

BEYİN - OMURİLİK SIVISINDAN İZOLE EDİLEN 45 *M. TUBERCULOSIS* SUŞUNUN E -TEST YÖNTEMİ İLE ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIKLARI*

Gönül ŞENGÖZ, Filiz YILDIRIM, Kadriye KART YAŞAR, Deneş BERZEG, Mehmet BAKAR,
Özcan NAZLICAN

Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Aksaray, İSTANBUL

ÖZET

Yüzyıllar boyunca toplum sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biri olan tüberküloz, günümüzdeki etkili tedavisine rağmen, sorun olmaya devam etmektedir. Laboratuvarımızda beyin-omurilik sıvısından Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilen ve M.tuberculosis olarak tanımlanan 45 suş için E-test yöntemi ile isoniazid, rifampisin, etambutol ve streptomisinin MİK değerleri araştırılmış, MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.016, 0.016, 0.023 ve 0.125 µg/ml olarak saptanmıştır. Bir olguda çok ilaca direnç tespit edilmiştir. Tüberküloz menenjit, klinik olarak hastalığın en ağır formudur, mortalitesi ve sekel kalma olasılığı yüksektir. Dirençli suşlarla karşılaşıldığında tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu çalışma ile, beyin omurilik sıvısından bakterinin izole edildiği her olguda duyarlılık testlerinin uygulanmasının gerekli olduğu, duyarlılık testlerini yapmak için ampirik tedavi başarısızlığını beklemeye fırsat olmayabileceği ve az oranda da olsa çok ilaca dirençli olgularla karşılaşılabilmesi vurgulanmak istenmiştir.

Anahtar sözcükler: beyin-omurilik sıvısı, E-test, M.tuberculosis

SUMMARY

Susceptibility of 45 *M.tuberculosis* Strains Isolated from Cerebrospinal Fluid to Antituberculous Drugs by E-Test

Tuberculosis is one of the most important diseases threatening public health throughout centuries and, in spite of the existence of an effective treatment, is still a problem. In our laboratory 45 M.tuberculosis strains isolated from cerebrospinal fluid cultured onto Löwenstein-Jensen medium were studied for their MIC values with E-test method for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin. MIC₉₀ values were found as 0.016, 0.016, 0.023 and 0.125 µg/ml, respectively. In only one case multi-drug resistance was present. Tuberculous meningitis is the most serious form of the disease, with high ratio of mortality and sequelae. We propose that in all cases of tuberculous meningitis the susceptibility tests should be performed immediately since there may not be a chance to wait the results of empirical treatment.

Keywords: cerebrospinal fluid, E-test, M.tuberculosis

Yazışma adresi: Gönül Şengöz, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Aksaray, İSTANBUL
Tel.: (0212) 453 07 66

e-posta: drgonul@hasekihastanesi.gov.tr

Alındığı tarih: 28.09.2005, revizyon kabulü: 27.12.2005

*13. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (13th ECCMID)'de sunulmuştur (10-13 Mayıs 2003, Glasgow)

GİRİŞ

İnsanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından olan tüberküloz, insanları arkeolojik ve kayıtlı tarih boyunca etkilemiştir, etkilemeye de devam etmektedir. Tüberküloza ait bir pandemi halen sürmektedir ve batı ülkelerinde bile, tüberkülozun birçok infeksiyondan daha yüksek morbidite ve mortalite yaratan bir hastalık olduğunu görmek şaşırtıcıdır.

Tüberkülozun en ağır formlarında biri santral sinir sistemi tüberkülozudur. Tüberküloz menenjitin görülme sıklığı toplumda tüberküloz prevalansına paraleldir. Genellikle primer infeksiyonun komplikasyonu olarak, kronik tüberkülozun seyri sırasında veya tedavi edilmeyen hastalarda terminal komplikasyon olarak gelişir. Her yaş grubunda görülebilir. Ancak çocukluk çağında özellikle ilk beş yaşta, erişkin yaş grubunda ise en fazla 25-45 yaş arasında görülmektedir. Çoğunlukla etken *M. tuberculosis*'tir⁽¹⁸⁾.

