

Bir Bitki Ekstresi Olan Ankaferd Blood Stopper®'in *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarına Karşı İn Vitro Etkinliği

In Vitro Effect of Ankaferd Blood Stopper®, a Plant Extract Against *Mycobacterium tuberculosis* Isolates

Aydın DEVECİ¹, Ahmet Yılmaz ÇOBAN², Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI², Özlem ACİCBE¹, Nuriye TAŞDELEN FİŞGIN¹, Alper AKGÜNEŞ³, Düzgün ÖZATLI⁴, Meltem UZUN⁵, Belma DURUPINAR²

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

¹ Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Samsun, Turkey.

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

² Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.

³ Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Samsun.

³ Samsun Chest Diseases Hospital, Clinical Microbiology Laboratory, Samsun, Turkey.

⁴ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Samsun.

⁴ Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Hematology Unit, Samsun, Turkey.

⁵ İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ Istanbul University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 24.07.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.09.2012

ÖZET

Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarının tedavisi, toksik yan etkileri olan antitüberküloz ilaçların kombinasyonunu gerektirdiğinden, güvenli ve etkili yeni ilaçlara gereksinim vardır. *Alpinia officinarum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Thymus vulgaris*, *Urtica dioica* ve *Vitis vinifera* bitki ekstraktlerinin bir karışımı olan Ankaferd Blood Stopper® (ABS), homeostatik ve antibakteriyel etkilere sahiptir. Ülkemizde ABS'nin standart solüsyonları, travmatik veya cerrahi sonrası kanama kontrolü amacıyla topikal olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *M. tuberculosis* izolatlarına karşı ABS'nin in vitro antitüberküloz etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 57 klinik izolat [17'si çok ilaca dirençli (ÇİD), biri izoniazid (INH) ve streptomisin (STR)'e dirençli, 11'i sadece INH'e dirençli, ikisi sadece STR'e dirençli, ikisi sadece etambutol (ETM)'e dirençli, 24'ü bütün ilaçlara duyarlı] ve üç standart suş [H37Rv (bütün ilaçlara duyarlı), ATCC 35822 (INH'e dirençli), ATCC 35820 (STR'e dirençli)] dahil edilmiştir. ABS MKK değerleri agar dilüsyon

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kurupelit, Samsun, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 362 457 6070, **E-posta (E-mail):** cobanay2003@yahoo.com.tr

yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda, bütün ilaçlara duyarlı *M. tuberculosis* H37Rv suşu için ABS MLK değeri 10.94 µg/ml olarak belirlenirken, INH dirençli ATCC 35822 ve STR dirençli ATCC 35820 suşları için 21.88 µg/ml olarak saptanmıştır. Klinik izolatlar dikkate alındığında; duyarlı 24 suşun 17'sinde ABS MLK değeri 10.94 µg/ml, altısında 21.88 µg/ml ve birinde < 1.37 µg/ml; ÇİD 17 suşun ise birinde 5.47 µg/ml, beşinde 10.94 µg/ml ve 11'inde 21.88 µg/ml olarak bulunmuştur. Sadece INH direnci olan 11 izolatın MLK değerleri < 1.37-21.88 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir. Yalnızca STR'ye dirençli iki izolatın MLK değerleri 21.88 µg/ml; yalnızca ETM'e dirençli iki izolatın MLK değerleri de 21.88 µg/ml ve 10.94 µg/ml olarak saptanmıştır. Hem INH hem de STR direnci olan bir izolatın MLK değeri ise 21.88 µg/ml olarak izlenmiştir. Test edilen bakterilerin MLK₅₀ ve MLK₉₀ değerleri sırasıyla 10.94 µg/ml ve 21.88 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, ABS'nin topikal olarak kullanılan solüsyonunun yaklaşık 16 kat dilüe edilmiş konsantrasyonu, tüberküloz basillerine karşı in vitro olarak etkili bulunmuş ve bu sonuç ABS'nin kütanöz tüberkülozda, özellikle ÇİD *M. tuberculosis*'in neden olduğu osteomyelit ve lenfadenit gibi tüberküloz odaklarının cerrahi debridmanında antitüberküloz ilaçlarla birlikte destekleyici amaçla başarıyla kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar sözcükler: Ankaferd Blood Stopper®; *Mycobacterium tuberculosis*; in vitro; duyarlılık; antitüberküloz etki.

