

Mikobakteriyoloji Laboratuvarında İzole Edilen Mycobacterium Tuberculosis Kompleks Suşlarının Agar Orantılama Yöntemi ile Duyarlılıklarının Araştırılması

Investigation of Drug Susceptibility of Mycobacterium Tuberculosis Complex Strains Isolated from Mycobacteriology Laboratory by Agar Proportion

Yasemin Ay Altıntop

Specialist, M.D.
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Erciyes University Medical Faculty
yaltintop@erciyes.edu.tr

Duygu Perçin

Assoc. Prof., M.D.
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Erciyes University Medical Faculty
duygu.percin@hotmail.com

Özet

Amaç: Mycobacterium tuberculosis güncel tanı ve tedavisine rağmen hala önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Hastaların tedaviye uyumsuzluğu ve etkili olmayan ilaç kombinasyonları giderek artan ilaç direncine yol açmaktadır. Bu çalışmada Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarının Kayseri bölgesindeki ilaç direnç kalıbının gösterilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Mayıs 2005 ile Temmuz 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'ne başvuran tüberküloz ön tanılı hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 33 Mycobacterium tuberculosis kompleks suşu çalışmaya alındı. Duyarlılık, agar orantılama yöntemiyle çalışıldı.

Bulgular: Toplam 33 suşun ikisinde (% 6) izoniazid ve rifampisine birlikte direnç bulundu. Streptomisin ve etambutole dirençli suş bulunmadı. Bulunan direnç primer çok ilaca direnç olarak kabul edildi.

Sonuç: Bu çalışmada bulunan direnç oranı, Kayseri bölgemizde agar orantılama yöntemiyle daha önce yapılan çalışmalardan düşük bulunmuştur. Ancak çok ilaca dirençli suş oranı fazladır. Daha fazla sayıda suşun dahil edildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır. Primer direnç oranının yüksek olması tüberküloz kontrol önlemlerinin ivedilikle gözden geçirilmesini gerektirmektedir.

Anahtar Kelimeler: **İlaç direnci; Mycobacterium tuberculosis.**

Abstract

Purpose: In spite of current diagnosis and treatment, Mycobacterium tuberculosis is still an important cause of mortality and morbidity. Ineffective drug combinations and patient incomppliance lead to increasing drug resistance. This study was carried out to determine the susceptibility patterns of Mycobacterium tuberculosis complex strains in Kayseri region.

Material and Methods: A total of 33 Mycobacterium tuberculosis complex strains, isolated from the pre-diagnosed tuberculosis patients' clinical samples who had applied to the Hospitals of University of Erciyes Medical Faculty from May 2005 to July 2006, were studied. Susceptibility was tested by the agar proportion method.

Results: Two of all of 33 isolates were both resistant to isoniazide and rifampicin. There were no resistance against streptomycin and ethambutol. These resistances were considered as primary multi-drug resistance.

Conclusion: The resistance rate found in this study by the agar proportion was lower than the previous studies performed in Kayseri region. However, multi-drug resistance rate was higher. Multi-centre studies with larger numbers of Mycobacterium tuberculosis strains are necessary. The control precautions of tuberculosis should be immediately revised due to high primary resistance rates.

Key Words: **Drug Resistance; Mycobacterium tuberculosis.**

This research was supported by Erciyes University Research Found

Submitted : March 05, 2008
Revised : September 11, 2008
Accepted : July 01, 2009

Corresponding Author:

Doç. Dr. Duygu Perçin,
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Faculty of Medicine, University of Erciyes
38039 Kayseri - Turkey

Telephone: +90- 352 4374937 - 23383
E- mail: duygu.percin@hotmail.com

Giriş

Tüberküloz başta akciğer olmak üzere tüm organ ve sistemleri tutabilen, tanımlanmış tedavisi olmasına rağmen uygun tedavi edilmediğinde hayatı tehdit eden sekellerle sonuçlanabilen bir hastalıktır. Günümüzde dünya nüfusunun 1/3'ünün tüberküloz basili ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. Basili taşıyan kişilerin 30 milyonu aktif tüberküloz hastası olup, hastalık her yıl yaklaşık 3 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır (1). Ölüm ve hastalığın görülme oranının artışı erken tanı koymada gecikme, etkili tedavinin planlanması ve uygulanmasında başarısızlıktan kaynaklanmaktadır.

