

ÇOK İLACA DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KLİNİK İZOLATLARINA KARŞI LİNEZOLİDİN İZONİAZİD VE RİFAMPİSİN İLE KOMBİNE ETKİSİ

EFFECT OF LINEZOLID IN COMBINATION WITH ISONIAZID AND RIFAMPICIN AGAINST MULTIDRUG RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES

Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Kemal BİLGİN¹, Meltem UZUN², Belma DURUPINAR¹

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun. cobanay2003@yahoo.com.tr

² İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Tüberküloz dünyada ciddi bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşları tüberküloz kontrolü için çok ciddi problemler oluşturduğundan yeni ve daha etkili kemoterapötik ajanlara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, çok ilaca dirençli 10 *M. tuberculosis* klinik izolatına karşı linezolidin tek başına ve izoniazid ve rifampisin ile kombine etkilerinin dama tahtası (checkerboard) yöntemiyle in vitro olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, %10 oleik asit-albümün-dekstroz-katalaz içeren Middlebrook 7H9 buyyon kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Antibiyotik kombinasyonları, linezolid için 4-0.06 µg/ml ve izoniazid ile rifampisin için 32-0.03 µg/ml konsantrasyonlarda test edilmiştir. Sonuçlar, fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FKİ) indeksi hesaplanarak değerlendirilmiştir. Çalışılan tüm klinik izolatlar linezolide duyarlı (2 izolat için MİK= 0.25 µg/ml, 8 izolat için MİK= 0.5 µg/ml) bulunmuştur. Rifampisin MİK değerleri tüm izolatlarda > 32 µg/ml iken, izoniazid MİK değerleri 2 izolat için 4 µg/ml, 6 izolat için 8 µg/ml ve birer izolat için 16 µg/ml ve 32 µg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, yalnızca bir izolat için linezolid ve izoniazid arasında sinerjistik etki saptanmış (FKİ indeksi: 0.265), linezolid ve rifampisin kombinasyonunda sinerjistik etki bulunmamıştır. Sonuçlarımız, linezolid ile izoniazid (bir izolat hariç) ve rifampisin arasında sinerji olmadığını vurgulamakla birlikte daha fazla sayıda izolatı içeren ileri in vitro ve in vivo çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

Anahtar sözcükler: Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis*, linezolid, kombinasyon.

ABSTRACT

Tuberculosis continues to be a serious public health problem worldwide. Since multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* constitutes a serious problem in tuberculosis control, new and more effective chemotherapeutic agents are required. This study was aimed to investigate the in vitro effect of linezolid alone and in combination with isoniazid and rifampicin against 10 multidrug resistant *M. tuber-*

culosis isolates by using the checkerboard method. Checkerboard testing was performed by the broth microdilution method, using Middlebrook 7H9 broth with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase. Antibiotic combinations were tested at concentrations of 0.06-4 µg/ml for linezolid and 0.03-32 mg/ml for isoniazid and rifampicin. The results were evaluated according to the calculated fractional inhibitory concentration (FIC) index. All clinical isolates were found to be susceptible to linezolid; MICs of linezolid were 0.25 µg/ml for two strains and 0.5 µg/ml for the other strains. While rifampicin MIC values were > 32 µg/ml for all the isolates, isoniazid MIC values were 4 µg/ml for two isolates, 8 µg/ml for six isolates, 16 µg/ml for one isolate and 32 µg/ml for one isolate. In this study, synergism was detected in only one strain between linezolid and isoniazid (FIC index: 0.265). Although synergy was observed between linezolid and isoniazid just for one strain, further larger scale in vitro and in vivo studies are necessary to evaluate the effect of different drug combinations against multidrug-resistant *M.tuberculosis* strains.

Key words: Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, linezolid, combination.

GİRİŞ

Tüberküloz dünyada ciddi bir sağlık problemi olmaya devam eden önemli bir hastalıktır. Duyarlı tüberküloz izolatlarına karşı tedavide isoniazid, rifampisin, pirazinamid ve etambutol veya streptomisinden oluşan 4 ilaçlı bir kombinasyon kullanılır. Son zamanlarda artan çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatları tüberküloz kontrolünde ciddi bir problemdir. Bu suşlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde yeni ve daha etkili terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır^{1,2}.

Oksazolidinonlar protein sentezini inhibe eden yeni bir antibiyotik sınıfıdır ve sınıfın ilk üyesi linezolidir. Linezolid, metisiline ve vankomisine dirençli stafilokoklar, vankomisine dirençli enterokoklar, penisiline dirençli pnömokoklar ve anaeroplara içeren geniş bir gram-pozitif bakteri grubuna etkilidir³. Yapılan çalışmalarda linezolidin hem duyarlı hem de çok ilaca dirençli *M.tuberculosis* izolatlarına karşı çok iyi bir etkinliğe sahip olduğu da gösterilmiştir⁴⁻⁷.

