

## MİKOBAKTERİ CİNSİNDE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ SAPTANMASI

Semra KUŞTİMUR

*Detection of antibiotic susceptibility in Mycobacterium genus.*

Antitüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı dirençli suşların ortaya çıkması tedavi olmamış hastalarda antibiyotik duyarlılık testinin yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Ayrıca antibiyotik duyarlılık testi önceden tedavi olan ve kemoterapi esnasında infeksiyonun tekrarladığı, tedaviden 2-3 ay sonra balgam yaymalarında aside dirençli basillerin görüldüğü, tedaviden 5-6 ay sonra kültürleri pozitif olan hastalara ve ilaca dirençli tüberküloz ile temas olasılığı olan kişilere de yapılmalıdır(9).

Direnç özellikle izoniazid (INH) ve rifampine karşı artmaktadır(6). Tedavide ilaç seçiminde son kararı vermek için in-vitro duyarlılık testleri yardımcı olabilir. Ancak bu çalışmalarda yöntemler iyi seçilmeli ve seçilen yöntemin esası antibakteriyel ajana dirençli bakterilerin mikroorganizma toplumdaki oranını belirlemeye dayanmalıdır(4). Tüberküloz laboratuvarlarında kullanılan yöntemler konvansiyonel ve non-konvansiyonel olarak ayrılabilir.

### KONVANSİYONEL YÖNTEMLER

Direkt veya indirekt yöntem olarak uygulanır. Doğrudan doğruya hastadan gelen örnek (genellikle balgam) ile çalışılan direkt test yalnızca yaymada fazla sayıda bakteri görüldüğü zaman uygulanmalıdır. Konvansiyonel yöntemler yumurta bazlı veya agar bazlı katı besiyerlerinde uygulanır. Sıvı besiyerlerinde direncin kesin başlangıç ya da bitişini gözleme güçlüğü olduğundan bu besiyerleri kullanılmaz. En çok kullanılan yöntemler: 1. konsantrasyon absölu yöntemi, 2. direnç rasyo yöntemi, 3. proporsiyonlar yöntemidir(7). 1963 yılında geliştirilen proporsiyonlar yöntemi bugün dünyada en yaygın kullanılan mikobakteri duyarlılık yöntemidir. Deneyde kullanılan canlı bakteri sayısının bilinmesi ve suş içindeki dirençli bakteri oranının saptanması esasına dayanır. Bu yöntemde ekim miktarı önemlidir. Direnç sıklığının % 1 oranını saptayabilmek için yeterli sayıda koloni besiyerinde gelişmelidir (100-300 cfu)(4). Bunun için iki dilüsyon yapılmalı ve biri diğerinin 100 katı olmalıdır. Canetti, Rist ve Grosset(1)'in geliştirdiği bu yöntemde  $10^{-3}$  ve  $10^{-5}$  dilüsyonlarının yapılması öngörülmüş ve değerlendirme bu esasa göre oturtulmuştur. Ancak pratikte iki dilüsyon ile yapılan ekimler ciddi zorluklar getirmektedir (materyal, personel, vb.). Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı bu konudaki zorlukları  $10^{-3}$  dilüsyondan kontrol ve ilaç tüplere,  $10^{-5}$  dilüsyondan ise yalnızca kontrol tüplerine ekim yaparak azaltmaya çalışmaktadır. Proporsiyonlar yönteminde yumurtalı besiyerleri yanında son yıllarda agarlı Middlebrook 7H 10 ve 7H 11 besiyerleri kullanılmaktadır. Yumurtalı besiyeri bazı ilaçların albumin ve diğer proteinlere bağlanarak aktivitelerinin azalmasına neden olabilmektedir(4). Çeşitli ilaç konsantrasyonları besiyerine karıştırılarak tüp veya petrilere konur (Agar dilüsyon yöntemi). Wayne ve Krassnow(8), filtre kağıdından hazırlanmış ve ilaç emdirilmiş diskleri petri üzerinde ayrılmış bölümlere tek disk şeklinde koyarak yöntemi uygulamışlardır (disk diffüzyon

yöntemi). Besiyelerinin 37°C'deki inkübasyonundan sonra sonuçlar direkt test ile 3-4 haftada, indirekt test ile 5-7 haftada elde edilir. Sonuçları değerlendirme aşamasında başarının düşmemesi için şu noktalara özen gösterilmelidir: 1- Ekime alınacak bakteri miktarı standart özeyi doldurmalı, birkaç kolonik üremeler pasajlar ile çoğaltılmalı; 2- Besiyerinde kontaminant koloni içeren suşlar mutlaka % 4 NaOH ile saflaştırılmalı; 3- Besiyerinin kurumaması için sıkı bir kapşonlama yapılp ya hep ya da birkaç gün, ekim volümü besiyerinin yüzeyine absorbe olacak şekilde yatık tutulmalıdır.