Hastalıkları Kontrol ve Önleme merkezi (Centers for Diseases Control and Prevention, CDC), kültüründe *M.tuberculosis* kompleks izole edilen, üç aylık tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden ve tedaviye klinik yanıt olmayan bütün hastalara duyarlılık testi yapılmasını önermektedir (2). Duyarlılık yöntemleri arasında agar orantılama yöntemi, Klinik Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards of Institue, CLSI) tarafından referans yöntem olarak kabul edilip uygulanması tavsiye edilmiştir (3). Bu çalışmada; *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının tüberküloz tedavisinin dört temel ilacı olan Streptomisin (STR), Etambütol (ETM), İzonyazid (İNH) ve Rifampisine (RİF) karşı duyarlılığının agar orantılama yöntemiyle belirlenmesi ve Kayseri bölgesindeki *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının duyarlılık kalıbının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Mayıs 2005 ile Temmuz 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'ne başvuran tüberküloz ön tanı hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 33 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşu çalışmaya alındı (Tablo I).

Tablo I. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının izole edildiği klinik örnekler (n:33)

Örnek	Sayı	%
Balgam	8	24,3
BAL	5	15,1
Plevral mayi	4	12,1
BOS	6	18,1
Apse	3	9,1
Doku	3	9,1
İdrar	2	6,1
Periton mayi	1	3,05
Batın içi mayi	1	3,05
Toplam	33	100

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nden Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen mikobakteriler klasik yöntemlere ek olarak NAP (P-Nitro-alfa- acetylamino-beta-hydroxypropiofenone) testi yapılarak *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak tanımlandı. Bakterilerin duyarlılığı CLSI M24-A standardında altın standart olarak kabul edilen agar orantılama yöntemiyle çalışıldı.

Üreticilerin tavsiyelerine uygun miktarda Middlebrook (M) 7H10 (GBL Rosmedia) besiyeri ve distile su konmuş halde otoklavlanan 200 mL'lik altı agar besiyerine 20'şer mL zenginleştirici Oleik asit, Albumin, Dekstroz, Katalaz (OADC) (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Sparks, MD) eklendi. Devamında bir balon ayrılarak geride kalan beş besi yerine İNH için son konsantrasyonları 0,2 µg/mL ve 1,0 µg/mL, STR için 2,0 µg/mL, ETM için 5,0 µg/mL ve RİF için 1,0 µg/mL olacak miktarda antitüberküloz ilaç eklendi (Tablo II). Ayrılan balondaki besi yeri üreme ve kontaminasyon kontrolü için kullanıldı. Toz şeklindeki antibiyotikler Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edildi.

Katı besiyerinde üremiş ortalama 2 haftalık koloniler kazınarak M 7H9 sıvı besiyerinde emulsifiye edildi. Sıvı besiyeri eklenerek süspansiyonun bulanıklığı MacFarland no 1'e ayarlanıp (yaklaşık 10⁷ CFU/mL) steril distile suyla bu süspansiyonun 10⁻² (1/100) ve 10⁻⁴ (1/10.000) dilüsyonları hazırlandı. Bu dilüsyonlar iki set besi yerine 0,1'er mL inokule edildi. Her bir petri plağı ayrı bir CO₂ geçirgen polietilen torbaya sarılıp % 5-10 CO₂'li ortamda 3 hafta süreyle inkübe edildi. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edildi. Üç haftadan önce kontrol bölmesinde 50 koloni üzerinde üreme (+1 veya daha fazla) görülünce test değerlendirildi ve dirençli sonuçlar kaydedildi. Fakat duyarlı sonuçları kaydetmek için üç hafta beklendi. İlaç içeren besi yerindeki üreme oranı kontrol besi yerindeki üremenin % 1'ine eşit veya daha büyük ise sonucu dirençli; % 1'inden az ise duyarlı olarak yorumlandı.

Bulgular

Agar orantılama yöntemine göre suşların duyarlılık ve direnç durumu Tablo III'de gösterilmiştir. Buna göre suşlar arasında STR'e ve ETM'e direnç bulunmazken İNH'a ve RİF'e aynı anda dirençli iki suş bulunmuştur.

Tablo II. Middlebrook 7H10 besiyerine eklenen ilaçların stok ve çalışma konsantrasyonları.

