

## MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SUŞLARININ PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİNDE BACTEC 460 VE AGAR PROPORSİYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

SUSCEPTIBILITY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS TO PRIMARY ANTITUBERCULOSIS DRUGS: A COMPARATIVE STUDY WITH BACTEC 460 AND AGAR PROPORTION METHODS

Gönül ASLAN Nuran DELİALİOĞLU Çilem YILDIZ Şahin DİREKEL Gürol EMEKDAŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

**Anahtar Sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*, agar proporsiyon yöntemi, BACTEC 460, primer antitüberküloz ilaçlar, *in vitro* duyarlılık

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, agar proportion method, BACTEC 460, primary antituberculous drugs, *in vitro* susceptibility

Geliş: 04 Ekim 2006

Kabul: 15 Ocak 2007

### ÖZET

Tüberkülozda ilaç tedavisi, mortalitenin azaltılması ile bulaşma zincirinin kırılması bakımından çok önemlidir. Hastaların tedaviye uyumsuzluğu ve veya etkin olmayan ilaç kombinasyonları, giderek artan direnç sorununa yol açmaktadır. Çalışma; primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde rutinde kullanılan BACTEC 460 TB sistemi ile birlikte agar proporsiyon yönteminin kullanılması, elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve dirençli suşlar için yüksek konsantrasyonlardaki ilaçlara karşı direnç düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Streptomisin (SM), izoniyazit (INH), etambutol (ETB) ve rifampisin (RİF)'e karşı duyarlılık Middlebrook 7H10 agar proporsiyon (düşük ve yüksek konsantrasyonlarda) ve BACTEC 460 TB sistemi ile belirlenmiştir. Çalışmada 84 *Mycobacterium tuberculosis* kökeninin 40'ı (%47.6) agar proporsiyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testinde primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı olarak saptanırken, BACTEC 460 sistemiyle ise suşların 36'sı(%42.8) tüm ilaçlara duyarlı bulunmuştur. İki yöntem arasındaki uyum %97.3, özgüllük %97.7, duyarlılık %98.6, pozitif prediktif değer %92.5, negatif prediktif değer %99.6 olarak hesaplanmıştır. Testler arası uyumun en az İNH (%96.5) için olduğu, en iyi uyumun RİF için (%98.8) olduğu saptanmıştır. Her iki yöntemle İNH için beş, SM ve ETB için yedi köken düşük düzeydeki ilaç konsantrasyonlarına direnç gösterirken, agar proporsiyon yöntemi ile yüksek düzey konsantrasyonda duyarlı olarak bulunmuştur. Çoklu ilaç direnci bulunan olgular için yüksek dozda ilaç konsantrasyonlarda ki duyarlılığın bilinmesi tedavinin yönlendirilmesinde önemli avantaj sağlayacaktır. Rutin laboratuvar koşullarında standardize, en kısa sürede sonuç alınabilecek yöntemler tercih edilmesi, ancak araştırma amaçlı çalışmalarda ve epidemiyolojik araştırmalarda kolay uygulanabilir, maliyeti düşük yöntemler standardizasyonları yapıldıktan sonra uygulanması önerilmektedir.

### SUMMARY

The antituberculosis drug treatment is very important in decreasing mortality and preventing transmission. Uneffective drug combinations and patient discordance lead to progressive drug resistance. The purpose of this study was to determine the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antituberculous drugs using the radiometric BACTEC 460 system which is available in routine use and the agar proportion method. Also the results of susceptibility methods were compared and drug resistance level of resistant strains to high drug concentrations were determined. Susceptibility to SM, INH, ETB and RIF were determined using the radiometric BACTEC 460 and the agar proportion method on Middlebrook 7H10 agar (low and high concentrations). In the study, 40 of 84 *M. tuberculosis* isolates (%47.6) were susceptible to all primary antituberculous drugs with the method of agar proportion method, and percentage of susceptibility was %42.8 (36 strains) when the BACTEC 460 system was used. The concordance between the two methods was %97.3, specificity %97.7, sensitivity %98.6, positive predictive value %92.5, and negative predictive value % 99.6. The concordance of the results of the two methods were lowest for INH (%96.5) and highest for RIF (%98.8). Also drug resistance of five isolates to INH and seven isolates to SM and ETB with low drug concentration were determined with these two methods. Sensitivity with high concentrations by the method of agar proportion was also determined. Knowledge of sensitivity to higher drug concentrations for patients with multidrug resistance is very important for management of tuberculosis. Rapid and standardized susceptibility methods should be preferred in routine laboratories. In epidemiological research studies, easily applicable, cheap and standardized methods should be recommended for use.

