pagès JM. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007; 59(6):1223-1229.
- Martins M, Schelz Z, Martins A, Molnar J, Hajös G, Riedl Z, Amaral L. In vitro and ex vivo activity of thioridazine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 338–40.
- McTavish D, Sorkin EM. Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. *Drugs* 1989; 38: 19–76.
- Morse D, Brothwell DR, Ucko PJ. Tuberculosis in ancient Egypt. *Am Rev Respir Dis*. 1964; 90:524-41.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Mycobacterium: Genel özellikleri, Laboratuvar Tanısı ve Boyanma İşlemleri*. *Klinik Mikrobiyoloji*. 9.baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009.
- Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M., Goudarzi H, Pormohammad A, Fooladi AAI, Feizabadi MM. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8. 2017.
- Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4781–5.
- Niederweis M. Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* 2003; 49:1167-77.
- Oh TS, Kimb, YJ, Kang HY, Kim CK, Cho SY, Lee HJ. RNA expression analysis of efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant and extensively

- drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Korea. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 49:111–115.
- Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, Amaral L. Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 917–22.
- Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007; from basic science to patient care*. 2007.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998; 62(1):1-34.
- Park JW, Lee SY, Yang JY, Rho HW, Park BH, Lim SN, Kim HR. Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on the dimerization of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1997; 1344(2):132-138.
- Pasca MR, Gugliera P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E, Riccardi G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoro-quinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3175-78.
- Pasca MR, Gugliera P, De Rossi E, Zara F, Riccardi G. MmpL7 Gene of *Mycobacterium tuberculosis* is Responsible for Isoniazid Efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 4775-7.
- Pease AS. Some remarks on the diagnosis and treatment of tuberculosis in antiquity. *Isis* 1940; 31(2):380-93.
- Piddock LJ, Ricci V. Accumulation of KRM-1648 by *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 681–4.
- Piddock LJV, Ricci V. Accumulation of five fluoroquinolones by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48:787-791.
- Pfyffer GE. *Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures*. *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. American Society of Microbiology. 2015; 536-569.
- Plummer AJ, Earl A, Schneider JA, Trapold J, Barrett W. Pharmacology of Rauwolfia alkaloids, including reserpine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1954; 59(1):8-21.
- Pule CM, Sampson SL, Warren RM, Black PA, Helden PD, Victor TC, Louw GE. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:17–26.
- Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:672-93.

- Ramon-Garcia S, Martin C, Ainsa JA, De Rossi E. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 252–9.
- Riccardi G, Pasca MR, Buroni S. *Mycobacterium tuberculosis*: drug resistance and future perspectives. *Future microbiology*. 2009; 4(5), 597-614.
- Roberts CA, Buikstra JE. *The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease*. Gainesville: University of Florida Press 2003.
- Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M, Couto I, Vavra M, Amaral I. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1076–82.
- Rodrigues L, Sampaio D, Couto I, Machado D, Kern WV, Amaral L, Viveiros M. The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *International journal of antimicrobial agents*. 2009; 34(6);529-533.
- Rodrigues L, Ainsa JA, Amaral L, Viveiros M. Inhibition of drug efflux in mycobacteria with phenothiazines and other putative efflux inhibitors. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2011; 6: 118–27.
- 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(4):695-700.
- Rodrigues L, Villellas C, Bailo R, Ainsa J. Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:751–757.
- Saier Jr, MH Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, Pao SS. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 1999; 1(2), 257-279.
- Saniç A, Çoban AY. *Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı*. Samsun, Ondokuz Mayıs Üni Tıp Fak Mik ve Kl Mik ABD, 1999.
- Schmitt L, Tampe R. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 2002; 12: 754–760.
- Silva PE, Bigi F, de la Paz Santangelo M, Romano MI, Martín, C, Cataldi A, Ainsa JA. Characterization of P55, a Multidrug Efflux Pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001; 45(3):800-804.
- Singh M, Jadaun GPS, Srivastava RK, Chauhan V, Mishra R, Gupta K, Nair S, Chauhan DS, Sharma VD, Venkatesan K, Katoch VM. Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* 2011; 133:535-540.
- Song L, Wu X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016; 47:421–429.

