

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının Birinci ve İkinci Seçenek Anti-Tüberküloz İlaçlara Karşı Duyarlılığın Sensititre MycoTB Plate Yöntemi ile Araştırılması*

Investigation of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Isolated from Clinical Samples Against the First and Second-Line Anti-tuberculosis Drugs by the Sensititre MycoTB Plate Method**

Figen KAYSERİLİ ORHAN¹, Ayşe Esin AKTAŞ², Nimet YİĞİT¹

¹ Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Erzurum, Türkiye

² Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

* Bu çalışma XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

** This work was presented as a poster in XXXVII Turkish Microbiology Congress.

ÖZET

Giriş: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC)'in ikinci seçenek ilaç duyarlılık testi için fenotipik yöntemler henüz standardize edilmiştir. Sensititre MycoTB Plate yöntemi liyofilize antibiyotikler içeren kuyucuklara sahip plaklardan oluşur ve birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi için geliştirilen bir yöntemdir. Bu çalışmanın amacı, hasta örneklerinden izole edilen MTC kökenlerinin birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesidir.

Materyal ve Metod: Çalışmaya değişik klinik örneklerden izole edilen 50 MTC kökeni dahil edilmiştir. Elli kökenin 38 (%76.0)'i balgam, 3 (%6)'ü beyin omurilik sıvısı, 3 (%6)'ü bronkoalveoler lavaj ve 6 (%12.0)'sı diğer klinik örneklerden izole edilmiştir. Bu kökenlerin antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığı Sensititre MycoTB Plate yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların alt kültüründen süspansiyonlar hazırlanarak MycoTB plak çukurlarına ekilmiş ve sonuçlar 7, 14 ve 21. günlerde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonunda 50 MTC izolatının 7 (%14)'si izoniazide, 5 (%10)'i streptomisine, 4 (%8)'ü etambutole, 4 (%8)'ü etionamide, 3 (%6)'ü rifampisine, 3 (%6)'ü rifabutine, 2 (%4)'si kanamisine, 2 (%4)'si ofloksasine, 2 (%4)'si P-aminosalisilik aside, 1 (%2)'i moksifloksasine ve 1 (%2)'i sikloserine dirençli bulunmuştur. Tüm kökenler amikasinine duyarlı bulunurken, 2 (%4) köken çoklu ilaç direnci (ÇİD) gösteren MTC olarak belirlenmiştir. Otuz beş (%70) köken tüm ilaçlara duyarlı bulunmuştur. Yaygın ilaç direnci (YİD) gösteren MTC kökeni bu çalışmada belirlenmemiştir.

Sonuç: Bu çalışma bölgemizde ikinci seçenek antitüberküloz ilaçların test edildiği ilk çalışma olup MTC izolatlarının ÇİD ve YİD oranları hakkında bize değerli bilgiler sağlamıştır. Sensititre MycoTB Plate yöntemi hızlı, güvenilir ve pratik bir yöntemdir ve birinci ve ikinci seçenek antitüberküloz ilaçların duyarlılığını belirlemede kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: ÇİD-TB; YİD-TB; *Mycobacterium tuberculosis* kompleks; Sensititre MycoTB Plate

SUMMARY

Investigation of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Isolated from Clinical Samples Against the First and Second-Line Anti-tuberculosis Drugs by the Sensititre MycoTB Plate Method

Figen KAYSERİLİ ORHAN¹, Ayşe Esin AKTAŞ², Nimet YİĞİT¹

¹ School of Health Service, University of Ataturk, Erzurum, Turkey

² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Yıldırım Beyazıt, Ankara, Turkey

Introduction: Phenotypic methods for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) to second-line drugs are not yet standardized. The Sensititre MycoTB Plate is a microtiter plate containing lyophilized antibiotics and configured for determination of MIC to first and second-line anti-tuberculosis drugs. The purpose of this study is to detect the susceptibility rates of MTC strains isolated from patients' specimens for first and second-line anti-tuberculosis drugs.

