

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS KÖKENLERİNİN BİRİNCİ SEÇENEK ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIĞININ SAPTANMASINDA BACTEC VE AGAR PROPORSİYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

MAJOR DRUG SUSCEPTIBILITY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX: COMPARISON OF BACTEC AND AGAR PROPORTION METHODS

Gülhan KORKMAZ

İclal BALCI

Ayşen BAYRAM

Tekin KARSLIĞİL

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Anahtar Sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, birinci seçenek antitüberküloz ilaçlar, *in vitro* ilaç duyarlılığı, BACTEC yöntemi, agar proporsiyon yöntemi

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, major antituberculosis drugs, *in vitro* drug susceptibility, BACTEC method, agar proportion method

Geliş: 18 Ekim 2004

Kabul: 22 Nisan 2005

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden BACTEC yöntemi ile soyutlanan 104 tane *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökeninin ilk dört seçenek antitüberküloz ilaca [izoniyazit (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB) ve streptomisin (STM)] karşı duyarlılıkları BACTEC ve agar proporsiyon yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Bu örneklerin Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile asidorezistan basil saptanma oranı %36.54 bulundu. BACTEC yöntemi ile 59 kökenin (%56.73) en az bir ilaca dirençli olduğu, 26 kökenin (%25) INH'e, 11 kökenin (%10.58) RIF'e, 19 kökenin (%18.27) EMB'e, üç kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptandı. Toplam altı kökenin (%5.76) iki ilaca, dört kökenin (%3.84) üç ilaca dirençli olduğu görüldü. Agar proporsiyon yöntemi ile toplam 67 kökenin (%64.42) en az bir ilaca dirençli olduğu, 25 kökenin (%24.04) İNH'e, 11 kökenin (%10.58) RIF'e, 27 kökenin (%25.96) EMB'e, üç kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptandı. Toplam yedi kökenin (%6.72) iki ilaca, beş kökenin (%4.81) üç ilaca dirençli olduğu saptandı. Her iki yöntemde de dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmadı. İki yöntem karşılaştırıldığında; INH için uyum %99, RIF için %100, EMB için %92.3, STM için ise %100 olarak saptandı. Ancak BACTEC yöntemi, agar proporsiyon yöntemine göre iş gücü az, daha hızlı ve standart sonuç vermesi nedeniyle üstünlük göstermektedir. Bu nedenle birinci seçenek antitüberküloz ilaçlar için rutin amaçlı kullanılabilir, güvenilir bir yöntem olarak önerilebilir.

SUMMARY

The purpose of this study was to compare and evaluate two methods, namely, BACTEC and agar proportion methods, in determining the *in vitro* susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex to major antituberculosis drugs (isoniazide=INH, rifampicin=RIF, ethambutol=EMB and STM=streptomycin). The positivity of acido-resistant bacilli among 104 concentrated clinical specimens was 36.54%. With the BACTEC method, 59 (56.73%) of 104 strains were resistant to at least one drug; 26 (25%) of them resistant to INH, 11 (10.58%) to RIF, 19 (18.27%) to EMB and 3 (2.89%) to STM. Six (5.76%) strains were resistant to two and four (3.84%) strains were resistant to three drugs. With agar proportion method, 67 (64.42%) of 104 strains were resistant to at least one drug; being 25 (24.04%) of them resistant to INH, 11 (10.58%) to RIF, 27 (25.96%) to EMB and 3 (2.89%) to STM. Seven (7.69%) strains were resistant to two and five (4.80%) strains were resistant to three drugs. There were no strains resistant to all of the four drugs with both methods. When the two methods were compared, the agreements for INH, RIF, EMB, and STM were as

follows: for INH 99%, for RIF 100%, for EMB 92.3% and for STM 100%. BACTEC method requires less laboratory work, is faster and gives more standardized results compared to agar proportion method, and it can be used safely for routine susceptibility tests of first-line antituberculosis drugs.

GİRİŞ

İnsanoğlunun en eski hastalıklarından olan tüberküloz, çok değişik klinik görünümlere sahip, kronik nekrotizan bir bakteri enfeksiyonudur. Hastalığın önde gelen etkeni *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)'dir. Hastalık tüm organları tutabilir, ancak ilk yerleştiği organ (%85) akciğerler olup diğer organlar sekonder olarak tutulur (1).

Bugün dünya nüfusunun %32'sinin tüberküloz basili ile enfekte olduğu, her yıl yaklaşık sekiz milyon kişinin tüberküloz hastalığına yakalandığı ve ortalama iki milyon insanın öldüğü bildirilmektedir (2). Tüm ülkeleri ilgilendiren önemli enfeksiyon hastalıklarından biri olmasına rağmen enfekte kişilerin büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde bulunmaktadır (2, 3).

