

## OFLOXACIN, AMOXILLIN + CLAVULONIC ASID, GENTAMICIN ve TETRACYCLINE'İN TUBERKÜLOZ BASİLLERİ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİ

Dr. Bülent BAYSAL \*, Dr. A. Zeki ŞENLİ \*\*,  
Dr. Mahmut BAYKAN \*\*\*, Dr. Ahmet SANIÇ \*\*\*\*

### ÖZET

Selçuk üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tuberküloz Laboratuvarı'na başvuran hastalardan izole edilen 80 adet tuberküloz basilinin ofloxacin, amoxicillin + clavulonic asid (AC), gentamicin ve tetracycline'e duyarlılıkları in vitro olarak çalışılmıştır. Ayrıca, bulgular antitüberküloz ilaçların etkileri ile karşılaştırılmıştır. Basiller antibiyotiklerin standart MIC'deki dozları içinde yalnızca ofloxacin'e duyarlı bulunmuştur (%100). AC, gentamicin ve tetracycline'e yüksek direnç görülmüş; diğer bütün ilaçlara hassas olan suşların bunlara da hassas olduğu gözlenmiştir.

### SUMMARY

*In Vitro Effect of Ofloxacin, Amoxicillin + Clavulonic Acide, Gentamicin and Tetracycline on M.tuberculosis*

*In vitro antituberculous activity of ofloxacin, amoxicillin plus clavulonic acid (AC), gentamicin and tetracycline was determined using mycobacterium tuberculosis isolated from 80 patients who were accepted to the University Hospital. The study was carried out in the tuberculous Laboratory of Microbiology and Clinical Microbiology Department, The School of Medicine, Selçuk University, Konya. Additionally, the sensitivity of the strains obtained from patients were also studied and determined with other antituberculous drugs. Antituberculous activity of ofloxacin was found to be 100% according to the standart MIC values and the other antibiotic have shown varying degree of antituberculous activities. Higher resistances of strains were found for AC, gentamicin and tetracycline. Interestingly, the strains that are sensitive to AC, gentamicin and tetracycline are found to be sensitive to the antituberculous drugs.*

### GİRİŞ

Tuberküloz tedavisinde kemoterapi antitüberküloz ilaçların bulunmasıyla önem kazanmıştır. Özellikle streptomycin ve isoniazid'e karşı gelişen direnç nedeniyle tedavide başarısızlıklar görülmekte; bunu önlemek için ikili veya üçlü ilaç kombinasyonları denenmektedir. Aynı zamanda her yeni çıkan ilacın antitüberküloz etkisini tespit etmek için in vivo ve in vitro çalışmalar da yapılmaktadır (1-9).

Ofloxacin (DL 8280) geniş spektrumlu 4-Quinolon grubundan yeni bir antibakteriyel ilaçtır. Mikobakteri dışındaki organizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda terapötik etkisi geniş olarak araştırılmış, fakat in vivo ve in vitro antimikobakteriyel etkisi ile ilgili çalışmalar daha az bildirilmiştir (2, 3, 10-12). Verilen raporlarda ise başarılı sonuçlar elde edilmiştir (3, 12).

Bir  $\beta$ -laktamaz inhibitörü olan clavulonic asid amoxicillin'le kombine edilerek, amoxicillin'in etkisi artırılmıştır (13). Tuberküloz basili dahil mikobakterilerin pek

\* S.Ü.T.F. Mikr. ve Kln. Mikr. A.B.D. Doç. Dr.

\*\* S.Ü.T.F. Mikr. ve Kln. Mikr. A.B.D. Uzm. Dr.

\*\*\* S.Ü.T.F. Mikr. ve Kln. Mikr. A.B.D. Arş. Gör.



çoğunun değişik oranlarda  $\beta$ -laktamaz yaptıkları (14), penicillin'lerin ve özellikle cephalosporin grubu  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin daha çok atipik mikobakterilere etkili oldukları çeşitli yayınlarda bildirilmiştir (14-18).

Tetracycline, gentamicin ve diğer aminoglikozid grubu antibiyotiklerle yapılan çalışmalar genellikle atipik mikobakterilere yönelik olmuştur (1, 2, 19-23). Bu antibiyotiklerle yapılan in vivo çalışmalarda yeterli başarı elde edilememiştir (1, 16).

