



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

Özlem Tuncer¹, Orhan Kaya Köksalan², Zeynep Sarıbaş¹

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

²İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tüberküloz Epidemiyolojisi Laboratuvarı

İsoniazid ve Direnç

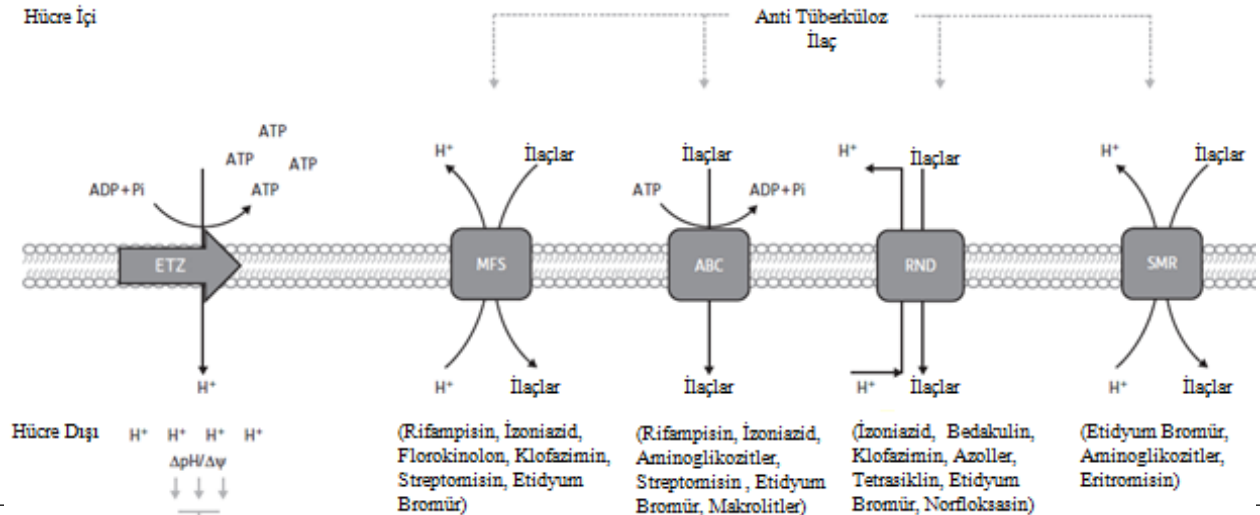
- İsoniazid → Tüberküloz tedavisinde primer ilaç
- İsoniazid direnci; *katG*, *inhA*, *ahpC*.....gen bölgesi mutasyonları
- Tüm isoniazid dirençli izolatlarının yaklaşık %20-30 kadarında dirençle ilgili bilinen genlerde mutasyonlara rastlanmamıştır
- Dirençle ilgili başka mekanizmalar????
- Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan mekanizma;

Dışa atım pompalarının varlığı

- Pompa ilişkili genlerin gösterilmesi
- mRNA ekspresyonlarının incelenmesi
- Etidyum bromür atılımının gösterilmesi
- **Pompa inhibitörleri** ile direnç fenotipindeki değişikliğin izlenmesi