İlaç	Çözücü	Stok konsantrasyon (µg/mL)	7H10 agar için çalışma konsantrasyonu (µg/mL)	200 mL 7H10 agara çalışma konsantrasyonundan eklenen miktar (mL)	7H10 agarda ilacın son konsantrasyonu (µg/mL)
İNH	SDS	10.000	200	0,2 1,0	0,2 (KK) 1,0
ETM	SDS	10.000	1.000	1,0	5,0 (KK)
RİF	MET	10.000	1.000	0,2	1,0 (KK)
STR	SDS	10.000	1.000	0,4	2,0 (KK)

SDS: Steril distile su, MET: Metanol, KK: Kritik konsantrasyon, İNH:İzoniazid, ETM:etambütol, RİF: Rifampisin, STR:Streptomisin

Tablo III. Agar orantılama yöntemine göre suşların duyarlılık ve direnç durumu

Agar Orantılama	Duyarlı	Dirençli	Direnç %
Streptomisin	33	0	0
İzoniyazid	31	2	6
Rifampisin	31	2	6
Etambütol	33	0	0

Standart yöntemle dirençli bulunan suşların özellikleri Tablo IV’de gösterilmiştir. Suşların retrospektif irdelenmesinde hastaların ilk kez tanı aldığı ve örnek alındığı sırada antitüberküloz tedavi almadığı bilgisine ulaşılmıştır.

Tablo IV. Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının özellikleri.

Suş no	Örnek		
30	Balgam	STR	Duyarlı
32	Doku (Akciğer)	R	Dirençli
33	Batın içi mayi	R	Dirençli

İNH:İzoniazid, ETM:etambütol, RİF: Rifampisin, STR:Streptomisin

Tartışma

Tüberküloz, tanı ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen sadece gelişmekte olan değil gelişmiş ülkelerde de çözülmesi gereken bir halk sağlığı sorunudur. Çözümün ilk aşaması tanının hızlı ve doğru konmasıyla tedavinin ivedilikle başlanmasıdır. Böylece en büyük bulaş kaynağı olan tanı almamış, çevreye basil saçan infekte bireyler daha çabuk kontrol altına alınmış olur. Çözümün ikinci aşaması ise verilen tedavinin uygunluğuna karar verilmesi

ve direnç gelişimine neden olunmaması için hasta ve kültür odaklı duyarlılık çalışmaları yaparak infeksiyonu sınırlandırmak ve sonrasında yok etmeyi amaçlamalıdır.

Mikobakteriyoloji laboratuvarına gelen örneğin sayısından çok niteliği, istek kağıdında beraberinde ilaç kullanılıp kullanılmadığı bilgisini içermesi önemlidir. Baylan ve arkadaşları (4) beş yıl içinde gönderilen örnek sayısında her yıl artış olmasına rağmen üreme oranlarında artış olmadığını bulmuşlardır. Klinik örneğin akciğer ya da akciğer dışı vücut bölgelerinden alınmış olması üreyecek etken ve direnci öngörmek açısından faydalı olabilir. Bu çalışmada klinik örneklerin yaklaşık % 60’ı akciğer (balgam, BAL, plevral mayi, doku) kaynaklıdır. Çalışmaya alınan suşlar *M. tuberculosis* kompleks olarak tanımlananlar olduğu için örneklerin çoğunun akciğer kaynaklı olması aslında klinik olarak da daha çok akciğer tüberkülozu ile karşılaştığımız gerçeğini doğrulamaktadır. Daha çok *M. tuberculosis* kompleks dışı mikobakterilerin etken olduğu genitoüriner sistem tüberkülozunun göstergesi olan idrar örneğinin oranı ise % 6’dır.

Duyarlılık yöntemleri arasında agar orantılama yöntemi CLSI tarafından referans yöntem olarak kabul edilip uygulanması tavsiye edilmiştir (3). Bu yöntemi uygularken Löwenstein Jensen (LJ), M 7H10 ya da 7H11 besi yerleri kullanılabilir. LJ besi yeri katılaştırılması sırasında uygulanan yüksek ısı ve besi yerinin bol protein içeriği nedeniyle antitüberküloz ilaçların inaktive olmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle ilaç konsantrasyonu ve etkinliği açısından agar orantılama yönteminde LJ besi yerinin kullanılması önerilmemektedir (5). Middlebrook besiyeri ilaç konsantrasyonunun standardizasyonu açısından daha kolay kullanılabilir. Değerlendirme yaparken de şeffaf olduğu için mikrokoloniler daha çabuk görünür hale gelir. Bu çalışmada da M 7H10 besiyeri kullanılmıştır.

Çalışmada antitüberküloz ilaçlara direnç İNH ve RİF için % 6 olarak bulunmuşken STR ve ETM'ye direnç bulunmamıştır. Özellikle antitüberküloz ilaç direnci bulunan klinik örneklerin hastalarının, önceden tüberküloz tanısı almamış yeni hastalar olduğu öğrenildi. Böylece İNH ve RİF için çalışmamızda bulunan % 6'lık direnç 'primer direnç' olarak yorumlandı. Çok ilaca direnç, en az izoniazid ve rifampisine birlikte olmak üzere daha fazla antitüberküloz ilaca dirençli suş olarak tanımlanır. Öyleyse bu izolatlar da çok ilaca dirençli suşlardır.