Standart antitüberküloz ilaçlara karşı olan mikobakteriyel direnç, bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum antibiyotik duyarlılık testinin yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Ülkemizde tüberkülozlu hastalardaki ilaç direncinin oldukça farklı düzeylerde olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır^(7,8,17). Bu farklılığı yaratan, özellikle seçilen hasta grupları ve yöntemlerin çeşitliliğidir. Duyarlılık testi yapmanın kriterleri, son birkaç yıl içerisinde çok ilaca dirençli (ÇİD) [multi drug resistance (MDR)] tüberkülozla (ÇİDT) ilgili olarak değişmiştir. Bugünkü tavsiyeler, hastalardan başlangıçta izole edilen tüm *M.tuberculosis* izolatlarının test edilmesi ve eğer hastanın kültürü 3 ay içinde negatifleşmezse veya tedaviye yanıtta klinik iyileşme yoksa elde edilen yeni izolatlara tekrar test uygulanmasıdır⁽¹⁰⁾.

GEREÇ VE YÖNTEM

1992-2002 yılları arasında laboratuvarımıza tüberküloz kültürü amacı ile 1515'i beyin-omurilik sıvısı (BOS) olmak üzere 7755 materyal gönderilmiştir. Gönderilen örnekler Löwenstein-Jensen besiyerine ekilerek daha erken üreme olmamışsa 45 güne kadar 37°C'de bekletilmiştir.

M.tuberculosis'i, diğer mikobakterilerden ayırmak için niasin testi, nitrit testi, katalaz damla testi ve 68°C'de ısıttıktan sonra katalaz testleri yapılmıştır. Niasin, nitrat ve damla katalaz pozitif, 68°C'de ısıttıktan sonra katalaz negatif olan suşlar *M.tuberculosis* olarak adlandırılmıştır.

BOS'dan üreyen, farklı hastalardan izole edilmiş 45 suş için isoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (ETB) ve streptomisin (SM)'in, hızlı ve kolay bir yöntem olan, E-test ile minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir^(6,12,16). Bunun için Löwenstein-Jensen besiyerinde üremiş kolonilerden, Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde McFarland

3'e göre bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonu, Middlebrook 7H11 katı besiyeri yüzeyine yayılmış ve üzerine değişen oranlarda antitüberküloz ilaç içeren E-test şeritleri konmuştur. *M.tuberculosis* H37Rv ile hazırlanan kontrol plağı ile birlikte 5-7 gün süre ile % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir^(5,16). Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin E-test şeridini kestiği nokta MİK değeri olarak saptanmıştır.

Çalışmaların tamamı güvenlik kabini içinde yapılmıştır.

BULGULAR

Gönderilen materyallerde üreme oranı % 7.9 (614/7755) olarak saptanmıştır. Abse içeriği % 16 ile en yüksek üreme oranına sahip materyal olarak tespit edilmiştir. Gönderilen BOS materyallerinin 159'unda üreme olmuş ve üreme oranı % 10.5 (159/1515) olarak bulunmuştur. İki BOS materyalinde direkt incelemede aside dirençli bakteri görülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda BOS'tan izole edilen 45 *M.tuberculosis* suşu için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri hesaplanmış, bu değerlerin duyarlılık sınırları içinde olduğu görülmüştür. Kritik konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında bir suşta çok ilaca direnç tespit edilmiş, MİK değeri INH için 0.2 µg/ml, RIF için 1.5 µg/ml, ETB için 48 µg/ml, SM için 4 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo: BOS'dan izole edilen 45 *M.tuberculosis* suşu için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (µg/ml).