Dışa atım pompa inhibitörleri

- Atım pompasının enerji kaynağı kesilerek
- Doğrudan pompanın bloke edilmesi



AMAÇ

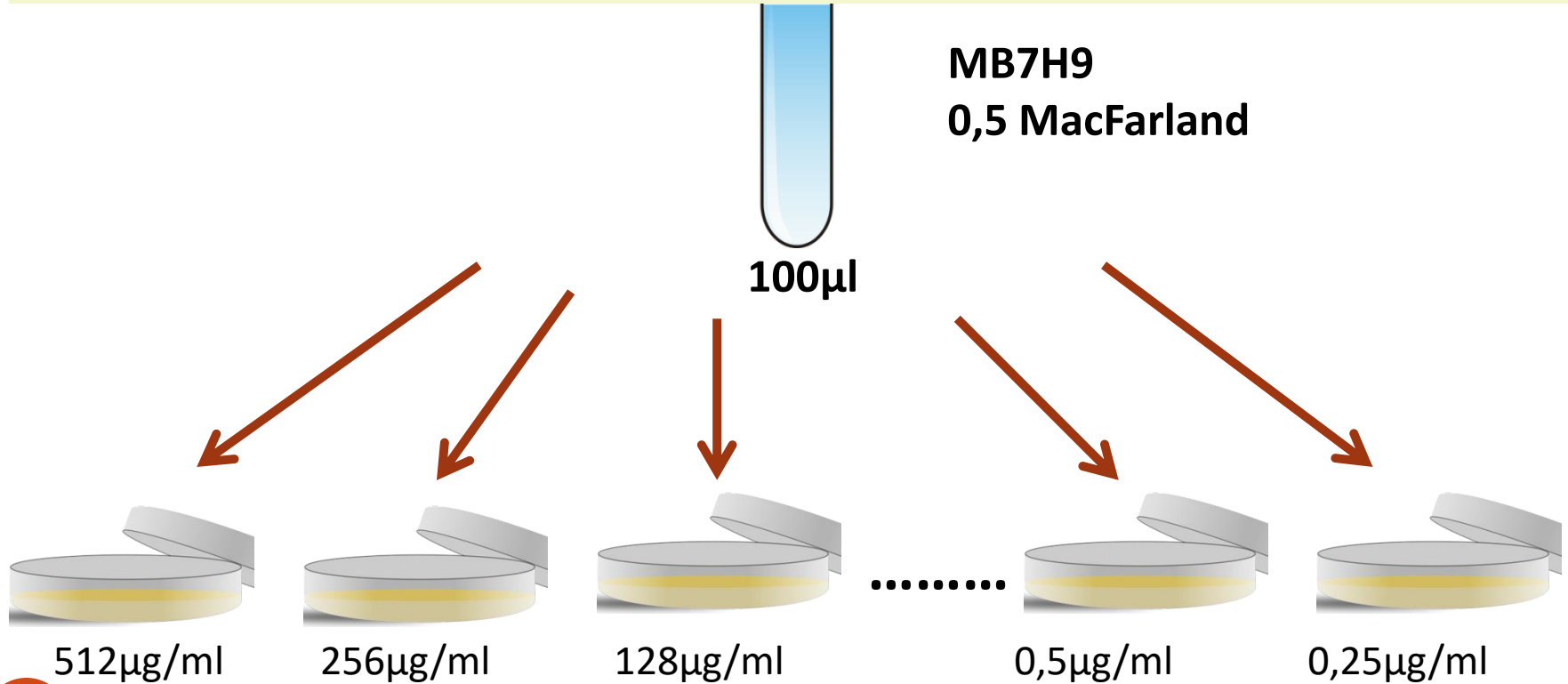
- İsoniazid dirençli *M. tuberculosis* izolatlarında atım pompalarının varlığının araştırılması,
- Pompa inhibitörleri kullanarak yüksek izoniazid MİK değerlerinin düşürülebilirliğinin gözlenmesi
- Tüberküloz tedavisinde oldukça önemli olan izoniazidin tekrar kullanılabilme potansiyelini saptamak;

