

MERSİN BÖLGESİNDE İZOLE EDİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARINDA AMİKASİN VE SİPROFLOKSASİN DUYARLILIĞI

Gönül ASLAN, Şahin DİREKEL, Feza OTAĞ, Emine AKDENİZLİ, Gürol EMEKDAŞ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

ÖZET

Primer antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı (43) ve bir ya da daha fazlasına dirençli (48) Mycobacterium tuberculosis izolatlarının amikasin ve siprofloksasine in-vitro duyarlılıkları agar proporsiyon yöntemi ile belirlenmiştir. Suşların direnç oranları amikasin için % 2.2, siprofloksasin için % 1.1 olarak bulunmuştur. Çoğul ilaç direnci olan izolatların tümü amikasin ve siprofloksasine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Çok ilaca dirençli tüberküloz suşlarının oluşturduğu infeksiyonların tedavisinde sekonder ilaç direncinin bilinmesi bu hastaların tedavi protokollerinin planlanması, DOTS-Plus stratejisi uygulaması ve tedavi başarısının artırılması için zorunlu olduğundan bu verilerin bölgemiz ve ülkemizdeki çok ilaca dirençli tüberküloz suşları ile infekte hastaların tedavisinin planlamasında faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: agar proporsiyon yöntemi, amikasin, çok ilaca dirençli *M.tuberculosis*, siprofloksasin

SUMMARY

The Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Mersin Region for Amikacin and Ciprofloxacin

In vitro susceptibility for amikacin and ciprofloxacin of 43 Mycobacterium tuberculosis isolates susceptible to all primary antituberculosis drugs and of 48 isolates resistant to one or more primary antituberculosis drugs was determined by agar proportion method. The resistance rates of the isolates were 2.2 % for amikacin and 1.1 % for ciprofloxacin. All of the multi-drug resistant isolates were found to be susceptible to amikacin and ciprofloxacin. As it is important to know the resistance rates to secondary drugs for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis, for the practice of DOTS-Plus strategies and increasing the therapeutic success, we consider that the results of such studies will aid the treatment of multi-drug resistant tuberculosis patients in our region and the country.

Keywords: agar proportion method, amikacin, ciprofloxacin, multi-drug resistant *M.tuberculosis*

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü 2004 yılında 9 milyon yeni tüberküloz olgusu görüldüğünü ve yaklaşık 2 milyon insanın bu hastalıktan öldüğünü bildirmektedir⁽²¹⁾.

Tüm dünyada son zamanlarda çoğul ilaç direnci olan tüberküloz olguları hızla artmıştır. Tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçlardan rifampisin ve isoniazide direnç gelişmesi çoğul ilaç direnci olan tüberküloz (ÇİDTB) olarak tanımlanmıştır⁽¹¹⁾. ÇİDTB hastaların tedavisinde amikasin, etionamid, kanamisin, kapreomisin, klofazimin, sikloserin, rifabutin, p-amino salisilik asit (PAS), ofloksasin ve siprofloksasin gibi sekonder ilaçlar kullanılmaktadır⁽¹⁰⁾. Doğal suşlardaki direnç oranları son derece düşüktür. Ancak tek ilaçla tedavi, yetersiz ilaç kombinasyonları ile tedavi, tedaviye ara vermek, ilaçların düzenli olarak ve yeterli süre kullanılmaması gibi durumlar, bulaşmayı sağlayan edinsel dirençli suşlarla infekte hasta sayısının artması, artan primer direnç oranları ve tedavi başarısızlığı kısır döngüsünü oluşturmaktadır.

Tüberküloz tedavisinde primer olarak kullanılan streptomisine karşı direnç geliştiğinde kullanılan amikasin ve kanamisin gibi aminoglikozit grubu antibakteriyeller bakteriyel ribozomun 30S parçasına geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve protein sentezini inhibe eder. Bu ilaçlar konsantrasyona bağımlı olarak bakterisidal etki gösterebilmektedirler⁽¹⁰⁾. Florokinolonlar makrofaj içine girme ve burada birikme özelliğinden dolayı in-vivo ve in-vitro koşullarda *Mycobacterium tuberculosis*'e etkili bulunan antibakteriyel ajanlardır⁽⁶⁾.