İlaç	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralıkları	Kritik konsantrasyon
INH	<0.016	0.016	<0.016-0.2	0.2
RIF	<0.016	0.016	<0.016-1.5	1
ETB	<0.016	0.023	<0.064-48	5
SM	<0.064	0.125	<0.016-4	2

Çalışmaya aldığımız BOS'dan izole edilen 45 *M.tuberculosis* suşunun 33'ü kliniğimizde, 11'i Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, biri de Nöroloji Kliniğinde yatarak izlenen hastalardan izole edilmiştir. Kliniğimizde takip edilen 33 hastanın 20'si erkek, 13'ü kadın, yaş aralığı 13-70 ve yaş ortalaması 29 olarak bulunmuştur. Hastalarımız arasında eşlik eden pulmoner tüberküloz varlığı oranı 7/33, ekstrapulmoner tüberküloz varlığı oranı 3/33 (gastrointestinal, lenfadenit, renal), tüberkülozlu ile temas hikayesi oranı 6/33 olarak saptanmıştır. Hastaların üçünde kliniğimizde yıllar içinde rekürren menenjit saptanmıştır. Antitüberküloz tedavi başlanmasına rağmen 33 hastanın üçü kaybedilmiştir.

Çok ilaca direncin saptandığı 13 yaşındaki hastanın anamnezinde, ailesinde tüberküloz öyküsü olduğu saptanmıştır. Hastaya Evre I tüberküloz menenjit tanısı konmuş ve işitme kaybı sekel olarak ortaya çıkmıştır.

TARTIŞMA

Tarihin en eski hastalıklarından biri olan tüberküloz, dünyada hâlâ hayatı tehdit eden bir hastalık olarak varlığını sürdürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü ile Tüberküloz ve Akciğer Hastalıkları Uluslararası Federasyonu'nun (IUATLD) saptamalarına göre, dünyada yaklaşık 1.7 milyar kişi *M.tuberculosis* ile infektidir^(3,4).

Tüberkülozda ilaç direnci, kemoterapi dönemi ile birlikte insanoglunun ortaya çıkardığı bir sorundur⁽³⁾. ÇİDT, etkeni en az izoniazid ve rifampisine ya da daha fazla sayıda ilaca dirençli olgu olarak tanımlanmıştır⁽¹¹⁾.

Çalışmamızda BOS'tan izole edilen 45 *M.tuberculosis* suşunun standart antitüberküloz ilaçlardan izoniazid, rifampisin, etambutol ve streptomisin için E-test ile MİK değerleri araştırılmıştır. Sadece bir suşta çok ilaca direnç tespit edilmiştir. Agar proporsiyon gibi referans yöntemlerin yanında kolay uygulanabilir bir yöntem olması, bir hafta gibi kısa sürede sonuçlandırılabilmesi ve pahalı ekipman, besiyeri vs. gerektirmemesi gibi sebeplerle E-test yöntemi çalışmamızda tercih edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda referans yöntemlerle karşılaştırıldığında E-test yönteminin duyarlı ve güvenilir olduğu gösterilmiştir^(5,6,16).

Tüberküloz bakterilerine yönelik duyarlılık testleri değerlendirilirken önce testlerin birbirleri ile uyumluluklarını gösteren çalışmaları, daha sonra da izole edilen suşların kaynaklandığı grupları karşılaştıran çalışmaları değerlendirmek gereklidir. Joloba ve ark.⁽⁵⁾ 4 antitüberküloz ilaç için, E-test ve agar proporsiyon metodunu karşılaştırdıkları çalışmalarında iki testin sonuçlarını izoniazid için % 98, rifampisin, etambutol ve streptomisin için % 100 uyumlu bulmuşlardır. Ülkemizden yapılan bir çalışmada da E-test, MGIT ve agar proporsiyon metoduyla yapılan duyarlılık çalışmaları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir⁽¹⁾.

