

# Klinik Örneklerden Elde Edilen *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Moksifloksasin MİK Değerlerinin Tespiti ve Moleküler Analizi

## Detection and Molecular Analysis of Moxifloxacin MIC Values of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated from Clinical Specimens

Taylan BOZOK<sup>1</sup>, Begüm KAYAR<sup>2</sup>, Gülfer YAKICI<sup>1</sup>, Emel EKER<sup>1</sup>, Mahdi MARZİ<sup>1</sup>, Fırat KARSLI<sup>1</sup>, Fatih KÖKSAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

<sup>1</sup> Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

<sup>2</sup> Çukurova Üniversitesi, Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi, Adana.

<sup>2</sup> Çukurova University, Tropical Diseases Research and Application Center, Adana, Turkey.

**Makale Atfı:** Bozok T, Kayar B, Yakıcı G, Eker E, Marzi M, Karslı F, Köksal F. Klinik örneklerden elde edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının moksifloksasin MİK değerlerinin tespiti ve moleküler analizi. Mikrobiyol Bul 2019;53(3):245-253.

### ÖZ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleks grubuna ait mikroorganizmaların yol açtığı kronik, granülomatöz ve nekrotizan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 Global Tüberküloz Raporuna göre 2017 yılında 6.4 milyon yeni TB olgusu bildirilmiştir. Son yıllarda artan ilaç direnç problemi ve kesin tanı konulmasında halen zorluklar olması nedeniyle TB çağımızın büyük sağlık problemleri arasındaki yerini korumaktadır. Klinisyenler tarafından solunum yolu veya üriner sistem enfeksiyonlarında oral formu var olan florokinolon grubu ilaçların yoğun olarak kullanılmasının dirence yol açabileceği ve bunun da tedavi başarısızlıkları ile sonuçlanabileceği belirtilmektedir. Bu çalışmada, klinik örneklerden elde edilen *M.tuberculosis* izolatlarının moksifloksasin duyarlılıklarının fenotipik yöntemlerle tespit edilmesi, direnç oranlarının belirlenmesi ve fenotipik direnç ile *gyrA* genindeki mutasyonların ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya akciğer tüberkülozu olan hasta örneklerinden izole edilen *M.tuberculosis* izolatlarından çok ilaca direnç görülmeyen ardışık 100 izolat ile çok ilaca direnç tespit edilen ardışık olmayan 37 izolat dahil edilmiştir. Bu izolatların Löwenstein-Jensen besiyeri kullanılarak moksifloksasine duyarlılıkları belirlenmiş ve epidemiyolojik özellikleri araştırılmış, ayrıca *gyrA* bölgesinin dizi analizi yapılarak tespit edilen mutasyonlar ilaç duyarlılık oranları ile karşılaştırılmıştır. Fenotipik duyarlılıkları test edilen 137 izolatın 25 (%18.2)'inin moksifloksasine karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Çok ilaca direnç görülmeyenler ve görülen izolatlar arasından direnç oranları sırasıyla %17 ve %21.6 olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların *gyrA* bölgesinin dizi analizi sonucuna göre toplamda altı örnekte tek baz mutasyonuna rastlanmıştır. Mutasyonların pozisyonları D94Y, D94G, A90V, G88A ve iki örnekte de D89N şeklinde tespit edilmiştir. Mutasyon görülen örneklerin ikisi moksifloksasine fenotipik olarak duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda *M.tuberculosis* izolatlarındaki moksifloksasin direncinin benzer çalışmalara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve mevcut dirençten *gyrA* geninde oluşan mutasyonlar dışında farklı mekaniz-