Laboratuvarımızda 2003-2004 yıllarında izole ettiğimiz 99 suşta yaptığımız antitüberküloz ilaç duyarlılık test sonuçlarına göre; suşların 80'i (% 81) birinci seçenek antitüberküloz ilaçların tümüne duyarlı iken, 19'u (% 19) bir veya daha fazla ilaca dirençli olarak tespit edilmiştir. Tek ilaca direnç 10 suşta, iki ilaca direnç 3 suşta, üç ilaca direnç 4 suşta ve dört ilaca direnç 2 suşta saptanmıştır⁽²⁾.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole ve identifiye edilen, primer antitüberküloz ilaçlara dirençli veya duyarlı *M.tuberculosis* izolatlarının sekonder antitüberküloz ilaçlardan amikasin ve siprofloksasine in-vitro duyarlılığını araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2005 ve Haziran 2006 arasında mikobakteriyoloji laboratuvarımıza gelen örneklerden izole edilen, 43'ü (% 47) primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı, 48'i (% 53) herhangi bir primer antitüberküloz ilaca karşı dirençli 91 *M.tuberculosis* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. İzolasyonda Löwenstein-

Jensen (LJ) ve/veya BACTEC 7H12B besiyerleri kullanılmıştır. *M.tuberculosis* kompleks (MTC) ve tüberküloz dışı mikobakterilerin (MOTT) ayrımında p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi uygulanmıştır⁽¹⁶⁾. Çalışmadaki suşların hepsi MTC suşlardır.

Primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılık testi BACTEC 460 TB kültür sistemi ile, son konsantrasyonları isoniazid için 0.1 μ g/ml, streptomisin için 2.0 μ g/ml, rifampisin için 2.0 μ g/ml ve etambutol için 2.5 μ g/ml olacak şekilde hazırlanarak uygulanmış ve üreme indeksi $30 \leq$ olan sonuçlar değerlendirilmeye alınmıştır⁽⁷⁾. NAP ve antibakteriyel duyarlılık testlerinin kalite kontrol işlemleri için standart *M.tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu kullanılmıştır.

Daha önce tiplendirmesi yapıp saklanan *M.tuberculosis* suşları yeni bir LJ besiyerine pasajlanmış, üç hafta içerisinde üreyen suşlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Middlebrook 7H10 agar besiyerinin hazırlanması:

Ticari olarak temin edilen (Difco Middlebrook 7H10 agar) toz haldeki besiyerinin 19 gramı bir cam balona aktarılmış, üzerine 5 ml gliserol ve 900 ml distile su eklenmiş, iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak steril edilmiştir. Besiyerinin 50-55°C'ye gelinceye kadar soğuması beklenmiştir. Soğuduktan sonra içerisine 100 ml OADC supplement (BBL Middlebrook OADC oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) eklenmiştir. İlaçsız besiyeri için maddeler balonda iyice karıştırıldıktan sonra steril vida kapaklı tüplere 5'er ml olacak şekilde eklenmiş ve eğik bir şekilde katlaşması için beklenmiştir. İlaçlı besiyeri için ise ilave olarak toz haldeki amikasin sülfat (Eczacıbaşı ilaç San. ve Tic. A.Ş. İstanbul, Türkiye) 4 μ g/ml olacak şekilde (1 litrelik besiyerine 4 mg) eklenmiştir. İlaçlı siprofloksasin besiyeri konsantrasyonu 2 μ g/ml olacak şekilde besiyerine siprofloksasin (Biofarma İlaç San. ve Tic. A.Ş. İstanbul, Türkiye) eklenerek aynı şekilde hazırlanmıştır. Besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

İnokülümün hazırlanması:

Saflık kontrolü yapılmış taze üremiş suşlardan öze ile alınan bakteriler içerisinde cam boncuk ve 5 ml steril % 0.9'luk serum fizyolojik bulunan steril tüpte iyice ezilip vortekslenmiştir. Tüp hareket ettirilmeden 30 dakika bekletilerek büyük partiküllerin ve besiyeri kalıntıların dip kısma çökmesi sağlanmıştır. Sonra üst kısımdan 1 ml yeni bir steril tüpe alınarak McFarland 1 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 10^{-2} ve 10^{-4} dilüsyonlar hazırlanmıştır.

