

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN TÜBERKÜLOZ BASILI KOMPLEKSİNİN MAJÖR ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DİRENÇ ORANLARI*

Adil KARADAĞ*, Murat TOKAÇ*, Abdullah GÜVENLİ*, Mustafa SÜNBÜL**, Murat GÜNAYDIN*, Ahmet SANIÇ*

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, SAMSUN

ÖZET

Ülkemizde ve tüm dünyada çoklu ilaç dirençli tüberküloz olgularının artışı önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda laboratuvarımızda izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının major antitüberküloz ilaçlara gösterdikleri direnç oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Hastalardan izole edilen 50 *M.tuberculosis* kompleksi'nin 34'ü balgam, 6'sı idrar, 3'ü torasentez ve 7'si diğer klinik materyalden üretilmiştir. Suşların antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları radyometrik proporsiyon metodu ile belirlenmiştir. Duyarlılık testi için streptomisin 2 ve 6 µg/ml, izoniazid 0.1 ve 0.4 µg/ml, rifampisin 2 µg/ml, etambutolün 2.5 µg/ml ve pirazinamidin 100 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır.

Suşların 8'i (6 suş 0.1 µg/ml, 2 suş 0.4 µg/ml) izoniazide, 2'si rifampisine ve 2'si streptomisine (2 ve 6 µg/ml) direnç gösterirken, etambutol ve pirazinamide 1'er dirençli suş tesbit edilmiştir. Bu suşlardan 1'i izoniazid, rifampisin ve streptomisine, 1'i izoniazid ve rifampisine, 1'i izoniazid ve streptomisine, 1'i izoniazid ve pirazinamide dirençli bulunmuştur.

Sonuç olarak 50 tüberküloz basili kompleksinin 9'u (% 18) major antitüberküloz ilaçlara karşı dirençli bulunmuş, bu suşlardan 2'sinin izoniazid ve rifampisine dirençli olduklarından çoklu ilaç dirençli tüberküloz izolatu oldukları saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: antitüberküloz ilaçlar, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

SUMMARY

Resistance Ratio to Major Antituberculosis Drugs of Tuberculosis Complex Bacilli Isolated from Clinical Samples

The increase of multidrug resistance in tuberculosis appears as an important public health problem both in our country and in the world. The aim of this study is to determine the rate of resistance to major antituberculosis drugs of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated in our laboratories.

Out of 50 strains, 34 were isolated from sputum, 6 from urine, 3 from thoracentesis, 7 from other samples. The susceptibility of the strains to antituberculosis drugs were determined by radiometric proportional method. The concentrations of the drugs used were 2 and 6 µg/ml for streptomycin, 0.1 and 0.4 µg/ml for isoniazid, 2 µg/ml for rifampin, 2.5 µg/ml for ethambutol and 100 µg/ml for pyrazinamide.

Eight strains were found to be resistant to isoniazid (6 strains to 0.1 µg/ml and 2 strains to 0.4 µg/ml), 2 strains to rifampin, 2 strains to streptomycin and 1 strain for each of ethambutol and pyrazinamide. One strain was resistant to isoniazid, rifampin and streptomycin; 1 strain to isoniazid and rifampin; 1 strain to isoniazid and streptomycin; 1 strain

Yazışma adresi: Adil Karadağ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN
Tel.:(0362) 457 60 00/2246
e-posta:adilkaradag@hotmail.com

Alındığı tarih:10.06.2004, revizyon kabulü:20.09.2004

*17. ANKEM Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresi'nde sunulmuştur (26-30 Mayıs 2002, Antalya).

to isoniazid and pyrazinamide.

As a result, resistance to major antituberculosis drugs was observed in 9 (18 %) of the 50 strains and 2 strains were accepted as multidrug resistant due to their resistance to both isoniazid and rifampin.

Key words: antituberculosis drugs, *Mycobacterium tuberculosis* complex

GİRİŞ

Günümüzde dünyada her yıl % 95'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere 10 milyon yeni tüberküloz olgusunun geliştiği ve yılda 3.5 milyon kişinin öldüğü tahmin edilmektedir. Ülkemizde de tüberküloz endemik bir hastalık olup, insidansını 1999'da 28/100,000 olduğu bildirilmiştir⁽⁹⁾.