## GİRİŞ

Tüberküloz (TB) dünyada bilinen en eski hastalıklardan biri olup, 1882 yılında hastalık etkeni, 1921 yılında ise hastalığa karşı etkili aşı geliştirilmiştir (1). Tedavide ilk olarak 1944 yılında para-aminosalisilik asit (PAS) hastalara tek başına uygulanmış, ancak modern ve etkili tedavi 1946 yılında Feldman ve Henshaw tarafından streptomisin (SM)'in antitüberküloz ilaç olarak kullanımıyla başlamıştır. Ancak SM tek başına uygulanması kısa sürede direnç gelişimine ve sık relapslara yol açmış, daha sonra tedavide SM ve PAS birlikte uygulanmış, SM'e direnç gelişimi nispeten azaltılmıştır. 1953'te izoniyazit (İNH) ve pirazinamid (PZ)'in tedavide kullanımı, 1964'te etambutol (ETB)'ün geliştirilmesi ile İNH ve ETB uygulaması TB tedavisinde önemli gelişme sağlamıştır. Fakat TB tedavisinde en önemli aşama 1965'te rifampisin (RİF)'in geliştirilmesi ve 1971'de kullanıma girmesiyle kaydedilmiştir. 1980'li yılların başlarında İNH ve RİF'in birlikte uygulanmasıyla tedavi süreleri 18 aydan 9 aya inmiş, bu tedaviye PZ de eklendiğinde altı ay gibi daha kısa bir sürede tedavinin yeterli olabileceği saptanmıştır (2, 3). Seksenli yıllardan sonra TB tedavisinde kullanılan ilaçlarla alınan başarılı sonuçlar üzerine hastalar hastane dışındada tedavi edilmeye başlanmıştır. Hastane dışında tedavilere başlanmasıyla hastalarda tedaviye uyumsuzluk sorunu ortaya çıkmış ve bunun sonucunda dirençli basillerle karşılaşmaya başlanmıştır (3, 4).

Tüberkülozda etkenin kısa sürede tanınması ve ilaç direncinin saptanması ve ilaçların uygun dozlarda uygulanması önem kazanmıştır. Bu nedenle klasik laboratuvar tanı yöntemleri yanında hızlı sonuç veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir yeni kültür yöntemleri ile moleküler biyoloji teknikleri geliştirilmektedir. Antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimini saptamak için *M. tuberculosis* kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesinde Dünya Sağlık Örgütü tarafından sıvı (7H12 besiyeri kullanılan ticari sistemler) ve katı [proporsiyon yöntemi (Middlebrook 7H10/7H11 agar veya Löwenstein-Jensen: LJ)] bazlı yöntemler önerilmektedir (5).

BACTEC 460, Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından önerilen referans yöntemlerden biridir. BACTEC 460 yöntemin en önemli avantajı kısa sürede sonuç alınabilmesi ve standardize olması olarak bildirilmekle birlikte çapraz kontaminasyon riskinin bulunması, sadece majör ilaç çalışılabilmesi ve radyo-aktif atıkların birikiminin olması dezavantajlar arasında bulunmaktadır (6).

Agar proporsiyon yönteminin en büyük avantajı farklı konsantrasyonlarda ve minör ilaçlar için uygulanabilirliği ve ticari sistemlere göre daha ucuz olmasıdır. Çoklu ilaç direnci gözlenen suşlarda yüksek konsantrasyonlarda

duyarlılığın belirlenebilmesi, hastaya alternatif tedavi şansı sağlamaktadır. Ancak ticari sistemlere göre daha uzun sürede sonuç alınması, ilaç konsantrasyonlarının besiyeri hazırlanması sırasında değişebilmesi ve inkübasyonun uzunluğundan ilaç aktivitesinin etkilenmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (6).