Bu çalışmada, çok ilaca dirençli *M.tuberculosis* izolatlarına karşı linezolidin tek başına ve isoniazid ve rifampisin ile kombine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, çok ilaca dirençli 10 *M.tuberculosis* klinik izolatu alındı (Tablo I). Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş taze kültürlerden 4-5 koloni alınarak içerisinde 4-5 ml 7H9 buyyonu ve 8-10 adet steril cam boncuk içeren tüplere konuldu. Tüpler vorteksenerek kolonilerin homojen olarak dağılması sağlandı. Daha sonra oluşabilecek aerosol ve büyük parçacıkların çökmesi için tüpler oda ısısında 20 dakika bekletildi. Süpernatant steril bir tüpe aktararak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı ve standart inokulum olarak kullanıldı.

Dama tahtası (checkerboard) testi, önceden tanımlandığı gibi buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı⁸⁻¹⁰. Besiyeri olarak %10 oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC) içeren Middlebrook 7H9 buyyonu kullanıldı. Antibiyotik kombinasyonları linezolid (Pfizer) için 4-0.06 µg/ml ve isoniazid (Sigma) ile rifampisin (Sigma) için 32-0.03 µg/ml konsantrasyonlarda test edildi. Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FİK) indeksi şu formüle göre hesaplandı: [B ilacı ile kombinasyonda A ilacının minimum inhibitör konsantras-

Tablo I. *Mycobacterium tuberculosis* Klinik İzolatlarının Direnç Profilleri

İzolat No	Streptomisin	İzoniazid	Rifampisin	Etambutol
1	S	R	R	S
2	S	R	R	S
3	S	R	R	S
4	S	R	R	S
5	S	R	R	S
6	S	R	R	S
7	S	R	R	R
8	R	R	R	S
9	R	R	R	R
10	S	R	R	R

S: Duyarlı, R: Dirençli.

yonu (MİK)/A ilacının MİK'i) + [A ilacı ile kombinasyonda B ilacının MİK'i/B ilacının MİK'i]. FİK indeksi ≤ 0.5 ise sinerjistik, $> 0.5 - \leq 4.0$ ise aditif veya indiferans, > 4.0 ise antagonist olarak değerlendirildi⁸.

BULGULAR

Çalışılan izolatların izoniazid, linezolid ve rifampisin MİK değerleri Tablo II ve III'de görülmektedir. Linezolidin kritik konsantrasyonu 1 µg/ml olarak kabul edilmiş¹¹ ve tüm izolatların linezolide duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo II). Linezolid ile izoniazid arasında yalnızca bir izolatta sinerjistik etki saptanırken, rifampisin ile kombinasyonda sinerjistik etki gözlenmemiştir (Tablo II,III).

Tablo II. Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarına Karşı Linezolidin Tek Başına ve İzoniazid ile Kombine Etkileri

İzolatlar	İzoniazid MİK (µg/ml)		Linezolid MİK (µg/ml)		FİK indeksi	Sonuç
	Tek başına	Linezolidle kombine	Tek başına	İzoniazidle kombine		
1	8	4	0.5	0.25	1	Add/ind
2	16	4	0.5	0.25	0.75	Add/ind
3	8	2	0.25	0.25	1.25	Add/ind
4	4	1	0.25	0.25	1.25	Add/ind
5	4	4	0.5	0.25	1.5	Add/ind
6	32	0.5	0.5	0.125	0.265	Sinerjistik
7	8	8	0.5	0.25	1.5	Add/ind
8	8	2	0.5	0.25	0.75	Add/ind
9	8	4	0.5	0.25	1	Add/ind
10	8	4	0.5	0.25	1	Add/ind

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, Add: Aditif, Ind: İndiferans.

Tablo III. Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarına Karşı Linezolidin Tek Başına ve Rifampisin ile Kombine Etkileri

İzolatlar	Rifampisin MİK (µg/ml)		Linezolid MİK (µg/ml)		FİK indeks	Sonuç
	Tek başına	Linezolidle kombine	Tek başına	Rifampisinle kombine		
1	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
2	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
3	> 32	> 32	0.25	0.25	2	Add/ind
4	> 32	> 32	0.25	0.125	1.5	Add/ind
5	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
6	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
7	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
8	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
9	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind
10	> 32	> 32	0.5	0.5	2	Add/ind

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, Add: Aditif, Ind: İndiferans.

TARTIŞMA

Duyarlı ve dirençli *M.tuberculosis* klinik izolatlarına karşı linezolidin etkinliğini göstermek amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Alcalá ve arkadaşları⁵ 117 *M.tuberculosis* izolatının linezolid MİK değerlerini ≤ 0.125 -1 µg/ml arasında bildirirken, Rodríguez ve arkadaşları⁴ 240 izolat için bu değerleri 0.06-1 µg/ml arasında saptamış, 3 izolatta ise > 16 µg/ml olarak rapor etmişlerdir. Tato ve arkadaşları⁷ 55 *M.tuberculosis* izolatına karşı linezolid MİK değerlerini 0.12-0.5 µg/ml arasında tespit etmişlerdir. Richter ve arkadaşları¹², çok ilaca dirençli 210 *M.tuberculosis* izolatının 4'ünün linezolide dirençli olduğunu bulmuşlar; MİK değerini bir izolatta 4 µg/ml 3 izolatta ise 8 µg/ml olarak saptamışlardır. Buna karşın Erturan ve Uzun⁶, çok ilaca dirençli tüm izolatlarının ≤ 8 µg/ml linezolid konsantrasyonunda inhibe olduğunu bildirmektedir. Bizim çalışmamızda da, çok ilaca dirençli tüm izolatlar linezolide duyarlı olarak saptanmıştır (Tablo II).