Bölgemizde önceki yıllarda yapılan duyarlılık çalışmalarında STR, İNH, RİF ve ETM direnç oranları sırasıyla % 6,5-37,6, % 25,8, % 22,6-26,3 ve % 4,4-6,5 (6, 7) arasında bulunmuştur. Bu çalışmalarda direncin çalışmamızdakinden fazla olması, örneklerle göğüs hastalıkları hastanesi ve verem savaş dispanserinden gelen, önceden tanı almış ve tedavide sorunu olan dirençli suşların da katılması sonucudur.

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarına 1999-2002 yılları arasında yedi bölge tüberküloz laboratuvarlarından gönderilen toplam 505 *M. tuberculosis* kompleks suşunun duyarlılıkları LJ orantılama yöntemiyle çalışılmıştır. İlk sıra antitüberküloz ilaçlara sırasıyla STR, İNH, RİF, ETM için % 9,1, % 13,2, % 13,2 ve % 3,3 direnç oranlarını bulmuşlardır (8). Yapılan çalışmalar, Türkiye'de tüberküloz kökenlerine yüksek oranda çoklu direnç olduğunu göstermektedir. Bu durum, tüberküloz olgularında direncin araştırılması ve tedavinin alınacak sonuca göre yönlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Primer ilaç direncinin %5 ve daha düşük olduğu ülkelerde iyi bir ulusal tüberküloz kontrol programının uygulandığı söylenebilir, ancak %15 ve daha fazla primer ilaç direnci varlığı ile uygulanan programın başarılı olmadığını ve yeni bir kontrol programının uygulanması gerektiğini göstermektedir (9).

Bu sonuçlara göre suş sayısı az olsa da İNH ve RİF için standart yöntemi kullanarak bulduğumuz oran ülke genelinde bulunan dirençle uyumludur. STR ve ETM'de ise direnç bulamamamız, kısıtlı popülasyonda çalışmamız ve özellikle ETM için görülen direncin zaten az olmasından kaynaklanabilir.

Agar orantılama yöntemi duyarlılık çalışılan her mikobakteriyoloji laboratuvarı personelinin bilmesi gereken bir yöntemdir. Uzun zaman alması ve uğraştırıcı olmasına rağmen güvenilir ve standart sonuç vermektedir. Bu nedenle rutin laboratuvar testi olarak kullanılması çok örnek çalışan laboratuvarlar için uygun değildir. Daha çok araştırma amaçlı ve yeni, sıvı bazlı, hızlı duyarlılık sistemlerinin doğrulamasında kullanılmalıdır.

Sonuç olarak bölgemizdeki ilaç direnç oranının belirlenmesi için daha geniş katımlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Erciyes Üniversitesi Hastanelerine daha çok ilk tanı alan hastalar başvurduğu için direnç oranı düşük bulunmuştur. Ancak primer direnç oranının bu hastalarda yüksek olması tüberküloz kontrol önlemlerinin ivedilikle gözden geçirilmesini gerektirmektedir.

Kaynaklar

1. [No authors listed] From World Health Organisation. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. World Health Organisation 2005: 1-255.*

2.[No authors listed] From the Centers for Disease Control and Prevention. *Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. JAMA 1993; 270:694-698.*

3. CLSI. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard. CLSI document M24-A [ISBN 1-56238-500-3]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.*

4. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, ve ark. *Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTC) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. Gülhane Tıp Dergisi 2003; 45: 256-262.*

5. Kent PT, Kubica GP. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. CDC, Atlanta, 1985; 71-120.*

6. Özcan M, Demir R, Gülmez İ, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis suşlarının bazı antitüberkülotiklere in-vitro rezistans durumu. Erciyes Tıp Dergisi, 1994; 16: 162-166.*

7. Özcan M, Koç AN, Yıldırım MS, ve ark. *Hızlı sonuç veren BACTEC TB sistemle Mycobacterium tuberculosis suşlarının antitüberkülotiklere karşı in vitro direnç durumunun değerlendirilmesi. Erciyes Tıp Dergisi, 1994; 16: 352-354.*

8. Saygan MB, Ocak F, Ceyhan İ, ve ark. *Bölge tüberküloz laboratuvarlarından gönderilen Mycobacterium tuberculosis suşlarının major antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları, Refik Saydam Hfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Sıhhiye, Ankara Mikrobiyoloji Bülteni 2007; 41: 403-9.*

9. Kocabaş A. *Akciğer tüberkülozu. In: Topçu-Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002: 538-599.*