Önlem alınmazsa 2004'te yıllık ölüm rakamları yılda dört milyonu aşacaktır (4). Son yıllarda, tüm dünyada, özellikle HIV pozitif ve bağışıklığı baskılanmış diğer hastaların artışına bağlı olarak tüberküloz olgu sayısında artışlar olmuştur (1-4). Tüberküloz insidansının artmasıyla birlikte çoklu dirençli tüberküloz (MDR-tb) ortaya çıkmıştır (5).

Mutasyonlar sonucu ortaya çıkacak dirençli kökenlerin oluşmasını uygun tedaviyle önlemek için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması önemlidir (5). Çok ilaca dirençli kökenlerle oluşan tüberküloz olgularının artması, mikobakterilerin tür ve direnç saptanmasında daha hızlı ve güvenli sonuçlar veren, standardize edilmiş ve doğru yorumlama kriterlerine sahip *invitro* duyarlılık yöntemlerine gereksinimi artırmıştır (4). Amerikan Hastalık Kontrol merkezi (CDC), klinik örnek laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28-30 günde *M. tuberculosis* kompleks için duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını önermektedir (6). Bu amaçla bütün dünyada yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri proporsiyon yöntemi olup, The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından altın standart olarak kabul edilmektedir (7). Bu yöntem zaman alan ve dikkatli uygulanması gereken bir yöntemdir. Diğer ise BACTEC 460 TB sisteminin kullanıldığı modifiye proporsiyon yöntemidir. Bu yöntem ise, hızlı, kolay uygulanan, fazla iş yükü gerektirmeyen bir yöntemdir ve günümüzde birçok merkezde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada altın standart olarak kabul edilen 7H10 agar proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460 TB sisteminin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney kökenleri; 2002-2003 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden elde edilmiştir (Tablo 1). Tüberküloz öntanılı hastaların balgam, beyin-omurilik sıvısı (BOS), açlık mide suyu (AMS), bronko-alveoler lavaj (BAL), idrar, apse, plevra sıvısı, perikart sıvısı gibi klinik örneklerinden, BACTEC sistemi ile soyutlanan 104 kökenin antibiyotik duyarlılık testi, BACTEC sistemi (Becton Dickonson Microbiology Systems, ABD) ve NCCLS'in altın standart olarak kabul ettiği proporsiyon (Middlebrook 7H10 agar besiyeri kullanılarak) yöntemi ile saptanmış, iki yöntem bulguları karşılaştırılmıştır. Standart köken olarak *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) ve *M. tuberculosis* ATCC 35838 kullanılmıştır.

Tablo 1. Örneklerin türlere ve gönderildiği kliniklere göre dağılımı

Örnek	Servisler			
	İnfeksiyon	Pediyatri	Diğer *	Göğüs Hastalıkları
Balgam				74
Bronkoalveoler lavaj				9
Plevra sıvısı			4	
Perikart sıvısı			2	
Trakeal aspirat				3
Açlık mide suyu		8		
Beyin-omurilik sıvısı			2	
İdrar	1			
Apse (irin)	1			

Örnekler dekontaminasyon ve homojenizasyon işleminin ardından Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile asido-rezistan basil (ARB) açısından incelenmiş ve ekimleri yapılmıştır.

Tablo 2. Middlebrook 7H10 besiyerine eklenecek ilaç konsantrasyonları

İlaçlar	İlaç konsantrasyonları (µg/ml)	200ml 7H10 agar besiyerine eklenecek ilaç (ml)	Besiyerindeki son ilaç konsantrasyonları (µg/ml)
İzoniyazit	100	0.4	0.2
Rifampisin	1000	0.2	1
Etambutol	1000	1	5
Streptomisin	1000	0.4	2

BACTEC yönteminde 12B besiyeri şişeleri kullanılmış, her şişe BACTEC 460-TB aygıtında okutulmuş büyüme indeksi (Bİ) saptanmıştır. Kan, BOS, plevra ve perikart sıvısı gibi örnekler 13A besiyerine direkt inoküle edilmiş, üreme durumunda 12B besiyerine subkültür yapılarak antibiyotik duyarlılık testine alınmıştır. Tüberküloz (TB) komplekse ait mikobakterileri MOTT basillerinden ayırt etmek için NAP testi kullanılmıştır. NAP testi ile TB kompleks olarak değerlendirilen örnekler duyarlılık testine alınmıştır. Duyarlılık testlerinde antibiyotik olarak etambutol (EMB), izoniyatit (INH), rifampisin, (RIF) ve streptomisin (STM)'i liyofilize formda içeren BACTEC SİRE kiti kullanılmış, üretici firmanın önerileri doğrultusunda B12 şişelerine eklenmiştir.