GEREÇ ve YÖNTEM

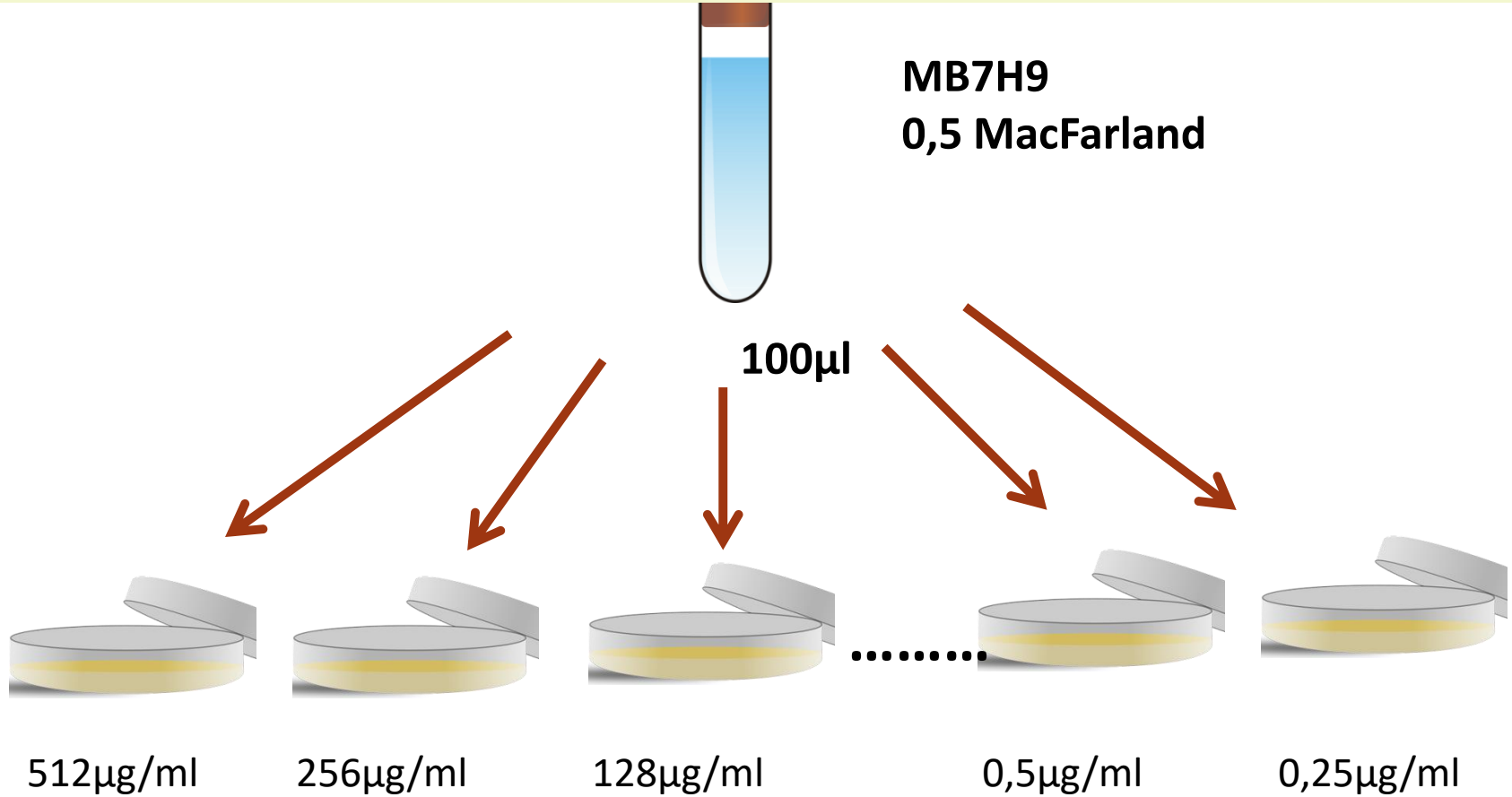
1. İzoniazid MİK değerlerinin saptanması
2. Pompa inhibitörleri varlığında izoniazid MİK değerlerinin saptanması
3. Etidyum bromür boyası kullanılarak atım pompalarının varlığının gösterilmesi
4. DNA dizi analizi ile *katG* ve *inhA* mutasyonlarının araştırılması

- 50 adet izoniazid dirençli *M. tuberculosis* kompleks klinik izolatu

1. İzoniazid ve pompa inhibitörlerinin (Klorpromazin, Verapamil ve Rezerpin) MİK değerlerinin saptanması

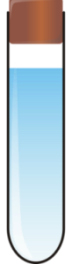


2. Pompa inhibitörleri (Klorpromazin, Verapamil, Rezerpin) varlığında İzoniazid MİK değerlerinin saptanması



Inhibitörler MİK değerlerinin $\frac{1}{4}$ 'ü olacak şekilde eklendi.

3. Etidyum bromür boyası kullanılarak atım pompalarının varlığının gösterilmesi



4 ml MB7H9
0,5 MacFarland
EtBr
Glukoz



4 ml MB7H9
0,5 MacFarland
EtBr
Glukoz
inhibitör (Mik ½)

