Kısa Bildiri/Short Communication *Mikrobiyol Bul 2023;57(4):639-649*/doi: 10.5578/mb.20239951

Geliş Tarihi (Received): 23.06.2023 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 27.09.2023

Rifabutin ve Klofaziminin Makrolidlere Dirençli *Mycobacterium abscessus* Kompleks Klinik İzolatlarına In vitro Etkinliği

In vitro Activity of Rifabutin and Clofazimine to Macrolide-Resistant *Mycobacterium abscessus* Complex Clinical Isolates

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU[1](ID), Nuri ÖZKÜTÜK[1](ID), Hörü GAZİ[1](ID), Cengiz ÇAVUŞOĞLU[2](ID)

[1] Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.
[1] Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Manisa, Türkiye.

[2] Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
[2] Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Türkiye.

**Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021-084).*

Makale Atıfı: *Sürücüoğlu S, Özkütük N, Gazi H, Çavuşoğlu C. Rifabutin ve klofaziminin makrolidlere dirençli Mycobacterium abscessus kompleks klinik izolatlarına in vitro etkinliği. Mikrobiyol Bul 2023;57(4):639-649.*

ÖZ

Mycobacterium abscessus kompleks (MABSK), antibiyotiklere en dirençli bakteriler arasında yer almaktadır. Antimikrobiyal tedavide makrolidler gibi oral yoldan kullanılabilen ilaçların sayısı sınırlıdır. Rifabutin ve klofazimin, oral yolla kullanılabilmeleri ayrıca makrolidler ve aminoglikozidler ile sinerjik etkili olmaları nedeniyle son yıllarda önem kazanmışlardır. Bu çalışmada, makrolidlere dirençli olan MABSK klinik izolatlarına karşı rifabutin ve klofaziminin in vitro etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Manisa Celal Bayar ve Ege Üniversitelerinin Tıp Fakültesi Tüberküloz Laboratuvarlarında solunum yolu ve diğer klinik örneklerden etken olarak elde edilen 48 MABSK izolatı dahil edilmiştir. İzolatların alt tür ayrımı ile aminoglikozid ve makrolid direnci GenoType NTM-DR testiyle belirlenmiştir. Rifabutin ve klofazimin duyarlılığı standart sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle incelenmiştir. MABSK izolatlarının 42'si *M.abscessus* subsp. *abscessus*, üçü *M.abscessus* subsp. *bolletii* ve üçü *M.abscessus* subsp. *massiliense* olarak tanımlanmıştır. İzolatların hiçbirinde kazanılmış makrolid direncini ve aminoglikozid direncini gösteren *rrs* ve *rrl* mutasyonu gözlenmemiştir. Ancak 41 (%85)'inde indüklenebilir makrolid direncini tanımlayan *erm*(41) T28 genotipi belirlenmiştir. *M.abscessus* subsp. *massiliense* izolatlarının tümü genotipik olarak makrolidlere duyarlı bulunmuştur. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değer aralığı rifabutin için 0.0625-32 µg/mL, klofazimin için 0.0625-1 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Makrolid direnci olan izolatlarda rifabutin MİK değeri anlamlı düzeyde (ortalama 5.98 µg/mL X 0.5 µg/mL, p= 0.026) yüksek bulunmuştur. Makrolid direnci ile klofazimin MİK değeri arasında ise bir ilişki saptanmamıştır (ortalama 0.25 µg/mL X 0.214 µg/mL, p= 0.758). $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri rifabutin için 1 ve 8 µg/mL, klofazimin için 0.25 ve 0.5 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Rifabutin MİK değerlerinin, $MİK_{50}$ değerinin üzerinde olduğu izolatlarda makrolid direnci daha fazla bulunmuştur (p= 0.045). Sonuç olarak, makrolidlere dirençli izolatlarda rifabutin MİK değerlerinin daha yüksek bulunması tedaviye rifabutin eklenmeden önce duyarlılık testinin yapılması

İletişim (Correspondence): *Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uncubozköy, Yunusemre, Manisa, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (236) 233 8586,*
E-posta (E-mail): *suheylasurucuoglu@yahoo.com*

gerektiğini düşündürmüştür. Klofaziminin MİK değerlerinin ise tüm izolatlarda düşük bulunması kombine tedavide ilk tercih olabileceğini göstermektedir. Ancak daha fazla sayıda klinik izolat kullanılarak genotipik ve fenotipik duyarlılık testlerinin uygulandığı ve klinisyene tedavi kararında yardımcı olmak için eşik MİK değerlerinin belirlendiği araştırmalara gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium abscessus kompleks; moleküler tanımlama; antimikrobiyal direnç; makrolid; rifabutin; klofazimin.*