Mycobacterium tuberculosis kompleksinin klasik metodlar ile identifikasyonu ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesi uzun zaman almaktadır. Tanı ve antibiyotik duyarlılığının saptanmasında hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar devam etmektedir. Laboratuvarlarımızda kullanımı yaygınlaşan hızlı kültür sistemleri ile izolasyon-identifikasyon yanı sıra major antitüberküloz ilaçlara duyarlılık testleri de çalışılmaktadır. Hızlı kültür sistemleri ile duyarlılık testleri 4-12 gün gibi kısa sürelerde sonuçlanmaktadır. Bactec 460 TB, MGIT 960 ve BacT/Alert MB'nin yanı sıra Dio-TK Scan kültür sistemleri ile major tüberküloz ilaçlarına duyarlılık testleri çalışılmaktadır^(8,11,19,20).

Çalışmamızda laboratuvarımızda tanımlanan tüberküloz basili kompleksi suşların antitüberküloz ilaçlara direnç oranlarının hızlı ve güvenilir bir yöntem olan radyometrik proporsiyon yöntemi (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Ünitesine başvuran hastalardan izole edilen 50 *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşun radyometrik proporsiyon yöntemi⁽⁵⁾ ile major antitüberküloz ilaç duyarlılıkları belirlenmiştir. Bu suşların 34'ü balgamdan, 6'sı idrardan, 3'ü torasentez ve 7'si diğer klinik materyallerden izole edilmiştir. Duyarlılık testi için kullanılan konsantrasyonlar Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1: Duyarlılık testi için kullanılan konsantrasyonlar (5).

Antitüberküloz ilaç	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/ml}$)
İsoniazid	0.1, 0.4
Rifampisin	2.0
Streptomisin	2.0, 6.0
Etambutol	2.5
Pirazinamid	100.0

Streptomisin, isoniazid, rifampisin, etambutol duyarlılık testinde besiyeri olarak Bactec 12B şişeleri, pirazinamid duyarlılığı için pH'ı 6.0 olan özel olarak üretilmiş Bactec PZA duyarlılık test şişeleri kullanılmıştır.

Mikroskop incelemesinde aside dirençli boyandığı, NAP ve Accu-Probe (GenProbe, San Diego, CA, USA) yöntemi ile *M.tuberculosis* kompleksi olduğu saptanan klinik izolatların Bactec 12B şişesindeki üreme indeksleri (Growth Indeks = GI) 500-800'e ulaştığında antitüberküloz ilaç duyarlılık testi başlatılmıştır. GI 800-999 arasında olanlar 1:1 oranında dilüe edildikten sonra duyarlılık testine alınmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi için SIRE (Streptomisin, isoniazid, rifampisin, etambutol) kitinden antitüberküloz ilaçların tablo 1'de sunulmuş olan kritik konsantrasyonları hazırlanmış ve Bactec 12B şişelerine 0.1 ml konmuştur. Üremeyi kontrol etmek amacıyla herhangi bir ilaç içermeyen kontrol Bactec 12B şişesi (C=0) kullanılmıştır. Bu şişeye de kültür örneğinden 0.1 ml eklenmiştir. Ayrıca dirençli/duyarlı ayırımında kullanabilmek için, C=100 adı verilen ikinci bir Bactec 12B kontrol şişesi kullanılmıştır. Kontrol C=100'ü hazırlamak amacı ile, yüz kat dilüe bakteri süspansiyonu elde etmek gerekmektedir. Bu amaçla, içinde 9.9 ml dilüsyon sıvısı bulunan DF şişesine yukarıda sözü edilen kültür örneğinden 0.1 ml konmuş ve vortekslenmiştir. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonundan (DF şişesinden) 0.1 ml bakteri süspansiyonu alınarak, içinde herhangi bir antitüberküloz ilaç bulunmayan C=100 kontrol Bactec 12B şişesine inoküle edilmiştir.

Şişeler 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiş ve her gün aynı saatte Bactec 460 cihazında okutulmuştur. C=100 kontrol şişesinde GI'ı 30 ve üzerine ulaşınca test sonlandırılmış, kontrol ve ilaç içeren şişelerin, bir gün önceyle karşılaştırarak, GI farklılıkları (Δ GI) hesaplanmıştır. Kontrol C=100 şişesinin Δ GI > ilaçlı şişenin Δ GI = duyarlı, C=100 şişesinin Δ GI < ilaçlı şişenin Δ GI = dirençli olarak belirlenmiştir⁽⁵⁾.