- 1 saat 37 °C'de inkübasyon
10 dk 5000g'de santrifüj

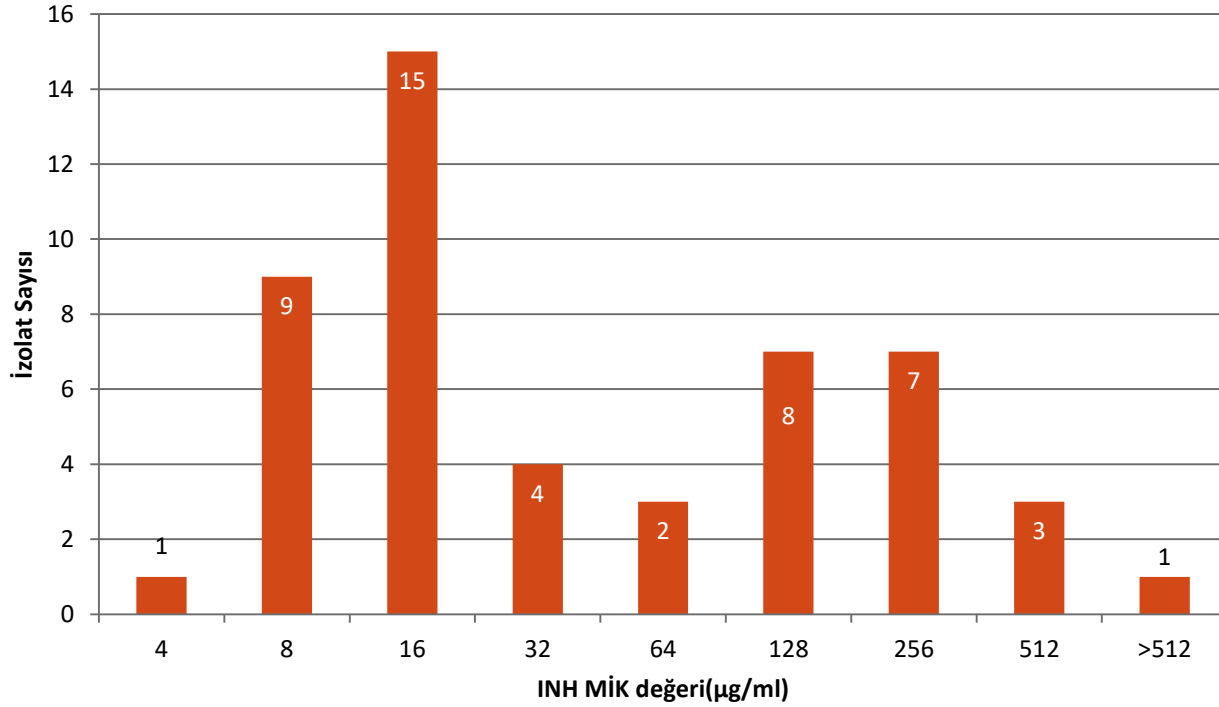


4. DNA dizi analizi ile *katG* ve *inhA* mutasyonlarının araştırılması

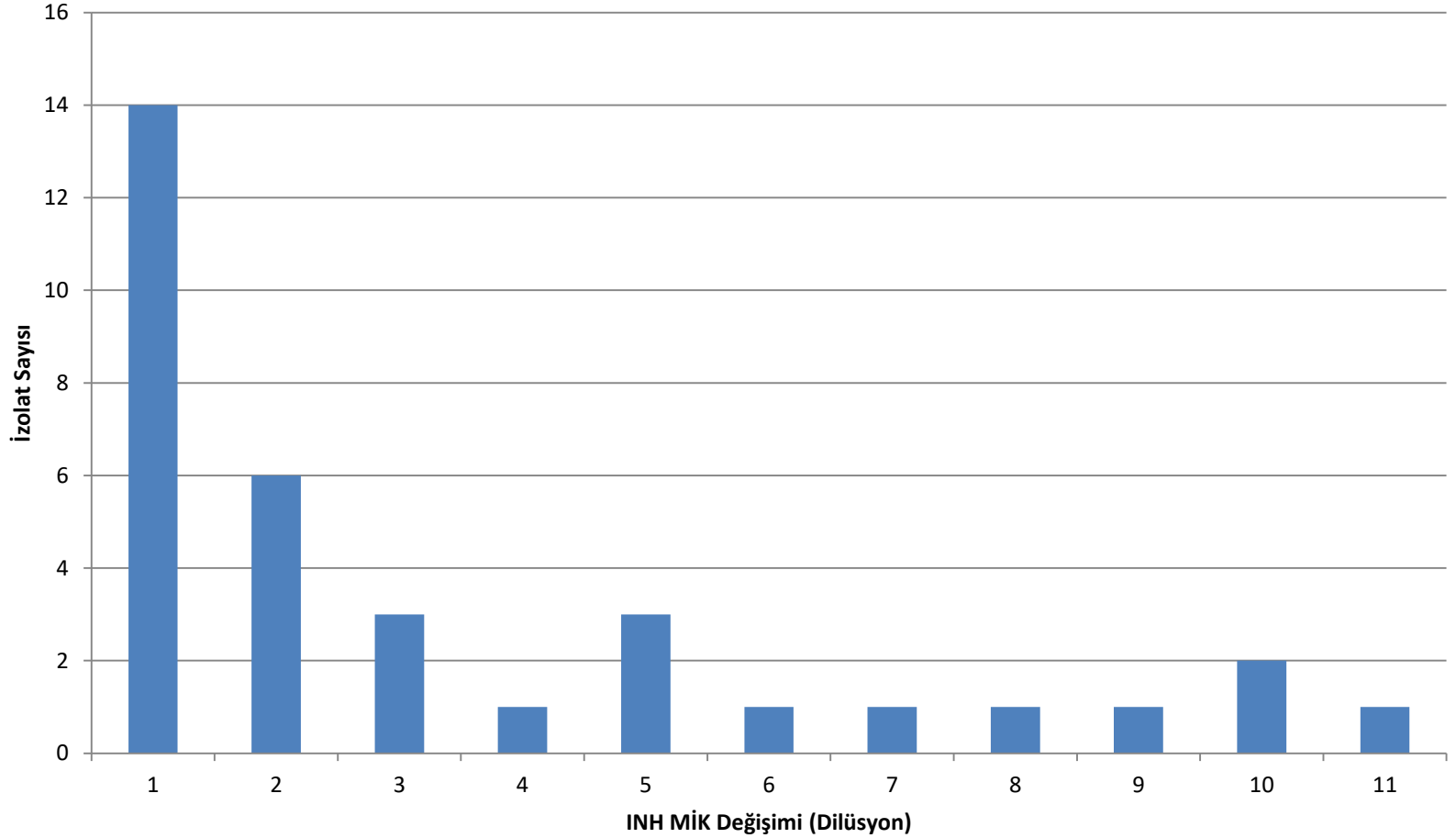
1. Ekstraksiyon
2. PCR
3. PCR ürünlerinin saflaştırılması (pürifikasyon)
4. DTCS (dye terminator cycle sequencing)
5. Sekans öncesi saflaştırma (pürifikasyon)
6. Analiz