Proporsiyonlar yönteminin en önemli avantajı, yüzbinlerce deney ile çalışılarak standardizasyon komisyonlarında standardize edilmiş olmasıdır. Bu standardizasyonda esası oluşturan iki kavram vardır: 1- Kritik konsantrasyon (KK): Belli bir oranda veya daha az mikobakteri popülasyonunun üremesini sağlayan konsantrasyondur. İlaç-besiyeri-yöntem etkileşimi sonucunda belirlenmiştir. 2- Kritik proporsiyon (KP): Belli bir konsantrasyonda (KK) üreyen bakteri popülasyonu oranıdır. Her ilaca ve her konsantrasyona göre değişiklik gösterir (Tablo).

Tablo. Bazı ilaçlar için kritik konsantrasyon (KK) ve kritik proporsiyon (KP) oranları.

	KK (mcg/ml)	KP (%)
İzoniiazid	0.2	1
Streptomisin	4	10
Etambutol	5	1
Kanamisin	20	10
Pirazinamid	50	10
Rifampisin	40	1

## NON-KONVANSİYONEL YÖNTEMLER

### Radyometrik yöntem

BACTEC 460 sistemi son yıllarda özellikle Amerika'daki birçok laboratuvarında klasik proporsiyonlar yönteminin yerini almıştır. Bu yöntemin farkı sıvı besiyeri kullanılması, üremenin radyometrik olarak ölçülmesi ve sonuçların 4-5 gün içinde alınabilmesidir (Konvansiyonel yöntemlere göre süre % 30 oranında kısalmaktadır). Ayrıca bu yöntemde direncin kritik proporsiyonu bütün antitüberküloz ilaçları için % 1'dir. İlk olarak 1970'lerde Middlebrook ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir(4). Temel prensibi, <sup>14</sup>C işaretli substrat içeren 7 H 12 besiyerinde mikobakterinin üremesi sonucu substratın kullanılması ile meydana gelen <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>'in saptanmasıdır. Üreme oranını yansıtan bu ölçüm üreme indeksi (GI) olarak ifade edilir. İlaçlı şişedeki üreme indeksi kontrol şişesinin üreme indeksine eşit veya daha fazla ise mikobakteri suşu ilaca dirençlidir. Aksine kontrol şişesindeki üreme indeksi, ilaçlı şişedeki üreme indeksinden fazla ise suş duyarlıdır.

Çeşitli çalışmalar standart yöntem ile radyometrik yöntem arasında % 90'ın üzerinde uygunluk olduğunu göstermiştir. Radyometrik yöntem uygun ilaç konsantrasyonu kullanılır ve test şartlarının kontrolü iyi yapılırsa primer ilaçlardan streptomisin, INH, rifampin ve etambutol için geçerli olmaktadır. Sekonder ilaçlar için yöntem henüz standardize edilememiştir.

BACTEC duyarlılık testi yalnızca *Mycobacterium tuberculosis* için önerilmektedir.

Çünkü, henüz *M.tuberculosis* dışındaki mikobakteriler (MOTT) için kliniğe yararlı bakteriyolojik konsantrasyonların sağlanmamış olması konvansiyonel in-vitro duyarlılık çalışmalarının değerini düşürmektedir. Ancak son bulgulara göre, izolatan duyarlı olduğu birçok ajanı içeren rejimlerde bakteriyolojik temizlenmenin başarılması ile birlikte kantitatif duyarlılık çalışmaları (MIC) ilaç seçiminde yardımcı olabilecektir. BACTEC sistemi yakın bir gelecekte MOTT için çeşitli antimikobakteriyel ajanların MIC'lerini belirlemede önemli bir rol oynayabilir(6).