ABSTRACT

Treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections requires combination of anti-tuberculosis drugs which have several toxic side effects. Thus there is a need for safer and effective new drugs. Ankaferd Blood Stopper® (ABS), which is a mixture of plant extracts prepared from *Alpinia officinarum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Thymus vulgaris*, *Urtica dioica* and *Vitis vinifera*, has homeostatic and antibacterial effects. Standard solutions of ABS are already being used topically for post-traumatic and post-operative bleeding control in our country. This study was aimed to evaluate the in vitro activity of ABS against *M. tuberculosis* isolates. A total of 57 clinical isolates [17 multidrug resistant (MDR), 11 resistant to only isoniazid (INH), one resistant to INH and streptomycin (STR), two resistant only to STR, two resistant only to ETM, and 24 susceptible to all drugs] and three standard strains [H37Rv (susceptible to all drugs), ATCC 35822 (INH-resistant), ATCC 35820 (STR-resistant)] were included in the study. Agar dilution method was used to detect the MIC values of ABS. In the study, ABS MIC value was determined as 10.94 µg/ml for *M. tuberculosis* H37Rv strain which was susceptible to all anti-tuberculosis drugs, whereas it was determined as 21.88 µg/ml for INH-resistant ATCC 35822 and STR-resistant ATCC 35820 strains. The MIC values for 24 susceptible clinical isolates were as follows; 10.94 µg/ml (n= 17), 21.88 µg/ml (n= 6) and < 1.37 µg/ml (n= 1). When evaluating 17 MDR clinical isolates, MIC values were determined as 5.47 µg/ml (n= 1), 10.94 µg/ml (n= 5) and 21.88 µg/ml (n= 11). MIC values were ranging between < 1.37-21.88 µg/ml among 11 INH-resistant isolates. These isolates were susceptible to other first line anti-tuberculosis drugs. MIC value of one isolate resistant to both of INH and STR was determined as 21.88 µg/ml. MIC value of the two sole STR-resistant isolates was 21.88 µg/ml. MIC values of the two sole ETM-resistant isolates were determined as 21.88 µg/ml and 10.94 µg/ml. MIC₅₀ and MIC₉₀ values for the tested bacteria were 10.94 µg/ml and 21.88 µg/ml, respectively. It was concluded that 16 fold diluted concentration of the topically used ABS solution was found to be active against tuberculosis bacilli in vitro. Thus ABS might be used as a supportive agent together with anti-tuberculous drugs during debridement of multiple drug-resistant *M. tuberculosis* caused osteomyelitis and lymphadenitis lesions.

Key words: Ankaferd Blood Stopper®; *Mycobacterium tuberculosis*; in vitro; susceptibility; anti-tuberculosis effect.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis, yavaş üreyen aerobik, sporsuz ve aside dirençli boyanma özelliğine sahip bir basildir. Tüberkülozun etkeni olan bu bakterinin tek rezervuarı insandır¹. Gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere bütün dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir². Vücutta herhangi bir organda hastalık yapabilme özelliğine sahip olabilmesine rağmen, genellikle kavitasyon oluşumuyla sonuçlanan kronik destrüktif bir inflamatuvar sürecin olduğu akciğerleri etkilemektedir¹. Tüberküloz (TB) hastalığı antik çağlardan beri bilinmesine rağmen antitüberküloz (anti-TB) ilaçlar ancak 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra geliştirilmiştir³. Anti-TB ilaçların klinik kullanımına paralel olarak dirençli *M.tuberculosis* kökenleri ortaya çıkmış ve dirençli TB olgularının tedavileri daha komplike bir hal almıştır⁴⁻⁶.