maların da sorumlu olabileceği görülmüştür. Bu grup ilaçlara karşı kısa sürede direnç gelişme ihtimalinin varlığı nedeniyle araştırmadan elde edilen verilerin ülkedeki tüm klinisyenler ile paylaşılması gerektiği ve bu ilacın TB tedavisinde önemli bir rolü olacağı göz önüne alındığında, spesifik olmayan endikasyonlarda daha sınırlı kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Daha geniş olgu grupları ve izolatlar kullanılarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *gyrA*, moksifloksasin; mutasyon; *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic, granulomatous and necrotizing disease caused by microorganisms belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex group. In 2017, 6.4 million new TB cases have been reported according to the World Health Organization 2018 Global Tuberculosis Report. TB remains among the major health problems of our time due to the increasing drug resistance problem and the difficulties in definitive diagnosis in recent years. It is stated by clinicians that intensive use of quinolone group drugs with oral form in simple indications such as respiratory or urinary tract infections may lead to resistance and this may result in treatment failures. The aim of this study was to determine the moxifloxacin susceptibility of *M.tuberculosis* isolates obtained from clinical specimens by phenotypical methods, to determine the resistance rates of moxifloxacin and to investigate the relationship between phenotypical resistance and mutations in the *gyrA* gene. A hundred (n= 100) consecutive non-multidrug resistant and 37 non-consecutive multidrug resistant *M.tuberculosis* strains isolated from the clinical specimens of patients with pulmonary tuberculosis were included in the study. The moxifloxacin susceptibility of the isolates was determined by using Löwenstein-Jensen medium and their epidemiological properties were investigated and also mutations detected by *gyrA* region were compared with drug susceptibility rates. Of the 137 isolates tested for phenotypical susceptibility, 25 (18.2%) were found to be resistant to moxifloxacin. Resistance rate among non-multidrug resistant and multidrug resistant isolates were determined as 17% and 21.6%, respectively. According to the results of the sequencing analysis, of the *gyrA* regions of all the isolates included in the study, a single base mutation was found in a total of six samples. The location positions of the mutations were determined as D94Y, D94G, A90V, G88A and among two strains as D89N. Two of the isolates with mutations were found to be phenotypically susceptible to moxifloxacin. In our study, it was found that moxifloxacin resistance in *M.tuberculosis* isolates was higher than similar studies and it was found that different mechanisms may be responsible for the existing resistance other than the mutations in the *gyrA* gene. It was concluded that the data obtained from the study should be shared with all clinicians in the country due to the possibility of resistance development to this group of drugs in a short time and considering this drug will have an important role in the treatment of TB, it should be used more limited in non-specific indications. Further studies using larger case groups and isolates are needed for the continuation of the research.

**Keywords:** *gyrA*; moxifloxacin; mutation; *Mycobacterium tuberculosis*.

## GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* kompleks grubuna ait mikroorganizmaların yol açtığı kronik, granülomatöz ve nekrotizan bir hastalıktır. Bu hastalık insan vücudunda tipik olarak akciğeri etkilemekte ancak akciğer dışında da birçok sisteme yerleşip primer veya sekonder TB enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. İnsanlık tarihi kadar eski olmakla birlikte, günümüzde enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm nedenleri arasında "Human Immunodeficiency Virus (HIV)"dan sonra ikinci sırada yer alan akciğer TB'si, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığını tehdit eden en büyük küresel sağlık problemlerinden birisi olma özelliğini halen sürdürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2018 Global Tüberküloz Raporuna göre 2017 yılında 6.4 milyon yeni TB olgusu bildirilmiştir. Bu sayı 2016 yılında 6.3 milyon olarak belirlenmiştir. Dünyada 10 milyon yeni TB olgusu olduğu

