

ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARI VE TÜRKİYE'DE DURUM

Özlem TANSEL

Trakya Ün. Tıp Fak. İnfeksiyon Hast. ve Kl. Mikrobiyoloji AB Dalı, Edirne

Günümüzde *Mycobacterium tuberculosis*'in etken olduğu tüberküloz hastalığının tedavisi birinci seçenek ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlarla yapılmaktadır (1). Birinci seçenek ilaçlar isoniazid, rifampisin, pirazinamid, streptomisin ve etambutoldür. İkinci seçenek grubu ise sikloserin, ethionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin, amikasin, para-aminosalisilik asit, florokinolonlar, rifabutin, klofazimin gibi ilaçlardır (1, 2).

Her 10^{5-8} basil topluluğunda bir basil, kullanılan tüberküloz ilaçlarından sadece birine karşı kendiliğinden mutasyonel dirençlidir (2). Bu direnç bakteri antibiyotikle karşılaşmadan da doğal olarak vardır. *M. tuberculosis* için bilinen bütün direnç mekanizmaları kromozomaldır ve bağımsız bir gende meydana gelen mutasyona bağlıdır. Genetik çalışmalar antitüberküloz ilaçlara direncin; ilacın hedef bölgesini yada aktivasyonunda rol alan enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlarla oluştuğunu göstermiştir (3). Direnç olasılığı tiasetazon, ethionamid, kapreomisin, sikloserin, viomisin gibi ilaçlar için çok yüksek (10^{-3}), isoniazid, streptomisin, etambutol, kanamisin, para-aminosalisilik asit için orta seviyelerde (10^{-6}), rifampisin için en azdır (10^{-8}) (4).

Primer direnç, daha önce hiç tüberküloz ilacı kullanmamış bir hasta da gelişen dirençtir. Bu durum kişinin enfeksiyonu, ilaçlara dirençli basillerle sahip bir hastadan aldığı gösterir. Sekonder direnç ise hatalı tedavi protokollerinin kullanılması veya tedaviye uyumsuzluk gibi nedenlerle tedavi sırasında gelişen dirençtir (2). Tüberküloz kontrol programlarının etkin uygulandığı ülkelerde antitüberküloz ilaçlara primer direnç oranı %5'in altında iken, etkin bir kontrol programının bulunmadığı ülkelerde bu oran %15 ve daha fazladır (2). Türkiye genelinde yapılmış direnç testi sonuçları bulunmamakla birlikte bir veya daha fazla antitüberküloz ilaca karşı primer direnç oranı %14-27, sekonder direnç oranı %37-66 düzeyindedir (2).

İsoniazid

İsoniazid, sentetik yapıda ve çoğalan basiller üzerine bakterisid etkili bir ilaçtır (1). Türkiye'de tek başına isoniazide primer direnç %5-12, sekonder direnç %27-48 olarak saptanmıştır (2). İsoniazid bir ön ilaçtır, katalaz-peroksidaz enzimiyle aktive olur. Katalaz-peroksidaz enzimini kodlayan *katG* genindeki mutasyonlar %60-70 oranında isoniazide karşı yüksek MİK değerli dirençten sorumludur (4). Bu gende en sık görülen Ser 315 Thr mutasyonudur (%40) (4). *KatG* geninde sıklıkla saptanan Arg 463 Leu mutasyonunun polimorfizm olduğu Çin, Rusya ve bazı Asya ülkelerinde isoniazide duyarlı izolatlarda da bulunduğu gösterilmiştir (5).

Mikolik asit biyosentezinde rol alan iki genden enoyl-ACP (acyl carrier protein) reduktaz enzimini kodlayan *inhA* geni (< %10) ve yağ asidi uzamasında önemli olan beta ketoasil ACP sentaz enzimini kodlayan *kas A* genindeki mutasyonlar da isoniazid direncinden sorumlu tutulmuştur (3, 4). Ancak *kasA* geninde mutasyon saptanan izolatlarda aynı zamanda *katG* veya *inhA* genlerinde de mutasyon bulunduğundan

bu genin isoniazid direnciyle ilişkisi şüphelidir (3). Oksidatif strese karşı hücresel cevaptan sorumlu alkil-hidroperoksid reduktaz enzimini kodlayan *ahpC* genindeki mutasyonların da (~%10) dirençten sorumlu olduğu düşünülmüş ancak bu mutasyona da *katG* genindeki mutasyonların eşlik edebildiği görülmüştür (3,4,5).

Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan hem isoniazid hem de rifampisine dirençli 92 *M. tuberculosis* izolatının 52'sinde (%56.5) *katG* geninde Ser 315 Thr mutasyonu, 10'unda (%10.9) *inhA* geninde Thr 209 Met mutasyonu saptanmıştır. Bir izolatta her iki gende de mutasyon bulunmuştur (%1.0) (6). Bu verilere dayanarak Türkiye'de isoniazid direncinden %68.4 oranında *katG* (Ser 315 Thr) ve *inhA* (Thr 209 Met) genlerindeki mutasyonların sorumlu olduğu söylenebilirken, İspanya'da bu oran %62.3 olarak bulunmuştur (7).

Rifampisin

Rifampisin yarısentetik, bakterisidal etkili bir ilaçtır (1). Türkiye'de tek başına rifampisine primer direnç %5-15, sekonder direnç %15-58 olarak saptanmıştır (2).

Bu ilaç DNA'ya bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesine bağlanıp RNA sentezini inhibe ederek etkisini gösterir. Yaklaşık 500 rifampisine dirençli *M. tuberculosis* izolatının %96'sında rifampisin direncinden, RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin 81 bp'lik bölgesindeki (27 kodon, 507-533) mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir (5). En sık görülen ve yüksek MİK değerli dirençten sorumlu mutasyonlar 526 ve 531. kodonlarındadır (%65-86) (3). Düşük MİK değerli rifampisin direnci 511, 516, 518 ve 522. kodonlardaki mutasyonlarla ilişkili bulunmuştur (3). En sık Ser 531 Leu (%42) ve His 526 Tyr (%23) mutasyonları saptanmıştır (5).

Türkiye'den izole edilen hem isoniazid hem de rifampisine dirençli 92 *M. tuberculosis* izolatında *rpoB* genindeki 27 kodonda mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemiyle incelendiğinde suşların %18.5'inde mutasyon bulunamamıştır (6). Benzer şekilde rifampisine dirençli *M. tuberculosis* izolatlarında Almanya'da %33, Sierra Leone'de %8, İspanya'da %8.5 oranlarında *rpoB* geninde mutasyon saptanamamıştır (7, 8). *RpoB* geninde mutasyon bulunamayan izolatlarda rifampisin geçirgenliğinin değişmesi, RNA polimerazın diğer alt ünitelerinde mutasyon gibi diğer muhtemel direnç mekanizmalarının rol oynadığı düşünülmektedir (9).

Türkiye'den toplanan 92 rifampisine dirençli *M. tuberculosis* izolatında en sık mutasyonlar 531. kodonda (%53.3), 526. kodonda (%13) ve 516. kodonda (%6.5) saptanmıştır. En sık görülen amino asit değişikliği Ser 531 Leu (%50) olarak bulunmuştur (6). Çavuşoğlu ve arkadaşları (10) Ege Bölgesinden izole edilen 41 rifampisine dirençli *M. tuberculosis* izolatında benzer şekilde en sık mutasyonları 531. kodonda (%56.1), 526. kodonda (%19.5) saptamış, en sık görülen amino asit değişikliğini Ser 531 Leu (%46.3) olarak bulmuştur.

Etambutol

Etambutol, sentetik yapıda, bakteriyostatik etkili bir ilaçtır (5). Türkiye’de tek başına etambutole primer direnç %1-5, sekonder direnç %2-27 olarak saptanmıştır (2).

Etambutol arabinogalaktan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinozil transferaz enzimiyle etkileşerek *M. tuberculosis*’ in hücre duvarı sentezini bozar (5). Arabinozil transferaz enzimini kodlayan *embCAB* geninde meydana gelen mutasyonlar %70 oranında etambutol direncinden sorumludur (4, 5). Özellikle en sık görülen mutasyonlar %60 oranında *embB* geninin 306. kodonundaki Met aminoasidindeki değişikliğe bağlıdır (4, 5). Yüksek MİK değerli etambutol direnciyle Met 306 ile mutasyonundan ziyade Met 306 Leu, Met 306 Val mutasyonları ilişkili bulunmuştur (4).

Türkiye’den izole edilen etambutole duyarlı 26, dirençli 66 toplam 92 *M. tuberculosis* izolatında reverse hibridizasyon yöntemiyle *embB* geninin 306. kodonundaki mutasyonlar araştırılmıştır. Duyarlı izolatlarda mutasyon bulunmazken dirençli izolatların sadece 19’unda (%29) mutasyon saptanmıştır. Yüksek MİK değerli etambutol direnciyle Met 306 ile ve Met 306 Val mutasyonları ilişkili bulunmuştur (Basılmamış veri). Türkiye’deki etambutole dirençli *M. tuberculosis* izolatlarında farklı bir direnç mekanizmasının rol oynayabileceği düşünülmekle birlikte bu konuda yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir. Rusya’da yapılan bir çalışmada ise *embB306* mutasyonunun etambutole dirençli izolatların %48,3’ünde olmakla birlikte duyarlı izolatların da %31,2’sinde bulunduğu öne sürülmüştür (11).