- Spies FS, Almeida da Silva, PE, Ribeiro MO, Rosetti ML, Zaha A. Identification of Mutations Related to Streptomycin Resistance in Clinic al of Mycobacterium tuberculosis and Possible Involvement of Efflux Mechanism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52(8):2947-2949.
- Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1247–60.
- Sun Z, Xu Y, Sun Y, Liu Y, Zhang X, Huang H, Li C. Ofloxacin Resistance in Mycobacterium tuberculosis is Associated with Efflux Pump Activity Independent of Resistance Pattern and Genotype. *Microbial Drug Resistance*. 2014.
- Suzuki Y, Suzuki A, Tamaru A, Katsukawa C, Oda H. Rapid Detection of Pyrazinamide-Resistant Mycobacterium tuberculosis by a PCR-Based In Vitro System. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(2): 501–507.
- Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, Jacobs WR. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in Mycobacterium smegmatis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93(1):362-366.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye’de Verem Savaş Raporu 2015. Ankara. 2016; 12-14.
- Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of Action of Isoniazid. *Mol. Microbiol*. 2006; 62 (5): 1220–1227.
- Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Ankara. 2014.
- Van Bambeke F, Page’s JM, Lee VJ. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2006; 1: 157–75.
- Vilcheze C, Jacobs WR. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. *Annu. Rev. Microbiol*. 2007; 61:35–50
- Viveiros M, Amaral L. Enhancement of antibiotic activity against polydrug resistant Mycobacterium tuberculosis by phenothiazines. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17:225–8.
- Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, Victor TC, Jordaan AM, Leandro C, Amaral L. Isoniazid-induced transient high-level resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002; 46(9):2804-2810.
- Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, Machado D, Couto I, Ainsa J, Amaral L. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 983–98.
- Weber WW, Hein DW. Clinic al Pharmacokinetics of Isoniazid. *Clin. Pharmacokinet*. 1979; 4(6):401–422.

Wilson ML. Rapid Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Infection and Drug Susceptibility Testing. Arch Pathol Lab Med 2013; 137.

World Health Organization Report 2016.

Yu EW, Zhang Q, Brown MH. Microbial Efflux Pumps. 1th edition. Great Britain, Norfolk UK: Caister Academic Press, 2013.

Yüce A, Özyürt M, Sürücüoğlu S, Uzun M, Sarıgüzel, N. M.tuberculosis ve Tüberküloz. 1.Baskı, İstanbul, Anka Matbaa, 2016.

Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. Journal of Bacteriology. 1999; 181(7): 2044-2049.

Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. Journal of medical microbiology. 2002; 51(1):42-49.

Zimmerman MR, Bull NY. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. Acad Med 1979; 55(6):604-8.

7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu. Mersin. 2015.14-17.

## EKLER

### Ek 1. 115S699 nolu 3001 Tübitak ARGE Proje Onay Raporu



Sayı : B.14.2.TBT.0.06.03.02-161-86868  
Konu : 115S699 Numaralı Proje Öneriniz

08/07/2015

Sayın Prof. Dr. BELMA DURUPINAR

"3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı" kapsamında Kurumumuza sunulan 115S699 numaralı ve "Mycobacterium Tuberculosis İlaç Direncinde Dışa Atım (Effluks) Pompasının Etkisinin Araştırılması" başlıklı proje önerinizin değerlendirme süreci tamamlanmıştır.

Projeniz, konunun uzmanı danışmanlar tarafından "Özgün Değer", "Yöntem", "Proje Yönetimi, Ekip ve Araştırma Olanakları" ve "Yaygın Etki" boyutlarında incelenmiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda, proje önerinizin desteklenmesi uygun bulunmuştur.

Projenize ilişkin değerlendirme raporu ekte tarafınıza iletilmektedir. Çalışmalanızda başarılar diler, saygılar sunarım.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "S. Aydın", is positioned above the typed name of the official.