Proporsiyon yönteminde; Middlebrook 7H10 agar besiyeri (Difco, Becton Dickinson Microbiology Systems, ABD), oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz (OADC) suplementi, gliserol, antibiyotik stok solüsyonları (EMB, INH, RIF ve STM) kullanılmıştır. Antibiyotikler liyofilize halde alınmış (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya), NCCLS'in önerdiği konsantrasyonlarda sulandırılarak kullanılmıştır (Tablo 2). Besiyerleri, 5'er ml olacak şekilde dispenser yardımıyla dört gözlü Felsen plaklarına gliserol ve OADC eklenerek dökülmüştür. Bakteriler Middlebrook 7H9 broth'da (Difco), 1 McFarland standardı sağlanıncaya kadar üretilmiş, steril distile su ile steril ve vidalı kapaklı 50 mililitrelik tüplerde 10^{-2} , 10^{-4} dilüsyonlara getirilmiştir. Middlebrook 7H10 agar besiyeri içeren Felsen plaklarının bir çeyreğine 10^{-2} diğer çeyreğine 10^{-4} bakteri dilüsyonu 0.1 ml olacak şekilde eklenmiştir. Dörtlü plağın diğer iki gözüne aynı şekilde hazırlanmış ancak duyarlılık testinde kullanılacak antitüberküloz ilaçlardan herhangi birini içeren Middlebrook 7H10 agar besiyeri dökülmüş ve aynı yöntemle ekim yapılmıştır. Plaklar, 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda 21 gün inkübe edilmiştir. İlaçsız kontrol bölmesinde üreyen bakterinin koloni sayısı 50-150 koloni miktarına ulaştığında 21 günlük sürenin dolması beklenmeden test değerlendirilmiş, 21 günün sonunda kontrol çeyreğinde üreyen bakterinin koloni sayısı 50'den az ise test geçersiz kabul edilerek tekrar-

lanmıştır. İlaçsız ve ilaçlı çeyreklerde üremiş koloniler sayılıp test edilen kökenin kullanılan ilaca karşı olan duyarlılığı saptanmıştır. Antibiyotikli çeyrekteki koloni sayısının kontrol çeyreğindeki koloni sayısına oranının 100 ile çarpılması direnci göstermektedir. Bu oranın %1 veya üzerinde olması dirençli olarak kabul edilmiştir.

Her iki yöntemin karşılaştırılmasında duyarlılık, özgürlük ve kapa değerleri kullanılmıştır (Tablo 3). Duyarlılık gerçekten dirençli olan kökenlerin yeni test tarafından hangi oranda saptanabildiğini belirtmekte olup testin gerçek dirençlileri ortaya çıkarmakta ne kadar duyarlı olduğunu göstermekte, A/A+C x 100 ile hesaplanmaktadır. Özgürlük ise testin gerçekten duyarlı olanları ayırabilme yeteneğini belirlemede ve D/B+D x 100 ile hesaplanmaktadır. Çalışmada iki testin birbirine uyumluluğunu göstermek için kullanılan değerler, tutarlılık (genel uyum, güvenilirlik) ve kappa sayısıdır (8). Tutarlılık (genel uyum); iki testin elde ettiği sonuçların birbiriyle ne ölçüde uyumlu olduğunu ölçmekte ve A+D/A+B+C+D ile hesaplanmaktadır. Kappa Sayısı (κ) ise tutarlılığın hesaplamasında kullanılan daha güvenilir bir yöntemdir. Gözlenen tutarlılık olasılığı ile beklenen tutarlılık olasılığının farkının değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır.

Tablo 3. İlaç duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Yeni test (BACTEC)	Geçerli (referans) test	
	Hasta	Sağlam
Dirençli köken sayısı	A (doğru dirençliler)	B (yanlış dirençliler)
Duyarlı köken sayısı	C (yanlış duyarlılar)	D (doğru duyarlılar)
Toplam	A+C (toplam dirençli)	B+D (toplam duyarlı)

BULGULAR

Çalışmaya alınan 104 klinik örneğin %36.54'ünde ARB pozitif saptanmıştır. BACTEC yöntemi ile toplam 59 kökenin (%56.73) en az bir ilaca dirençli olduğu, 26 kökenin (%25) INH'e, 11 kökenin (%10.58) RIF'e, 19 kökenin (%18.27) EMB'e, üç kökenin (%2.89) STM'e dirençli