ABSTRACT

Mycobacterium abscessus complex (MABSC) is one of the most resistant bacteria against antimicrobial agents. The number of agents that can be used by oral route, such as macrolides, is limited in antimicrobial therapy. In recent years, rifabutin and clofazimine have gained importance as they can be administered by oral route and have shown synergistic effects with macrolides and aminoglycosides. The aim of this study was to determine the in vitro activity of rifabutin and clofazimine against clinical isolates of MABSC resistant to macrolides. A total of 48 MABSC isolates obtained from respiratory tract and other clinical samples in the Tuberculosis Laboratories of the Faculty of Medicine of Manisa Celal Bayar and Ege Universities were included in the study. Subspecies differentiation and aminoglycoside and macrolide resistance of the isolates were determined by GenoType NTM-DR test. Rifabutin and clofazimine susceptibilities were determined by standard broth microdilution method. Of the MABSC isolates 42 were identified as *M.abscessus* subsp. *abscessus*, three as *M.abscessus* subsp. *bolletii* and three as *M.abscessus* subsp. *massiliense*. None of the isolates exhibited *rrs* and *rrl* mutations indicating acquired macrolide resistance and aminoglycoside resistance. However, the *erm*(41) T28 genotype which is associated with inducible macrolide resistance was detected in 41 (85%) of the strains. All *M.abscessus* subsp. *massiliense* isolates were found to be genotypically susceptible to macrolides. The minimum inhibitory concentration (MIC) range values for rifabutin were 0.0625 to 32 µg/mL, while for clofazimine, the range was 0.0625 to 1 µg/mL. Rifabutin MIC values were significantly higher (mean 5.98 µg/mL vs 0.5 µg/mL, p= 0.026) in the isolates with macrolide resistance. There was no correlation between macrolide resistance and clofazimine MIC values (mean 0.25 µg/mL vs. 0.214 µg/mL, p= 0.758). The MIC_{50} and MIC_{90} values for rifabutin were 1 and 8 µg/mL, respectively, while for clofazimine they were 0.25 and 0.5 µg/mL. Macrolide resistance was found to be higher in isolates with rifabutin MIC values above the MIC_{50} value (p= 0.045). In conclusion, the determination of higher rifabutin MIC values in isolates resistant to macrolides suggested that susceptibility testing should be performed before adding rifabutin to the treatment regimen. The low MIC values of clofazimine in all strains indicated that it may be used as a first choice in the combination therapy. However, further studies using a larger number of clinical isolates and applying genotypic and phenotypic susceptibility tests are needed to determine threshold MIC values to assist clinicians in making treatment decisions.

Keywords: *Mycobacterium abscessus complex; molecular identification; antimicrobial resistance, macrolide; rifabutin, clofazimine.*

GİRİŞ

Tüberküloz dışı mikobakteriler içinde yer alan *Mycobacterium abscessus* kompleks (MABSK), antibiyotiklere en dirençli bakterilerden biridir ve "antibiyotik kabusu" olarak adlandırılmıştır[1]. MABSK'ye en etkili antimikrobiyal ilaçlar makrolid ve aminoglikozidlerdir. Makrolid direnci olanlarda kliniğin kötü seyirli olduğu ve kültür konversiyonunun anlamlı oranda düşük olduğu gösterilmiştir[2]. Makrolid direnci, kazanılmış veya indüklenebilir (intrensek) mekanizmalar ile ortaya çıkabilir[3]. Kompleks içinde yer alan *M.abscessus* subsp. *abscessus* (*M.abscessus*) ve *M.abscessus* subsp. *bolletii* (*M.bolletii*) izolatlarının birçoğu *erm*(41) geni tarafından kodlanan işlevsel bir eritromisin ribozom metiltransferaz

enzimi yolu ile indüklenebilir makrolid direncine sahiptir. Kazanılmış direnç ise makrolidlerin hedefi olan 23S rRNA'nın peptidiltransferaz alanını kodlayan *rrl* genindeki nokta mutasyonlar (A2058 ve A2059) ile ortaya çıkar. *M.abscessus* komplekste 16S rRNA'nın 1408 pozisyonundaki farklı mutasyonların ise aminoglikozidlere yüksek düzeyde dirençten sorumlu olduğu bilinmektedir[4]. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)], etken olarak kabul edilen MABSK üyelerinin moleküler olarak alt tür ayrımının yapılmasını ve klaritromisin ve amikasin başta olmak üzere çeşitli antimikrobiyal ilaçlara in vitro duyarlılıklarının belirlenmesini önermiştir[5].