İnokülasyon için aynı hasta suşunun 10^{-2} sulandırımı bir ilaçlı bir de ilaçsız besiyerine 100 μ l olacak şekilde insülin enjektörü ile inoküle edilmiştir. Aynı işlem 10^{-4} sulandırım için de yapılmıştır. Tüplerin içerisindeki inokülüm sıvısının

besiyeri yüzeyine iyice yayılması sağlanmış ve 37°C'de 2-3 hafta inkübasyona bırakılmıştır.

Değerlendirme: İlaçsız kontrol besiyerindeki koloni sayıları ile ilaçlı besiyerindeki koloni sayıları karşılaştırılmıştır. İlaçlı besiyerindeki üreme kontroldeki üremenin % 1 ve daha fazlası ise suş dirençli olarak kabul edilmiştir. Oran hesaplanırken “İlaçlı besiyerindeki koloni sayısı/İlaçsız besiyerindeki koloni sayısı x 100=% direnç” formülü kullanılmıştır. Kontrol besiyerindeki üreme 50-100 koloniden az ise ya da sayılamayacak kadar çok koloni varsa çalışma tekrarlanmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 91 izolattan 64'ü (% 70) erkek, 27'si (% 30) kadın olgulardan izole edilmiştir. Suşların 81'i balgamdan, 4'ü steril vücut sıvılarından, diğerleri çeşitli materyallerden üretilmiş, bu materyallerin 38'i Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalından, 37'si Verem Savaş Dispanserlerinden, 8'i Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanelerinden, diğerleri çeşitli birimlerden gönderilmiştir.

Çalışmaya alınan 91 *M.tuberculosis* suşunda antitüberküloz ilaçlara direnç tablosunda gösterilmiştir. Suşların

ikisinde (% 2.2) amikasin, birinde (% 1.1) siprofloksasin direnci saptanmıştır. Amikasin direnci saptanan suşlardan birinde yalnız INH direnci, diğerinde yalnız etambutol direnci belirlenmiş, suşların biri Sosyal Sigortalar Kurumundan gönderilen steril vücut sıvısından, diğeri Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalından gönderilen balgamdan izole edilmiştir. Siprofloksasin direnci saptanan suş primer ilaçların tümüne duyarlı bulunan ve proporsiyon çalışması tekrarlanınca da aynı sonuç alınan suştur ve Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalından gönderilen plevra sıvısından izole edilmiştir.

TARTIŞMA

Amikasin kanamisin A'dan elde edilen yarı sentetik bir türevidir. Amikasin *M.tuberculosis*'in direnç gösterme oranı % 5'in altında olarak bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda streptomisin ile amikasin veya kanamisin arasında çapraz direnç görülmezken, amikasin ve kanamisin arasında çapraz direnç bulunduğu bildirilmektedir⁽⁹⁾.

Kinolonlar bakteri DNA-giraz enzimini inhibe etmesi sonucu DNA'nın süpersarmal yapısının bozulması, replikasyonunun engellenmesi ile bakteri hücresinin ölümüne neden olmaktadır. Bu gruptan ofloksasin ve siprofloksasinin 2 µg/ml veya daha düşük yoğunluğu *M.tuberculosis*'e etki

Tablo: 91 *M.tuberculosis* suşunda antitüberküloz ilaçlara direnç.