Materials and Methods: This study included 50 MTC strains isolated from various clinical specimens. Out of the 50 strains, 38 were isolated from sputum, three from cerebrospinal fluid, three from bronchoalveolar lavage, and six from other samples in this study. The susceptibility of strains to anti-tuberculosis drugs were determined by the Sensititre MycoTB Plate Method. Thawed isolates were subcultured, and dilutions were inoculated into MycoTB wells. The results were read at days 7, 14 and 21.

Results: At the end of study, out of 50 MTC isolates, 7 (14%) showed resistance to Isoniazid (INH), 5 (10%) to streptomycin (SM), 4 (8%) to ethambutol (EMB), 4 (8%) to ethionamide (ETH), 3 (6%) to rifampicin (RIF), 3 (6%) to rifabutin (RFB), 2 (4%) to kanamycin (KAN), 2 (4%) to ofloxacin (OFL), 2 (4%) to P-aminosalicylic acid (PAS), 1 (2%) to moxifloxacin (MOX), and 1 (2%) to cycloserine (CYC). All strains were found sensitive to amikacin while 2 strains (4%) were identified as multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Thirty-five strains (70%) were sensitive to all drugs. Extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) was not determined in this study.

Conclusion: This is the first study that tests second line anti-tuberculosis drugs in our location and provides us valuable data regarding MDR-TB and XDR-TB rates. The Sensititre MycoTB Plate Method is a fast, reliable and practical method and can be used to determine the susceptibility of first and second-line anti-tuberculosis drugs.

Key Words: MDR-TB; XDR-TB; *Mycobacterium tuberculosis* complex; Sensititre MycoTB Plate

GİRİŞ

2015 küresel tüberküloz raporuna göre; tüberküloz (TB) artık, tüm dünyada infeksiyon hastalıkları arasında en fazla ölüm nedeni olan insan immünyetmezlik virüsü (HIV)'nin yanında yer almaktadır. Yine bu rapora göre 2014 yılında dünya çapında, 9.6 milyon kişinin TB hastası olduğu tahmin edilmektedir. Küresel olarak; yeni olguların %3.3'ü, önceden tedavi görmüş olguların %20'si çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olgusudur^[1]. Anti-TB ilaçların uzun yıllardan beri var olması ve etkili bir şekilde tedavi edilebiliyor olmasına rağmen TB'nin tüm dünyayı tehdit eden bir sağlık sorunu olmasının en önemli nedeni bu ilaçlara karşı gelişen dirençtir. Dirençli olgularının artışının en önemli nedeni ise yanlış ve yetersiz tedavi uygulamalarıdır^[2].

Sayıları giderek artan dirençli olgular nedeniyle ilaç duyarlılık testleri günümüzde daha da önem kazanmıştır. İlaç duyarlılığını belirlemek için kullanılan laboratuvar yöntemleri ve bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. İkinci basamak ilaçların duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanımı kolay, hızlı ve ucuz duyarlılık testlerinin geliştirilmesi dünya çapında acil öncelik haline gelmiştir^[3].

Günümüzde; ÇİD-TB izolatlarında ikinci basamak anti-TB ilaç direncini saptamaya yönelik değişik yöntemler uygulanmasına karşın standardize ve hızlı bir yöntem henüz mevcut değildir^[4]. Anti-TB ilaç duyarlılık testinde altın standart agar proporsiyon yöntemidir. Ancak bu yöntemin uzun sürede sonuç vermesi, hastaların uygun tedaviye başlamalarında gecikmelere yol açmaktadır. Sensititre MycoTB Plate yöntemi birinci ve ikinci seçenek ilaç grubundan toplam 12 anti-TB ilacı aynı

anda yaklaşık 10 gün içerisinde test edebilmekte ve klinisyene erken dönemde tedavi seçeneği sunmaktadır^[4,5].

ÇİD-TB tedavisinde standart protokollerinin oluşturulabilmesi için ulusal ve bölgesel ölçekli direnç profilini belirleyecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır^[6].