tahmin edilmektedir ve bunların 920.000'ini HIV ile enfekte hastalar oluşturmaktadır. Son yıllarda alınan önlemler ve uygulanan doğrudan gözetimli ilaç tedavisi (DGİT) ile hastalığın insidansında ciddi bir düşüş görülmektedir. Ancak dünyada HIV enfeksiyonu tanısı alan olgu sayısında meydana gelen artış ve çok ilaca dirençli (ÇİD)-yaygın ilaç dirençli (YİD) TB izolatlarının sık görülmeye başlaması TB epidemisinin kontrolünü güçleştirmektedir<sup>1,2</sup>. TB hastalarının mevcut tedavi rejiminin iyileştirilmesi gerektiği herkes tarafından kabul edilmiş bir görüştür. Mevcut tedavi çok uzun süre almakta, birçok hasta kombinasyon tedavisini tolere edememektedir. Bu nedenle yeni anti-TB ilaç geliştirme çalışmaları devam etmekle birlikte kullanımda olan bazı antibakteriyel moleküllerin TB tedavisindeki etkinliği araştırılmaktadır. Bir 8-metoksi-florokinolon olan moksifloksasin bu sürecin bir örneğidir<sup>3</sup>. Moksifloksasin, toplumdaki kazanılmış pnömoni de dahil olmak üzere geniş bir yelpazede enfeksiyonların tedavisi için kullanılan önemli bir antibakteriyel ilaçtır<sup>4</sup>. Yapılan meta-analiz çalışmaları moksifloksasinin ilaca dirençli olmayan TB tedavisi için önerilen rejime girmesinin, kültür negatifleşme oranını arttırarak ve nüks oranını azaltarak klinik sonuca katkıda bulunacağını ileri sürmektedir<sup>5</sup>. Florokinolon direncini belirlemede giraz genindeki mutasyonlar araştırılmaktadır. Kinolon direncini belirleyen bölge (QRDR), *M.tuberculosis* de dahil olmak üzere birçok bakteri türünde florokinolona direnç gösteren mutasyonların bulunduğu giraz geninin içinde korunan alanlardan oluşmaktadır. Ayrıca, florokinolon atım pompalarına ve "DNA-mimic (DNA benzeri)" proteinler gibi etkenlere bağlı olarak direnç gelişebilmektedir<sup>6-8</sup>.

Bu çalışmada, ÇİD olmayan ve ÇİD olan *M.tuberculosis* izolatlarının moksifloksasin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri kullanılarak tespit edilmesi ve florokinolon direncinin görülmesinde önemli bir yere sahip olan *gyrA* geninin QRDR bölgesindeki özgül mutasyonların dizi analizi yöntemi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Bakteri İzolatları

LJ ve MGIT960 (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD) besiyerlerinde üretilmiş ve birincil anti-TB ilaçlara duyarlılıkları belirlenmiş 137 adet *M.tuberculosis* izolatı bu çalışmaya dahil edildi. Çalışmada akciğer tüberkülozu olan hasta örneklerinden elde edilen *M.tuberculosis* izolatlarından çok ilaca direnç görülmeyen ardışık 100 izolat ile çok ilaca direnç tespit edilen ardışık olmayan 37 izolat kullanıldı.

### İlaç Konsantrasyonları ve Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Tespiti

*M.tuberculosis* izolatlarının moksifloksasin duyarlılıklarını test etmek için LJ besiyeri kullanıldı. Moksifloksasin (Bayer Pharmaceutical Corporation, Leverkusen, Almanya) stok çözeltisi steril 0.1 N NaOH içerisinde hazırlandı. İlaç dilüsyonları steril damıtılmış su ile yapıldı ve son konsantrasyonları 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ve 16.0 mg/L olacak şekilde koagüle edilmemiş patates nişastası içermeyen besiyerlerine eklendi ve tüplere dağıtıldı. Besiyerleri 85°C'de iki saat süre ile yatık pozisyonda koagüle edildi. Çalışmaya

dahil edilen her bir *M.tuberculosis* izolatının aktif olarak üreyen 2-4 haftalık LJ besiyerindeki kültürlerinden yaklaşık bir öze dolusu bakteri (~4 mg) 10 ml'lik bir vida kapaklı şişede 0.2 ml steril damıtılmış su içinde süspansiyon edildi.

Yukarıda hazırlanan bakteri süspansiyonundan  $10^{-2}$  (S1) ve  $10^{-4}$  (S2) olacak şekilde seyreltme yapıldı. Elde edilen süspansiyonlardan ilaç içermeyen besiyerlerine S1 ve S2, ilaç içeren besiyerlerine ise yalnız S1 inoküle edildi ve 37°C'de inkübe edildi. İlaç içermeyen besiyerleri 28. gün ve 42. günde okundu. İlaç içeren ortam ilaç içermeyen ortamlarla karşılaştırıldığında; bakteri popülasyonunun %99'unun üremesini inhibe eden ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak yorumlandı. Kalite kontrolünde duyarlı olan *M.tuberculosis* H37Rv suşu kullanıldı<sup>9,10</sup>. DSÖ'nün moksifloksasin için katı ortamda önerilen herhangi bir kritik konsantrasyon değeri bulunmamaktadır. Ancak, MGIT960 ve BACTEC460 için önerilen kritik konsantrasyon sırasıyla 0.25 ve 0.5 mg/L'dir<sup>11</sup>. Moksifloksasin için LJ besiyeri ile yapılmış çalışmalarda direncin belirlenmesinde en uygun konsantrasyon olarak 1 mg/L olarak önerilmektedir<sup>9,10</sup>. Çalışmamızda bu değer üzerindeki konsantrasyonlarda üreme tespit edilen örnekler dirençli, daha düşük konsantrasyonlarda üreme gösteren örnekler duyarlı olarak kabul edildi.