Çalışmada, izole ve identifiye edilen *M. tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde rutinde kullanılan BACTEC 460 TB sistemi ve proporsiyon yönteminin kullanılması, elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve dirençli suşlar için yüksek konsantrasyonlardaki ilaçlara karşı direnç düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2005 ve Haziran 2006 yılları arasında çeşitli kliniklerden gönderilen örnekler işlendikten sonra, LJ ve BACTEC 12B besiyerine inoküle edilmiş ve hazırlanan preparatlar Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile boyanarak değerlendirilmiştir. Löwenstein-Jensen ve/veya BACTEC 12B besiyerine üreme kaydedilen örneklerden MTC ve tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımı p-nitro- $\alpha$ -asetilamino- $\beta$ -hidroksi-propiofen (NAP) testi ile yapılmıştır (7).

Primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testi; BACTEC 460 TB kültür sistemi ile, son konsantrasyonları İNH için 0.1  $\mu$ g/ml, SM için 2.0  $\mu$ g/ml, RİF için 2.0  $\mu$ g/ml ve ETB için 2.5  $\mu$ g/ml olacak şekilde hazırlanarak uygulanmış ve 37 $\pm$ 1° C'de inkübe edilmiştir (7). Antibakteriyel duyarlılık ve NAP testlerinin kalite kontrol işlemleri için standart *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu kullanılmıştır.

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran tüberküloz şüpheli hastaların klinik örneklerinde üretilen 84 *M. tuberculosis* suşu alınmıştır.

### Middlebrook 7H10 Agar besiyerinin hazırlanması:

Ticari olarak sağlanan Middlebrook 7H10 Agar (Difco. Middlebrook 7H10 Agar Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) toz haldeki besiyerinin 19 gramı bir cam balona aktarılmış, üzerine 5 ml gliserol 900 ml distile su eklenmiştir. Otoklavda 121° C'de 15 dakika tutularak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50-55° C'ye kadar soğuduktan sonra içerisine 100 ml oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (OADC) (BBL Middlebrook OADC; Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) supplement eklenmiştir. İlaçsız besiyeri steril vida kapaklı tüplere 5'er ml olacak şekilde eklenmiş ve eğik bir şekilde katılaşması için beklenmiştir. Aynı şekilde ilaçlı besiyeri hazırlanırken otoklavdan çıkan ve OADC eklenmiş olan besiyerine son konsantrasyonu İNH 0.2  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml,

RIF 1 µg/ml, SM 2 µg/ml, 10 µg/ml, EMB 5 µg/ml, 10 µg/ml olacak şekilde toz haldeki antitüberküloz ilaçlar eklenmiş daha sonra steril vida kapaklı tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyerleri kullanıncaya kadar +4° C'de buzdolabında tutulmuştur. (8).

**İnokulumun hazırlanması:** Çalışmaya alınacak olan suşlar öncelikle saflık kontrolünden geçirilmiştir. Löwenstein-Jensen besiyerinde saf olarak üremiş olan koloniler öze ile alınmış ve içerisinde 5 ml steril %0.85'lik serum fizyolojik (SF) ve cam boncuk bulunan 10 ml'lik steril tübün içerisinde süspanse edilmiştir. Daha sonra tübün ağız kapatılıp bir dakika süre ile vorteks ile iyice çalkalanmıştır. Bu işlemde sonra vortekslenen tüp hareket ettirilmeden 30 dakika bekletilerek büyük partiküllerin ve besiyeri kalıntılarının dip kısma çökmesi sağlanmıştır. Bekleme süresinin sonunda süspansiyonun üst kısmından steril pipet ucu ile 1 ml yeni bir steril tüpe alınarak steril SF ile Mc Farland 1 bulanıklık değerinde süspansiyon elde edilmiştir. Bu süspansiyondan 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-4</sup> dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlar, aynı hasta suşunun 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-4</sup> sulandırımı için ilaçlı ve ilaçsız besiyerine 100 µl olacak şekilde insülin enjektörü ile inoküle edilmiştir. Kontaminasyon kontrolü için incelenen her suş aynı zamanda çukulata/kanlı agar besiyerine de ekilmiştir. Tüplerin içerisindeki inokulumun besiyeri yüzeyine tamamen yayılması sağlanmış ve 37° C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun birinci-ikinci gününde çukulata/kanlı agar ve ekim yapılan tüpler kontaminasyon yönünden incelenmiştir. Kontaminasyon saptanması durumunda çalışma tekrar edilmiştir. Oluşan üremeler ikinci haftadan sonra kontrol edilmiş ve üçüncü hafta sonunda üreme olan tüplerdeki koloniler sayılmıştır. Koloniler EZN yöntemiyle boyanarak doğrulanmıştır. İlaçsız besiyerinde üreyen *M. tuberculosis* kolonileri sayıldıktan sonra koloni sayısının %1'i hesaplanmıştır. İlaçlı besiyerinde üreyen koloni sayısı hesaplanan %1'lik sayıdan fazla ise bu suş dirençli, az ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir (9). Yapılan bu çalışmanın tüm aşamaları Class II tipi güvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR

Ocak 2005 ve Haziran 2006 yılları arasında tüberküloz ön tanısı ile laboratuara gönderilen ve klinik örneklerden izole edilen 84 suş çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan kökenlerin 24'ü (%28.5) kadın, 60'ı (%71.5) erkek hastalara ait klinik örneklerden izole edilmiştir. Tablo 1'de tüberküloz öntanısı ile laboratuara gönderilen örneklerin gönderen kliniğe göre dağılımları, Tablo 2'de ise klinik örneklerin türe göre dağılımları gösterilmiştir. Tablo 3'te kökenlerin BACTEC 460 ve agar proporsiyon yöntemiyle elde edilen duyarlılıkları verilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmaya alınan 84 suşun örneğe türüne göre dağılımı

Örneğin cinsi	Sayı	%
Balgam	73	86.9
İdrar	2	1.2
Bronko-alveolar lavaj sıvısı	1	2.4
Plöra sıvısı	3	3.6
SVS	1	1.2
Beyin-omurilik-sıvısı	1	1.2
Apse	1	1.2
Doku	2	2.4
Toplam	84	

**Tablo 2.** Klinik örneklerin geldiği yere göre dağılımı

Örneğin geldiği yer	Çalışmaya alınan köken	
	Sayı	%
Göğüs Hast.	34	40.5
VSD	35	41.6
SSK	8	9.5
Diğer	7	8.3
Toplam	84	

Diğer: [Genel Cerrahi (1), Kulak-Burun-Boğaz (2), Pediatri (1), Dahiliye (1), Enfeksiyon Hastalıkları (1), Kardiyoloji (1)] VSD: Verem Savaş Dispanseri, SSK: Sosyal Sigortalar Kurumu

**Tablo 3.** *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılık durumları

Antitüberküloz ilaç direnci	BACTEC		Proporsiyon	
	n=84	%	n=84	%
Tümü duyarlı	36	42.8	40	47.6
Tek başına INH direnci	13	15.5	12	14.3
Tek başına RIF direnci	5	5.9	5	5.9
Tek başına SM direnci	8	9.5	6	7.1
Tek başına ETB direnci	3	3.5	3	3.5
Toplam tek başına ilaç direnci	29	34.5	26	30.9
INH+RIF	7	8.3	6	7.1
INH+SM	3	3.5	2	2.4
INH+ETB	1	1.2	1	1.2
ETB+SM	0	0	1	1.2
Toplam ikili ilaç direnci	11	13.1	10	11.9
INH+ RIF +SM	1	1.2	1	1.2
INH+RIF+ETB	2	2.4	2	2.4
RIF+SM+ ETB	1	1.2	1	1.2
Toplam çoklu ilaç direnci	10	11.9	9	10.7
Tüm ilaçlara dirençli suş	4	4.7	4	4.7
Herhangi bir INH direnci	31	36.9	28	33.3
Herhangi bir RIF direnci	20	23.8	19	22.6
Herhangi bir SM direnci	17	20.2	15	17.8
Herhangi bir ETB direnci	11	13.1	12	14.3
Toplam dirençli suş	48	57.1	44	52.4

INH: İzoniyazit, RIF: Rifampisin, Sm: Streptomisin, ETB: Etambutol

Çalışmada 84 *M. tuberculosis* kökeninin 40'ı (%47.6) agar proporsiyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testinde primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı olarak saptanırken BACTEC 460 sistemiyle ise suşların 36'sı (%42.8) tüm ilaçlara duyarlı bulunmuştur. Alınan bu iki değer arasındaki uyum %97.3, özgüllük %97.7, duyarlılık %98.6, pozitif prediktif değer (PPD) %92.5 ve negatif prediktif değer (NPD) %99.6 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4).