### Yeni, çabuk sonuç veren yöntemler

"Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)" ile antitüberküloz ilaca duyarlı bakterilerden dirençli olanları ayırdedilebilir. Bu yöntemde esas, dirençli suş ile duyarlı suş arasındaki genetik farklılığı göstermeye dayanır. Ancak mikobakterilerde ilaç direncini kodlayan genler hakkındaki bilgiler yeni öğrenilmektedir. Son çalışmalarda rifampine duyarlı *M.tuberculosis* suşlarında RNA polimeraz  $\beta$  alt ünitesinin ilgili sekansının aminoasit farklılığı belirlenmiştir(3). Mikobakterilerin ilaç duyarlılık yöntemleri için genetik yaklaşımlarda önemli bir nokta, her bir ilaca karşı gelişen direnç mekanizmaları farklı olacağından, herbir ilaç için ayrı bir yöntemin geliştirilmesinin gerekebileceğidir.

Rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılarak geliştirilen "Lusiferaz taşıyıcı mikobakteriyofaj (LRM)" yönteminde lusiferaz enzimi tarafından oluşturulan ışık jenerasyonu luminesans spektrofotometresi veya sintillasyon sayacı ile ölçülmektedir(2,3). Bu sistemde, antimikobakteriyel ajanların bulunduğu ortamda duyarlı suşlar dirençli suşlardan birkaç saat içinde (48 saat) ayırdedilebilmektedirler. Işıklar en düşük seviyede bile ölçülebildiği için bu yöntem çok fazla duyarlı ve mikobakteriyofaj sadece mikobakteri hücrelerine tutunduğu için de çok fazla özgül bir yöntemdir(3). Araştırmacılar *M.tuberculosis*, *M.smegmatis* ve BCG suşlarında rifampin, streptomisin, INH, sikloserin duyarlılığı için uygulamışlardır. Yayınlarında bu yöntemin BACTEC yönteminden çok daha kısa sürede sonuç verdiğini, yöntemin mikroyetlerde uygulanmasının çok sayıda örneği inceleme olanağı sağladığını, az miktarda ilaç ile çalışabilen basit bir yöntem olduğunu belirtmektedirler(2,3).

Çabuk üreyen mikobakterilerin antibakteriyel ajanlara duyarlılıklarını gösteren basit standart testler henüz geliştirilmemiştir. Koontz ve ark.(5)'nin 1994'de yayınladıkları çalışmalarında, çabuk üreyen mikobakteriler için Swenson'un 1981'de önerdiği "sıvı-mikrodilüsyon" yönteminin birçok laboratuvar tarafından başarılı bulunmadığı bildirilmekte ve 72 saatte sonuç veren, kolay rutin çalışmalara uygun bir test olarak "E test strip" yöntemi açıklanmaktadır.

Çabuk sonuç veren duyarlılık testlerinin klinik laboratuvarlarda rutin kullanımları için birçok çalışmalara gereksinim vardır. Bu testler ile ilgili çeşitli düşünceler ve potansiyel sorunlar olmasına rağmen testlerin yeni jenerasyonları geleceğin hakimleri olarak ümit edilmektedir.

### KAYNAKLAR

- 1- Canetti G, Rist N, Grosset J: Mesure de la sensibilité du bacille Tb. aux drogues antibacillaires par la methode des proportions, *Rev Tuberc Pneumol* 27:217 (1963).
- 2- Cooksey RC, Crawford JT, Jacobs WR, Shinnick TM: A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of Mycobacterium tuberculosis expressing firefly luciferase, *Antimicrob Agents Chemother* 37:1348 (1993).
- 3- Ellner J, Hinman A, Dooley S, Fischl M, Sepkowitz K, Goldberger M, Shinnick T, Iseman M, Jacobs W: Tuberculosis Symposium: emerging problems and promise, *J I D* 168:537 (1993).

- 4- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Mycobacteria. Susceptibility testing, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4. baskı, s.735, J B Lippincott, Philadelphia (1992).
- 5- Koontz FP, Erwin ME, Barrett MS, Jones RN: E test for routine clinical antimicrobial susceptibility testing of rapid-growing Mycobacteria isolates, *Diagn Microbiol Infect Dis* 19:183 (1994).
- 6- Pfaller MA: Application of new technology to the detection, identification and antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria, *Clin Infect Dis* 101:329 (1994).
- 7- Ülgenalp I: *Tüberküloz Bakteriyolojisi*, s.114, Ankara Basım San. A.Ş., Ankara (1987).
- 8- Wayne LG, Krassnow I: Preparation of tuberculosis testing medium by means of impregnated disks, *Am J Clin Pathol* 45:769 (1966).
- 9- Woods GL, Washington JA: The clinician and microbiology laboratory. Determination of antimicrobial activity, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında, s.191, Churchill Livingstone, New York (1995).