Prof. Dr. Sevim AYDIN  
Sağlık Bilimleri Araştırma Destek  
Grubu  
Yürütme Komitesi Sekreteri V.

PANEL PUAN SEVİYESİ: B

A: Çok İyi B: İyi C: Orta D: İyi Değil E: Yetersiz

Panel toplam puanı A ve B seviyesinde olan projeler desteklenmiştir.

## Ek 2. 115S699 nolu 3001 Tübitak ARGE Proje Sonuç Raporu



T.C.  
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI  
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : 92045188/161.10/E.129233

05/06/2017

Konu : 115S699 Numaralı Proje - Sonuç Raporu

Sayın Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Yürütücülüğünü yaptığınız 115S699 numaralı ve "**Mycobacterium Tuberculosis İlaç Direncinde Dışa Atım (Effluks) Pompasının Etkisinin Araştırılması**" başlıklı projenizin **Sonuç Raporu**, Grup Yürütme Kurulumuzun 26.05.2017 tarih ve 759 sayılı toplantısında görüşülmüş ve ilgili raporun kabulüne karar verilmiştir.

İlgili mevzuat gereği, sonuçlanan 3001 programı projeniz için hesaplanan Proje Teşvik İkramiyesini (PTİ) alabilmeniz için, projenizin sonuçlanmasını takiben 2 yıl içerisinde, **1001, 1003, 1005, 3501, 1007, COST ve İkili İşbirliği** (sadece seyahat desteği alınan projeler hariç) programları kapsamında yürütücü olarak sunacağınız bir proje önerisinin desteklenmesi koşulu bulunmaktadır. Bu programlar kapsamında yürütücü olarak yer aldığınız bir projenin desteklenmesi durumunda, sonuçlanan 3001 projenize ait PTİ'nizi almak istediğinize dair yazılı başvurunuzu, 3001 programı projenizi izleyen Gruba iletmeniz gerekmektedir.

Bu proje kapsamında yapacağınız çıktılarınıza ilişkin bilgilerin ardeb-pts.tubitak.gov.tr adresinden erişebileceğiniz çıktı ekleme bölümüne girilmesi ve ilgili dosyaların bu bölüme yüklenmesi önem taşımaktadır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Prof. Dr. Sevim AYDIN  
SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA DESTEK  
GRUBU  
Grup Koordinatörü V.

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmış ve proje yürütücüsünün (Prof. Dr. BELMA DURUPINAR) TÜBİTAK ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ hesabına yüklenmiştir.  
Evrak doğrulaması talepleri, ebys@tubitak.gov.tr adresine e-posta yoluyla yapılabilir.

Atatürk Bulvarı No:221 06100 Kavaklıdere/ANKARA  
Telefon No: (0312) 468 53 00 Fax No: (0312) 427 74 89  
e-Posta: iletisim@tubitak.gov.tr İnternet Adresi: www.tubitak.gov.tr

Bilgi İçin: Recep Emrah ÇEVİK  
Unvanı: Bil.Prog.Uzmanı  
Tel: 296 1214

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Gumral ALAKBAROVA  
**Doğum Yeri:** Azerbaycan  
**Doğum Tarihi:** 23.05.1990  
**Yabancı Dil:** İngilizce, Rusca  
**E-Posta Adresi:** [dr gumral@gmail.com](mailto:dr gumral@gmail.com)

### Akademik Eğitim:

Azerbaycan Tıp Üniversitesi, Tıp Fakültesi. 2007- 2012

### Proje:

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 3001 – Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı Proje No: 115S699

### Kurs:

Bölgesel Uzman Eğitimi Tüberküloz Laboratuvarları Tanısal Standardizasyon Eğitimi, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 27 – 30 Eylül 2016, Samsun

Rehberlerimizi birlikte kullanalım-Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi: Üriner Sistem Örnekleri, KLİMUD, 27 Mayıs 2016, Samsun