Primer antitüberküloz ilaç direnci	n (%)	Amikasin (4 µg/ml) direnci	Siprofloksasin (2 µg/ml) direnci
Dört ilaca duyarlı	43 (47)	0	1
Tek ilaca direnç			
INH	14	1	0
RIF	3	0	0
STR	9	0	0
ETB	3	1	0
Toplam	29 (32)	2	0
İki ilaca direnç			
INH+RIF	2	0	0
RIF+ETB	1	0	0
INH+STR	4	0	0
INH+ETB	2	0	0
ETB+STR	1	0	0
Toplam	10 (11)	0	0
Üç ilaca direnç			
INH+RIF+STR	2	0	0
INH+RIF+ETB	5	0	0
Toplam	7 (8)	0	0
Dört ilaca direnç	2 (2)	0	0
Toplam dirençli suş	48 (53)	2 (2.2)	1 (1.1)
Herhangi bir INH direnci	31 (34)	0	0
Herhangi bir RIF direnci	15 (16)	0	0
Herhangi bir STR direnci	18 (20)	0	0
Herhangi bir ETB direnci	14 (15)	0	0

INH: isoniazid, RIF: rifampisin, STR: streptomisin, ETB: etambutol.

etmektedir. ilgili gende oluşan nokta mutasyonları sonucunda DNA-giraz enziminin A alt ünitesindeki değişiklik, bu ilaçlara direnç gelişimine neden olmaktadır^(1,19). Kinolonlar geniş spektrumu, iyi tolere edilmesi, üriner ve solunum sistemi infeksiyonları gibi yaygın bakteriyel infeksiyonlardaki tedavi başarıları nedeniyle son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanıma rağmen *M.tuberculosis* izolatlarında bu ilaca karşı direncin nadir olduğu bildirilmektedir. Siprofloksasine dirençli izolatların çoğunun ÇİDMT olduğu bildirilmektedir⁽⁶⁾. Kinolonların klasik tüberküloz tedavisinde yeri yoktur, ancak ÇİD basil ile infekte olgularda duyarlılık testi sonrası, mutlaka basilin duyarlı olduğu başka bir ilaçla birlikte uygulanması gerekmektedir^(1,18).

Siprofloksasine dirençli izolatların çoğunun ÇİDMT olduğunun bildirilmesine rağmen bizim dirençli tek suşumuz tüm primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı bulunan grupta yer almıştır.

ÇİDTB olgularının tedavisinde başarı şansı ile ilgili çok düşük oranlar gözlenmekle birlikte Tahaoğlu ve ark.⁽¹⁷⁾'larının izledikleri 158 olgu ile ilgili değerlendirmelerinde tedavi başarıları % 77 olarak bildirilmiştir. Doğrudan Gözetim Altında Tedavi Stratejisi (DOTS) uygulayan ülkeler; bu gibi olguların tedavisinde DOTS-Plus stratejileri planlamıştır ve antitüberküloz duyarlılık testleri DOTS-Plus tedavisinin en önemli kriteri olarak bildirilmektedir^(5,20).

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda amikasinin kritik konsantrasyonu proporsiyon yöntemi ile Middlebrook 7H10 agar besiyerinde 4 g/ml olarak belirlenmiştir^(13,14,18). Kruuner ve ark.⁽⁹⁾ Middlebrook 7H10 agar ile kanamisin ve amikasin MİK değerlerini araştırmışlar, MİK için 2 ile 256 µg/ml konsantrasyonlar hazırlamışlar ve sonuçta MİK > 4 µg/ml olan suşları dirençli olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada da amikasin konsantrasyonu 4 µg/ml olacak biçimde hazırlanmıştır.

Balabanova ve ark.⁽⁴⁾ Rusya Samara'da yapmış oldukları çalışmada 69 ÇİDTB izolatının ikinci kuşak antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarını araştırmış, amikasin direncini 5 (% 7.2) ve siprofloksasin direncini 3 (% 4.3) izolatta belirlemişlerdir.

Hindistan'da Muralidhar ve Srivastava⁽¹²⁾ 75 klinik izolatın primer antitüberküloz ilaçlara ve siprofloksasine duyarlılığını iki farklı proporsiyon metodu (LJ ve Middlebrook 7H11 agar) ve E test metodu ile karşılaştırmışlar, üç metodla 3 izolatta (% 4), LJ proporsiyon metodu ile 5 izolatta (% 6.7) direnç saptamışlardır.