BULGULAR

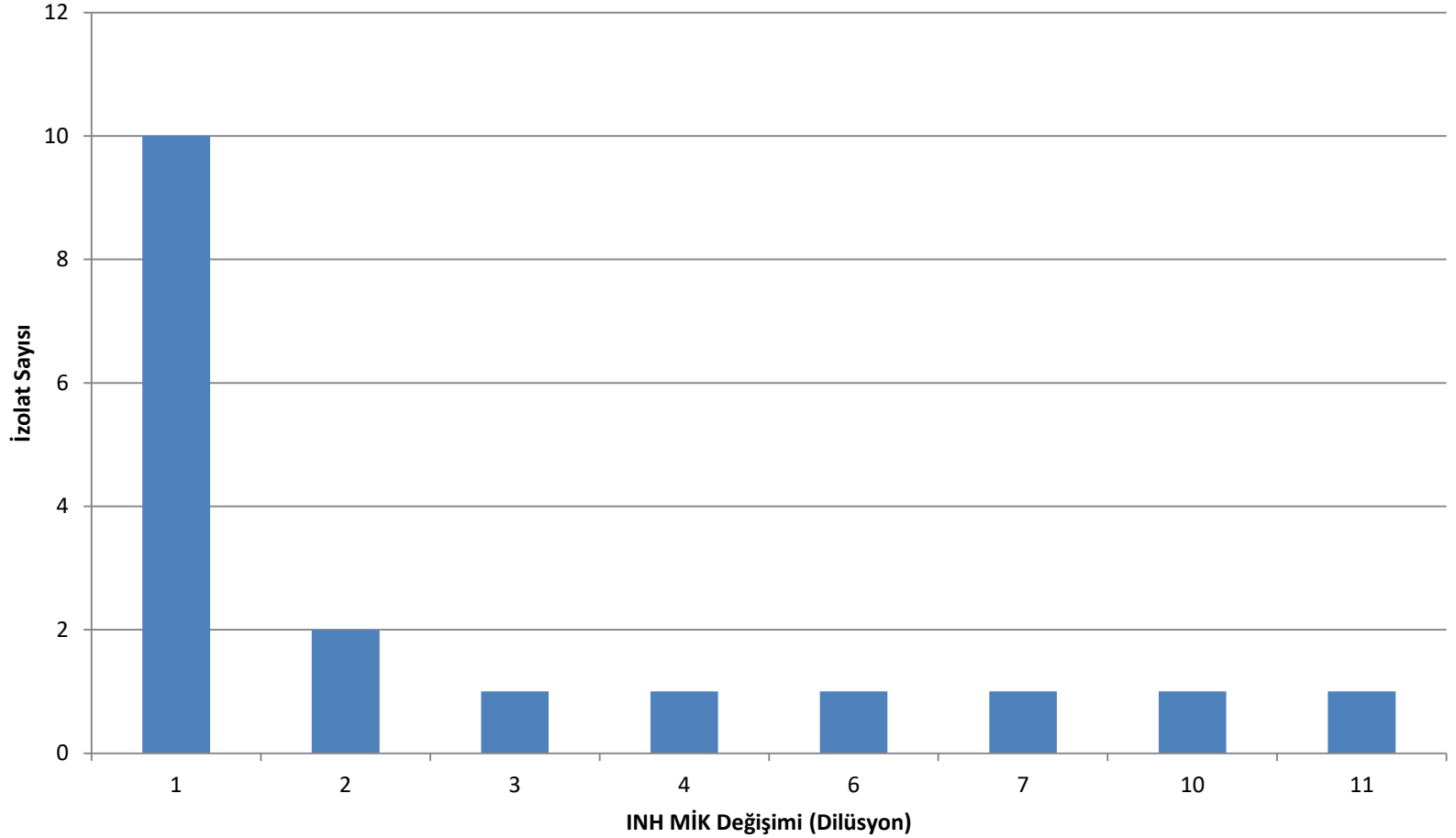
1. İzoniazid MİK sonuçları