M.abscessus kompleks enfeksiyonlarının tedavisinde birçok yeni ilaç denenmektedir. Bu ilaçlar içinde rifabutin ve klofazimin, oral kullanılabilmeleri ve MİK değerlerinin düşük olmasıyla önem kazanmıştır[1,6]. MABSK rifampisine dirençli olmakla birlikte rifabutin MABSK'nin hem hücre içi hem de hücre dışı formlarında etkili bulunmuştur[7]. Yarılanma ömrünün uzun olması, hücre içi penetrasyonunun ve dokulara dağılım hacminin yüksek olması ve ayrıca ilaç etkileşimlerinin az olması tedavi seçeneği olarak rifabutini öne çıkarmaktadır[8]. Klofazimin ise lepra ve çok ilaca dirençli tüberküloz tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Amikasin ve makrolidler ile kullanıldığında sinerjik etkili olduğu gösterilmiştir[9]. Bu nedenle tedaviyi güçlendirmek için iyi bir seçenek olabilir. Bu çalışmada, line probe assay teknolojisine dayalı bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan GenoType NTM-DR testiyle alt türleri tanımlanan, makrolid ve aminoglikozid direnci belirlenen MABSK izolatlarının yeni tedavi seçeneklerinden klofazimin ve rifabutine duyarlılıklarının fenotipik olarak saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 07/07/2021 ve Karar no: 20.478.486).

Mycobacterium abscessus Kompleks İzolatları

Araştırmada Manisa Celal Bayar Üniversitesi ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüberküloz Laboratuvarlarında solunum yolu ve diğer klinik örneklerden etken olarak elde edilmiş ve stoklanmış her biri farklı hastaya ait toplam 48 MABSK izolatı kullanıldı. Kriyobanklarda yağsız süt içinde -20 derecede saklanmakta olan izolatlardan 100 µl alınarak "mycobacterium growth indicator tube (MGIT)" kültür şişelerine aktarıldı ve izolatlar MGIT 960 otomatize kültür sistemi (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak canlandırıldı. Üreme sinyali alınan şişelerden çikolata besiyerine (Becton Dickinson, ABD) ekim yapılarak olası kontaminasyon durumu araştırıldı. Kontaminasyon durumunda bu izolatlar değerlendirme dışında tutuldu.

Genotype NTM-DR Testi

"GenoType NTM-DR (Hain Lifescience, Almanya)" sürüm 1 testi üretici firmanın önerilerine uygun olarak çalışıldı. DNA ekstraksiyonu için MGIT kültür şişesinden 1 ml alınarak 10000xg hızda 15 dakika santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldıktan sonra çökeltiye

100-300 µl steril distile su eklendi ve vortekslendi. Daha sonra tüpler 95 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Ardından ultrasonik banyoda (Elmasonic, Singen D-78224) 15 dakika inkübe edildi. Tüpler tam hızda beş dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvıdan 5 µl alınarak polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] için kullanıldı. Revers hibridizasyon sonrası şeritler değerlendirme kağıdına yapıştırıldı ve üretici tarafından sağlanan şablon yardımıyla yorumlandı.