ÇİDTB izolatlarına ofloksasin, levofloksasin ve norfloksasinin in-vitro etkisinin araştırıldığı bir çalışmada en yüksek MİK değeri norfloksasin için, en düşük MİK değeri ise levofloksasin için elde edilmiş, levofloksasine alternatif ilaç olarak ofloksasinin kullanılabilirliği belirtilmiştir⁽¹⁹⁾.

Avkan Oğuz ve ark.⁽³⁾ streptomisin için % 68.7, kanamisin

için % 9.3, kapreomisin için % 12.5; Tansel ve ark.⁽¹⁸⁾ ÇİDTB suşlarında amikasin için % 21, kapreomisin için % 52, siprofloksasin için % 16 direnç bildirmişlerdir.

Günden güne artan ve ciddi boyutlara ulaşan primer ilaçlara direnç, tedavi başarısızlıklarını oluşturmaktadır. Sekonder ilaçlar bu grup hastalara bir şans gibi görünse de tedavi sırasında sekonder ilaç direnci de gelişebilmektedir. Florokinolon duyarlılığı ile primer seçenek antitüberküloz ilaç duyarlılığı arasında bir ilişki bulunmamakla birlikte; bazı çalışmalarda ÇİDTB izolatlarında kinolon MİK değerlerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra florokinolonlar arası çapraz direnç bulunmaktadır. Kinolon direncini önlemek için bu grup ilaçların mutlaka primer ilaçlara direncin tespit edildiği durumlarda, başlangıç tedavisinin parçası olmaksızın ve duyarlılık testleri sonrası uygulanması vurgulanmaktadır.

ÇİDTB tedavisinde kullanılacak diğer ilaçlar ve kısaca etki mekanizmaları ve tercih edilme/edilmeme nedenlerine bakacak olursak; kapreomisin kanamisin ve amikasinle çapraz direnç gösterebilen peptid yapıları bir antibiyotiktir. Para-aminosalisilik asit folat biyosentezindeki p-aminobenzoik aside (PABA) yapıca benzerliği yüzünden onun kompetitif inhibitördür ve bakteriyostatiktir. 2 yaş altı çocuklarda ETB yerine uygulanırsa da primer direnç yüksek olduğundan ve güç tolere edildiğinden tercih edilmemektedir. İNH'in yapısal bir analogu olan etionamid mikolik asit sentezini engelleyerek etki göstermektedir. Sikloserin, alanin reseması bloke ederek bakteri duvarı peptidoglikanına D-alanin girişini engelleyip hücre duvarı sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Klofazimin bakteri DNA'sına bağlanıp transkripsiyonuna engel olarak etki göstermektedir. Öncelikle lepra tedavisinde uygulanmakta, ancak çoğul dirençli TB tedavisinde de son çare olarak denmektedir. Bir rifamisin türevi olan rifabutin, CD4 sayımı düşük olan hastalarda *M.avium* kompleksi infeksiyonlarına karşı profilaksiste endikedir. Ayrıca, tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonlarında da kullanılmaktadır. RİF dirençli olguların % 25'inin rifabutin duyarlılığı göstermesi RİF dirençli hastaların tedavisinde yeni bir avantaj oluşturmaktadır.

İzolatlarımızın % 53'ü bir ya da birden fazla ilaca dirençli suşlar, % 12'si ÇİD olan suşlardan oluşmasına rağmen, ÇİD olan izolatlarımızın tümü amikasin ve siprofloksasine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Bölgemizde bu iki antibiyotige direnç ülkemizdeki diğer araştırmacıların sonuçlarından düşük olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız *M.tuberculosis* izolatlarının tümünde (duyarlı ve dirençli) amikasin ve siprofloksasin direncinin düşük olması ve ÇİD olan izolatlarımızın tümünün bu iki ilaca duyarlı olmaları bölgemiz açısından avantaj getiren bir özellik olarak değerlendirilmiştir.