Seçilen gruplara dayalı farkları gösteren çalışmalar arasında bölgesel verem savaş dispanserine başvuran hastalardan izole edilen 214 suşun incelendiği ve % 49 oranında tek ilaca direnç saptanan çalışma dikkat çekicidir. INH, RIF, ETB ve SM için direnç oranları sırasıyla % 27, % 21, % 10, % 29 ve ÇİDT ise % 11 olarak bulunmuştur⁽⁷⁾. Bu çalışmada çalışma materyalini dispanserlerin takibinde olan ve defalarca tedavi olmuş, sosyoekonomik durumu kötü ve tedaviye cevapsız pulmoner tüberkülozlu hastaların tekrarlanan kültürlerinden elde edilen izolatlar oluşturduğu için direncin daha yüksek bulunmuş olma ihtimali göz önünde tutulmalıdır. Ülkemizde yapılan ve 365 yeni tanımlanan ve daha önceden hiç tedavi almamış hastadan izole edilen suşların araştırıldığı çalışmada ise tek ilaca direnç % 24 bulunurken en fazla direnç INH için (54 olgu) bulunmuştur ve çok ilaca direnç ise sadece 10 hastada saptanmıştır⁽⁸⁾. Ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde 451 *M.tuberculosis* suşunun

antimikobakteriyel duyarlılıklarının incelendiği bir çalışmada da direnç oranları INH için % 4.4, RIF için % 4.9, SM için % 4.7, INH+SM için % 3.1 ve RIF+SM için % 1.8 gibi düşük olarak saptanmıştır⁽¹⁷⁾. Bu çalışmalar arasındaki farklılık çalışılan gruplara dayalıdır ve ülke genelinde dirençten bahsederken bu çalışmaların farklılıkları da göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızdaki suşlardan 33'ünün elde edildiği takibimiz altındaki hastalardan 10'unda, pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozun eşlik ettiği saptanmıştır. Ancak hastalarımızın hiçbiri daha önceden tedavi almamış hastalardı. Ülkemiz şartlarında bu hasta grubunun sosyokültürel özellikleri nedeniyle, tüberküloz menenjit dışında genellikle acil bir klinik tablo oluşturmayan diğer tüberküloz formlarında hastanın bir sağlık kuruluşuna başvurup tedavi alması gecikebilmektedir. Farklılığı yaratan bir diğer unsur da suşların izole edildiği materyallerin seçiminden kaynaklanıyor olabilir. Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde Thwaites ve ark.⁽¹⁴⁾'nın 180 Vietnam'lı erişkin menenjitli hastadan elde ettikleri izolatları inceledikleri ve en az bir ilaca direnci % 40 olarak saptadıkları çalışmalarında % 5.6 olguda INH ve RIF direnci birlikte bulunmuştur. Bu çalışmada INH ve RIF direncine sahip olmak ölümle en fazla ilişkili faktör olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız gibi bu çalışmada da BOS'tan izole edilmiş suşlarda direnç oranlarının oldukça düşük bulunması dikkat çekicidir⁽¹⁴⁾. Bu durumun aksine Pakistan'da 98 ekstrapulmoner örnekle yapılan çalışmada % 21.4 çok ilaca direnç, % 9.2 dört ilaca da direnç tespit edilmiştir⁽²⁾.

Çin'de 109 *M.tuberculosis* suşu ile yapılan çalışmada % 50'nin üzerinde en az iki ilaca direnç tespit edilirken, INH, RIF, EMB ve SM'e direnç sırasıyla % 71, % 80, % 48, % 78 gibi çok yüksek oranlarda tespit edilmiştir⁽¹⁵⁾. Yine Çin'de 30 kenti içeren ve 953 *M.tuberculosis* suşu ile yapılan geniş kapsamlı bir araştırmada primer direnç % 14.8, primer çok ilaca direnç % 4.4, sekonder direnç % 59, sekonder çok ilaca direnç % 34.7 bulunmuştur⁽⁹⁾. Çin'de tespit edilen bu direnç oranları çalışmamızdan oldukça yüksektir. 2002 yılında incelediğimiz Çin doğumlu bir Türkmen kadın hastada 2 yıl ara ile tüberkülozun farklı formları ile iki kez hastalık saptanmıştı⁽¹³⁾. Bu olgudaki gibi kalabalık ortam ve kötü yaşam koşulları tedaviye rağmen reinfeksiyonlara ve tedaviye dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Tüberkülozun etkin şekilde kontrolü ile başarılı sağaltımı için erken tanı yöntemleriyle hızlı duyarlılık testlerine gereksinim vardır. Tüberküloz ilaçlarına direnç, tüberküloz kontrolünde en önemli problemlerden biridir. Primer direncin yüksek olduğu ülkelerde üreyen tüm mikobakteri suşlarına, özellikle de beyin omurilik sıvısından izole edilenlere direnç çalışması yapılması artık bir zorunluluktur. Geliştirilen hızlı tanı teknikleri ve duyarlılık testlerinde kantitatif testlerin kullanılmasıyla daha kısa sürede daha sağlıklı sonuçlar alınabilecektir. Doğru verilerin elde edilmesi, gerçek direnç