Tablo 4. Agar proporsiyon ve BACTEC yöntemleriyle antitüberküloz ilaçlara duyarlılık

İlaçlar	Agar proporsiyon		BACTEC	
	Duyarlı (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	Dirençli (%)
İzoniiazit (0.1 µg/ml)	79 (75.96)	25 (24.04)	78 (75)	26 (25)
Rifampisin (2 µg/ml)	93 (89.42)	11 (10.58)	93 (89.42)	11 (10.58)
Etambutol (2.5 µg/ml)	77 (74.04)	27 (25.96)	85 (81.73)	19 (18.27)
Streptomisin (2 µg/ml)	101 (97.11)	3 (2.89)	101 (97.11)	3 (2.89)

Tablo 5. Agar proporsiyon ve BACTEC yöntemleriyle çoklu ilaç direnci

	Agar proporsiyon		BACTEC	
	Dirençli	%	Dirençli	%
INH+RIF+EMB	4	3.85	3	2.88
INH+RIF	1	0.96	2	1.92
INH+EMB	5	4.8	3	2.88
INH+RIF+STM	1	0.96	1	0.96
RIF+STM	1	0.96	1	0.96
Toplam	12	11.53	10	9.6

INH: İzoniiazit, RIF: Rifampisin, EMB: Etambutol, STM: Streptomisin

Tablo 6. Her iki yöntemin istatistiksel değerlerinin karşılaştırılması

	Genel uyum	Kapa değeri	Duyarlılık	Özgüllük
İzoniiazit	%98	0.974 (p<0.0001)	%100	%98.7
Rifampisin	%100	1.00 (p<0.0001)	%100	%100
Etambutol	%78	0.779 (p<0.0001)	%70.4	%100
Streptomisin	%100	1.00 (p<0.0001)	%100	%100

olduğu bulunmuştur. Toplam altı kökenin (%5.76) iki ilaca, dört kökenin de (%3.84) üç ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Agar proporsiyon yöntemi ile toplam 66 kökenin (%63.46) en az bir ilaca dirençli olduğu, 25 kökenin (%24.04) İNH'e, 11 kökenin (%10.5) RIF'e, 27 kökenin (%25.96) EMB'e, üç kökenin (%2.89) STM'e dirençli olduğu saptanmış, toplam yedi kökenin (%6.72) iki ilaca, beş kökenin (%4.81) üç ilaca dirençli olduğu görülmüştür. Her iki yöntemde de dört ilaca birden dirençli kökene rastlanmamıştır (Tablo 4 ve 5).

İzoniiazit duyarlılığı açısından BACTEC sistemi (0.1 µg/ml) ile agar proporsiyon (0.2 µg/ml) yöntemleri karşılaştırıldığında genel uyum %98 olarak saptanmış, Kappa değeri 0.974 (P<0.0001), duyarlılık %100, özgüllük %98.7 olarak saptanmıştır. İzoniiazit için agar proporsiyon yöntemi ile dirençli olup BACTEC yöntemi ile duyarlı bulunan 1 köken saptanmıştır. Rifampisin duyarlılığı açısından BACTEC yöntemi ile agar proporsiyon yöntemi %100 uyumlu bulunmuştur. Kappa değeri 1.00 (P<0.0001),

duyarlılık: %100, özgüllük: %100 olarak bulunmuştur. Etambutol için Bactec (2.5 µg/ml) ve agar proporsiyon (5 µg/ml) karşılaştırıldığında BACTEC yöntemi ile 19 dirençli köken saptanırken agar proporsiyon yöntemi ile 27 köken saptanmıştır. Toplam sekiz köken BACTEC sistemi ile duyarlı bulunurken agar proporsiyon yöntemi ile dirençli bulunmuştur. Yöntemler arası genel uyum %78 olarak saptanmış, Kappa değeri 0.779 (p<0.0001), duyarlılık %70.4, özgüllük %100 olarak değerlendirilmiştir. BACTEC yöntemi ile elde edilen streptomisin duyarlılığı (2 µg/ml) agar proporsiyon yöntemi ile (2 µg/ml) karşılaştırıldığında elde edilen sonuçların hepsi uyumlu bulunmuştur. Yöntemler arası genel uyum %100, Kappa değeri 1.00 (p<0.0001), duyarlılık %100, özgüllük %100 olarak saptanmıştır.

BACTEC yöntemi, altın standart agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırıldığında birinci seçenek ilaçlara direnç ve duyarlılığı saptamada genel uyumu çok iyi olarak bulunmuştur (Tablo 6).