### DNA Dizi Analizi

LJ stok besiyerinde üretilmiş olan bakterilerden bir öze dolusu alınıp, "Mickle tissue disintegrator (MICKLE)" cihazında mekanik hücre parçalama işlemine tabi tutularak bakteriyel DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. *gyrA* geninin 530 baz çifti (bp) QRDR bölgesi *gyrAF* (5'- AGA CAC GAC GTT GCC GCC TG-3') ve *gyrAR* (5'- CTG ACC CGT TGG CCA GCA GG-3') primer çifti kullanılarak PCR ile amplifiye edildi<sup>12</sup>. PCR döngüsü şu şekilde uygulandı; ilk basamak 95°C'de 5 dakika daha sonra 40 döngü olacak şekilde sırasıyla; 94°C de 30 saniye, 56°C'de 45 saniye, 72°C'de 1 dakika ve son basamakta 72°C'de 10 dakika 96 kuyucuklu ısı döngü cihazında (Applied Biosystem AB, ABD) çalışıldı. Amplifiye edilen bölgelerin Sanger (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, ABD) tekniği ile DNA dizilemesi yapıldı<sup>13</sup>. Elde edilen sonuçlar Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems, ABD) programında analiz edildi. *gyrA* mutasyonları *M.tuberculosis* H37Rv (GenBank accession number L27512) suşunun dizisi ile <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> üzerinden tespit edildi.

### BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen ÇİD-TB olmayan izolatların %17 (17/100)'sinde, ÇİD-TB izolatların %21.6 (8/37)'sinde, toplamda izolatların %18.2 (25/137)'sinde fenotipik olarak moksifloksasine karşı direnç olduğu tespit edilmiştir. 16 mg/L düzeyinde direnç %1.5 ile iki izolatta görülmüştür. Bu yüksek oranda direncin görüldüğü iki izolatın birisi ÇİD-TB grubunda, diğeri ise ÇİD-TB olmayan grupta tespit edilmiştir (Tablo I).

Yüz otuz yedi izolat arasında majör anti-TB ilaçların tamamına duyarlı olanların %15.9 (14/88)'unda moksifloksasine direnç gözlenirken, en az bir majör ilaca dirençli olanların %22.4 (11/49)'ünde moksifloksasin direnci saptanmıştır (Tablo II).

**Tablo I.** ÇİD-TB ve ÇİD-TB Olmayan İzolatların Moksifloksasin MİK Değerleri ve *gyrA* QRDR Bölgesindeki Mutasyonlar

| Moksifloksasin MİK (mg/L) | ÇİD TB olmayan n (%) | ÇİD TB n (%) | Kodon 95 polimorfizm n | Mutasyon |                                                             | Nükleotit değişikliği               |
|---------------------------|----------------------|--------------|------------------------|----------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
|                           |                      |              |                        | sayısı n | Kodon                                                       |                                     |
| 0.125                     | 11 (%11)             | 1 (%2.7)     | 9                      |          |                                                             |                                     |
| 0.25                      | 14 (%14)             | 1 (%2.7)     | 12                     |          |                                                             |                                     |
| 0.5                       | 21 (%21)             | 9 (%24.3)    | 26                     | 1        | D89N <sup>a</sup>                                           | GAC - AAC                           |
| 1                         | 37 (%37)             | 18 (%48.6)   | 31                     | 1        | D89N <sup>a</sup>                                           | GAC - AAC                           |
| 2                         | 8 (%8)               | 5 (%13.5)    | 11                     | 3        | G88A <sup>a</sup><br>D94G <sup>a</sup><br>D94Y <sup>b</sup> | GGC - GCC<br>GAC - GGC<br>GAC - TAC |
| 4                         | 3 (%3)               | 0 (%0)       | 1                      |          |                                                             |                                     |
| 8                         | 5 (%5)               | 2 (%5.4)     | 1                      |          |                                                             |                                     |
| 16                        | 1 (%1)               | 1 (%2.7)     | 1                      | 1        | A90V <sup>a</sup>                                           | GCG - GTG                           |
| Toplam                    | 100                  | 37           | 92                     | 6        |                                                             |                                     |