**Tablo 4.** BACTEC 460 sisteminin agar proporsiyon yöntemine göre antitüberküloz ilaç duyarlılıklarının belirlenmesindeki tanılal performans değerlendirme sonuçları

İlaç	Uyum	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
Genel	%97.3	%98.6	%97.7	%92.5	%99.6
İNH	%96.5	%100	%94.9	%90.3	%100
RİF	%98.8	%100	%98.4	%95	%100
ETB	%98.8	%92.3	%100	%100	%98.6
SM	%97.6	%100	%97.1	%88	%100

İNH: İzonyazit, Rif: Rifampisin, ETB: Etambutol, SM: Streptomisin, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

Proporsiyon yöntemiyle 28 kökende (%33.3) İNH direnci gözlenirken BACTEC 460 sistemi ile kökenlerin 31'inde (%36.9) direnç gözlenmiştir. BACTEC 460 sistemi ile İNH direnci saptanan üç köken, proporsiyon yönteminde de hem düşük hem de yüksek konsantrasyonda İNH'a karşı duyarlı olarak saptanmıştır.

Kökenlerin 19'unda (%22.6) proporsiyon yöntemi ile RİF'e karşı direnç saptanırken BACTEC 460 ile 20 kökende (%23.8) direnç görülmüştür.

BACTEC 460 ve agar proporsiyon yöntemi ile SM için sırasıyla 17 (%20.2) ile 15 (%17.8) direnç saptanırken ETB için direnç 11 (%13.09) ve 12 (%14.2) olarak bulunmuştur.

Agar proporsiyon ve BACTEC 460 sistemi ile İNH için üç kökende, RİF için bir kökende, ETB için bir kökende, SM için ise iki kökende uyumsuz sonuçlar alınmıştır.

İkili ilaç dirençlerine bakıldığında da, her iki yöntemle benzer sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir. İzonyazit+RIF için BACTEC 460 sistemi ve proporsiyon yöntemi ile direnç oranları 7 (%8.3), 6 (%7.1), İNH+SM için üç (%3.5), iki (%2.3) ve İNH+ETB için her iki yöntemle de bir (%1.12) olarak saptanmıştır. İzonyazit+RIF ve İNH+SM için bir kökende sonuçlar arasında farklılıklar gözlenmiştir.

Çoklu ilaç direnci ve tüm ilaçlara dirençli kökenler için her iki yöntemle de aynı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 3).

Çalışmada SM'e karşı yedi kökende hem BACTEC 460 sistemi hem de agar proporsiyon [düşük konsantrasyonda (2 µg/ml)] yöntemi ile ilaç direnci gözlenirken agar proporsiyon ile yüksek konsantrasyonda (10 µg/ml) duyarlı bulunmuştur.

Benzer şekilde agar proporsiyon yöntemi ile İNH'e karşı beş kökende düşük düzeyde (0.2 µg/ml) ilaç direnci (bu kökenler BACTEC 460 sistemi ile de dirençli olarak saptanmıştır) saptanırken yüksek düzeyde (1 µg/ml) duyarlılık gözlenmiştir.

Etambutol içinde düşük konsantrasyonda BACTEC ile uyum gösteren sonuçlar (dirençli), yüksek konsantrasyonda duyarlı bulunmuştur (Tablo 5).