Ankaferd Blood Stopper® (ABS) klinik kullanıma giren homeostatik bir bitki ekstresidir. Anadolu'da uzun zamandır geleneksel tıp uygulamalarında topikal olarak kullanılmaktadır⁷. Bu madde *Alpinia officinarum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Thymus vulgaris*, *Urtica dioica* ve *Vitis vinifera* bitki ekstraktlarının standardize edilmiş bir karışımı olup, 100 ml'lik solüsyonu 7 g *A.officinarum*, 7 g *G.glabra*, 5 g *T.vulgaris*, 6 g *U.dioica* ve 8 g *V.vinifera* ihtiva etmektedir. ABS'nin endotel hücreler, kan hücreleri, damar dinamiği ve hücre mediatörleri üzerinde etkileri vardır. Pıhtılaşma kaskadının intrinsik ve ekstrinsik yollarına etki etmeden homeostazla sonuçlanan hızlı bir protein ağ oluşumunu indükler⁷. ABS'nin homeostatik etkilerinin yanında gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı in vitro etkinliği de gösterilmiştir^{8,9}. Bu çalışmada, *M.tuberculosis* izolatlarına karşı ABS'nin in vitro etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları

Çalışmaya 57 klinik izolat ve üç standart suş [H37Rv (tüm ilaçlara duyarlı), ATCC 35822 (izoniazide dirençli), ATCC 35820 (streptomisine dirençli)] dahil edildi. Klinik izolatların 17'si çok ilaca dirençli (ÇİD), 11'i sadece izoniazid (INH)'e dirençli, biri INH ve streptomisin (STR)'e dirençli, ikisi STR'ye dirençli, ikisi etambutol (ETM)'e dirençli ve geri kalan 24'ü bütün ilaçlara duyarlıydı (Tablo I).

Besiyerinin Hazırlanması

ABS'nin anti-TB etkisi Middlebrook 7H10 agar besiyerinde agar dilüsyon yöntemiyle araştırıldı. ABS'nin sıvı solüsyonları üretici firmadan (Trend Teknoloji İlaç AŞ, İstanbul, Türkiye) temin edildi. Middlebrook 7H10 agar üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanıp otoklav ile steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra besiyeri 40-45°C'ye soğuduktan sonra %10 olacak şekilde OADC (oleik asit, albumin, dekstrozu ve katalaz) zenginleştirici eklendi. ABS çözeltisi besiyerine eklenerek 1/16 (21.88 µg/ml), 1/32 (10.94 µg/ml), 1/64 (5.47 µg/ml), 1/128 (2.74 µg/ml) ve 1/256 (1.37 µg/ml)'lık dilüsyonları içeren besiyerleri hazırlandı. Her bir dilüsyonu içeren besiyeri vida kapaklı steril tüplere 5 ml konuldu ve katılaşması için yarı yatık pozisyonda bekletildi. Besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

Tablo 1. Çalışmada Test Edilen *M.tuberculosis* Suşlarının ABS MİK Değerleri

Suş No.	STR	INH	RIF	ETM	ABS MİK (µg/ml)
Standart suşlar (n= 3)					
H37Rv	S	S	S	S	10.94
ATCC 35822	S	R	S	S	21.88
ATCC 35820	R	S	S	S	21.88
Tüm ilaçlara duyarlı suşlar (n= 24)					
S.1	S	S	S	S	10.94
S.2	S	S	S	S	21.88
S.3	S	S	S	S	10.94
S.4	S	S	S	S	21.88
S.5	S	S	S	S	10.94
S.6	S	S	S	S	10.94
S.7	S	S	S	S	10.94
S.8	S	S	S	S	10.94
S.9	S	S	S	S	10.94
S.10	S	S	S	S	21.88
S.11	S	S	S	S	10.94
S.12	S	S	S	S	21.88
S.13	S	S	S	S	10.94
S.14	S	S	S	S	10.94
S.15	S	S	S	S	10.94
S.16	S	S	S	S	10.94
S.17	S	S	S	S	21.88
S.18	S	S	S	S	10.94
S.19	S	S	S	S	10.94
S.20	S	S	S	S	21.88
S.21	S	S	S	S	10.94
S.22	S	S	S	S	10.94
S.23	S	S	S	S	10.94
S.24	S	S	S	S	< 1.37
Çok ilaca dirençli suşlar (n= 17)					
MR.1	S	R	R	S	10.94
MR.2	S	R	R	S	21.88
MR.3	R	R	R	R	21.88
MR.4	S	R	R	S	10.94
MR.5	R	R	R	R	21.88
MR.6	S	R	R	R	10.94
MR.7	S	R	R	S	21.88