Pirazinamid

Pirazinamid, sentetik yapıda, bakterisidal etkili bir ilaçtır (1). Türkiye’de tek başına pirazinamide primer direnç %3, sekonder direnç %13 olarak saptanmıştır (2).

M. tuberculosis suşlarının ürettiği pirazinamidaz enzimi, pirazinamidi pirazinik asit denilen aktif şekline dönüştürür. Pirazinamidaz enzimi kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar pirazinamid direncinden %70-100 oranında sorumlu bulunmuştur (5). Yüksek MİK değerli pirazinamid direnci olan ancak *pncA* geninde mutasyon içermeyen izolatlarda başka direnç mekanizmalarının etkili olduğu düşünülmektedir (3). *M. bovis* ve *M. bovis* BCG doğal olarak pirazinamide dirençli olup *pncA* geninin 169. kodonunda C nükleotidinin G nükleotidiyle yer değiştirdiği gösterilmiştir (3).

Türkiye’den izole edilen pirazinamide duyarlı beş *M. tuberculosis* izolatında *pncA* geninde mutasyon bulunmazken, pirazinamide dirençli beş izolat da farklı genotipler saptanmış olup bunlar daha önce literatürde bildirilmemiştir ancak daha fazla *M. tuberculosis* izolatında *pncA* geninin incelenmesi bu konudaki bilgilerimizi arttıracaktır (12).

Streptomisin

Streptomisin, bakterisidal etkili bir aminoglikozittir (1). Türkiye’de tek başına streptomisine primer direnç %7-21, sekonder direnç %12-32 olarak saptanmıştır (2).

Streptomisin bakteri ribozomuna bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Ribozomal protein S12’yi kodlayan *rpsL* genindeki mutasyonlar (%60) ve 16S rRNA’yı kodlayan *rrs* genindeki mutasyonlar (< %10) streptomisin direncinden sorumludur (4). En sık görülen *rpsL* genindeki Lys 43 Arg mutasyonu olup daha nadiren Lys 43 Thr mutasyonu da görülmektedir (4, 5). Bu gende ayrıca Lys 88 Arg veya Lys 88 Gln mutasyonları da saptanmıştır. Bu gendeki mutasyonlar yüksek MİK değerli streptomisin direncinden sorumlu bulunmuştur (5). Streptomisin direncinden sorumlu diğer mutasyonlar *rrs* geninin 530 halkası ve 915 bölgesinde bulunmaktadır. 530 halkasında C 491 T, C 512 T, C 516 T, A 513 C, A 513 T nükleotid değişiklikleri görülmüştür. 915 bölgesinde ise C 903 A, C 903 G, A 904 G nükleotid değişiklik-

leri siktir (5). Victor ve arkadaşları (13) *rrs* genindeki C 491 T değişikliğinin polimorfizm olabileceğini, dirençli olmayan izolatlarda da bulunduğunu öne sürmüşlerdir. Streptomisine karşı düşük değerli MİK direncinin, hücre zarında oluşan değişiklikler sonucu ilacın hücre içine girişinin azalmasıyla olabileceği düşünülmektedir (5).

Kanamisin, Amikasin, Kapreomisin

Kanamisin, amikasin ve kapreomisin protein sentezini inhibe ederek etkilerini gösteren aminoglikozitlerdir (5). Streptomisin ile kanamisin veya amikasin arasında çapraz direnç bulunmazken, kanamisin ve kapreomisin arasındaki çapraz direnç değişkendir. Kanamisin ve amikasine karşı yüksek MİK değerli dirençten *rrs* geninde A 1400 G nükleotid değişikliğinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (5).