Bu çalışmada laboratuvarımızda izole edilen 50 MTC izolatının henüz yeni bir sistem olan mikrodilüsyon temelli Sensititre MycoTB Plate yöntemi ile birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara karşı duyarlılığının test edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Klinik Örnekler

2010-2015 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tüberküloz Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen her biri farklı hastaya ait 50 MTC kökeni çalışma kapsamına alındı. H37Rv (ATCC 27294) kontrol kökeni olarak çalışmaya dahil edildi. Laboratuvarımızda izole edildikten sonra, stok besiyerinde -80°C'de saklanan 50 izolat buzdolabında +4°C'de çözülürüldükten sonra LJ besiyerlerine iki adet ekim yapılarak 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. MTC'yi tanımlamak için MTBc identifikasyon test kiti (BD MGIT) kullanıldı ve üretici firmanın çalışma prosedürü uygulandı.

MycoTB Yöntemi

OADC (oleik-asit-albumin-dekstroz-katalaz) ilaveli 7H9 besiyeri (+4°C'de saklanan) oda ısısına getirildi. Çalışma kapsamına alınan her bir köken için LJ besiyerinde üretilen en fazla beş haftalık saf koloniler, besiyeri üzerinden steril plastik öze ile kazanarak %0.2 tween ve cam boncuk içeren tüplere aktarıldı ve nefelometre yardımı ile 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Steril pipet ucu kullanılarak örnekten 100 µL alınıp, 11 mL 7H9\OADC içeren tüpe ilave edildi. Böylece 1 x 10⁵'lik inokulum hazırlandı. Tüp yaklaşık 20 saniye yavaşça vorteksledi. Daha sonra bu inokulum MycoTB (TREK Diagnostic System) plaklarının her bir kuyucuğuna 100 µL pipetlendi ve üzeri yapışkan film ile sıkıca kaplandı. Daha sonra plaklar kilitli şeffaf poşetlere konularak 37°C'de inkübasyona bırakıldı^[5,7].

Sterilite ve Saflık Kontrolü

Sterilite ve saflık kontrolü için, plaklara inoküle edilmek üzere hazırlanan örnekten 50 µL alınıp doğrudan koyun kanlı agar ve 7H10 agara birer adet ekim yapıldı. Plakların ağız parafilm ile sarılarak 37°C'lik etüvde bekletildi. 0.5 McFarland ayarının doğruluğunu test etmek için koloni sayımı yapıldı. Bunun için 1/1 ve 1/50'lik dilüsyonlar hazırlandı. 1/1'lik dilüsyon için ekim yapılmış plakların pozitif kontrol kuyucuğundan (H12) 1 µL alınıp direkt 7H10 agara, 1/50'lik dilüsyon için ise yine H12 kuyucuğundan 1 µL alınıp 50 µL steril saf su içeren tüpe ilave edildi ve buradan 1 µL alınarak 7H10 besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de sekiz hafta inkübasyona bırakıldı^[5,7,8].

Plakların Değerlendirilmesi

Plaklar 7, 14 ve 21. günlerde manuel olarak ayna yardımıyla okundu. Anti-TB ilaç içermeyen pozitif kontrol kuyucuklarında üç hafta içinde üreme olmayan plaklar çalışmaya dahil edilmedi. Bulanık ya da dibinde çökelti bulunan kuyucuklar üreme yönünden pozitif değerlendirildi. Her bir suş için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri üreme olmayan ilk kuyucuk konsantrasyon değeri olarak kaydedildi^[5,7]. Sonuçlar daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen MİK sonuçlarına göre değerlendirildi (Tablo 1)^[9-11].

BULGULAR

Sterilite kontrolü için kanlı agara ekilen MTC izolatlarından yalnızca birinde 24 saat sonra kontaminasyon görüldü ve bu izolat çalışmaya dahil edilmeyip başka bir izolatla çalışma tekrarlandı. Saflık kontrolü için 7H10 besiyerine yapılan ekimler 14. ve 21. günlerde kontrol edildi ve farklı tipte kolonilere rastlanmadı. Koloni sayımı için 1/1 dilüsyonda 7H10 besiyerine yapılan ekimlerde 50-100 arasında koloni sayıldı ve bu değer istenilen aralıktaydı.