Çalışmamızda ofloxacin, AC, gentamicin ve tetracycline'in standart MIC dozları içinde tüberküloz basillerine in vitro etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır; bulgular antitüberküloz ilaçların aynı suşlara etkileri ile karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOD

Araştırma; Selçuk üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tuberküloz Laboratuvarı'nda klinik, poliklinik ve dispanserlerden alınan hastalık materyallerinden Lowenstein-Jensen besiyerlerinde üretilen tüberküloz basillerinde yapılmıştır. Basillere ofloxacin, AC, gentamicin ve tetracycline'nin in vitro etkileri yanında isoniazid, streptomycin, ethambutol ve rifampicin'e duyarlılıkları da test edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyonu standart MIC sınırları içinde alınıp; ofloxacin 2  $\mu$ g/ml, AC 10 $\mu$ g/ml, gentamicin 5  $\mu$ g/ml ve tetracycline 15  $\mu$ g/ml olarak kullanılmıştır (23-25).

Rutin tüberküloz antibiyogram yöntemine göre Lowenstein-Jensen besiyerlerine indirek metotla,  $10^3$  ve  $10^5$  konsantrasyonlarda ekimi yapılan tüberküloz basillerinin duyarlılıkları, 37°C de 1 ay inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 80 adet tüberküloz basilinden hiçbirinde 2  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki ofloxacin'e direnç görülmemiş; 10  $\mu$ g/ml konsantrasyonundaki AC'ye %97.5, 15  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki tetracycline'e %95 ve 5  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki gentamicin'e %92.5 oranlarında direnç gözlenmiştir (Tablo 1).

TABLO 1

Tuberküloz Basillerinin<sup>n</sup> Test Edilen Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Antibiyotik	MIC konsantrasyonu	Duyarlı sayısı	(%)	Dirençli sayısı	(%)
Ofloxacin	2 $\mu$ g/ml	80	100.0	0	0
Gentamicin	5 $\mu$ g/ml	6	7.5	74	92.5
Tetracycline	15 $\mu$ g/ml	4	5.0	76	95
Amox.Clav.Asit	10 $\mu$ g/ml	2	2.5	78	97.5

Basillerin antitüberküloz ilaçlara resistansı ise %2.5 ile %66.3 arasında değişmiştir (tablo 2). Basillerin antitüberküloz ilaç kombinasyonlarına karşı direnç durumlarına göre (Tablo 3) streptomycin ile kombine edilen kemoterapide direnç daha az görülmüştür. (Tablo:3) Tuberküloz ilaçlarının tümüne %27.5 (22/80) oranında hassasiyet gözlenmiştir.

Ofloxacin dışındaki antibiyotiklere karşı gözlenen yüksek dirence rağmen, diğer



ilaçlara hassas olan suşların bunlara da hassas olduğu sonucuna varılmıştır.

TABLO 2

*Tuberküloz Basillerinin Antitüberküler İlaçlara Karşı Direnç Durumu*

İlaç	Dirençli	
	Sayısı	Yüzdesi
Isoniazid	17	21.2
Streptomycin	16	20.0
Ethambutol	2	2.5
Rifampicin	53	66.3
Bir ilaca dirençli	35	43.7
İki ilaca dirençli	17	21.3
Üç ve daha fazla ilaca dirençli	6	7.5

TABLO 3

*Tuberküloz Basillerinin Antitüberküler Isozid, Rifampicin, Streptomycin Kombinasyonlarındaki Direnç Durumu*

İlaç Kombinasyonları	Dirençli	
	Sayısı	Yüzdesi
Isoniazid+Rifampicin	9	11.2
Isoniazid+Streptomycin	2	2.5
Rifampicin+Streptomycin	5	6.3
Isoniazid+Rifampicin+Streptomycin	4	5.0