Florokinolonlar

Florokinolonların bakterideki hedefi DNA giraz (Topoizomeras II) enzimidir. Bu enzim kromozomal çift sarmallı bakteri DNA’sında reversibl kesme, tekrar bağlama fonksiyonuyla negatif kıvrılmalar yaparak, DNA’yı hücre içine sığdırır (4, 5). DNA giraz enzimi *gyrA* geni tarafından kodlanan iki A alt ve *gyrB* geni tarafından kodlanan iki B alt birimden oluşur. *M. tuberculosis*’in *gyrA* genindeki küçük bir bölgesinde oluşan mutasyonlar yüksek MİK değerli kinolon direncinden sorumlu bulunmuştur (> %90) (4, 5). *GyrA* genindeki Ser 95 Thr mutasyonu polimorfizm olarak değerlendirilmiştir, duyarlı izolatlarda da vardır. Bununla birlikte *gyrB* genindeki mutasyonlar nadirdir, düşük MİK değerli dirençten sorumludur ve fenotipe her zaman direnç olarak yansımamaktadır. Türkiye’den izole edilen ofloksasine duyarlı üç *M. tuberculosis* izolatının ikisinde ve üç dirençli izolatda Ser 95 Thr mutasyonu (polimorfizm) bulunmuştur. Bu dirençli üç izolata ayrıca Ala 90 Val, Asp 94 Gly mutasyonları eşlik etmiştir (14). Diğer bazı yayınlarda da 90. aminoasitteki değişikliğe %27, 95. aminoasitteki değişikliğe %42 oranında rastlanılmıştır (15).

Rifabutin

Rifampisin, rifamisin-B’nin yarı sentetik türevidir, rifabutin ise rifamisinin spiroperidil derivativesidir (5, 16). Etki mekanizması rifampisinle aynıdır. Rifampisin ve rifabutin arasında çapraz direnç oranı yüksektir ve İstanbul’da yapılan bir çalışmada %88, Avustralya’da yapılan diğer bir çalışmada %81 olarak saptanmıştır (16, 17).

RpoB geninin 511, 516 ve 531 kodonlarında meydana gelen mutasyonların bu çapraz dirençle ilgili olduğu düşünülmektedir (18).

Ethionamid

Ethionamid, isoniazidin yapısal analogu olup, *M. tuberculosis*’de mikolik asit biyosentezini inhibe eder (1, 5). Isoniazid ve ethionamid arasında çapraz direnç vardır ve ülkemizden yapılan bir çalışmada bu oran %65,6 olarak bulunmuştur (19).

Ethionamid direncinden *inhA* genindeki mutasyonların sorumlu olduğu düşünülmektedir (1, 5).

KAYNAKLAR

1. Wallace RJ. Antimycobacterial agents. In: Mandell G, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 436-448.
2. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. In: Topcu Willke A, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 396-443.
3. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2: 164-168.
4. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium*

- tuberculosis: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis* 1998; 42: 195-207.
5. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc Lung Dis* 1998; 79:3-29.
 6. Tansel Ö, Brown TJ, Yüksel P, Drobniewski F ve Çalışma Grubu: Özakin C, Avkan Oğuz V, Bayram A, Hoşoğlu S, Saniç A, Gündüçüoğlu H, Albayrak A, Yaylı G. Türkiye'deki çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında *rpoB*, *katG*, *inhA* genlerinde mutasyonların araştırılması. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (30 Mart- 4 Nisan 2003, İstanbul) Kongre Kitabı. 2003.
 7. Torres M J, Criado A, Gonzalez N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 160-163.
 8. Rinder H, Dobner P, Feldmann K, Rifai M, Bretzel G, Rüsç-Gerdes S, Löscher T. Disequilibria in the distribution of *rpoB* alleles in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Germany and Sierra Leone. *Microb Drug Resist* 1997; 3:195-197.
 9. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in *Mycobacteria*: molecular genetic insights. *Clin Microb Rev* 1995; 8: 496-514.
 10. Çavuşoğlu C, Hilmioğlu S, Güneri S, Bilgiç A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4435-4438.
 11. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3810-3813.
 12. Brown TJ, Tansel Ö, French GL. Simultaneous identification and typing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by analyses of *pncA* and *rpoB*. *J Med Microbiol* 2000; 49:651-656.
 13. Victor TC, van Rie A, Jordaan AM, Richardson M, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Warren R. Sequence polymorphism in the *rrs* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is deeply rooted within an evolutionary clade and is not associated with streptomycin resistance. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4184-4186.
 14. Tansel Ö. Ofloksasine dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarında *gyrA* geninde mutasyonların belirlenmesi. Uzmanlık Tezi. 1999.
 15. Delgado MB, Telenti A. Detection of fluoroquinolone resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Persing DH ed. *Selected PCR protocols for emerging infectious diseases*. Washington DC, American Society for Microbiology. 1996;138-143.
 16. Uzun M, Erturan Z, Anç Ö. Investigation of cross-resistance between rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6 :164-165.
 17. Yuen LKW, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3844-3850.
 18. Bodmer T, Zurcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 345-348.
 19. Avkan Oğuz V, Akbal H, Sarıbaş S, Karagöz T, Öztürk R. Edinsel çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının major ve minör antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı. *İnfeks Derg* 2000; 14:383-386.