<sup>a</sup> ÇİD-TB.<sup>b</sup> ÇİD-TB olmayan.

ÇİD-TB: Çok ilaca dirençli-tüberküloz, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

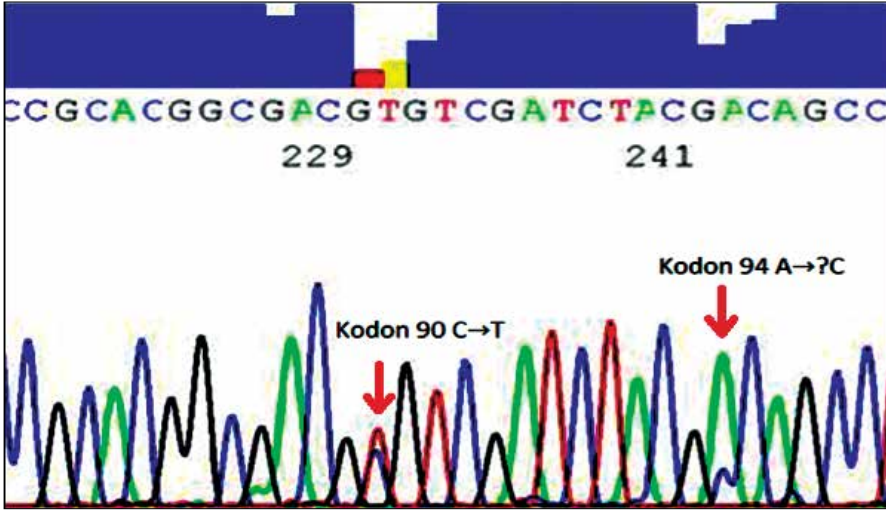
**Tablo II.** Majör İlaç Direnci Tespit Edilmiş ÇİD-TB Olmayan İzolatların Moksifloksasin Direnci

| Moksifloksasin direnci  | Majör ilaç direnci* |                |              |
|-------------------------|---------------------|----------------|--------------|
|                         | Duyarlı n (%)       | Dirençli n (%) | Toplam n (%) |
| Duyarlı (MİK ≤ 1 mg/L)  | 74 (%84)            | 9 (%75)        | 83 (%83)     |
| Dirençli (MİK > 1 mg/L) | 14 (%16)            | 3 (%25)        | 17 (%17)     |
| Toplam                  | 88 (%100)           | 12 (%100)      | 100 (%100)   |

\* En az bir adet ilk seçenek ilaca dirençli.

ÇİD-TB: Çok ilaca dirençli-tüberküloz, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

Toplamda 137 klinik izolattan altısında (n= 6) mutasyon tespit edilmiştir. Saptanan mutasyonlar; D94Y, D94G, A90V, G88A ve D89N olarak belirlenmiştir. Moksifloksasin dirençli izolatların %16 (4/25)'sında, moksifloksasin duyarlı izolatların %1.8 (2/112)'inde *gyrA* mutasyonu gözlenmiştir. Mutasyona sahip izolatların ikisinde moksifloksasin MİK değeri sırasıyla 0.5 ve 1 mg/L olarak tespit edilmiştir. Diğer dört tanesinin MİK değerleri 1 mg/L'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Mutasyon tespit edilen ve fenotipik olarak moksifloksasin duyarlı bulunan bu iki örnekte de D89N mutasyonu olduğu gözlenmiştir (Tablo I). Yüksek konsantrasyonlara (16 µg/ml) dirençli bulunmuş örneklerden bir tanesinde A90V mutasyonu tespit edilmiştir. Ancak mutasyonun analizi sonucunda değişen baz çiftinin olduğu bölgede GCG-GTG polimorfizm olduğu görülmüştür. Yine aynı izolataın *gyrA* kodon 94 de minimal düzeyde GAC-GCC polimorfizm görülmektedir (Şekil 1). Diğer yüksek konsantrasyonda dirence sahip örnekte *gyrA* bölgesinde dizi analizi yöntemiyle herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.