## TARTIŞMA

Bazı *M.tuberculosis* infeksiyonlarında ilaçlara karşı multiresistans gelişmesi nedeniyle tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle mikobakteriyel hastalıkların tedavisi için yeni ilaçlar gerekmektedir; yeni izole edilen hemen her ilacın mikobakterilere etkisi de araştırılmaktadır. Bu arada 4-Quinolon grubu ilaçların mikobakterilere karşı *in vitro* etkileri ile ilgili yayımlanmış çeşitli makalelere de rastlanmaktadır (2, 10-12, 26). Ofloxacin ile yapılan çalışmalarda, *M. tuberculosis* için MIC değerinin 0.39 µg/ml ile 2.5 µg/ml arasında değiştiği gösterilmiştir (2, 10, 12, 26). Fenlon (11) bu ilacın *M. tuberculosis*'e karşı *in vitro* sonuçlarının *in vivo* kullanımda avantajını gösterdiğini de savunmuş, Tsukamura (3) ise 19 hastada yaptığı *in vivo* çalışmaların sonuçlarına göre ofloxacin'in akciğer tuberkülozu tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmüştür.

Bizim bulgularımızda, bir DNA-giraz inhibitörü olan ofloxacin'in tedavi dozuyla sağlanan serum pik seviyesi içindeki, 2 µg/ml'lik standart MIC konsantrasyonunda tuberküloz basillerinin hepsine *in vitro* olarak etkili bulunmuştur.

Mikobakterilerin hem penicillin'lere hem de cephalosporin'lere etkisi β-laktamaz enzimini yaptıkları bilinmektedir (15, 18, 27). β-laktamaz inhibitörü ilave edilmiş bazı β-laktam antibiyotiklerin çeşitli mikobakteri türlerine *in vitro* etkileri de araştırılmıştır (527). Wong ve ark (27) amoxicillin, ampicillin ve ticarcillin'e clavulonic asid ilave edildiği zaman etkilerinin artacağını, bu artışın AC'de en yüksek olduğunu; kendi bulgularında clavulonic asid'in amoxicillin'in etkisini 8 kat artırdığını ileri sürmüştür. Ancak bu artış amoxicillin'e %50 oranında clavulonic asit kombine edildiğinde sağlanmıştır. Cynamon ve Palmer (17) de 4 µg/ml amoxicillin ile 2 µg/ml clavulonic asid kombinasyonunu, 15 adet *M.tuberculosis* basilinun 14'ünde etkili bulmuşlardır.

Bizim bulgularımızda 80 adet tuberküloz basilinun yalnızca ikisi (%2,5) AC'e hassas bulunmuştur. Bu bakteriler aynı zamanda diğer antibiyotiklere ve antitüberküloz ilaçlara da hassas görülmüştür. Diğer araştırmacılarla bizim bulgularımız arasındaki farklılık metod farklılığından olabilir. Onlar yüksek oranda clavulonic asid ilave ederken, biz nonspesifik



tedavide standart olarak kullanılan AC kombinasyonunu tercih ettik. Bu kombinasyon her 30 µg da 25 mg amoxicillin ve 5 mg clavulonic asid içermekte; test edilen MIC değeri ise 10 µg/ml dir (24). Bulgularımızı değerlendirdiğimizde AC kombinasyonunun standart terapötik dozlar içinde antimikobakteriyel aktivitesinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Streptomycin, kanamycin ve neomycin gibi diğer aminoglikozitlerin etkisi göz önüne alınarak gentamicin'inde antitüberküloz aktivitesinin olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca birkaç mikobakteri türünü in vitro inhibe ettiği de gösterilmiştir (1). Dalavasio ve Pankey (23) 4 µg/ml konsantrasyonundaki gentamicin'in 5 adet *M.chelonei*'nin ikisini, 7 adet *M.fortitutum*'un 3'ünü in vitro inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Sanders ve arkadaşları (1) *M.tuberculosis*'in ilaçlara hasas suşu olan H37Rv ve H37RvSm-R suşlarından 13 adedinin üremesini 3,1 µg/ml konsantrasyondaki gentamicin ile inhibe etmişlerdir. Buna karşılık Gangadharam ve Candler (21) hastalardan izole ettikleri 20 adet *M.tuberculosis*'den yalnızca 1'inin 64 µg/ml konsantrasyonda 3'ünün de bunun üzerindeki konsantrasyonlarda inhibe edilebildiğini bildirmişlerdir.