**Tablo 5.** BACTEC 460 ve Agar proporsiyon yöntemi ile dirençli bulunan suşların agar proporsiyon yüksek konsantrasyonlardaki ilaçlara karşı duyarlılıkları

	BACTEC 460	Agar dilüsyon düşük kons	Agar dilüsyon yüksek kons
		İNH için 0.2 µg/ml SM için 2 µg/ml ETB için 5 µg/ml	İNH için 1 µg/ml SM için 10 µg/ml ETB için 10 µg/ml
İNH (5 köken)	R	R	S
SM (7 köken)	R	R	S
ETB (7 köken)	R	R	S

İNH: İzonyazit, SM: Streptomisin, ETB: Etambutol R=Dirençli, S=Duyarlı,

Çalışmada ilaç duyarlılığını belirlemede BACTEC 460 ile sonuçlar ortalama bir hafta içinde alınmış, buna karşılık agar proporsiyonda bu süre üç hafta olmuştur

## TARTIŞMA

Tüberkülozda ilaç tedavisi, mortalitenin azaltılması ile bulaşma zincirinin kırılması bakımından çok önemlidir. Hastaların tedaviye uyumsuzluğu ve/veya etkin olmayan ilaç kombinasyonları, giderek artan direnç sorununa yol açmaktadır. Son yıllarda İNH ve RİF'e karşı direncin birlikte bulunduğu ve çoklu ilaç direnci olarak tanımlanan suşların ortaya çıkması, tüberküloz tedavisinde karşılaşılan en önemli sorundur. Sorunun çözümünde en önemli basamak, hızlı tanı ve antitüberküloz ilaç direncinin belirlenmesidir. Çoklu ilaç direnci bulunan olgular için yüksek dozda ilaç kullanımının tedaviye katkısı ve gerekli durumlarda minör antitüberküloz ilaçlarına karşı duyarlılığın bilinmesi tedavinin yönlendirilmesinde önemli avantaj sağlamaktadır (6).

Dirençli hastalarda minör ilaç direnci belirlemede ve majör ilaçlardan İNH, SM ve ETB için yüksek konsantras-

yonlarda ilaç duyarlılıkları belirlemede rutin uygulaması olmayan ticari sistemler ya da genellikle proporsiyon yöntemi tercih edilmektedir (10).

Çalışmada 84 *M. tuberculosis* kökeninin 40'ı (%47.6) agar proporsiyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testinde primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı olarak saptanırken, BACTEC 460 sistemiyle ise suşların 36'sı (%42.8) tüm ilaçlara duyarlı bulunmuştur. İki yöntem arasındaki uyum %97.3, özgüllük %97.7, duyarlılık %98.6, PPD %92.5 ve NPD %99.6 olarak hesaplanmıştır. İlaçlar bazında testlerin tanısıl performansları ayrıntılı biçimde Tablo 4'te belirtilmiştir.

Antitüberküloz ilaç direnci belirlemeye yönelik farklı yöntemlerle yapılan araştırmalarda çalışılan yöntemlere göre farklılıklar göstermekle birlikte İNH, ETB ve SM için uyum oranlarında düşüklük olduğu ancak en iyi uyumun RİF direncinde olduğu belirtilmektedir (10-12). De Coster ve ark.(10) BACTEC 460, Flovsiometrik yöntem ve agar proporsiyon yöntemi ile 26 köken için, İNH için proporsiyon yöntemi ile Flovsiometrik yöntem arasındaki uyum %94, proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460 yöntemi arasındaki uyum %78 olarak, RİF ve ETB için proporsiyon yöntemi ile flovsiometrik yöntem tamamen uyumlu bulunmuştur. Freixo ve ark.(12) E test ve LJ proporsiyon yöntemleri arasında yaptıkları karşılaştırmada, SM için uyumsuzluğun olduğu ancak İNH ve RİF için uyumun iyi olduğu belirtilmiştir. MB/BacT sistemi LJ proporsiyon yöntemi ile yapılan çalışmada ise İNH ve ETB için uyumsuz sonuçların elde edildiği vurgulanmaktadır. Ancak yaygın olarak İNH için uyumsuz, RİF için uyumlu sonuçların daha yüksek olduğu bildirilmektedir (10, 11, 13). Bu çalışmada da testler arasındaki uyumun en az İNH (%96.5) ve SM (%97) için olduğu en iyi uyumun RİF ve ETB %98.8 olduğu saptanmıştır.