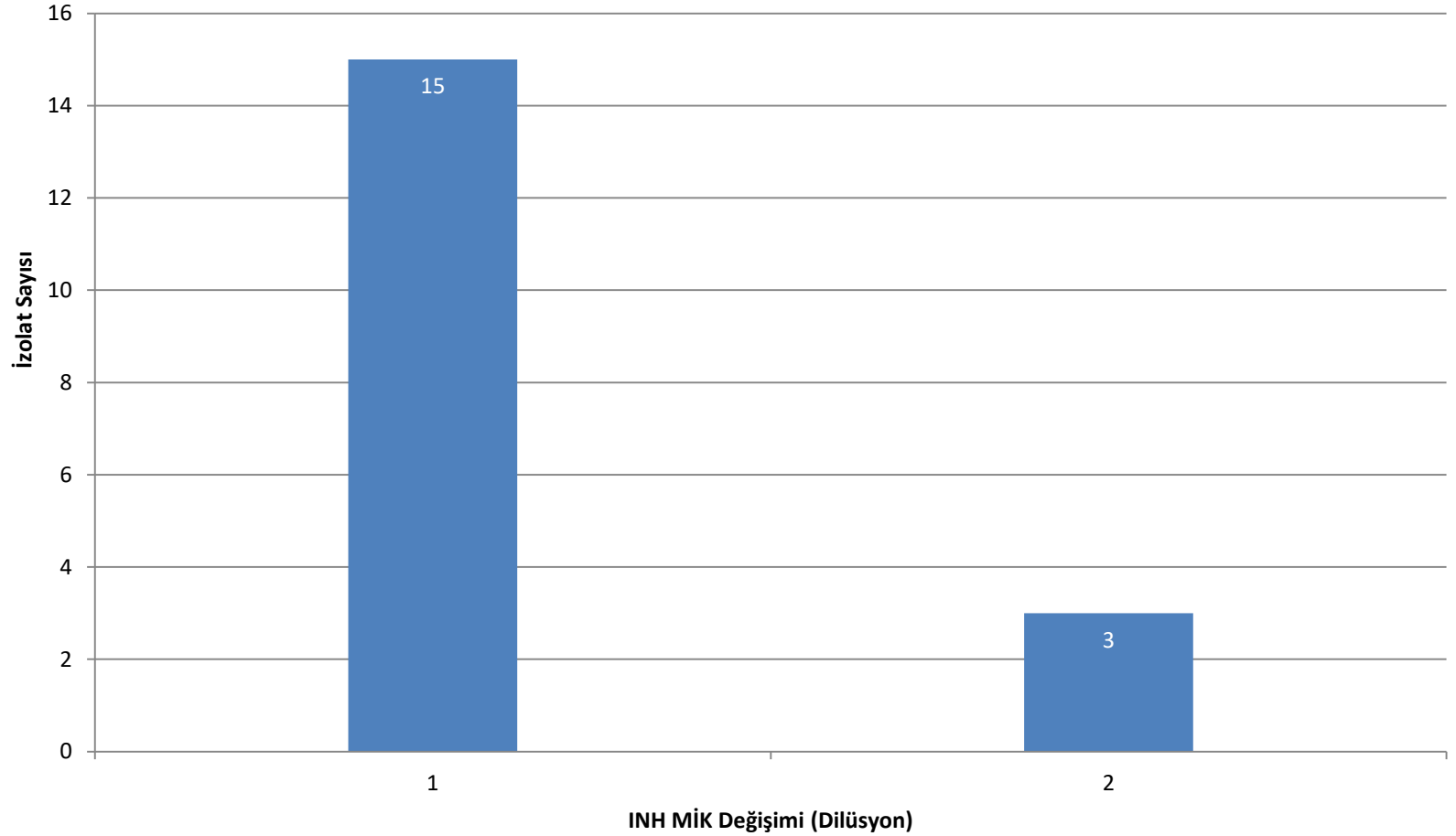
2. İzoniazid ve klorpromazin kombinasyonunun MİK sonuçları