Pirazinamid, tüberküloz basillerine karşı sadece düşük pH'da aktif olan bir antimikrobiyal ajan olduğundan, pirazinamid duyarlılığı için pH değeri 6.0 olan özel hazırlanmış şişeler kullanılmıştır. Test için GI = 500-999'a ulaşmış Bactec 12B şişesi poli-oksi-etilen-stearat (POES) solüsyonu ile 1/10 dilüe edildikten sonra biri pirazinamid içeren, diğeri içermeyen olmak üzere iki pirazinamid şişesine kültürden 0.1'er ml konmuş ve şişeler 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Şişeler her gün yaklaşık aynı saatte okutulmuştur. Pirazinamid konulmamış şişenin GI'ı 200'e ulaşınca test sonlandırılmıştır.

Pirazinamid şişesinin GI < kontrol şişesinin GI'nin %10'u = duyarlı, pirazinamid şişesinin GI > kontrol şişesinin GI'nin %10'u= dirençli olarak kabul edilmiştir⁽⁵⁾.

Hem isoniazide, hem rifampisine dirençli suşlar çoklu dirençli olarak kabul edilmiştir⁽⁷⁾.

BULGULAR

Suşların 8'inde (6 suş 0.1 µg/ml, 2 suş 0.4 µg/ml) izoniazide, 2'sinde rifampisine ve 2'sinde (2 ve 6 µg/ml) streptomisine direnç gözlenirken, etambutol ve pirazinamide 1'er dirençli suş gözlenmiştir. Bu suşlardan 1'i izoniazid, rifampisin ve streptomisine, 1'i izoniazid ve rifampisine, 1'i izoniazid ve streptomisine, 1'i izoniazid ve pirazinamide dirençli bulunmuştur. Antitüberküloz ilaçlara direnç oranları tablo 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 2: İzole edilen 50 suşun antitüberküloz ilaçlara direnç oranları.

Antitüberküloz ilaç	Dirençli suş (%)
İsoniazid	4 (8)
Etambutol	1 (2)
İsoniazid + Rifampisin	1 (2)
İsoniazid + Streptomisin	1 (2)
İsoniazid + Pirazinamid	1 (2)
İsoniazid + Rifampisin + Streptomisin	1 (2)
Toplam dirençli suş	9 (18)

Çalışmaya alınan 50 tüberküloz basili kompleksinin 9'unda (% 18) major antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gözlenmiştir. Bu suşlardan 2'sinin çoklu ilaç dirençli tüberküloz olduğu tesbit edilmiştir.

Tablo 3: Ülkemizde antitüberküloz ilaçlara karşı saptanan direnç oranları (%).

Kaynak	Besiyeri	Şehir	Yıl	INH	RIF	SM	EMB
Uzun ve ark. ⁽¹⁸⁾	12B	İstanbul	1993	33.0	5.0	2.0	5.0
Yaman ve ark. ⁽¹⁹⁾	12B	Adana	1994	16.9	12.5	14.2	2.6
Yüce ve ark. ⁽²¹⁾	LJ	İzmir	1997	6.0	10.3	10.3	5.2
Otkun ve ark. ⁽¹⁰⁾	7H10	Edirne	1997	30.0	11.0	39.0	13.0
Özcan ve ark. ⁽¹²⁾	12B	Kayseri	1998	7.3	22.1	10.1	4.6
Aydın ve ark. ⁽¹⁾	12B	Bursa	1998	22.2	7.4	4.5	4.0
Balcı ve ark. ⁽²⁾	12B	Gaziantep	1999	10.6	0.5	2.0	4.5
Öztürkeri ve ark. ⁽¹⁴⁾	12B	İstanbul	1999	35.3	21.0	6.8	30.5
Saniç ve ark. ⁽¹⁵⁾	LJ	Samsun	2000	7.3	22.1	10.1	16.0
Özcan ve ark. ⁽¹³⁾	12B	Kayseri	2002	19.8	21.3	9.4	4.2
Sürücüoğlu ve ark. ⁽¹⁶⁾	12B	Manisa	2002	17.1	12.4	20.2	7.0
Kısa ve ark. ⁽⁶⁾	12B	Ankara	2002	8.7	2.1	4.1	5.1
Gani ve ark. ⁽⁴⁾	12B	Gaziantep	2002	13.9	2.9	1.9	3.4
Kocazeybek. ⁽⁸⁾	MGIT	İstanbul	2002	19.6	14.7	6.5	3.2
Tansel ve ark. ⁽¹⁷⁾	12B	Edirne	2002	9.0	4.5	2.2	1.5
Çalışmamız	12B	Samsun		8.0	4.0	4.0	2.0