Rifabutin ve Klofaziminin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Rifabutin ve klofaziminin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI M24 önerileri doğrultusunda 96 kuyucuklu steril mikroplaklar kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırıldı[5]. Rifabutin (CAS No 72559-06-9) ve klofazimin (CAS No 2030-63-9) ticari olarak (Sigma-Aldrich, ABD) temin edildi. Antibiyotiklerin stok çözeltileri 1 ml dimetil sülfoksit içinde hazırlandı. Her iki antibiyotik için mikroplak kuyucuklarındaki final konsantrasyonlar 0.0625-64 µg/mL idi. Plaklar dikkatlice karıştırıldıktan sonra üzeri steril yapışkan bant ile kaplandı ve kilitli plastik poşetlere yerleştirildi. Plaklar 30 °C'de 3-5 gün inkübe edildi. Her gün görsel olarak pozitif kuyucuk bulanıklık için kontrol edildi ve üreme yeterliyse MİK değerleri kaydedildi. Rifabutin ve klofazimin için belirlenmiş bir MİK değeri olmadığından sonuçlar dirençli veya duyarlı olarak değerlendirilmedi. Kontrol olarak *M.abscessus* NCTC13031 suşu kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 21.0 paket programı (SPSS Inc, Chicago, ABD) kullanıldı. Grup değişkenleri yüzde ile sunuldu. Sayısal değişkenlerdeki farklılıklar Mann-Whitney U testiyle, kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki-kare testiyle değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda $p < 0.05$ değerler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

GenoType NTM-DR testi sonuçlarına göre 48 MABSK izolatının 42 (%88)'si *M.abscessus*, üçü (%6) *M.bolletii* ve üçü (%6) *M.massiliense* olarak belirlenmiştir. Makrolid ve aminoglikozidlere moleküler direnç oranları Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I. *Mycobacterium abscessus Kompleks İzolatlarının GenoType NTM-DR Sonuçlarına Göre Makrolid ve Aminoglikozidlere Direnç Oranları**

	Makrolid Direnci				Aminoglikozid Direnci	
	İndüklenebilir Direnç		Kazanılmış Direnç			
Alt Tür	**Var**	**Yok**	**Var**	**Yok**	**Var**	**Yok**
M.abscessus	38 (%90)	4 (%10)	0	42 (%100)	0	42 (%100)
M.bolletii	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0	3 (%100)
M.massiliense	0	3 (%100)	0	3 (%100)	0	3 (%100)
Toplam	41 (%85)	7 (%15)	0	48 (%100)	0	48 (%100)

*Satır yüzdeleri alınmıştır.

İzolatların hiçbirinde moleküler olarak aminoglikozid direnci (*rrs* mutasyonu) ve kazanılmış makrolid direnci (*rrl* mutasyonu) gözlenmemiştir. *M.abscessus* izolatlarının 38 (%90)'inde ve *M.bolletii* izolatlarının tümünde (%100) indüklenebilir makrolid direnci belirteci olan *erm*(41) T28 genotipi izlenmiştir. *M.massiliense* izolatlarında makrolid duyarlılığını ifade eden *erm*(41) delesyonu tespit edilmiştir. *M.abscessus* kompleks izolatlarının GenoType NTM-DR sonuçları ile rifabutin ve klofazimin MİK değerleri Tablo II'de gösterilmiştir.

M.abscessus kompleks izolatlarının rifabutin ve klofazimin MİK değerlerine ve makrolid dirençlerine göre dağılımı Tablo III'te gösterilmiştir. Makrolid direnci olan izolatlarda rifabutin MİK değeri anlamlı düzeyde (ortalama 5.98 µg/mL X 0.5 µg/mL, p= 0.026) yüksek bulunmuştur. Makrolid direnci ile klofazimin MİK değeri arasında ise bir ilişki saptanmamıştır (ortalama 0.25 µg/mL X 0.214 µg/mL, p= 0.758).

$MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri rifabutin için 1 ve 8 µg/mL, klofazimin için 0.25 ve 0.5 µg/mL olarak saptanmıştır. Tablo IV'te rifabutin ve klofozamin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri eşik olarak alınarak izolatların makrolidlere direnç durumlarına göre dağılımı gösterilmiştir. Rifabutin MİK değeri, $MİK_{50}$ değerinin üzerinde olan izolatlarda makrolid direnci daha fazla bulunmuştur. Klofazimin için bu ilişki saptanmamıştır.