Şekil 1. Yüksek konsantrasyonda moksifloksasin direnci saptanmış bir örneğin 90. ve 94. kodonlarını içeren dizi analizi grafik kesiti verilmiştir. 90. kodonda oluşan mutasyon ve polimorfizm açık bir şekilde gözlenmektedir.

S95T polimorfizmi ardışık izolatlar arasında %66 (66/100), ÇİD-TB izolatlar arasında ise %70.8 (26/37) oranında bulunmuştur. Moksifloksasin direnci olan izolatlar arasında ise bu oran %56 (14/25) olarak saptanmıştır. Mutasyon tespit edilen altı izolatın beşinde kodon 95 polimorfizmi gözlenmiştir.

## TARTIŞMA

Son yıllarda artan ilaç direnç problemi ve kesin tanı konulmasında halen zorluklar olması nedeniyle TB çağımızın büyük sağlık problemleri arasındaki yerini korumaktadır. Florokinolonlar akciğer TB'si tedavisinde gittikçe artan öneme sahip antibiyotiklerdir. Ancak bu moleküller, bütün dünyada klinik örneklerden izolasyon oranları artış gösteren ÇİD-TB izolatlarla enfekte ve/veya majör ilaçları tolere edemeyen hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle moleküle eklenen halojenler gibi bileşikler sayesinde etki spektrumu genişletilmiş olan moksifloksasin gibi ilaçların oral formunun kullanım kolaylığı getirmesi nedeniyle de klinisyenler tarafından solunum yolu veya üriner sistem enfeksiyonları gibi TB dışı endikasyonlarda yoğun olarak kullanılması, *M.tuberculosis* izolatlarında da nonspesifik olarak bu ilaçlara karşı primer direnci provoke edecektir. Oysa yapılan araştırmalarda florokinolon grubu ilaçların makrofajlar içerisine penetre olarak burada bakterisidal aktivite gösterdikleri ve bu farmakokinetik avantajın latent TB tedavisinde etkili olabileceği belirtilmiştir<sup>14,15</sup>. Ancak son yıllarda akciğer TB'si olan kişilerden elde edilen *M.tuberculosis* izolatlarında florokinolon direncinde artış görüldüğü bunun da tedavi başarısızlıklarına yol açabileceği belirtilmektedir<sup>16,17</sup>.

Çalışmamızda ÇİD görülmeyen izolatlardaki direnç oranı %17, ÇİD tespit edilen izolatlar arasındaki direnç oranı %21.6 olmak üzere genelde 137 test izolatı arasındaki di-