Bulgularımızda hastalardan izole edilen 80 adet tüberküloz basilinin 6'sı (7,5) gentamicin'in 5 µg/ml'lik MIC değerinde in vitro üreme gestermemiştir. Bunlardan 3'ü antitüberküloz ilaçlara, özellikle 6'sı streptomycine de hasas bulunmuştur. Sonuçlara göre gentamicin'in test edilen standart konsantrasyonda tüberküloz basillerine etkisi düşük bulunmuştur. Gentamicin'in etkili olduğu basil suşlarının, diğer antitüberküloz ilaçlarına da hassas olduğu gözlenmiştir.

Tetracycline grubu antibiyotiklerinin antimikobakteriyel aktiviteleri ile ilgili çeşitli araştırmalar vardır. Çoğunluğu atipik mikobakterilerle yapılmıştır (2, 16, 19, 20, 22). Tsukamura (28)'in diğer mikobakterilerle birlikte yaptığı çalışmada 5 adet *M.tuberculosis*'in in vitro üremesinin 12,5 µg/ml konsantrasyonundaki minocyclin ile inhibe edildiğini bildirmiştir. Dalavasio ve Ponkey (22) ile Wallace (20) de tetracycline'in atipik mikobakterilere %50 oranında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim bulgularımızda, 4 adet (%5) tüberküloz basili tetracycline'in 15 µg/ml'lik konsantrasyonunda üreyememiştir. Bunların hepsi antitüberküloz ilaçlara da duyarlı bulunmuştur.

Gentamicin ve tetracycline grubu ilaçların ancak hasas suşlara etkili olması yanında, gösterdikleri yüksek orandaki direnç, mikobakterilerde rezistans veya kross-rezistansa neden olan genlerin varlığına bağlı olabilir. Genetik çalışmalar bazı mikobakterilerde en az 4 genin çeşitli direnç özelliklerini belirlediğini göstermiştir. Bunlara bağlı olarak kemoterapotiklerin etkileriyle ribozomların 30S veya 50S'den herhangi birisinde de veya her ikisinde, ribozomal RNA'da ya da hücre permeabilitesinde değişiklikler meydana gelebilmektedir (29). Buna karşılık antitüberküloz ilaçlara rezistans olan suşların hiç birisinde ofloxacin'e karşı direnç görülmemiştir. Bu ofloxacin ile diğerleri arasında çapraz direncin oluşmadığını göstermektedir.

Bu araştırma ile, klinik, poliklinik ve dispanserlerden alınan materyallerden izole edilen 80 adet tüberküloz basili ile ofloxacin, AC, gentamicin ve tetracycline'in standart MIC değerleri içinde yapılan in vitro duyarlılık testlerinde yalnız ofloxacin'in etkili olduğu ve dirençli vakalarda tedavide kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