Çalışmamızda plaklardan sadece birinde pozitif kontrolde üçüncü haftaya kadar üreme olmadı ve bu plak çalışmaya dahil edilmeyip başka bir izolat çalışmaya dahil edildi. Diğer tüm plakların H11 ve H12 pozitif kontrol kuyucuklarında yedinci günde hafif 14. günde belirgin üremeler görüldü. Antibiyotik içeren kuyucukların bazılarında yedinci günde hafif üreme kaydedildi ancak 14 ve 21. günlerdeki sonuçlar dikkate alındı. Ayrıca iki

Tablo 1. Kullanılan antibiyotiklerin kritik konsantrasyonları

| İlaç | MİK (µg/mL) | İlaç | MİK (µg/mL) |
|----------------|----------------|-----------------------|------------------|
| Ofloksasin | ≤ 2.0 > 2.0 | P-aminosalisilik asid | ≤ 2.0 > 2.0 |
| Moksifloksasin | ≤ 2.0 > 2.0 | Etionamid | ≤ 5.0 > 5.0 |
| Rifampin | ≤ 1.0 > 1.0 | Sikloserin | ≤ 32.0 > 32.0 |
| Amikasin | ≤ 4.0 > 4.0 | İsoniazid | ≤ 0.25 > 0.25 |
| Streptomisin | ≤ 2.0 > 2.0 | Kanamisin | ≤ 5.0 > 5.0 |
| Rifabutin | ≤ 0.5 > 0.5 | Etambutol | ≤ 4.0 > 4.0 |

Tablo 2. 50 MTC izolatının birinci ve ikinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranları

| İlaç | Dirençli (sayı) | Dirençli (%) | İlaç | Dirençli (sayı) | Dirençli (%) |
|----------------|-----------------|--------------|-----------------------|-----------------|--------------|
| Streptomisin | 5 | 10 | Amikasin | 0 | 0 |
| İsoniazid | 7 | 14 | Rifabutin | 3 | 6 |
| Rifampisin | 3 | 6 | P-aminosalisilik asid | 2 | 4 |
| Etambutol | 4 | 8 | Etionamid | 4 | 8 |
| Ofloksasin | 2 | 4 | Sikloserin | 1 | 2 |
| Moksifloksasin | 1 | 2 | Kanamisin | 2 | 4 |

Tablo 3. Birden fazla ilaca karşı direnç gösteren MTC izolatlarının sayısı ve yüzdesi

| | | Dirençli (sayı) | Dirençli (%) |
|-------------------|---|-----------------|--------------|
| İki ilaç direnci | İsoniazid, etionamid | 1 | 2 |
| | Etambutol, kanamisin | 1 | 2 |
| Üç ilaç direnci | Etionamid, izoniazid, kanamisin | 1 | 2 |
| | Rifampin, rifabutin, P-aminosalisilik asid | 1 | 2 |
| Dört ilaç direnci | P-aminosalisilik asid, sikloserin, izoniazid, etambutol | 1 | 2 |
| | Ofloksasin, moksifloksasin, etionamid, izoniazid | 1 | 2 |
| | Rifampin, rifabutin, izoniazid, etambutol | 1 | 2 |
| Beş ilaç direnci | Rifampin, rifabutin, etionamid, izoniazid, etambutol | 1 | 2 |

plakta üçüncü hafta üreme görüldü ve bu durum inokülasyon miktarının azlığına bağlandı.

Çalışmamızda internal kalite kontrolü olarak *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu kullanıldı. Çalışma kapsamına alınan toplam 50 MTC izolatının birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç oranları Tablo 2'de, birden fazla ilaca direnç gösteren izolatların sayısı ve yüzdesi Tablo 3'te verilmiştir.

TARTIŞMA

2050 yılına kadar TB'nin eliminasyonunu sağlamak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün hedefleri arasındadır. Ancak ÇİD-TB ne yazık ki bu hedefin önünde önemli bir engeldir. Ayrıca ÇİD-TB hastalarının doğru tedavi edilmemeleri sonucu ortaya çıkan YİD-TB bu konudaki endişeleri daha da arttırmaktadır^[12]. Dünyanın çeşitli yerlerinde yapılan çalışmalarda, ilaç direncinin yaygın olarak bulunduğu ve bazı ülkelerde ciddi boyutlara ulaştığı görülmüştür. Tanı konulan her dört hastadan birinin ölmesi, TB hastalarının yeterince tedavi edilemediklerinin açık bir göstergesidir^[13].