TARTIŞMA

Tüberküloz uzun yıllardır tedavi edilebilen bir hastalık olmasına rağmen halen insanlığı tehdit eden sağlık problemleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verileri; dünya nüfusunun 1/3'ünün MTB ile infekte olup, yaklaşık 30 milyon tüberkülozlu olduğunu, her yıl sekiz milyon yeni tüberküloz olgusunun ortaya çıktığını ve yılda yaklaşık üç milyon kişinin tüberkülozdan öldüğünü göstermektedir. Diğer yandan, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de yapılan tarama çalışmalarının raporları, özellikle 1985'ten bu yana birden çok ilaca dirençli MTB'nin neden olduğu salgınlardaki artışa dikkat çekmektedir (9).

Tüberkülozun tanısında, hastanın öyküsü, kliniği ve radyolojik bulguları önemli göstergeler olmalarına karşın, kesin tanı için etkenin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir. Bu amaçla, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen tüberküloz kuşku örneklerinin ARB açısından hızla değerlendirilmesi, izolasyon, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin en kısa süre içinde yapılarak sonucun bildirilmesi, infeksiyöz kişilerin oluşturduğu bulaş zincirinin kırılmasına, yayılımının önlenmesine önemli katkıda bulunmaktadır (10).

Çalışmada örneklerin %36.54'ünde ARB pozitifliği saptanmıştır. Bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmış olup, duyarlılık değerleri aralığının çok fazla (%22-80) oluşu dikkat çekmektedir (11, 12). Bu değerlerin; örneğin cinsi, örnekteki basil sayısı, dekontaminasyon, konsantrasyon işlemleri, yayma kalınlıkları, ve değerlendiren kişinin deneyimi gibi kişisel faktörlerle değişebildiği bilinmektedir.

Son 15 yılda özellikle HIV ile infekte hastalarda MDR-tb olgularının hızla artması, bu olguların %40'ının ölmesi ve sağaltımın başarısız olması, hastane kaynaklı bulaşların gözlenmesi, primer ve sekonder ilaç direncinin artması gibi nedenler tüberküloz kontrol çalışmalarını sonuçsuz bırakmaktadır (13). Günümüzde tüberküloz tüm insanlık için büyük bir sağlık sorunu olma özelliğini korumaktadır. İlaçlara duyarlı mikobakteriler ile oluşan hastalıklarda uygun ilaç kombinasyonu ile olguların %88-98'nin sağaltılabilesine karşın, MDR-tb olgularının sağaltımı büyük bir sorun olmaktadır (13). Bu nedenle antibiyogram çalışmalarının mutlaka yapılması gerekmektedir. Türkiye'de yapılan antibiyotik duyarlılık sonuçları farklılık göstermektedir. Direnç oranları INH için %8.1 ile %33, RIF için %1.3-%21.3 arasında, EMB için %1.6-%18.27, STM için %1.99-%9.4 arasında bildirilmektedir (Tablo 7). Bölgesel özellikler, örnek sayısı ve araştırmacıların kullandığı yöntem farklılığı nedeniyle sonuçlar değişebilmektedir.

Tablo 7. Türkiye'deki çeşitli çalışmalarda saptanan direnç durumları

Kaynak	Yıl	Yöntem	Örnek sayısı	INH (%)	RIF (%)	EMB (%)	STM (%)	2 ilaç (%)	3 ilaç (%)	4 ilaç (%)	
Arseven ve ark.	14	1985-1990	L-J	1388	29.6	17.1	23.3	8.8	11.7	6.8	3.9
Arseven ve ark.	14	1994	L-J	333	34.8	25.2	10.5	29.4	12.9	10.5	7.8
Orhan ve ark.	15	1998-2001	BACTEC	201	13.93	2.98	3.48	1.99	7.96	9.45	0.99
Şenyüz ve ark.	16	1990-1994	L-J	328	33.2	20.1	5.5	35.3			
Şenyüz ve ark.	16	1994-2000	BACTEC	328	19.8	21.3	4.2	9.4			
Kıbar	17	2000-2001	BACTEC MGIT	354	20.90	9.03	5.08	7.62	6.49	3.10	1.12
Balcı ve ark.	18	1995-1999	BACTEC	264	33	18.6	15.9	8.7	10.6	11	0.8
Hasçelik ve ark.	19	1995-2000	BACTEC	2944	8.1	1.3	1.6	2.5	3.26	6.25	2.89
Bu çalışmada		2002-2003	BACTEC	104	25	10.58	18.27	2.89	5.76	3.84	—
Bu çalışmada		2002-2003	Proporsiyon	104	24.04	10.58	25.96	2.89	6.72	4.81	—

INH: İzonyazit, RIF: Rifampisin, EMB: Etambutol, STM: Streptomisin, LJ: Löwenstein-Jensen besiyeri

BACTEC yöntemi ile yapılan çalışmalarda genel olarak INH en yüksek dirence sahip olup, en düşük direnç STM'e karşı saptanmıştır. Çalışmada; INH, RIF, STM dirençleri diğer çalışmalarda alınan sonuçlar arasında bulunmuştur. Etambutol için saptanan direnç diğerlerinden yüksek çıkmıştır. İki ilaç ve üç ilaca direnç oranı diğer çalışmalara benzemekle birlikte, dört ilaca birden dirençli köken saptanmamıştır.