* INH: İsoniazid, RIF: Rifampisin, SM: Streptomisin, EMB: Etambutol

TARTIŞMA

Son yıllarda tüm dünyada HIV epidemisi ile birlikte tüberküloz olgularındaki artış dikkatleri tekrar bu infeksiyonun üzerine çekmiş ve duyarlılık belirleme çalışmalarının önemini artırmıştır⁽³⁾. Ülkemizin tümünü kapsayan bir ilaç direnç çalışması bulunmamakla birlikte, gerek hastanelerde gerekse bazı bölgeleri kapsayacak şekilde yapılan çeşitli çalışmalarda antitüberküloz ilaç direnci konusunda farklı direnç oranları bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda elde edilen antitüberküloz direnç oranları tablo 3'de verilmiştir.

Çalışmamızda izoniazide % 8, rifampisine % 4, streptomisine % 4, etambutole % 2 ve pirazinamide % 2 direnç saptanmıştır. Diğer çalışmalarda pirazinamid direnci ile ilgili veriye rastlanmamaktadır.

Çoklu ilaç dirençli tüberküloz; iki veya daha fazla major antitüberküloz ilaca dirençli *M.tuberculosis* kompleksinin neden olduğu tüberküloza verilen isimdir. Klinik olarak en önemli çoklu ilaç dirençli tüberküloz kalıbı izoniazid ve rifampisin direncinin birlikte bulunduğu durumdur⁽⁷⁾. İsoniazid ve rifampisin direncindeki artış tüberküloz eradikasyonunun önündeki en büyük engel olarak görülmektedir^(7,9).

Çalışmamızda izoniazid ve rifampisine birlikte direnç oranları, yurdumuzda yapılan diğer çalışmalardakine yakın değerlerde bulunmuştur. İsoniazid ve rifampisine birlikte direnç % 4'tür. Isparta yöresinde yapılan bir çalışmada iki ilacın ikisine birden direnç oranı % 2.7⁽²⁰⁾, Edirne'de farklı zamanlarda yapılan iki çalışmada % 7 ve % 3^(10,17) Gaziantep'te yapılan iki farklı çalışmada % 12.8 ve % 19.6^(2,4) olarak saptanmıştır.

Çeşitli çalışmalardaki antitüberküloz direnç oranlarında

gözlemlediğimiz farklılıkların (Tablo 3) çalışma için seçilen grubun sosyoekonomik ve kültürel farklılıklarından veya uygulanan duyarlılık test yöntemlerinin standardizasyon problemlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Radyometrik proporsiyon yönteminin en önemli avantajı, mikobakterilerin üretilmesi ve ilaç duyarlılık testi için gereken süreyi kısaltması ve hastaya uygun tedavinin daha erken başlanmasına olanak sağlamasıdır^(11,19,20).