## KAYNAKLAR

- 1.Sanders W.E., Pejovic I., Cacciatore R., et al.: Activity of against Mycobacteria In vitro and against Mycobacterium tuberculosis in Mice, J. infect. Diseases., 124 (supple) 533-6 1971.
2. Tsukamura M.: In Vitro Antituberculosis Activity of a New Anti bacetrial Substance Oflaxacin (DL 8280). Am. Rev. Respir. Dis. 131, 348-51, 1985.
- 3.Tsukamura M., Nakamura E., Yoshii S., et al.: Therapeutic Effect of a New Antibacterial Substance Oflaxacin (DL 8280) on Pulmonary Tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 131, 352-6, 1985.
- 4.Collins F.M., Klayman D.L., Morrison N.E.: Activity of 2-acetyl pyridine and 2-acetyl quinoline Thiocemicarbazones Tested In Vitro in Combination with other Antituberculous Drugs. Am. Rev. Respir. Dis., 125, 58-60, 1982.
- 5.Garcia-Rodriguez J.A., Martin-Luengo F.: In Vitro Susceptibility of Atypical Mycobacteria to Cephalosporins. Tubercle, 61, 39-40, 1980.
- 6.Bilgehan H., Klinik Mikrobiyoloji. Bilgehan Basımevi, İzmir, 406-36, 1986.
- 7.Jacobsen P.L., Herman N.G., Lecy. L.: The Susceptibility of Mycobacteria to Hydnocarpic Acid. Am. Rev. Respir. Dis. 107, 1022-9, 1973.
- 8-David H.L.: Effect of O-Carbamyl-D-Serine on the Growth of Myco bacterium tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis., 102, 68-74, 1970.
9. Damle P., McClatchy J.K., Gangadharam P.R.J., et al.: Antimycobacterial Activity of Some Potential Chomotherapeutic Compounds. Tubercle, 59, 135-8, 1978.
10. Soejima R., Niki Y., Kawanishi M., et al.: Bacteriological and Clinical Studies on DL-8280. Chemotherapy, 32, 443-53, 1984.
11. Fenlon C.H., Vynamon M.H.: Comparative in Vitro Activities of Ciproflaxacin and other 4-Quinolones Against Mycobacterium intracellulare. Antimicrob. Agents. Chemother., 29, 386-8, 1980.
12. Saygun N., Osmanlıoğlu G.: oflaxacin (Tarivid)'in insan tipi Mikobakteriler üzerine in Vitro Etkisi XVIII. Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi, 15-17 Ocak 1988 Etap Marmara Oteli, İstanbul.
13. Rolinson G.N.: The History and Spectrum of Augmentin, Proceedings of a Symposium in New York City, January, 19-21, 1984, New York.
14. Baclein B., Lind A., Riedell M., : A New Test Method For Demonstrating  $\beta$ -Lactamase Activity Among Mycobacteria and Nocardia Tubercle, 54, 297-307, 1973.
15. Kasik J.E., Monick M., Schwarz B.:  $\beta$ -Lactamase Acticity in Slow-Growing Nonpigmented Mycobacteria and their Sensitivity to Certain  $\beta$ -Lactam Antibiotics. Tubercle, 61, 213-9, 1980.
- 16.Garcia-Rodriguez J.E., Martin-Luengo F.: Activity of Amikacin, Erytromycin and Doxyclyne Against Mycobacterium chelonai and Mycobacterium fortitutum. Tubercle, 59, 277-80, 1978.
- 17.Cyanom M., Palmer G.: In Vitro Susceptibility of Mycobacterium fortitutum to Severel cephamycins. Am. Res. Dis, 123, 252, 1981.



18. Haas H., Michel J., Sacks T.G.: In Vitro Susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* and Related Strains to Cephalosporins. *J. Med. Microbiol.*, 6, 141-5, 1973.
19. Torres J.R., Saunders M., Sanders C.V.: In Vitro Sensitivity of *Mycobacterium marinum* to minocycline and doxycycline. *Tubercle*, 59, 193-6, 1978.
20. Wallace R.J., Wiss K., Septimus E.J., et al.: The In Vitro Activity of Antibacterial agents Against *Mycobacterium marinum*. *As. Rev. Respir. Dis.*, 123, 260, 1981.
21. Gangadharam P.R.J., Candler E.R.: in Vitro Anti-Mycobacterial Activity of some New Aminoglycoside Antibiotics. *Tubercle*, 58, 35-8, 1977.
22. Dalavio J.R., Pankey G.: Problems in Diagnosis and Therapy of *Mycobacterium fortuitum* infections. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 117, 625-30, 1978.
23. Mandell G.L., Douglas R.G., Bennet J.E.: infectious disease. Wiley Med. Publ. New York., U.S.A., Vol. 1, pp.312-24, 1985.
24. Joklik W.K., Willet H.P., Amos D.B.: Zinsser Microbiology, Eighteenth Ed. Appleton-Century-Crofts, U.S.A., pp. 141, 1984.
25. Howard B.J., Damato J.J.: Mycobacteria. Howard B.J. (Eds.): Clinical and Pathogenic Microbiology. The C.V. Mosby Company St. Louis, 479-500, 1987.
26. Tsukamura S., Muzmo S., Sotoyama H.: In Vitro Antituberculous Activity of DL 8280 on *Mycobacterium tuberculosis*. *Kekkaku (Tuberculosis)* 59, 429-34, 1984.
27. Wong C., S., Palmer G. S., Cynamon M.H.: In Vitro Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, and *Mycobacterium kansasii* to Amoxycillin and Ticarcillin in Combination with Clavulonic acid. *J. Antimicrob. Chemotherapy.*, 22, 863-6, 1988.
28. Tsukamura M., Kita N., Shimoide H.: Lung infections Due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *Kekkaku*, 60, 429-34, 1985.
29. Wilson G., et al.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, Seventh Ed. Vol. 2,70, 1983.