TARTIŞMA

M.abscessus kompleks üyelerinde makrolidlerin hedefi olan rRNA operonunun tek kopyası olduğundan hem indüklenebilir hem de kazanılmış makrolid direncinden sorumlu genotipler yüksek düzeyde dirence neden olur[10]. Bu izolatlarda makrolid tedavisi başarısız kalır. Araştırmada incelenen 48 MABSK izolatının %85'inde indüklenebilir makrolid direncini tanımlayan işlevsel *erm*(41) geni saptanmıştır. Bu sonuç hastaların ancak %15'inin makrolid tedavisine yanıt vereceğini göstermektedir. İndüklenebilir makrolid direnci *M.abscessus* alt türlerinin %90'ında, *M.bolletii* alt türlerinin ise tamamında saptanmıştır. *M.massilense* izolatlarında *erm*(41) gen delesyonu nedeniyle indüklenebilir makrolid direnci bulunmamıştır. Bu nedenle MABSK enfeksiyonlarında kültürde üreme olduktan sonra moleküler olarak alt tür ayrımının yapılması tedaviye hızla yön verilmesi açısından önemlidir.

MABSK'ye etkili olan ve oral kullanılabilen sadece birkaç antimikrobiyal ilaç bulunmaktadır. Bu nedenle rifabutin ve klofazimin ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır[2,5,6,11-14]. Rifamisinler içinde tüberküloz dışı mikobakterilere karşı en düşük MİK değeri rifabutinde gözlenmiştir[15]. Rifabutin direnci için belirlenmiş bir MİK değeri yoktur. MABSK standart suşları ve klinik izolatlar ile yapılan bir araştırmada rifabutin $MİK_{90}$ değeri 3 µg/mL olarak bulunmuştur[6]. Tayvan'da yapılan bir araştırmada ise 26 *M.abscessus* izolatında rifabutinin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri sırasıyla 16 ve 32 µg/mL olarak bulunmuştur[3]. Bu araştırmada ise rifabutinin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri 1 ve 8 µg/mL olarak bulunmuştur. Coğrafik bölgeye, hastanın tedavi öyküsüne, uygulanan yönteme ve kullanılan besiyerine göre MİK değerleri değişebilmektedir. Araştırmada makrolidlere dirençli olan izolatlarda rifabutin MİK değeri anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.

Tablo II. *Mycobacterium abscessus Kompleks İzolatlarının GenoType NTM-DR Sonuçları ile Rifabutin ve Klofazimin MİK Değerleri*

		Makrolid		Aminoglikozid	MİK µg/mL	
İzolat No	**Alt Tür**	***rrl***	***erm*(41)**	***rrs***	**Rifabutin**	**Klofazimin**
1	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.125
2	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.125
3	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.125	0.06
4	*M.abscessus*	*rrl*, WT	C(28)	*rrs*, WT	0.125	0.06
5	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	1	0.25
6	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.25
7	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.25
8	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.125	0.06
9	*M.abscessus*	*rrl*, WT	C(28)	*rrs*, WT	0.125	0.25
10	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.125	0.06
11	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.5	0.25
12	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.06	0.06
13	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.125	0.06
14	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	8	0.25
15	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	2	0.125
16	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.25
17	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.06	0.06
18	*M.abscessus*	*rrl*, WT	C28	*rrs*, WT	0.125	0.5
19	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	16	0.5
20	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	1	0.25
21	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.06	0.06
22	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.25
23	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.25
24	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	8	0.5
25	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.125	0.25
26	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.5	0.25
27	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	8	0.5
28	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	16	1
29	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	1	0.25
30	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	32	0.5
31	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	32	0.25
32	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	32	0.5
33	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	2	0.125
34	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	4	0.25
35	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	8	0.125
36	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.125	0.25
37	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	16	0.125
38	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	8	0.25

Tablo II. *Mycobacterium abscessus Kompleks İzolatlarının GenoType NTM-DR Sonuçları ile Rifabutin ve Klofazimin MİK Değerleri (devamı)*

		Makrolid		Aminoglikozid	MİK µg/mL	
İzolat No	**Alt Tür**	***rrl***	***erm*(41)**	***rrs***	**Rifabutin**	**Klofazimin**
39	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.06	0.06
40	*M.abscessus*	*rrl*, WT	C(28)	*rrs*, WT	0.06	0.06
41	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	16	0.06
42	*M.abscessus*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	1	0.25
43	*M.bolletii*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	1	0.5
44	*M.bolletii*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	2	0.125
45	*M.bolletii*	*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	0.5	0.25
46	*M.massiliense*	*rrl*, WT	T(28), SP10 delesyon	*rrs*, WT	0.25	0.125
47	*M.massiliense*	*rrl*, WT	T(28), SP10 delesyon	*rrs*, WT	1	0.25
48	*M.massiliense*	*rrl*, WT	T(28), SP10 delesyon	*rrs*, WT	2	0.25
***M.abscessus* NCTC 13031**		*rrl*, WT	T(28)	*rrs*, WT	2	0.5