Tablo I. Çalışmada Test Edilen *M.tuberculosis* Suşlarının ABS MİK Değerleri (Devamı)

Suş No.	STR	INH	RIF	ETM	ABS MİK (µg/ml)
MR.8	S	R	R	R	21.88
MR.9	S	R	R	S	21.88
MR.10	S	R	R	S	21.88
MR.11	S	R	R	R	21.88
MR.12	R	R	R	R	21.88
MR.13	S	R	R	S	21.88
MR.14	R	R	R	S	21.88
MR.15	S	R	R	S	5.47
MR.16	R	R	R	S	10.94
MR.17	R	R	R	S	10.94
Farklı direnç paterni gösteren suşlar (n= 16)					
R.1	S	R	S	S	21.88
R.2	R	R	S	S	21.88
R.3	S	R	S	S	21.88
R.4	R	S	S	S	21.88
R.5	R	S	S	S	21.88
R.6	S	S	S	R	21.88
R.7	S	R	S	S	21.88
R.8	S	R	S	S	21.88
R.9	S	S	S	R	10.94
R.10	S	R	S	S	21.88
R.11	S	R	S	S	21.88
R.12	S	R	S	S	< 1.37
R.13	S	R	S	S	21.88
R.14	S	R	S	S	10.94
R.15	S	R	S	S	10.94
R.16	S	R	S	S	5.47

S: Duyarlı; R: Dirençli; STR: Streptomisin; INH: İzoniazid; RIF: Rifampisin; ETM: Etambutol.

Bakteri İnokülasyonu

Çalışmada test edilen her bakteri izolatının Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen taze kolonilerinden 3-5 tanesi alınarak 5 ml fosfat tampon çözeltisi ve cam boncuk içeren vida kapaklı tüplere aktarıldı ve 1 dakika vortekslendi. Vorteks işleminden sonra büyük partikül ve aerosollerin çökmesi için tüpler dik bir şekilde oda ısısında 30 dakika bekletildi. Elde edilen bu süpernatandan McFarland no 1 standardına ayarlı bakteri süspansiyonu hazırlandı. İnokülasyon için bakteri süspansiyonu 1:100 oranında fosfat tampon çözeltisiyle dilüe edildi.

Antitüberküloz Etkinin Test Edilmesi

İçerisinde farklı ABS konsantrasyonu ihtiva eden 7H10 agar besiyeri bulunan vidalı kapaklı test tüplerine dilüe edilen bakteri süspansiyonundan 100 µl inoküle edildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Üreme kontrolü için ABS içermeyen tüplere de inokülasyon yapıldı. Üreme kontrol tüpleri 14 ve 21. günlerde bakteri üremesi açısından değerlendirildi ve sonuçları kaydedildi. MİK değeri çıplak gözle görülebilen bakteri üremesinin olmadığı en düşük ABS dilüsyonu olarak tanımlandı.

İstatistiksel Analiz

Klinik izolatlar; primer anti-TB ilaçların tümüne duyarlı, çok ilaca dirençli ve herhangi bir primer anti-TB ilaca dirençli olarak üç gruba ayrıldı. Her grubun MİK değerleri tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda test edilen *M.tuberculosis* izolatları için ABS MİK değerlerinin 21.88-< 1.37 µg/ml arasında değiştiği saptanmıştır. İzolatlardan 28'inin üremesi 21.88 µg/ml, 25'inin üremesi ise 10.94 µg/ml ABS konsantrasyonu ile inhibe edilmiştir. Geriye kalan dört izolatın ikisinin MİK değeri 5.47 µg/ml, diğer ikisinin ise < 1.37 µg/ml'dir. Bu verilere göre, test edilen tüm izolatların MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 10.94 ve 21.88 µg/ml olarak izlenmiştir.