Günümüzde sayıları giderek artan birinci ve ikinci seçenek anti-TB ilaçlara dirençli olgular nedeniyle ilaç direncini belirlemeye yönelik çalışmaların sayısı artmıştır^[3]. Birinci seçenek ilaçların duyarlılık testleri ülkemizde birçok merkezde değişik yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak ikinci seçenek ilaç duyarlılığı ile ilgili çalışmalar, ilaçlar için kullanılan mevcut duyarlılık testlerinin uygulanmasının iş gücü gerektirmesi, pahalı olması ve tam olarak standardize edilmemiş olmasından dolayı sınırlıdır^[4,14]. İkinci seçenek ilaçların duyarlılık testi için FDA onaylı bir sistem henüz mevcut değildir^[5].

DSÖ, ÇİD-TB tedavisinde etkili tedavi seçeneği sunması, TB ile mücadele programlarının yapılabilmesi ve uzun süreli sürveyans çalışmalarına ışık tutabilmesi amacıyla ikinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlılık testi yapılmasını yakın zamanda tüm dünyada zorunlu hale getirmeyi planlamaktadır^[14].

Özellikle ikinci seçenek ilaçların duyarlılığını test etmek için düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir testlerin kullanıma girmesi dünya çapında TB'nin kontrolü açısından oldukça önemlidir^[15].

Duyarlılık test yöntemleri arasında agar proporsiyon yöntemi altın standart olmasına karşın gec

sonuç vermesi nedeniyle hastalara uygun tedavinin başlanmasında gecikmelere yol açmaktadır. Ayrıca kültüre dayalı yöntemlerde test için bulundurulması gereken ilaç konsantrasyonları kullanılan yöntem, besiyerine ve test edilen antibiyotige göre farklılık göstermektedir. Önerilen kritik konsantrasyonların kullanılmaması yanlış sonuçlara neden olabilmektedir^[14,16].

Radyometrik BACTEC 460 TB sisteminde ikinci seçenek anti-TB ilaç duyarlılık testleri çalışmakta iken, sistemin yarı otomatize olması, 12B şişelerinin radyoaktif madde içermesi ve kontaminasyon riski gibi dezavantajları nedeniyle günümüzde bu sistem kullanılmamaktadır.

Son zamanlarda geliştirilen nitroredüktaz testi (NRA) ve mikroskopik gözleme dayalı duyarlılık testi (MODS) gibi daha yeni yöntemler kısa sürede sonuç vermekte ancak bu testlerin yorumlanması için uzman personele ihtiyaç duyulmakta ve yoğun iş gücü gerektirmektedir. Genotipik analiz yöntemleri kısa sürede sonuç vermesine karşın maliyet yüksekliği, yorumlama zorluğu, belirli ilaçların duyarlılığının çalışılabilmesi gibi nedenlerden dolayı bu testler gelişmekte olan ülkelerde rutin kullanıma girememektedir^[5]. E-test yöntemi ile birden fazla ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılığının çalışıldığı az sayıda çalışma mevcuttur^[4].

Ülkemizde sekonder anti-TB ilaçlar ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma olması nedeniyle YİD-TB ile ilgili veriler de oldukça sınırlıdır. Türkiye'deki ilk YİD-TB izolatı Özkütük ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir^[14,17].

Bektöre ve arkadaşları YİD-TB insidansının belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada, 81 ÇİD-TB izolatının birinci ve ikinci basamak anti-TB ilaçlara duyarlılıklarını BACTEC MGIT 960 sistemiyle araştırmışlar ve ÇİD-TB izolatlarının %54.3'ünde etambutol, %50.6'sında ise streptomisin direnci tespit etmişlerdir^[6]. İzolatların %24.7'sinde sadece izoniazid ve rifampisin, %24.7'sinde izoniazid, rifampisin, etambutol, %21'inde izoniazid, rifampisin ve streptomisin, %29.6'sında ise tüm birinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç geliştiğini saptamış ve çalışma sonucunda YİD-TB belirlememişlerdir.