Ülkeler ve hatta bölgeler arası farklı direnç paternlerinin saptanabilmesi nedeniyle, her ülkenin kendi direnç özellikleri

ışığında tedavi protokollerini belirlemesi ve zaman zaman gözden geçirerek güncel epidemiyolojik verilerle bu protokollerini yenilemesi, tüberküloz tanısı, takip ve tedavisinde görev alan kurum ve hekimlerin işbirliği ve iletişim kurması gerekmektedir. Bunun yanı sıra ÇİDTB tedavisinde sekonder ilaç direncinin bilinmesinin bu hastaların tedavi protokollerinin planlanması, DOTS-Plus stratejisi uygulaması ve tedavi başarısının artırılması için zorunlu olduğu inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Akcalı S, Surucuoglu S, Cicek C, Ozbakkaloglu B: In vitro activity of ciprofloxacin, ofloxacin and levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *Ann Saudi Med* 2005;25(5):409-12.
2. Aslan G, Delialioğlu N, Emekdaş G et al: *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının isoniazid, rifampisin, streptomisin ve etambutol duyarlılıklarının BACTEC yöntemi ile belirlenmesi, *ANKEM Derg* 2005;19(1):43-7.
3. Avkan Oğuz V, Akbal H, Sarıbaş S, Karagöz T, Öztürk R: Edinsel çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının major ve sekonder antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı, *İnfeksiyon Derg* 2000;14(3):383-6.
4. Balabanova Y, Ruddy M, Hubb J et al: Multidrug-resistant tuberculosis in Russia: clinical characteristics, analysis of second-line drug resistance and development of standardized therapy, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24(2):136-9.
5. Bastian I, Rigouts L, Van Deun A, Portaels F: Directly observed treatment, short-course strategy and multidrug-resistant tuberculosis: are any modifications required? *Bull World Health Organ* 2000;78(2):238-51.
6. Bozeman L, Burman W, Metchock B, Welch L, Weiner M, Tuberculosis Trials Consortium: Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada, *Clin Infect Dis* 2005;40(3):386-91.
7. CDC: Initial therapy for tuberculosis era of multiagent resistance: recommendations of Advisory Council for the elimination of tuberculosis, *MMWR* 1993;42(R-7):001.
8. Çiçek Saydam C, Çavuşoğlu C, Burhanoğlu D, Bardak FZ, Bilgiç A: Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* strains to first-line and second-line antituberculosis drugs in Ege University Hospital, *Türk J Med Sci* 2001;31(5):395-400.
9. Kruuner A, Jureen P, Levina K, Ghebremichael S, Hoffner S: Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(9):2971-3.
10. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM: Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3192-7.
11. Mirsaedi SM, Tabarsi P, Khoshnood K et al: Treatment of multiple drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Iran, *Int J Infect Dis* 2005;9(6):317-22.
12. Muralidhar S, Srivastava L: Evaluation of three methods to determine the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*, *Indian J Med Res* 2004;120(5):463-7.
13. Parsons LM, Somoskovi A, Urbanczik R, Salfinger M: Laboratory diagnostic aspects of drug resistant tuberculosis, *Front Biosci* 2004;1(9):2086-105.
14. 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(10):3179-86.
15. Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE: Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs, *J Clin Microbiol* 1999;37(1):45-8.
16. Siddiqi SH: BACTEC 460 TB System Product and Procedure Manual, Becton Dickinson and Company, Sparks, Md. (1995).
17. Tahaoglu K, Torun T, Sevim T et al: The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey, *N Engl J Med* 2001;345(3):170-4.
18. Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F: Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının sekonder antitüberküloz ilaçlara duyarlılık sonuçları, *İnfeksiyon Derg* 2003;17(3):307-11.
19. Uzun M, Şatana D, Dere S: In vitro activities of ofloxacin, levofloxacin and norfloxacin against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004;34(3):171-4.
20. World Health Organization: Guidelines for establish DOTS-Plus pilot projects for management of multidrug resistance tuberculosis, WHO/CDC/TB/2000.279, WHO, Geneva (2000).
21. World Health Organization: Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing, WHO/HTM/TB/2006.362, WHO, Geneva (2006).