Türkiye'de proporsiyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık sonuçları karşılaştırıldığında direnç oranları; INH için %24.04-34.8, RIF için %10.58-%25.2 arasında, EMB için %5.5-%25.96 arasında ve STM için %2.89-%35.3 arasında değişmektedir (Tablo 7) (14-19). Çalışmada; INH, RIF ve STM'e direnç oranları diğer çalışmalardan düşüktür.

Yapılan çalışmalarda toplam çoklu direnç oranı %10.7-30.2 arasında değişmektedir (Tablo 7). Bu çalışmada çoklu dirençli köken oranı BACTEC yöntemi için %9.6 iken agar proporsiyon yöntemi ile %11.53 olarak saptanmıştır. Bu çalışma diğer yapılanlarla kıyaslandığında ortalama değerler arasında bulunmuştur.

Çalışmalar farklı zaman dilimlerinde ve farklı bölgelerde yapılmıştır. Ülke genelinde gerçek direnç oranını belirlemek için çok katımlı ve standardizasyonun sağlanmış olduğu yöntemlerle çalışılıp sonucun bu değerlere göre tartışılması gerekmektedir. Hasçelik ve ark. (19)'nın çalışması bu açıdan çok önemlidir. Çalışma, yedi merkezde yapılmış olup bu merkezlerden biri de bizim hastanemizdir. Ancak sağlıklı ulusal direnç haritalarının çıkarılması için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır. Antitüberküloz ilaç direnci, özellikle çoklu direnç, tüberkülozun kontrolünü sağlamada ciddi problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Dirençli kökenlerin oluşmasını önlemek için standart kombinasyon tedavisi ya da yeni tedavi rejimlerinin uygulanması önerilmektedir. Primer ilaç direncinin %5 ve daha düşük olduğu ülkelerde iyi bir ulusal tüberküloz kontrol programının uygulandığı söylenebilir, ancak %15 ve daha fazla primer ilaç direnci varlığı ile uygulanan programın başarılı olmadığını ve yeni bir kontrol programının uygulanması gerektiğini göstermektedir (20). Yapılan çalışmalar, Türkiye'de tüberküloz kökenlerine yüksek oranda çoklu direnç olduğunu göstermektedir. Bu durum, tüberküloz olgularında direncin araştırılması ve tedavinin alınacak sonuca göre yönlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Nitekim bazı kaynaklarda primer INH direncinin yüksek (%4'den fazla) olduğu bölgelerde mutlaka direnç varlığının saptanması gerektiği vurgulanmaktadır (1,1). Türkiye'de uygulanan tüberküloz kontrol programı, çok büyük oranda kültür ve

antibiyoqram sonucu olmadan tedaviye başlanması, hasta uyumundaki problemler ve direnç gelişmiş hastaların aktif olarak basili topluma yayması gibi nedenlerden dolayı sağlıklı yürümektedir. Sekonder ilaçlarla tedavi maliyeti yüksek olup ülke ekonomisine zarar vermekte, hastaya ise yüksek toksisiteye sahip olduğundan zarar verebilmektedir. Bu nedenle; primer seçenek ilaçların önemi büyüktür.

Çalışma, bölgede daha önce yapılan çalışmalara göre değerlendirildiğinde tek ilaç direncinin önce yüksek sonra azalma trendine girdiği ve tekrar artma eğiliminde olduğu görülmektedir. İki ve üç ilaca birden direnç bu çalışmada önceki çalışmalara oranla düşük bulunmuştur. Çoklu direnç saptanan hastalar, direkt olarak Göğüs Hastalıkları Hastanesi'ne gönderilmekte, orada kontrol altına alınarak gerekirse yeni ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavide edinilen başarı nedeniyle çoklu ilaç direncinde bir düşme görülüyor olabilir. Tahaoğlu ve ark. (21) tarafından 1992-1999 yılları arasında MDR-tb saptanan 158 hasta üzerinde yapılan çalışmada 36 hastaya cerrahi tedavi, diğerlerine tedavi ilaçlarından biri ofloksasin olan rejimle 24 ayda kültürde negatifleşme sağlanmıştır.