oranlarının belirlenmesi ve uygun tedavi protokollerinin seçilebilmesi için gerekir.

KAYNAKLAR

1. Birinci A, Coban AY, Ekinci B, Durupinar B: Comparison of the proportion method with mycobacteria growth indicator tube and E-test for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis, Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(3):351-2.
2. Butt T, Kazmi SY, Ahmad RN et al: Frequency and antibiotic susceptibility pattern of mycobacterial isolates from extra-pulmonary tuberculosis cases, J Pak Med Assoc 2003;53(8):328-32.
3. Chretien J: Tuberculosis today, Eur Respir J 1995;20 (Suppl):S617-9.
4. Collins FM: Tuberculosis: The return of an old enemy, Crit Rev Microbiol 1993;19(1):1-16.
5. Joloba ML, Bajaksouzian S, Jacobs MR: Evaluation of E test for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis, J Clin Microbiol 2000;38(10): 3834-6.
6. Kakkar N, Sharma M, Ray P, Sethi S, Kumar S: Evaluation of E test for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to primary anti tubercular drugs, Indian J Med Res 2000;111:168-71.
7. Karabay O, Otkun M, Akata F, Karlikaya C, Tugrul M, Dündar V: Antituberculosis drug resistance and associated risk factors in the European section of Turkey, Indian J Chest Dis Allied Sci 2004;46 (3): 171-7.
8. Kartaloğlu Z, Bozkanat E, Öztürkeri H, Okutan O, Ilvan A: Primary antituberculosis drug resistance at Turkish Military Chest Diseases Hospital in Istanbul, Med Princ Pract 2002;11(4):202-5.
9. Li Q, Wang X, He H: WHO sample survey on drug resistant tuberculosis in Zhejiang, China (abstract), Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 2000; 23(12):718-21.
10. MMWR: Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis of the Centers for Diseases Control and Prevention. MMWR 1993;42:1-8.
11. Rieder HL: Drug-resistant tuberculosis: Issues in epidemiology and challenges for public health, Tuber Lung Dis 1994;75(5):321-3.
12. Sanchez L, Londono D, Arango AI, Mattar S: In vitro activity of antituberculous agents against Mycobacterium tuberculosis isolates from Bogota, DC (Colombia) evaluated by E test, Diagn Microbiol Infect Dis 1999;35 (2):109-12.
13. Şengöz G, Yıldırım F, Berzeg D ve ark.: Nedeni bilinmeyen ateş ve ekstrapulmoner tüberküloz, ANKEM Derg 2004;18(2):120-2.
14. Thwaites GE, Lan NT, Dung NH et al: Effect of antituberculosis drug resistance on response to treatment and outcome in adults with tuberculosis meningitis, J Infect Dis 2005;192(1):79-88.
15. Wang W, Li H, Wu X et al: Clinical application and evaluation of the detection of five drugs resistance genes in Mycobacterium tuberculosis (abstract), Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 2002; 25(11): 670-3.
16. Wanger A, Mills K: Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin and streptomycin by using E test, J Clin Microbiol 1996;34(7):1672-6.
17. Yaramış A, Gürkan F, Elevli M, Soker M, Haspolat K, Kırbaş G, Taş MA: Central nervous system tuberculosis in children: A review of 214 cases (abstract), Pediatrics 1998;102(5):e49.
18. Zuger A: Tuberculosis, "Scheld WM, Whitley RI, Marra CM (eds): Infections of Central Nervous System, 3. baskı" kitabında s.441-59, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2004).