3. İzoniazid ve verapamil kombinasyonunun MİK sonuçları

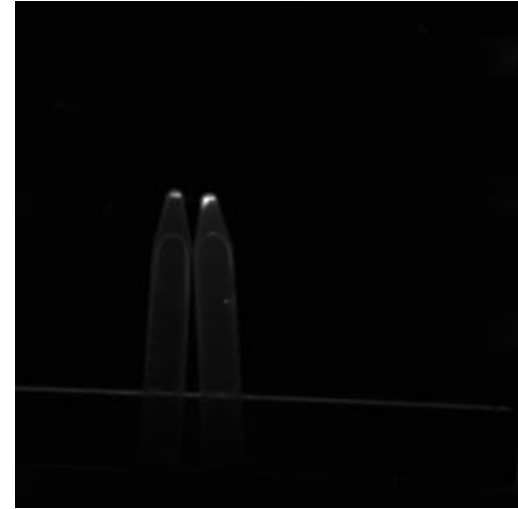


4. İzoniazid ve rezerpin kombinasyonunun MİK sonuçları



5. İzoniazid MİK değeri ≥ 2 dilüsyon değışen izolatlarda EtBr floresans sonuçları

- 21 izolat ≥ 2 dilüsyon
- 11 izolat görsel olarak pozitif



6. DNA dizi analizi sonuçları

katG

29 izolat

Ser315Thr AGC-ACC (28)

Ser315Asn AGC-AAC (1)

inhA

7 izolat

-15C→T (6)

-8T→A (1)

katG* ve *inhA

14 izolat

Ser315Thr AGC-ACC (14)

-15C→T (13)

-8T→C (1)

TARTIŞMA

Dışa atım pompaları ve dirençle ilişkili çalışmalarda;

- Laboratuvar mutanları suşları
- *M. smegmatis*
- Gen bölgelerinin gösterilmesi,
- Pompa inhibitörleri ile direnç fenotipinde değişiklik,
- EtBr atılımının pompa inhibitörü varlığında inhibisyonu

- *M. tuberculosis* klinik izolatları ile az,
- Dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatlarıyla ise çok daha az sayıda çalışma mevcut
- Atım pompaları-direnç ilişkisi ve pompa inhibitörlerinin etkinliğini ve mekanizmaları anlamak için klinik izolatlarla yapılacak çalışmalara ihtiyaç var

- **Pompa inhibitörlerinin izoniazid MİK'lerine etkisi**

- 34 izolatta (%68) klorpromazin ile,
 - 18 izolatta (%36) verapamil ile,
 - 18 izolatta (%36) rezerpin ile
- İzoniazid MİK değerinde ≥ 1 dilüsyon düşme saptandı.

- **EtBr floresansının değerlendirilmesi**

- 21 izolatta inhibitör varlığında MİK'te ≥ 2 dilüsyon düşme
- 11 izolatta gözle görülür belirgin şekilde floresans azalması saptandı.

- **DNA dizi analizi sonuçları**

- 29 izolatta (%58) *katG*,
- 7 izolatta (%14) *inhA*,
- 14 izolatta (%28) *katG* ve *inhA* mutasyonu birlikte saptandı.