Çeşitli çalışmalarda agar proporsiyon yöntemi BACTEC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Hoel ve Eng (22) 104 klinik örnekten izole ettikleri MTB birinci seçenek antitüberküloz ilaç direncini BACTEC yöntemi ile INH, EMB, STM için Löwenstein-Jensen (L-J) proporsiyon yöntemi, RIF için 7H10 agar proporsiyon yöntemini kullanarak saptamışlar ve iki yöntem arasında %97.4 uyum bulmuşlardır. Bu uyum INH, RIF, EMB ve STM için sırasıyla %95.2, 100, 96.2 ve 98.1 olarak saptanmıştır. Yine Fadda ve Roe (23), ekstrapulmoner örneklerde izole ettikleri MTB kökenlerinin duyarlılıklarını, BACTEC (INH:0.2, RIF:0.2, EMB:0.2, STM:4µg/ml) ve L-J proporsiyon yöntemiyle (INH:0.2, 1 µg/ml, RIF:1, 2 µg/ml, EMB:5, 10 µg/ml, STM:2, 10 µg/ml) araştırmış ve karşılaştırmışlar, STM ve INH için %95 uyum EMB ve RIF için %100 uyum bulmuşlardır. Woodley (24) tarafından 100 MTB'nin klinik izolatlarında yapılan çalışmada Bactec (INH:0.2, RIF:1, 2, EMB:10, STM:4 µg/ml) ile 7H10 agar proporsiyon (INH:0.2, RIF:1, 2, EMB:5, 10, STM:2,4,10 µg/ml) yöntemi karşılaştırılmıştır. İki metodda duyarlılar arasında 0.99 uyum, dirençlilerde 0.97 uyum bulmuşlardır. Lee ve Heifest (25) tarafından yapılan çalışmada beş antitüberküloz ilacın çeşitli konsantrasyonları kullanılarak (INH, RIF, EMB, STM, etiyonamit) BACTEC ve 7H11 agar proporsiyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda iki yöntem arasında MIK değerleri farklı bulunmuştur. Bunun nedeni olarak da ilaçların bu besiyerine

bağlanma, absorpsiyon ve potesteki azalma özelliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Burada da belirtildiği gibi proporsiyon yöntemlerinin çok dikkatli uygulanması gerekmektedir. Sonuçlar birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir. Ancak tüm araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda her iki yöndemin de uyumluluğu oldukça yüksek (%90-100) görülmektedir. Bu çalışma, NCCLS'in önerdiği antibiyotik konsantrasyonları kullanılarak yapılmıştır ve her iki yöntem arasındaki uyum %98'in üzerinde bulunmuştur.

Proporsiyon yöntemi altın standart ve referans yöntem olmasına karşın zahmetli ve iş yükünü artırıcı bir yöntemdir. Bu yöntemle MTB'in duyarlılık paterninin ortaya konulabilmesi için 21 günlük inkübasyon süresine gereksinim vardır. Proporsiyon yönteminde ilaç dilüsyonları hazırlarken ilacın sterilizasyonu için membran filtrelerden geçirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, kullanımdan arta kalan liyofilize toz halindeki ilacın uygun koşullarda saklanamaması ve ilacın besiyerine eklenirken uygun ısıda ve konsantrasyonlarda eklenmemesi testte kullanılan ilacın