Agar proporsiyon yönteminde yüksek ve düşük konsantrasyonda ilaç kullanılması tedavide yol gösterici olabilmektedir. Düşük konsantrasyonda dirençli bulunan kökenler yüksek konsantrasyonda ilaca karşı duyarlı olabilmekte ve tedavide başarılı olunabilmektedir. Çalışmada da SM için yedi köken, İNH için beş, ETB içinde yedi köken düşük konsantrasyonda dirençli saptanırken yüksek konsantrasyonda duyarlı olarak bulunmuştur.

Agar proporsiyon yönteminde besiyeri şeffaf olması nedeniyle koloniler 10-12 günde gözle ya da büyüteçle rahatlıkla görülebilmekte, ancak yine de üç haftadan önce test sonuçlandırılmamaktadır. BACTEC 460 sistemi ile sonuçlar genellikle 4-12 gün içinde alınabilmektedir (10).

Özellikle EMB ilave edilen 7H10 (OADC supplement ilaveli) agarda mikrokoloni oluşumu bildirilmektedir. Mikrokoloni oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalarda mikrokolonilerin oluşumunda besiyerine ilave edilen OADC miktarının fazla olması ve inokulumun konsantrasyonunun yüksek olması sorumlu tutulmaktadır. Mikrokoloni oluşumu EMB ile diğer primer ilaçlardan daha sık birliktelik göstermektedir. Madison ve ark. (14)'nin yaptıkları çalışmada, proporsiyon yöntemi ile çalışmaya alınan kökenlerin %5.2'de (46 köken) mikrokoloni oluşumu gözlenmiş, mikrokoloni oluşumu gözlenen kökenlerin BACTEC 460 sistemi ile yapılan duyarlılık testinde EMB'e karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da 10 kökende (%11.9) mikrokoloni oluşumu gözlenmiş ve bu suşlar BACTEC 460 sistemi ile yapılan duyarlılık testinde EMB'e karşı duyarlı olarak saptanmıştır.

DeCoster ve ark.(10)'nin yaptıkları çalışmada; 26 klinik kökenin primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı BACTEC 460 ve proporsiyon yöntemiyle değerlendirilmiş, yedi köken İNH'nin 0.2 mg/L konsantrasyonunda proporsiyon yöntemiyle ilaca karşı dirençli bulunurken, BACTEC 460 ile duyarlı olarak bulunmuştur. Bu çalışmada iki köken İNH için proporsiyon yöntemiyle duyarlı bulunurken BACTEC 460 ile dirençli olarak saptanmıştır. İzoniyazidin diğer konsantrasyonlarında da farklılıklar kaydedilmiş, EMB ve RİF içinde altı kökende her iki yöntemle de uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir (10). Bu çalışmada da benzer olarak İNH için 28 köken aynı konsantrasyonda proporsiyon yöntemiyle dirençli bulunurken BACTEC 460 ile 31 köken dirençli olarak saptanmıştır.

Varma ve ark. (13)'nin yaptıkları çalışmada ilaç duyarlılığını belirlemede proporsiyon yöntemi ile E test karşılaştırılmış 37 kökende proporsiyon yöntemi ile benzer sonuçlar alınmış ve üç kökende farklılıklar olduğu belirtilmiştir. E test ile duyarlılık sonuçları çok daha kısa sürede alınabilmekte, ancak yöntemin çok pahalı olması, standarde edilememesi nedeniyle kullanımı kısıtlı olmaktadır (13).

Muralidhar ve ark. (15)'nin çalışmasında da proporsiyon yöntemi ile E test yöntemi karşılaştırılmış, proporsiyon yöntemi LJ ve Middlebrook agarda uygulanmıştır. Çalışmaya alınan 75 kökenin 52'si (%69.3) LJ proporsiyon ile, 54'ü (%72) Middlebrook agarda yapılan proporsiyon ve 55'i (%73.3) E-test ile tüm ilaçlara duyarlı olarak saptanmıştır. Bir kökende (%1.3) her üç yöntemle de tüm ilaçlara dirençli olarak bulunmuş, üç yöntem ile 57 (%76) kökende alınan sonuçlar birbiri ile tamamen uyumlu olarak

saptanmıştır. Löwenstein-Jensen ve agar proporsiyon yöntemlerinin E teste göre daha geç sonuç verdiği bildirilmiştir (15).