Aynı zamanda MİK değeri, $MİK_{50}$ değerinin üzerinde olan izolatlarda makrolid direnci daha fazla bulunmuştur. Bu sonuç, makrolidlere dirençli MABSK tedavisinde rifabutinin duyarlılık test sonuçlarına göre kullanılmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Klofazimin oral kullanılabilmesi, yarılanma ömrünün uzun olması, makrofajlarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmesi nedeniyle tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarının tedavisi için iyi bir seçenektir[16]. Klofaziminin *M.abscessus* ve *M.avium* kompleks izolatlarına karşı MİK değerleri ile hastalığın prognozu arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada MİK değerleri MAK için 0.031-8 µg/mL, *M.abscessus* için 0.031-16 µg/mL bulunmuştur[17]. Klofazimin MİK değeri ≤ 0.25 µg/mL olan *M.abscessus* ve *M.avium* kompleks izolatlarının etken olduğu hastaların tümünde kültür konversiyonunun sağlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte *M.abscessus*'un etken olduğu akciğer enfeksiyonu olan 42 hastanın retrospektif değerlendirmesinin yapıldığı bir araştırmada hastaların %81'inde semptomatik düzelme sağlanırken hastaların ancak %24'ünde kültür konversiyonu sağlanabilmiştir[18]. Bu araştırmada klofazimin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri ise 0.25 ve 0.5 µg/mL olarak bulunmuştur. MABSK alt türlerinde klofazimin MİK değerlerini araştıran iki farklı çalışmada da benzer şekilde $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri 0.125 µg/mL ve 0.25 µg/mL bulunmuştur[19,20]. Tayvan'da yapılan bir çalışmada $MİK_{90}$ değeri 2 µg/mL iken Çin'de bu değer > 8 µg/mL olarak bildirilmiştir[3,20]. Bu araştırmada izolatların tamamının klofazimin MİK değerleri ≤ 1 µg/mL bulunduğundan ve klaritromisine dirençli izolatlarda da MİK değeri düşük olduğundan MABSK enfeksiyonlarının tedavisinde öncelikli olabileceği düşünülmüştür. Ülkemizde MABSK enfeksiyonlarının bildiriminin sınırlı olması

Tablo III. *Mycobacterium abscessus Kompleks İzolatlarının Rifabutin ve Klofazimin MİK Değerlerine ve Makrolid Dirençlerine Göre Dağılımı*

MİK µg/mL Rifabutin	*M.abscessus* Kompleks (n= 48) Makrolid			MİK µg/mL Klofazimin	*M.abscessus* Kompleks (n= 48) Makrolid		
	Duyarlı	Dirençli	Toplam		Duyarlı	Dirençli	Toplam
0.0625	1 (%20)	4 (%80)	5 (%100)	0.0625	2 (%18)	9 (%82)	11 (%100)
0.125	3 (%33)	6 (%67)	9 (%100)	0.125	1 (%13)	7 (%87)	8 (%100)
0.25	1 (%100)	0	1 (%100)	0.25	3 (%14)	18 (%86)	21 (%100)
0.5	0	3 (%100)	3 (%100)	0.5	1 (%14)	6 (%86)	7 (%100)
1	1 (%17)	5 (%83)	6 (%100)	1	0	1 (%100)	1 (%100)
2	1 (%25)	3 (%75)	4 (%100)	2	0	0	0
4	0	8 (%100)	8 (%100)	4	0	0	0
8	0	5 (%100)	5 (%100)	8	0	0	0
16	0	4 (%100)	4 (%100)	16	0	0	0
32	0	3 (%100)	3 (%100)	32	0	0	0
Toplam	7 (%15)	41 (%85)	48 (%100)	Toplam	7 (%15)	41 (%85)	48 (%100)
	p= 0.026*				p= 0.758*		

*Mann-Whitney U testi.

ve klofaziminin yaygın kullanılmaması direnç sonuçlarını etkilemiş olabilir. Bu nedenle MABSK enfeksiyonlarının tedavisinin antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarına göre düzenlenmesi akılcı bir yaklaşım olacaktır.