Çalışmamızda rastgele seçtiğimiz 50 MTC izolatının 14 (%28)'ünde majör ilaçlardan (streptomisin, rifampisin, etambutol, izoniazid) en az birine

karşı direnç gözlenirken, bir izolatta yalnızca ikinci seçenek ilaçlardan ofloksasine karşı direnç gözlemlendi. Otuz beş izolat ise çalışılan tüm ilaçlara duyarlı bulundu. Ayrıca çalışmamızda en fazla direnç oranı birinci seçenek ilaçlardan izoniazid ve streptomisin karşı (izoniazid %14, streptomisin %10) belirlendi. İzolatların birinde yalnızca izoniazid direnci, beşinde ise yalnızca streptomisin direnci tespit edildi.

ÇİD-TB olgularını tanımlamak amacıyla izoniazid ve rifampisine direnç gelişimi paralel incelenmektedir. Ancak sadece rifampisin direnci ÇİD-TB'nin güçlü bir ön belirleyicisi kabul edilmektedir^[18]. Çalışmamızda rifampisin direnci olmadan izoniazid direnci 5 (%10) susta, izoniazid direnci olmadan rifampisin direnci ise 1 (%2) susta bulunmuştur. Dünyada tüm TB olguları arasında rifampisin direnci olmadan izoniazid direnci %9.5 olarak bildirilmiştir^[19].

Yapılan çalışmalarda izoniazid direncinin tek başına diğer ilaçlardan fazla olduğu belirlenmiştir (%14). Özellikle izoniazid direncinin %4'ten fazla olduğu bölgelerde mutlaka duyarlılık testi sonrasında tedaviye başlanması gerektiği bildirilmektedir^[20]. Çalışmamızda da izoniazid direncinin yüksek olması bölgemizde tedaviye başlanılacak her TB hastası için mutlaka birinci seçenek ilaçların test edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda ÇİD-TB olarak tanımlanan iki izolatın hepsinde aynı zamanda rifabutın ve etambutol direnci tespit edilmiştir. Bu izolatlar ofloksasine, moksifloksasine, amikasin, P-aminosalisilik aside, sikloserine duyarlı bulunmuştur. Bektöre ve arkadaşları ise 81 ÇİD-TB izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada en sık direnci etionamide karşı (%37) belirlemişlerdir^[6].

Çalışmamızda aynı izolatlarda rifampin ve rifabutın direnç oranları eşit bulunmuştur (%6). Direnç oranlarının eşit olmasının rifabutinin, rifampisin türevi bir ilaç olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

MTC izolatlarına karşı in vitro ve in vivo etkinlikleri nedeniyle florokinolonlar, özellikle ÇİD-TB tedavisinde DSÖ tarafından alternatif olarak önerilmektedir^[15]. Çalışmamızda florokinolon grubundan ofloksasin direnci %4, moksifloksasin direnci %2 olarak belirlenirken, bir izolat ise çalışılan tüm ilaçlara duyarlı bulunmuş yalnızca ofloksasine direnç göstermiştir.

Henüz yeni bir sistem olan MycoTB için agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılmış ve bu yöntemin agar proporsiyon yöntemi ile uyumlu olduğu ve MycoTB plaklarının etambutol haricindeki diğer ilaçlar için hızlı, güvenilir ve pratik olduğu sonucuna varılmıştır. Sullivan ve arkadaşları dokuz mikobakteri referans suşu ile farklı dilüsyonlarda yaptıkları çalışmada, Agar proporsiyon ve MycoTB yöntemleri arasında %100 uyum bulmuşlardır^[21]. Abuali ve arkadaşları ÇİD ve YİD izolatları dahil 37 MTC izolatını kullanarak MycoTB ve Agar proporsiyonu karşılaştırdıkları çalışmalarında iki yöntemin %99.3 oranında uyumlu olduğunu bildirmişlerdir^[5].

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Şimşek ve arkadaşları, aralarında ÇİD-TB'nin de bulunduğu 96 MTC izolatının duyarlılığını MycoTB ve proporsiyon yöntemleri ile çalışmışlar ve izoniazid, rifampisin, sikloserin, kanamisin ve ofloksasin için %90'ın üzerinde, streptomisin için %86.5, etambutol için %83.3, P-aminosalisilik asid için %82.3, etionamid için %70.8 oranında korelasyon bulmuşlar ve iki sistemin uyumlu olduğu kanısına varmışlardır^[22].