renç oranı %18.2 olarak bulunmuştur. Çalışma verilerimiz kritik eşik daha yüksek olmasına rağmen Ho ve arkadaşlarının<sup>18</sup> sonuçları ile kıyaslanamayacak ölçüde yüksektir. Benzer şekilde Pakistan'da Rafiq ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada elde ettikleri %5.9'luk direnç oranından daha yüksek olmasına karşılık yine Pakistan'da Jabeen ve arkadaşlarının ÇİD görülmeyen izolatlardan elde ettikleri %10.3 ve %19.4 direnç oranı ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir<sup>19</sup>. Bu grupta değerlendirilen örnek sayıları, sırası ve çalışmanın yapıldığı yıllar irdelendiğinde 2014 yılındaki artmış direnç bizim aynı yıl saptadığımız %17'lik direnç oranımızdan daha yüksektir. Pakistan'dan bildirilen üç farklı çalışmanın yapıldığı yıllar ve direnç oranları dikkate alındığında moksifloksasin direncinin genel enfeksiyon insidansının yüksek olduğu ülkelere ve yıllara bağlı olarak artmakta olduğunu çarpıcı şekilde ortaya koymaktadır. Nitekim Ho ve arkadaşlarının Avustralya ve Yeni Zelanda izolatları için bildirdikleri orana benzer şekilde Sahly ve arkadaşlarının<sup>20</sup> 2011 yılında Amerika'nın Teksas eyaleti izolatları için bildirdikleri %1.8'lik direnç oranı ve Casal ve arkadaşlarının<sup>21</sup> İspanya kökenli izolatlar için verdikleri %6 direnç oranları bizim oranlarımızdan oldukça düşüktür. Bu sonuçlar bir taraftan moksifloksasine karşı artmakta olan direnci gösterirken diğer taraftan da non-spesifik enfeksiyonlarda bu grubun yaygın kullanımının önemine işaret etmektedir. Bizim ÇİD görülmeyen izolatlarımız arasında anti-TB ilaçların tamamına duyarlı olan 88 izolatımız arasında bile direnç oranımız 14 izolat ile %15.9'dur. Bu gruptaki direnci genel kullanım dışında izah etmek gerçekten zordur. Bu konuda kesin sonuç daha fazla sayıda izolatin değerlendirildiği, hasta bilgilerine ulaşılmış yeni ve süreklilik arz eden çalışmalar sonucu oluşacaktır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar fenotipik olarak florokinolon direnci tespit edilen izolatların *gyrA* bölgesinde %80'in üzerinde mutasyon saptandığını göstermektedir<sup>22</sup>. Çalışmamızda fenotipik olarak moksifloksasin direnci gösteren dört izolat ile duyarlı bulunan iki izolat dışında test izolatlarının hiçbirisinde *gyrA* geninin QRDR bölgesini içeren 530 bp büyüklükteki kısmında mutasyon tespit edilmemiştir. Moksifloksasin duyarlı iki izolatta da D89N mutasyonu görülürken, dirençli izolatların ikisinde 94. kodonda mutasyon olduğunu ve diğer iki mutasyonun da 88 ve 90. kodonlarda gerçekleştiğini tespit ettik. Benzer çalışmalarda sıklıkla belirlenen D94G ve A90V mutasyonlarına, çalışmamızdaki moksifloksasin direnci gösteren izolatlarda da rastlanılmıştır<sup>22</sup>. İki izolatta tespit ettiğimiz D89N mutasyonu literatürde nadir olarak görüle de bu mutasyonun tespit edildiği çalışmalarda moksifloksasin MİK değerlerindeki artışla anlamlı şekilde ilişkilendirildiği gözlenmiştir<sup>23-25</sup>. Çalışmamızda bu iki izolatin moksifloksasin MİK değerlerinin 2 mg/L'den küçük olarak tespit edilmesi dikkat çekici bir bulgudur. Ayrıca 92 izolatta tespit ettiğimiz kodon 95 polimorfizmin moksifloksasin duyarlılığı ile önemli bir ilişkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgu literatürdeki çalışmaları destekler niteliktedir<sup>26,27</sup>.

Çalışmamız sonucunda *M.tuberculosis* izolatlarında yapılan diğer çalışmalardan çok daha yüksek oranda moksifloksasin direnci saptanmıştır. Literatür bilgilerine göre florokinolon direnci olan izolatların yaklaşık %70-90'ında *gyrA* mutasyonu tespit edilmesine rağmen bizim çalışmamızda moksifloksasin direnci saptanan izolatların çok az bir bölümünde (%16) *gyrA* mutasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca direnç oranının fazla olmasının