- Türkiye'den Çalgın'ın tez çalışmasında 10'ar adet çoklu ilaç dirençli ve duyarlı *M. tuberculosis* klinik izolatlarında;
 - *Rv1410c (p55), Rv2333c, drrA, drrB, mmpL4, mmpL7, Rv1258c, iniA (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c* ve *Rv3000* genlerinin ekspresyon miktarları
 - Duyarlı ve dirençli izolatlar arası belirgin fark saptanmamış

- Li ve ark. (2015) : 10 adet duyarlı-9 adet INH ve rifampisin dirençli *M. tuberculosis* klinik izolatında;
 - INH ve rifampisin MİK saptanması
 - CCCP ve rezepin ile MİK değişimleri
 - INH ve rifampisin direnciyle ilişkili *katG, inhA, oxyR-ahpC, rpoB* bölge mutasyonları
 - 20 farklı atım pompasının ekspresyonları araştırılmış.
- 9 izolattan 8'inde INH ile ilgili en az 1 mutasyon
- 6 izolatta rezepin ile,
- 4 izolatta CCCP ile INH MİK'inde belirgin düşme
- Dirençli izolatlarda daha fazla pompa geni ekspresyon artışı
- INH MİK'i ≥ 4 kat düşenlerde daha fazla sayıda pompa geni ekspresyonu mevcut

- **Çalışmamızda** ; bütün INH dirençli izolatlarda en az bir mutasyon varlığı saptandı.
- Bu sonuçlar da, ilaçla maruziyet başladıktan itibaren atım pompalarının direnç gelişimi üzerine etkili olmaya başladıklarını ve kromozomal mutasyonlar geliştikten sonra da etkinliklerinin devam ettiğini düşündürmektedir.

- Klinik izolatlarla daha geniş sayıda ve daha kapsamlı çalışmaların, hem atım pompalarının daha iyi anlaşılmasını hem de tedavide kullanılabilir bir hedef olmalarını sağlayarak ; hala önemli bir halk sağlığı sorunu olan tüberkülozun tedavisi için oldukça faydalı bilgiler sağlayacağına inanılmaktadır.

Teşekkürler...

- Çoğu çalışmada laboratuvar ortamında dirençli hale getirilen suşlar
- Klinik izolatlarla yapılan araştırmalar daha az sayıda izolat içerirken
- **Çalışmamızda** 50 adet INH dirençli klinik izolat çalışıldı.

- Farklı pompa inhibitörleri ile araştırmalar mevcut olsa da, genellikle verapamil ve rezerpin ile ilgili çalışmalar daha fazla görünmekte ve direnç üzerine bu inhibitörler daha etkili bulunmuş.
- **Çalışmamızda** ise klorpromazin belirgin olarak daha fazla izolat üzerinde etkili bulunmuş.
- Uzun antibiyotik tedavisi ve zorlu koşullar altında mikobakterilerin enerji sağlamak üzere ETZ'lerinde birtakım değişiklikler olduğu ve
- Anaerobik bu koşullarda ETZ'de daha aktif olan NDH2 ve SDH enzimlerinin fenotiyazinler ve valinomisin gibi ilaçlar tarafından etkilendiği bildirilmekte
- Bu açıdan bakıldığında, sonuçlarımız bu bilgileri destekler nitelikte ve beklenen şekilde bulunmuştur

- Pompa inhibitörlerinin etkinliğine, gen ekspresyonlarına bakılması ve dirençle ilgili kromozomal mutasyonlara bakılması ile Li ve ark. (2015)'nin çalışması oldukça kapsamlı
- 9 izolattan 8'inde kromozomal mutasyon olduğunu saptamışlar
- **Çalışmamızda** ; benzer şekilde bütün INH dirençli izolatlarda en az bir mutasyon varlığı saptandı.
- Bu sonuçlar da, ilaçla maruziyet başladıktan itibaren atım pompalarının direnç gelişimi üzerine etkili olmaya başladıklarını ve kromozomal mutasyonlar geliştikten sonra da etkinliklerinin devam ettiğini düşündürmektedir/göstermektedir.

- Klinik izolatlarla daha geniş sayıda ve daha kapsamlı çalışmaların, hem atım pompalarının daha iyi anlaşılmasını hem de tedavide kullanılabilir bir hedef olmalarını sağlayarak ; hala önemli bir halk sağlığı sorunu olan tüberkülozun tedavisi için oldukça faydalı bilgiler sağlayacağına inanılmaktadır.