Çalışmada, bütün ilaçlara duyarlı *M.tuberculosis* H37Rv suşu için ABS MİK değeri 10.94 µg/ml, INH dirençli ATCC 35822 ve STR dirençli ATCC 35820 suşları için 21.88 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bütün ilaçlara duyarlı 24 klinik izolat değerlendirildiğinde; 17'sinin ABS MİK değeri 10.94 µg/ml, altısının 21.88 µg/ml ve birinin < 1.37 µg/ml olarak saptanmıştır (Tablo I). Çok ilaca dirençli 17 klinik izolatın ABS MİK değerleri ise; 11'inde 21.88 µg/ml, beşinde 10.94 µg/ml ve birinde 5.47 µg/ml'dir (Tablo I). Test edilen diğer dirençli 16 suş için ABS MİK değerleri incelendiğinde; sadece INH direnci olan 11 izolat < 1.37-21.88 µg/ml arasında; sadece STR direnci olan iki izolat 21.88 µg/ml; sadece ETM direnci olan iki izolat 21.88 µg/ml ve 10.94 µg/ml; hem INH hem de STR direnci olan bir izolat ise 21.88 µg/ml olarak bulunmuştur (Tablo I).

ABS MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, primer anti-TB ilaçlara duyarlı izolatlarda 10.94 µg/ml ve 21.88 µg/ml olarak tespit edilirken, hem ÇİD hem de primer anti-TB ilaçların herhangi birine dirençli olan izolatlarda MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 21.88 µg/ml olarak saptanmıştır. İstatistiksel değerlendirmede; hem ÇİD hem de primer anti-TB ilaçların herhangi birine dirençli olan izolatların MİK değerleri, duyarlı izolatların MİK değerlerinden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p< 0.05).

TARTIŞMA

Antitüberküloz (anti-TB) ilaçların kullanıma girmesi, *M.tuberculosis* enfeksiyonları üzerinde çok yaygın etkiler sağlamış; tüberküloza bağlı mortalite ve morbiditede önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur^{3,10}. Ancak bu ilaçların klinik kullanımı, dirençli izolatların

ortaya çıkmasıyla sonuçlanmış ve tedavi başarısızlığı olasılığı gündeme gelmiştir^{11,12}. Dirençli *M.tuberculosis* enfeksiyonlarının tedavisi toksik yan etkisi olan anti-TB ilaçların kombinasyonunu gerektirdiğinden, daha güvenli ve etkili yeni ilaçların geliştirilmesine gereksinim vardır⁶.

Bitkisel içerikli ilaçlar geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Anti-TB ilaçlarla tüberkülozun bilinen tıbbi tedavisinin yanında, *M.tuberculosis*'e karşı aktivite gösteren geleneksel bitki içerikleri de vardır¹³. Lall ve Meyer¹⁴, pulmoner TB tedavisinde kullanılan 20 Güney Afrika tıbbi bitkisini duyarlı ve dirençli *M.tuberculosis* suşlarına karşı değerlendirmişler; bu bitkilerin 14'ünün *M.tuberculosis*'e karşı in vitro inhibitör etkisinin olduğunu saptamışlardır. Guatam ve arkadaşları¹⁵ Hindistan'da bazı tıbbi bitkilerin TB tedavisinde kullanıldığını rapor etmişlerdir.

Ankaferd Blood Stopper® (ABS), beş adet bitki ekstresi içeren, topikal olarak kullanılan ancak sistemik kullanımı bulunmayan sıvı bir solüsyondur. ABS, ülkemizde kanama kontrolü amacıyla geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Homeostatik etkilerini gösteren raporları takiben, Türkiye'de yapılan çalışmalarda, ABS'nin eksternal, travmatik, dental ve gastrointestinal cerrahi sonrası oluşan kanamaların kontrol altına alınmasını sağladığı kanıtlanmıştır^{7,16-23}. Antimikrobiyal etkinliğin araştırıldığı çalışmalarda da, Fışgın ve arkadaşları⁸, ABS'nin gram-pozitif ve gram-negatif tüm klinik izolatlara karşı etkili olduğunu bulmuşlardır. Benzer şekilde Sarıbaş ve arkadaşları⁹, önemli nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* ve *Acinetobacter* türlerini içeren klinik izolatlara karşı ABS'nin etkili olduğunu rapor etmişlerdir. ABS'nin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisine ek olarak, ÇİD *M.tuberculosis* suşlarını da içeren tüberküloz basillerine karşı etkin olduğu, bu çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmamızda, ABS'nin topikal olarak kullanılan solüsyonunun yaklaşık 16 kat dilüe edilmiş konsantrasyonu, tüberküloz basillerine in vitro olarak etkili bulunmuştur. Bu sonuç, ABS'nin kütanöz tüberkülozda, özellikle ÇİD *M.tuberculosis*'in neden olduğu osteomyelit ve lenfadenit gibi tüberküloz odaklarının cerrahi debridmanında anti-TB ilaçlarla birlikte destekleyici amaçla başarıyla kullanılabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, ABS'nin in vitro antibakteriyel aktivitesi ile ilgili umut verici gözlemler, tedavi seçeneği olarak değerlendirilmesi amacıyla yapılacak olan ileri klinik çalışmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Fitzgerald, DW, Sterling TR, Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*, pp: 3129-63. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2010, 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier Inc, Philadelphia.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. WHO/HTM/TB/2009.426. WHO, Geneva.
3. Harries AD, Dye C. Tuberculosis. Ann Trop Med Parasitol 2006; 100(5-6): 415-31.
4. Zager EM, McNerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. BMC Infect Dis 2008; 8: 10.
5. Caminero J, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect Dis 2010; 10(9): 621-9.