Türkiye’de TB ilaç dirençlerine ait çeşitli bölgelerde bildirilen direnç sonuçları arasında farklılıklar gözlenmektedir. Türkiye’nin sosyo-ekonomik durumu, iklim koşulları, gelişmişlik düzeyi bölgeler arasında farklılıklar göstermekte ve bu faktörlerde coğrafi bölgeler arasındaki direnç değerlerinde önemli farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ancak tüm bunların yanısıra incelenen hasta gruplarının seçimi, kullanılan duyarlılık yöntemleri, ilaç konsantrasyonlarındaki farklılıklar ve çalış-

macıların konu ile ilgili deneyimlerinin de sonuçları etkilediği düşünülmektedir.

Bu çalışmaya benzer araştırmalarda da yöntemler arası uyumsuzluklara dikkat çekilmektedir (10-12). Sonuç olarak, rutin laboratuvar koşullarında standardize, en kısa sürede sonuç alınabilecek yöntemler tercih edilmesi ancak araştırma amaçlı çalışmalarda ve epidemiyolojik araştırmalarda kolay uygulanabilir, maliyeti düşük yöntemler standardizasyonları yapıldıktan sonra uygulanması önerilmektedir. Özellikle TB tanı ve duyarlılık yöntemlerinde ulusal standardizasyon, güvenilir epidemiyolojik verilerin oluşturulmasını sağlayacaktır. Bunun yanısıra hızlı tanı ve başarılı tedavi hastalığın yayılmasını, morbidite ve mortaliteyi azaltacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. **Balcı İ, Bayram A, Ayten F.** *Mycobacterium tuberculosis*’de birinci seçenek ilaçlara direnç. *Infek Derg* **1999**; 13: 521-3.
2. **Bass JB Jr, Farer LS, Hopewell PC, et al.** Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**; 149:1359-74.
3. **Oztürk CE, Balbay OA, Kaya D, Ceyhan I, Bulut I, Sahin I.** The resistance to major antituberculous drugs of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the respiratory system specimens of tuberculosis patients in Duzce, Turkey. *Jpn J Infect Dis* **2005**; 58: 47-9.
4. **Yaylı G, Sözen H, Ağalar C.** Isparta yöresinden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberkuloz ilaçlara karşı duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2003**; 33: 24-30.
5. **Paramasivan CN.** Two speedier phenotypic methods on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* **2004**; 120: 440-4.
6. **Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, et al.** Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 3179-86.
7. **Siddiqi SH.** BACTEC 460 TB System *Product and Procedure Manual*. Becton Dickinson and Co, **1995**.
8. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia and other aerobic Actinomycetes; Tentative Standard. Second Edition. NCCLS Document M24-T. Pennsylvania, NCCLS, **2002**.
9. **Esen N, Gündüz AT.** Dokuz Eylül Üniversitesinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında ilaç direnci (2000-2002) *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2003**; 33: 337-42.
10. **DeCoster DJ, Vena RM, Callister SM, Schell RF.** Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the BACTEC TB-460 method and flow cytometric assay with the proportion method. *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11: 372-8.
11. **Barreto AM, Araujo JB, de Melo Medeiros RF, de Souza Caldas PC.** Evaluation of indirect susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to the first- and second-line, and alternative drugs by the newer MB/BacT system. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2003**; 98: 827-30.
12. **Freixo MI, Caldas PC, Said A, et al.** Antimicrobial susceptibility determined by the E test, Loewenstein-Jensen proportion, and DNA sequencing methods among *Mycobacterium tuberculosis* isolates discrepancies, preliminary results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2004**; 99: 107-10.
13. **Varma M, Kumar S, Kumar A, Bose M.** Comprason of E test and a gar proportion method of testing drug susceptibility of *M. tuberculosis*. *Indian J Tuberc* **2002**; 490: 217-20.
14. **Madison B, Robinson-Dunn B, George I, et al.** Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3976-9.
15. **Muralidhar S, Srivastava L.** Evaluation of three methods to determine the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* **2004**; 120: 463-7.

#### İLETİŞİM

Doç. Dr. Gönül ASLAN  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
33079 MERSİN  
e-posta: drgaslan@mersin.edu.tr