OMÜ Tıp Fakültesi ve Samsun Tabip Odası, Akademik Gelişim Kursu-6, 28-29 Mart 2015, Samsun

İmmundiagnostikler, EUROIMMUN Türkiye, 14-15 Ekim, 2015, Samsun

Virüs Hastalıklarının Serolojik Tanısı: Rutin Tanı Testlerinin Kalite Kontrolü, Uygulanması, Yorumlanması, Raporlanması, KLİMUD, 27 Haziran 2014, Samsun

Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon Sertifikası 2013, Antalya

6. DAS Okulu, 17-22 Şubat 2013, Antalya

OMÜ Tıp Fakültesi ve Samsun Tabip Odası, Akademik Gelişim Kursu-2, 16-17 Mart 2013, Samsun



**Kongre:**

32. Ankem Kongresi 10-14 Mayıs 2017, Antalya

XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya

9. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 18 Kasım 2016, Antalya

International Symposium on Parasitic Zoonoses 18-19 November 2016, Antalya

3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya

7. Ulusal mikobakteri sempozyumu, 8-10 Mayıs 2015, Mersin

XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Kasım 2014, Antalya

14<sup>th</sup> World Sterilization Congress and 8th National Sterilization Disinfection Congress of Turkey, 6-9 November 2013, Antalya

**Makale:**

Asuman Birinci, Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova. Cryptococcosis Cases İn A University Hospital. Türk Mikrobiyol Cem Derg 46(4):188-190, 2016

Keramettin Yanık, Nevzat Unal, Adil Karadag, Gumral Alakbarova, Kemal Bilgin Murat Hokelek, Evaluation of Suspected Leishmania Samples in University Hospital Laboratory Between 2001 and 2013. Austin J Microbiol 1(1):1001, 2015

**Poster Sunum:**

Gumral Alakbarova, Ahmet Yılmaz Çoban, Belma Durupınar. Mycobacterium tuberculosis Kompleksi İzolatlarının Primer ve Sekonder Antitüberküloz İlaçlarına Duyarlılığı, 32. Ankem Kongresi, 10-14 Mayıs 2017, Antalya

Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova, Asuman Birinci Transplantasyon yapılan hastalardan izole edilen mikroorganizmaların dağılımı. 32. Ankem Kongresi, 10-14 Mayıs 2017, Antalya

Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova, Asuman Birinci. Kan dönörlerinde HBsAg, Anti-HCV ve Anti-HIV test sonuçlarının değerlendirilmesi. XXXVII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya

Asuman Birinci, Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova, Mustafa Sünbül. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin 12 yıllık kriptokokkoz vakalarının değerlendirilmesi. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya.

Keramettin Yanık, Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova, Asuman Birinci. Enterobacteriaceae İzolatlarının Tigesiklin ve Sefalosporinlere Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya.

Asuman Birinci, Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova, Keramettin Yanık. Candida türlerinin antifungal duyarlılığı. 1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Kongresi, 24-26 Eylül 2014, Ankara.

Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Gumral Alakbarova, Asuman Birinci. Mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerde Gene Xpert MTB/RIF yönteminin performansının değerlendirilmesi:5 yıllık değerlendirilme. 7. Ulusal mikobakteri sempozyumu, 8-10 Mayıs 2015, Mersin.

Hava Yılmaz, Keramettin Yanık, Gumral Alakbarova, Kemal Bilgin, Canan Canan Albayrak, Şaban Esen. A pseudo-outbreak of Streptococcus mitis /oralis and his prevention in children with malignancy. 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases. Abstract Book, 15-18 May, 2013, Tirana, Albania.

Keramettin Yanık, Nevzat Ünal, Adil Karadağ, Gumral Alakbarova, Kemal Bilgin, Murat Hökelek. Leishmaniasis Şüphesi ile 2001-2013 Yılları Arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Gönderilen Örneklerin Değerlendirilmesi. 13-14 Haziran 2013, Şanlıurfa.