6. Migliori GB, Centis R, Lange C, Richardson MD, Sotgiu G. Emerging epidemic of drug-resistant tuberculosis in Europe, Russia, China, South America and Asia: current status and global perspectives. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16(3): 171-9.
7. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, et al. Haemostatic actions of folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res* 2008; 36(1): 163-70.
8. Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, et al. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia* 2009; 80(1): 48-50.
9. Saribas Z, Sener B, Haznedaroglu IC, Hascelik G, Kirazli S, Goker H. Antimicrobial activity of Ankaferd Blood Stopper® against nosocomial bacterial pathogens. *Cent Eur J Med* 2010; 5(2): 198-202.
10. Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(10 Suppl 2): S231-79.
11. Berry M, Kon OM. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an emerging threat. *Eur Respir Rev* 2009; 18(114): 195-7.
12. Migliori GB, Sotgiu G, Lange C, Centis R. Extensively drug-resistant tuberculosis: back to the future. *Eur Respir J* 2010; 36(3): 475-7.
13. Tabuti JR, Kukunda CB, Waako PJ. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners in the treatment of tuberculosis and related ailments in Uganda. *J Ethnopharmacol* 2010; 127(1): 130-6.
14. Lall N, Meyer JJ. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol* 1999; 66(3): 347-54.
15. Gautam R, Saklani A, Jachak SM. Indian medicinal plants as a source of anti-mycobacterial agents. *J Ethnopharmacol* 2007; 110(2): 200-34.
16. Cipil HS, Kosar A, Kaya A, et al. In vivo haemostatic effect of the medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper in rats pretreated with warfarin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009; 15(3): 270-6.
17. Karakaya K, Ucan HB, Tascilar O, et al. Evaluation of a new hemostatic agent Ankaferd Blood Stopper in experimental liver laceration. *J Invest Surg* 2009; 22(3): 201-6.
18. Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, Kahya V. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73(12): 1742-5.
19. Haznedaroglu BZ, Haznedaroglu IC, Walker SL, et al. Ultrastructural and morphological analyses of the in vitro and in vivo hemostatic effects of Ankaferd Blood Stopper. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; 16(4): 446-53.
20. Sonmez M, Baltacioğlu E, Sarac O, Erkut N. The use of Ankaferd blood stopper in a patient with Glanzmann's thrombasthenia with gingival bleeding. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21(4): 382-3.
21. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Bagcioğlu M, Germiyanoglu C. First clinical experience of Ankaferd Blood Stopper as a hemostatic agent in partial nephrectomy. *Kaohsiung J Med Sci* 2010; 26(9): 493-5.
22. Karaman A, Torun E, Gursoy S, et al. Efficacy of Ankaferd Blood Stopper in post-polypectomy bleeding. *J Altern Complement Med* 2010; 16(10): 1027-8.
23. Yarali N, Oruc M, Bay A, et al. A new hemostatic agent-Ankaferd blood stopper: management of gastrointestinal bleeding in an infant and other experience in children. *Pediatr Hematol Oncol* 2010; 27(8): 592-6.