Çalışmamızın iki kısıtlı yönü bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi hastaların tedavi öykülerinin ve klaritromisin tedavisine yanıtlarının bilinmemesidir. Bu nedenle duyarlılık test sonuçları ile klinik yanıt arasında korelasyon olup olmadığı belirlenememiştir. Ayrıca kazanılmış makrolid direncini gösteren *rrl* mutasyonlarının ve aminoglikozid direncini tanımlayan *rrs* mutasyonlarının görülmemesi, değerlendirilen izolat sayısının az olmasıyla ilişkili olabilir. Bu nedenle daha fazla sayıda izolat içeren geniş kapsamlı çalışmalar gereklidir.

Sonuç olarak, etken olarak belirlenen MABSK izolatlarında makrolid direncinin yüksek oranda bulunması kombine antimikrobiyal tedavide oral olarak kullanılabilen rifabutin ve klofaziminin önemini arttırmaktadır. Araştırmada makrolidlere dirençli izolatlarda rifabutin MİK değerleri daha yüksek bulunmuştur. Rifabutinin klaritromisin ile kullanıldığında sinerjik etkili olduğu bildirilmiş olmakla birlikte tedaviye rifabutin eklenmeden önce duyarlılık testinin yapılması yararlı olacaktır. Klofazimin MİK değerleri ise hem makrolidlere dirençli hem de duyarlı izolatlarda düşük bulunmuştur. Bu sonuç klofaziminin kombine tedavide ilk tercih olabileceğini göstermektedir. Ancak daha fazla sayıda klinik izolat kullanılarak genotipik ve fenotipik duyarlılık testlerinin uygulandığı ve klinisyene tedavi kararında yardımcı olmak için eşik MİK değerlerinin belirlendiği araştırmalara gereksinim vardır.

Tablo IV. *Mycobacterium abscessus Kompleks İzolatlarının Rifabutin ve Klofazimin $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ Eşik Değerlerine Göre Makrolid Direnç Durumları*

	Makrolid				Makrolid		
Rifabutin $MİK_{50}$	**Dirençli**	**Duyarlı**	**Toplam**	**Rifabutin $MİK_{90}$**	**Dirençli**	**Duyarlı**	**Toplam**
≥ 1 µg/mL	28 (%93.3)	2 (%6.7)	30 (%100)	≥ 8 µg/mL	12 (%100)	0	12 (%100)
< 1 µg/mL	13 (%72.2)	5 (%27.8)	18 (%100)	< 8 µg/mL	29 (%80.6)	7 (%19.4)	36 (%100)
Toplam	41 (%85.4)	7 (%14.6)	48 (%100)	Toplam	41 (%85.4)	7 (%14.6)	48 (%100)
	p= 0.045*				p= 0.098		
Klofazimin $MİK_{50}$	**Dirençli**	**Duyarlı**	**Toplam**	**Klofazimin $MİK_{90}$**	**Dirençli**	**Duyarlı**	**Toplam**
≥ 0.25 µg/mL	25 (%86.2)	4 (%13.8)	29 (%100)	≥ 0.5 µg/mL	8 (%88.9)	1 (%11.1)	9 (%100)
< 0.25 µg/mL	16 (%84.2)	3 (%15.8)	19 (%100)	< 0.5 µg/mL	33 (%84.6)	6 (%15.4)	39 (%100)
Toplam	41 (%85.4)	7 (%14.6)	48 (%100)	Toplam	41 (%85.4)	7 (%14.6)	48 (%100)
	p= 0.8				p= 0.743		