potensini azaltmakta ve sonuç olarak test edilen kökenlerin duyarlılık paternlerinin yanlış saptanmasına neden olmaktadır. Bu yöntem referans ve altın standart bir yöntem olarak kabul edilmesine ve ucuz olmasına rağmen belirtilen bu zorluklardan dolayı tüm dünyada yaygın olarak kullanılan rutin antitüberküloz ilaç duyarlılık testi olma özelliğini kazanamamıştır (26). BACTEC yönteminin zaman yönünden büyük bir üstünlüğe sahip olduğu açıktır. BACTEC yöntemiyle ilaç duyarlılık sonuçları 4.2-6.9 günde rapor edilebilmektedir. Ayrıca BACTEC yöntemi kolay uygulanabilir olması nedeniyle de, klasik yöntemlere göre üstünlük gösterir. Ancak radyo-aktif materyalle çalışılması, testin ikincil ilaçlara adaptasyonunda karşılaşılan bazı güçlükler ve maliyetin yüksek olması bu yöntemin dezavantajıdır (9). Yine de izolasyon sürecinin kısalığı, izolasyon sonrasında antitüberküloz ilaçlara daha hızlı ve kolay olarak duyarlılık araştırılması, kontaminasyon azlığı gibi nedenlerden dolayı BACTEC yöntemi rutin laboratuvarlarda kullanılabilirliği olan bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. **Kocabaş A.** Akciğer tüberkülozu. Topçu-Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, ed. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **2002**: 538-99.
2. **Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H.** *Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı*. Ankara: Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, **2003**: 1-11.
3. World Health Organization Geneva. WHO Report. **1999**: 29-32.
4. **Öztürk R.** Mikobakteriyoloji laboratuvarında tür ve direnç tayininde yenilikler. Eraksoy H, Yenen OŞ, ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**: 35-43.
5. **Anğ Ö, Erturan Z.** Tüberkülozun dönüşü ve direnç sorunu. Anğ Ö, Uzun M, ed. *Tüberküloz-Tanı, Direnç, Tedavi*. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1996**: 17-25
6. **Tansel Ö.** Klasik antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. 21. *Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı yöntemleri Kursu* kitabında. Samsun, **2003**: 347-59.
7. **Saniç A.** Mikobakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri. *XXX Türk Mikrobiyoloji Kongresi* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2000**: 141-3
8. **Aksakoğlu G.** *Sağlıkta Araştırma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri*. İzmir: D.E.Ü. Rektörlük Matbaası, **2001**: 89-92.
9. **Över U.** Antitüberküloz Duyarlılık Testleri. *Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **1997**: 115-25.
10. **Songur M.** Tüberküloz tanısında standart kültür, hızlı kültür (MGIT) ve polimeraz zincir tepkimesi (PZT), yöntemlerinin karşılaştırılması [Doktora Tezi]. İzmir, **1998**.
11. **Bekiroğlu N, Baysallar M, Gün H.** Mikobakterilerin mikroskopik tanısında kullanılan iki aside dirençli boyama yönteminin karşılaştırılması. *İnfek Derg* **1998**; 12: 69-73.
12. **Sarıgüzel N.** Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. 21. *Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu* kitabında. Samsun, **2003**: 291-9.
13. **Çoban AY, Ekinci B, Birinci A, Yenigün A, Durupınar B.** *Mycobacterium tuberculosis* klinik suşlarında streptomisin direncinin araştırılması. *İnfek Derg*, **2002**; 16: 35-8.
14. **Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y ve ark.** Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. *KLİMİK Derg* **1995**; 8: 63-7.
15. **Orhan G, Zer Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G.** Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2002**; 33: 225-9.

16. **Şenyüz A, Özcan M, Özbal Y.** Mikobakterilerde anti-tüberkülotiklere karşı direnç gelişimi. *XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Antalya, **2002**: 297.
17. **Kibar F, Yaman A, Dündar İH.** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2002**: 298.
18. **Balcı I, Bayram A, Dikensoy O, Filiz A.** Drug-resistant tuberculosis at The University Hospital in Gaziantep, south-eastern Turkey. *J Int Med Res*, **2000**; 28: 300-6.
19. **Hasçelik G, Ercis S, Özakin C, et al.** Is *Mycobacterium tuberculosis* still a problem in Turkey? In: *ASM 101st General Meeting (May 20-24 May 2001 Orlando Miami)*. **2001**: 235.
20. **Okutan O.** Hastanelerde tanı konulan tüberküloz hastalarının bildiri ve izlenmesi. *XXIII. Ulusal Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi* kitabında. **2003**: 52-60.
21. **Tahaoglu K, Torun T, Sevim T, et al.** The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey. *N Engl J Med* **2001**; 345: 208-10.
22. **Hoel T, Eng J.** Radiometric and conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *APMIS* **1991**; 99: 977-80.
23. **Fadda G, Roe SL.** Recovery and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from extrapulmonary specimens by the Bactec radiometric method. *J Clin Microbiol* **1984**; 19: 720-1.
24. **Woodley CL.** Evaluation streptomisin and ethambutol concentrations for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and conventional procedurs. *J Clin Microbiol* **1986**; 23: 385-6.
25. **Lee C, Heifets LB.** Determination of minimal inhibitory concentrations of antituberculosis drugs by radiometric and conventional methods. *Am Rev Respir Dis* **1987**; 136: 349-52.
26. **Dibek MA.** *Mycobacterium tuberculosis* complex kökenlerinin MB/BacT sistemi ile ilaç duyarlılıklarının saptanması ve sistemin standardize edilmesi [Uzmanlık Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, **1999**.

İLETİŞİM

Prof. Dr. İclal BALCI
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
27310 GAZİANTEP
e-posta: balci@gantep.edu.tr