çalışmamızda kullandığımız LJ besiyerinde duyarlılık testlerinin yapılmasını negatif etkileyen pişirek katılaştırmak, antibiyotikleri bağlayabilen yüksek protein içeriği gibi yöntemlere dayalı nedenlere bağlı olabileceği düşünülebilir. Bu nedenle dizi analizi ile fenotipik yöntemlerin sonuçlarının uyumsuz çıktığı izolatlar için duyarlılık testinin MGIT960 veya Middlebrook besiyerlerinde tekrarlanması ve doğrulanması kuvvetle önerilir. Ek olarak dirençten sorumlu olabilecek diğer gen bölgelerindeki mutasyonların veya atım pompa sistemi gibi farklı mekanizmaların araştırılması önem arz etmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Fox W. Whither short-course chemotherapy? Br J Dis Chest 1981;75(4):331-57.
4. Grossman RF, Hsueh PR, Gillespie SH, Blasi F. Community-acquired pneumonia and tuberculosis: differential diagnosis and the use of fluoroquinolones. Int J Infect Dis 2014;18:14-21.
5. Xu P, Chen H, Xu J, Wu M, Zhu X, Wang F, et al. Moxifloxacin is an effective and safe candidate agent for tuberculosis treatment: a meta-analysis. Int J Infect Dis 2017;60:35-41.
6. Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science 2005;308(5727):1480-3.
7. Pasca MR, Guglielame P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E, Riccardi G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(8):3175-8.
8. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, et al. A systematic review of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed *gyrA* numbering system. J Antimicrob Chemother 2012;67(4):819-31.
9. Somasundaram S, Paramasivan NC. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* strains to gatifloxacin and moxifloxacin by different methods. Chemotherapy 2006;52(4):190-5.
10. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler H, Menon N, Mitchison D, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969;41(1):21-43.
11. Barrera L, Cooreman E, de Dieu Iragena J, Drobniewski F, Duda P, Havelkova M, et al. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Geneva, World Health Organization, 2008.
12. Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Hu Z. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009. BMC Infect Dis 2011;11:78.
13. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. Sequencing by chain termination with dideoxynucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74(12):5463-7.
14. Van der Auwera P, Matsumoto T, Husson M. Intraphagocytic penetration of antibiotics. J Antimicrob Chemother 1988;22(2):185-92.
15. Rastogi N, Labrousse V, Goh KS. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. Curr Microbiol 1996;33(3):167-75.
16. Agrawal D, Udwadia Z, Rodriguez C, Mehta A. Increasing incidence of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mumbai, India. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13(1):79-83.



17. Hu Y, Mathema B, Wang W, Kreiswirth B, Jiang W, Xu B. Population-based investigation of fluoroquinolones resistant tuberculosis in rural eastern China. *Tuberculosis (Edinb)* 2011;91(3):238-43.
18. Ho J, Jelfs P, Sintchenko V. Fluoroquinolone resistance in non-multidrug-resistant tuberculosis a surveillance study in New South Wales, Australia, and a review of global resistance rates. *Int J Infect Dis* 2014;26:149-53.
19. Jabeen K, Shakoor S, Malik F, Hasan R. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan 2010-2014: Implications for disease control. *Int J Mycobacteriol* 2015;4 (Suppl 1):47-8.
20. El Sahly HM, Teeter LD, Jost KC, Dunbar D, Lew J, Graviss EA. Incidence of moxifloxacin resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Houston, Texas. *J Clin Microbiol* 2011;49(8):2942-5.
21. Casal M, Ruiz P, Herreras A. Study of the in vitro susceptibility of *M.tuberculosis* to ofloxacin in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4(6):588-91.
22. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J, et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review. *PLoS One* 2015;10(3):e0120470.
23. Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, Kaur D, Sloutsky A, Mitnick CD, et al. *GyrAse* mutations are associated with variable levels of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2016;25(3):727-33.
24. Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, Kaur D, Murray M, Mitnick CD. Fluoroquinolone resistance mutation detection is equivalent to culture-based drug sensitivity testing for predicting multidrug-resistant tuberculosis treatment outcome: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2017;65(8):1364-70.
25. Bernard C, Aubry A, Chauffour A, Brossier F, Robert J, Veziris N. In vivo *Mycobacterium tuberculosis* fluoroquinolone resistance emergence: a complex phenomenon poorly detected by current diagnostic tests. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(12):3465-72.
26. Arjomandzadegan M, Titov L, Farnia P, Owlia P, Ranjbar R, Sheikholeslami F, et al. Molecular detection of fluoroquinolone resistance-associated *gyrA* mutations in ofloxacin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran and Belarus. *Int J Mycobacteriol* 2016;5(3):299-305.
27. Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(2):122-30.