Yine Şimşek ve arkadaşları, duyarlılığı bilinen 19 adet referans MTC suşunun birinci ve ikinci basamak ilaçlara duyarlılıklarını MGIT 960 ve MycoTB yöntemleriyle çalışmışlar ve iki yöntemin sonuçlarının uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir^[23]. MGIT 960 sisteminin en uygun test olduğu ancak sensititre MycoTB MİK plate testinin de ÇİD-TB şüpheli örneklerde kısa sürede sonuçlanması nedeniyle kullanılabilmesi sonucuna varmışlardır.

Balcı ve arkadaşları MycoTB yöntemiyle 36'sı farklı direnç paternine sahip, 64'ü tüm ilaçlara duyarlı bulunan toplam 100 MTC izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada, MycoTB ve agar proporsiyon yöntemini özgüllük, duyarlılık ve zaman açısından değerlendirmişlerdir^[24]. Araştırmacılar tüm antibiyotiklerin uyum yüzdelerini %95 ile %100; özgüllüklerini %95 ile %100; duyarlılıklarını %86 ile %100 arasında belirlemişlerdir.

Lee ve arkadaşları duyarlı ve dirençli izolatlardan oluşan toplam 222 MTC izolatının duyarlılığını MycoTB ve 7H10 Agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırmışlar ve MycoTB'nin birinci ve ikinci basamak ilaçların (etambutol hariç) duyarlılığında

güvenilir sonuçlar sağladığı ve Agar proporsiyon yönteminden daha erken sonuç verdiği kanısına varmışlardır^[8].

Salee ve arkadaşları MODS ve MycoTB'yi kombine ettikleri çalışmalarında, üç günlük inkübasyondan sonra izoniazidin %91.4, rifampisin %100, beş günlük inkübasyondan sonra ise florokinolonların %86.7, aminoglikozidlerin ise %94.6 oranında duyarlılığının belirlenebildiğini, iki yöntem beraber kullanıldığında ÇİD-TB'nin yaklaşık üç gün içerisinde, YİD-TB'nin ise beş gün içerisinde tanısının konulabileceğini bildirmişlerdir^[25].

Sonuçlanma süresine baktığımızda yapılan çalışmalarda 10-14 gün içerisinde sonuç alınabildiği bildirilmektedir^[5,22]. Çalışmamızda da izolatların büyük çoğunluğunun duyarlılığı iki hafta içerisinde belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız yöntemin sınırlayıcı yönü; plakların gözle değerlendirilmesinden dolayı yanılmaların olabileceği ve asidik ortam ihtiyacından dolayı pirazinamid duyarlılığının test edilememesidir. Plakların değerlendirilmesi aşamasında yanılmaların önüne geçmek için okuma ayna kullanılarak yapıldı ve bağımsız iki kişi tarafından değerlendirildi.

Sonuç olarak çalışmamız bölgemizde ikinci seçenek ilaçların test edildiği ilk çalışma olup MTC izolatlarının ÇİD ve YİD durumları hakkında bize değerli bilgiler sağladı. Çalışmamızda %4 oranında ÇİD-TB izolatına rastlanılmıştır ve bu oran Türkiye ortalaması içerisinde. YİD-TB'ye rastlanılması ise sevindiricidir.