Fare modelinde yapılan bir çalışmada, etionamidin moksifloksasinin aktivitesini artırdığı belirlenirken, linezolid ve test edilen diğer ilaçların (sikloserin, tiyasetazon, kapreomisin, para-aminosalisilik asit) moksifloksasinin etkisini artırmadığı saptanmıştır¹. Sood ve arkadaşları¹³ *M.tuberculosis* ile enfekte makrofajları geniş spektrumlu yeni bir oksazolidinon ile karşılaştırdıklarında, 8 µg/ml'de canlı bakteri sayısının 200 kattan daha fazla azaldığını göstermişlerdir. Fortun ve arkadaşları¹⁴ da, çok ilaca dirençli *M.tuberculosis* ile enfekte 5 hastada linezolid içeren kombinasyon rejimleri ile tedavi deneyimlerini rapor etmişler ve bu hastaların tedavisinde linezolidin alternatif bir ilaç olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bir kombinasyon çalışmasında, izoniazide duyarlı 10 izolatın üçünde linezolid ile izoniazidin sinerjistik etki gösterdiği, ancak izoniazide dirençli izolatlarda bu etkinin gözlenmediği ifade edilmiştir¹⁵. Rifampisin ile linezolid kombine edildiğinde de, ri-

fampisine duyarlı 15 izolatın 5'inde sinerjistik etki saptanırken dirençli izolatlarda bu etki saptanmamıştır¹⁵.

Bizim çalışmamızda, yalnızca bir izolatta linezolid ile izoniazid arasında sinerjistik etki belirlenmiş, rifampisin ile linezolid kombinasyonunda sinerji tespit edilmemiştir. Linezolid ile kombinasyonda izoniazid MİK'leri 2 izolatta değişmezken, 8 izolatta 2-64 kat arasında bir azalma göstermiş; izoniazid ile kombinasyonda linezolid MİK'leri de 2 izolatta değişmezken, diğerlerinde 2-4 kat azalma göstermiştir (Tablo II). Linezolid ile kombinasyonda rifampisin MİK'lerinde herhangi bir değişme saptanmamış; rifampisin ile kombinasyonda linezolid MİK'leri yalnızca bir izolatta 2 kat azalırken diğerlerinde değişiklik gözlenmemiştir (Tablo III). Sonuç olarak, linezolid ile izoniazid ve rifampisin arasındaki etkileşim ile ilgili daha fazla sayıda izolatın çalışıldığı kapsamlı in vitro ve in vivo çalışmalara gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Fattorini L, Tan D, Lona E, et al. Activities of moxifloxacin alone and in combination with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 360-2.
2. Shoen CM, De Stefano MS, Sklaney MR, et al. Short-course treatment regimen to identify potential antituberculous agent in a murine model of tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 641-5.
3. Bozdoğan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activities, mode of action, and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 113-9.
4. Rodriguez JC, Ruiz M, Lopez M, et al. In vitro activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 464-7.
5. Alcalá L, Ruiz-Serrano MJ, Turegano CP, et al. In vitro activities of linezolid against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* that are susceptible or resistant first-line antituberculous drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 416-7.
6. Erturan Z, Uzun M. In vitro activity of linezolid against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 78-80.
7. Tato M, de la Pedrosa EG, Canton R, et al. In vitro activity of linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* complex, including multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 75-8.
8. Koneman EW, Allen AD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC (eds). *Antimicrobial Susceptibility Testing*, pp: 841-4. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology: 1997*, 5th ed. Lippincott Co. Philadelphia.
9. Leite CQF, Berette ALRZ, Anno IS, et al. Standardization of broth microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 127-9.
10. Coban AY, Birinci A, Ekinci B, et al. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by the broth microdilution method with 7H9 broth. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 111-3.
11. Rüşch-Gerdes S, Pfyffer GE, Casal M, et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 688-92.
12. Richter E, Rüşch-Gerdes S, Hillemann D. First linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1534-6.
13. Sood R, Rao M, Singhal S, et al. Activity of RBx 7644 and RBx 8700, new investigational oxazolidinones, against *Mycobacterium tuberculosis* infected murine macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 464-8.
14. Fortun J, Martin-Davila P, Navas E, et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 180-5.
15. Diaz JCR, Ruiz M, Lopez M, et al. Synergic activity of fluoroquinolones and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 354-6.