Sonuç olarak laboratuvarımıza gelen klinik materyallerden izole ettiğimiz tüberküloz basilleri kompleksinde antitüberküloz ilaçlara karşı % 18 oranında direnç geliştiği, bunun % 4'ünün çoklu ilaç dirençli tüberküloz olduğu gözlenmiştir. Tüberküloz eradikasyonunu tehdit eden yüksek ilaç dirençleri nedeniyle duyarlılık testlerinin standardizasyonunun sağlanması, ayrıca hızlı ve güvenilir sonuç vermesi açısından radyometrik proporsiyon yönteminin kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Aydın Ö, Özakin C, Gedikoğlu S: 175 Mycobacterium tuberculosis kompleks suşunun Bactec ile saptanan antitüberküloz ilaç duyarlılıkları, II. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Ankara (1998).
2. Balcı İ, Bayram A, Filiz A: Mycobacterium tuberculosis'te birinci seçenek ilaçlara direnç, İnfeksiyon Derg 1999;13(4):521-5.
3. Busillo C P, Leasonau K D, Sonjana V, Soumakis S, Davidson M, Mullen M P: Multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection, Chest 1992;102:797.
4. Gani O, Zer Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G: Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002;32(3-4):225-9.
5. Inderlied CB, Pfyffer GE: Susceptibility test methods: Mycobacteria, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology, Vol I, 8th ed" kitabında s.1149-77, ASM Press, Washington (2003).
6. Kısa Ö, Albay A, Baylan O, Doğançlı L: Mycobacterium tuberculosis suşlarında antitüberküloz ilaç direnç oranlarının BACTEC 460 TB kültür sistemi ile değerlendirilmesi, Flora 2002;7(3):171-6.
7. Kocabaş A: Akciğer tüberkülozu, "Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds): İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2. baskı" kitabında s. 539, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (2002).
8. Kocazeybek B: Tüberküloz tanısında BBL-"Mycobacteria-Growth Indicator Tube (MGIT)" Yönteminin "Löwenstein-Jensen" besiyeri ile karşılaştırılması ve izole edilen suşların dört majör ilaca karşı dirençlerinin değerlendirilmesi, Flora 2002;7(2):112-9.
9. Mert A: Erişkinlerde yüzeysel tüberküloz ve lenfadenopati, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun (2003).
10. Otkun M, Akata F, Karabay O, Tabakoğlu E, Tuğrul M, Dündar V: Trakya Üniversitesi Hastanesine 1996 yılı içinde başvuran tüberkülozlu olgularda antitüberküloz ilaçlara direnç sorunu, İnfeksiyon Derg 1997;11(3):191-6.
11. Özakin C, Gedikoğlu S: Tüberküloz tanısında tüberküloz laboratuvarının rolü. Tanı ve ilaç duyarlılık testlerinde rutin laboratuvar yöntemlerinin değeri, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun (2003).
12. Özcan M, Özbal Y, Fazlı A, Kılıç H: Kayseri'de tüberküloz kompleksi mikobakterilerin antitüberkülotiklere karşı direnç durumu, 2.Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Ankara (1998).
13. Özcan M, Özbal Y, Şenyüz A: Mikobakterilerde antitüberkülotiklere karşı direnç gelişimi, 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Abant (2002).
14. Öztürkeri H, Emektaş G, Kocabay Ö, Gözüaçık A: İzoniazid, rifampin, streptomisin ve etambutolün tüberküloz basillerine in-vitro etkinlikleri. BACTEC test yöntemi ile alınan sonuçlar, Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999;29(1-2):58-60.
15. Saniç A, Günaydın M, Çoban AY, Tokaç MS, Çetin M: A comparison of the E-test and proportion methods for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis, J Chemother 2000;12(6):491-4.
16. Sürücüoğlu S, Özkütük N, Kurutepe S, Değerli K, Özbakkaloğlu B: Manisa bölgesinde izole edilen tüberküloz basillerinin primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının incelenmesi, 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, Abant (2002).
17. Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F: Mycobacterium tuberculosis suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnci: Trakya Üniversitesi Hastanesi'nin iki yıllık sonuçları, İnfeksiyon Derg 2003;17(1):23-6.
18. Uzun M, Kiraz M, Kaya D, Aktan G, Kasımoğlu Ö: Mycobacterium türlerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları, ANKEM Derg 1993;7(4):273-6.
19. Yaman A, Dündar İH, Aksungur P, Apan TZ: Mycobacterium tuberculosis'in izolasyonunda Bactec sistemi ile Löwenstein-Jensen'in kıyaslanması ve ilaç hassasiyetlerinin Bactec ile değerlendirilmesi, Mikrobiyol Bül 1994;28(3):189-98.
20. Yaylı G, Sözen H, Ağalar C: Isparta yöresinden izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003;33:24-30.
21. Yüce A, Yücesoy M, Ercan H, Çeliktepe E, Yuluğ N: Mycobacterium tuberculosis suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnç paternleri ve izoniazid direnci ile katalaz aktivitesi arasındaki ilişki, Klimik Derg 1997;10(1):33-5.