*Ki-kare testi.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Sayı: 20.478.486, Tarih: 07.07.2021).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: A new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother 2012; 67(4): 810-8. https://doi.org/10.1093/jac/dkr578
2. Wetzstein N, Kohl TA, Schultze TG, Andres S, Bellinghausen C, Hügel C, et al. Antimicrobial susceptibility and phylogenetic relations in a German cohort infected with *Mycobacterium abscessus*. J Clin Microbiol 2020; 58(12): e01813-20. https://doi.org/10.1128/JCM.01813-20
3. Cheng A, Tsai YT, Chang SY, Sun HY, Wu UI, Sheng WH, et al. In vitro synergism of rifabutin with clarithromycin, imipenem, and tigecycline against the *Mycobacterium abscessus* complex. Antimicrob Agents Chemother 2019; 63(4): e02234-18. https://doi.org/10.1128/AAC.02234-18
4. Bouzinbi N, Marcy O, Bertolotti T, Chiron R, Bemer P, Pestel-Caron M, et al. Evaluation of the GenoType NTM-DR assay performance for the identification and molecular detection of antibiotic resistance in *Mycobacterium abscessus* complex. PLoS One 2020; 15(9): e0239146. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239146
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardia* spp., and other aerobic actinomycetes. 3rd ed, CLSI Standard Document, M24.
6. Aziz DB, Low JL, Wu ML, Gengenbacher M, Teo JWP, Dartois V, et al. Rifabutin is active against *Mycobacterium abscessus* complex. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(6): e00155-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00155-17
7. Johansen MD, Daher W, Roquet-Banères F, Raynaud C, Alcaraz M, Maurer FP, et al. Rifabutin is bactericidal against intracellular and extracellular forms of *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 2020; 64(11): e00363-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00363-20
8. Chen Y, Chen J, Zhang S, Shi W, Zhang W, Zhu M, et al. Novel mutations mssociated with clofazimine resistance in *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62(7): e00544-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00544-18
9. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ Jr, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: An official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. Eur Respir J 2020; 56(1): 2000535. https://doi.org/10.1183/13993003.00535-2020
10. Dos Santos Carneiro M, de Lima-Morales D, Crispim MN, de Souza Nunes L, Barth AL. Novel mutations in the resistome of a new sequence type (ST262) of clarithromycin resistant *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. J Glob Antimicrob Resist 2020; 21: 294-5. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.030
11. Chew KL, Octavia S, Go J, Ng S, Tang YE, Soh P, et al. In vitro susceptibility of *Mycobacterium abscessus* complex and feasibility of standardizing treatment regimens. J Antimicrob Chemother 2021; 76(4): 973-8. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa520
12. Huh HJ, Kim SY, Jhun BW, Shin SJ, Koh WJ. Recent advances in molecular diagnostics and understanding mechanisms of drug resistance in nontuberculous mycobacterial diseases. Infect Genet Evol 2019; 72: 169-82. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.003
13. Hurst-Hess KR, Saxena A, Rudra P, Yang Y, Ghosh P. *Mycobacterium abscessus* HelR interacts with RNA polymerase to confer intrinsic rifamycin resistance. Mol Cell 2022; 82(17): 3166-3177.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.034
14. Aziz DB, Go ML, Dick T. Rifabutin suppresses inducible clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus* by blocking induction of *whi*B7 and *erm*41. Antibiotics (Basel) 2020; 9(2): 72. https://doi.org/10.3390/antibiotics9020072
15. Kim DH, Kim SY, Huh HJ, Lee NY, Koh WJ, Jhun BW. In vitro activity of rifamycin derivatives against nontuberculous mycobacteria, including macrolide-/amikacin-resistant clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2023; 65(5): e02611-20. https://doi.org/10.1128/AAC.02611-20
16. Kim DH, Kim BG, Kim SY, Huh HJ, Lee NY, Koh WJ, et al. In vitro activity and clinical outcomes of clofazimine for nontuberculous mycobacteria pulmonary disease. J Clin Med 2021; 10(19): 4581. https://doi.org/10.3390/jcm10194581

17. Kwak N, Whang J, Yang JS, Kim TS, Kim SA, Yim JJ. Minimal inhibitory concentration of clofazimine among clinical isolates of nontuberculous mycobacteria and its impact on treatment outcome. Chest 2021; 159(2): 517-23. https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.07.040

18. Yang B, Jhun BW, Moon SM, Lee H, Park HY, Jeon K, et al. Clofazimine-containing regimen for the treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(6): e02052-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02052-16

19. Schulthess B, Akdoğan Kittana FN, Hömke R, Sander P. In vitro bedaquiline and clofazimine susceptibility testing in *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 2022; 66(5): e0234621. https://doi.org/10.1128/aac.02346-21

20. Luo J, Yu X, Jiang G, Fu Y, Huo F, Ma Y, et al. In vitro activity of clofazimine against nontuberculous mycobacteria isolated in Beijing, China. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62(7): e00072-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00072-18