MycoTB plakları hızlı, güvenilir ve kantitatif değer veren bir sistem olup, bu sistemin ülkemizde önümüzdeki yıllarda yaygın kullanım alanı bulacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015. Geneva. <http://WHO/HTM/TB/2014>.
2. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. Samsun 2003:173-7.
3. Çimen Özışık N. Çok ilaca dirençli tüberküloz hastalarında bactec ve agar proporsiyon yöntemleri ile saptanan etionamid direncinin klinik önemi. Uzmanlık tezi, 2006. Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
4. Şimşek H, Tarhan G, Cesur S. Çok ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarında ikinci basamak antitüberküloz ilaç duyarlılıklarının E-test yöntemi ile değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2015;49:47-55.
5. Abuali MM, Katariwala R, LaBombardi VJ. A comparison of the Sensititre MycoTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31:835-9.
6. Bektöre B, Haznedaroğlu T, Baylan O, Ozyurt M, Özkütük N, Satana D ve ark. Çok ilaca dirençli tüberküloz izolatlarında yaygın ilaç direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2013;47:59-70.
7. Hall L, Jude KP, Clark SL, Dionne K, Merson R, Boyer A, et al. Evaluation of the sensititre MYCOTB MIC plate for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex against first and second line agents. J Clin Microbiol 2012;50:3732-4.
8. Lee J, Armstrong DT, Ssengooba W, Park JA, Yu Y, Mumbowa F, et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first and second line drugs. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:11-8.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, 2nd Edition, 2011:34-6.
10. Mayo Clinic. Interpretive Handbook: Susceptibility, Mycobacterium tuberculosis Complex, Second line. Test 34550.
11. Mpagama SG, Houtp ER, Stroup S, Kumburu H, Gratz H, Kibiki GS, et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. BMC Infect Dis 2013;13:432.
12. T.C. Sağlık Bakanlığı. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Başak Ltd. Şti. Ankara, 2011. <http://www.verem.org.tr/pdf/tum-kitap.pdf>
13. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. 2003. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı, Ankara.
14. Baylan O. Çok ilaca dirençli tüberkülozdan sonra yaygın ilaca dirençli ve tüm ilaçlara dirençli tüberküloz formları: Eski hastalığın yeni yüzleri. Mikrobiyol Bul 2011;45:181-95.
15. Ruh E, Öcal HY, Yurdakul P, Sarıbaş Z, Alp A. Dirençli Mycobacterium tuberculosis izolatlarında siprofloksasin direncinin saptanmasında tetrazolyum moru ve rezaurin testlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2013;47:49-58.
16. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Yayın No: 935, Ankara, 2014.
17. Özkütük N, Sürücüoğlu S, Gazi H, Coşkun M, Özkütük A, Özbakkaloğlu B. Second-line drug susceptibilities of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Aegean region-Turkey. Turk J Med Sci 2008;38:245-50.
18. Baylan O. İlaça dirençli tüberkülozun tedavisi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32:788-804.
19. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. Geneva. <http://WHO/HTM/TB/2014>.

20. Uysal EB, Kaya H. Klinik örneklerden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks suşlarının major antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. *TAD* 2014;12:67-70.
21. Sullivan N, Sotos J, Anhalt K, Allen S. Preliminary results from a new TREK Sensititre *Mycobacterium tuberculosis* MIC plate (MYCOTB). *American Society for Microbiology, Annual Meeting 2010; San Diego*. C-151.
22. Şimşek H, Arslantürk A, Albayrak N, Sezen F, Ceyhan İ. The comparison of antimicrobial susceptibilities of *M. tuberculosis* complex for first and second line drugs by the sensititre MYCOTB plate rapid test and conventional proportion method on lowenstein jensen. *Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 1-4 Temmuz 2012, Romanya. Kongre Kitabı, s: 43, P-181*.
23. Şimşek H, Uçarman N, Arslantürk A, Özsaraç H, Sezen F, Sarıbaş A, et al. *M. tuberculosis* izolatlarının TREK Sensititre MYCO-TB MIC Plate testi ile ilaç duyarlılık sonuçlarının tanısız doğruluğunun değerlendirilmesi. *7. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 8-10 Mayıs 2015, Mersin. Sempozyum Kitabı, s: 188, P-34*.
24. Balcı F, Çavuşoğlu C. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının duyarlılık testlerinde kullanılan sensititre MYCOTB panel yönteminin performansının agar proporsiyon yöntemi ile karşılaştırılması. *3. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya. Kongre Kitabı, s: 131-132, SS04*.
25. Salee P, Harrison L, Dionne K, McArthur C, Parrish N. Combination of the MODS assay with the sensititre™ MYCOTB plate for rapid detection of MDR and XDR-TB. *Journal of Tuberculosis Research* 2014;101-5.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Yrd. Doc. Dr. Figen KAYSERİLİ ORHAN

Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri
Meslek Yüksekokulu, Erzurum-Türkiye

E-posta: figen.kayserili@hotmail.com