ANKEM Derg 7 (No.4): 273-276 (1993)

MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN ANTİTÜBERKÜLO İLAÇLARA DUYARLILIKLARI

Meltem UZUN[1], Muammer KİRAZ[2], Dilek KAYA[1], Gülşen AKTAN[1], Ömer KASIMOĞLU[1]

ÖZET

Bir yıllık bir süre içinde toplam 3940 muayene maddesi tüberküloz yönünden Bactec TB 460 sistemi ile incelenmiş, 171 olguda (% 4.3) pozitif sonuç alınmıştır. İzole edilen suşların NAP (paranitro-alpha-acetylamino-beta-hydroxy-propiophenone) TB ayrım testi ile 154 (% 90)'ı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti*), 17 (% 10)'u MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis) basili olarak tanımlanmıştır. *M. tuberculosis* kompleks (TB kompleks) suşlarının INH, etambutol, rifampin ve streptomisine karşı duyarlılık deneyleri Bactec tekniği ile yapılmış, suşlar streptomisine % 98, etambutole ve rifampine % 95, INH'a % 67 duyarlı olarak bulunmuştur.

SUMMARY

Susceptibility of Mycobacterium strains to antituberculous drugs.

Totally 3940 clinical specimens were examined in a one year period with Bactec TB system and 171 of them were found positive (4.3 %). The p-nitro-alpha-acetylamino-beta-hydroxy-propiophenone test (Bactec NAP differentiation test) was applied for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti*) and MOTT bacilli (Mycobacteria other than tuberculosis). 154 (90 %) of 171 isolates were identified as *M. tuberculosis* complex and 17 (10 %) were as MOTT bacilli. Antibiotic susceptibility tests were performed also by Bactec technique and 98 %, 95 %, 95 % and 67 % susceptibility ratios were found for streptomycin, ethambutol, rifampin and INH, respectively.

GİRİŞ

Klinik mikobakteriyoloji alanındaki gelişmeler son on yılda büyük bir ilerleme kaydetmiştir. Bu gelişmelerin içinde en önemlileri radyometrik sistem, gaz-likit kromatografisi ve DNA problarının kullanıldığı standardize ve çabuk tanı sağlayan yöntemlerdir. Tüberküloz tanısı ile ilgili radyometrik sistemde *M. tuberculosis* kompleks diğer mikobakteri türlerinden ayrılabilmekte ve aynı zamanda antitüberkülo ilaçlara duyarlılık deneylerinin 4-5 günde sonuçlanması sağlanmaktadır(9).

Yöntemde kullanılan Bactec TB besiyeri (12B) zenginleştirilmiş Middlebrook 7H9 buyyonudur. Mikobakteriler besiyerinde bulunan ^{14}C işaretli substratı (palmitik asit) kullanırlar ve besiyerinin üzerindeki atmosfere $^{14}CO_2$ çıkarırlar. 12B besiyerinde üreme varsa Bactec 460 cihazında yapılan kontroller sırasında

1- İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

2- İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi, Çapa, İstanbul.

şişeden $^{14}CO_2$ çekilir ve radyoaktivitesi 0-999 sınırları içinde sayısal olarak saptanır. Bu sayılar üreme indeksini (GI) gösterir.

Bu sistemle yapılan mikobakteri duyarlılık deneyleri, konvansiyonel yöntemlerle aynı temel prensibe dayanır. Bu yöntemler arasındaki tek fark Bactec sisteminde sıvı besiyeri kullanılması, duyarlılık deneyi sonuçlarının 3 ay yerine 4-5 günde sonuçlanabilmesi ve standardize edilmiş olmasıdır (11).

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 1992-Ocak 1993 döneminde çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen 3940 muayene maddesinden 154 (% 4.3) *M. tuberculosis* kompleks suşu izole edilmiş, bu suşların INH, etambutol, rifampin ve streptomisine karşı duyarlılıkları Bactec sistemi ile araştırılmıştır (8, 9, 10, 11).

Muayene maddelerinin ekildiği 12B besiyerleri 37°C'de inkübe edilmiş, ilk iki hafta haftada iki kez, son dört hafta haftada bir kez kontrol edilerek negatif kültür sonuçları 6 haftada bildirilmiştir (9, 11, 12). Yapılan kontrollerde üreme indeksi ≥ 10 olan 12B besiyerleri günlük kontrole alınmış ve GI≥50-100 olduğunda bu besiyerlerinden Ziehl-Neelsen boyama ve kanlı jeloz besiyerine ekim yapılmıştır. Boyamada saf halde aside dirençli bakteri görülen ve kanlı jeloz besiyerinde üremeyen (kontamine olmayan) kültürlere NAP ayrım testi uygulanmış, *M. tuberculosis* kompleks suşları idantifiye edilmiştir (5,6).GI≥500-999 olduğunda 12B besiyerlerinde duyarlılık deneyi yapılmıştır. Bu aşamaya kadar olan ve bunu izleyen işlemlerin tümü emniyet kabininde gerçekleştirilmiştir. Duyarlılık deneyi uygulanmadan önce her 12B besiyerine 0.1 ml PANTA solüsyonu (polimiksin B, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim ve azlosilin) ilave edilmiştir.

Liyofilize olarak hazırlanmış antitüberkülo ilaçlar, 5 ml steril deionize su ilavesiyle stok solüsyon haline getirilmiş, bu solüsyonlardan 0.1 ml 12B besiyerine ilave edilerek aşağıdaki konsantrasyonlar elde edilmiştir:

INH ..... 0.2 mcg/ml
Etambutol ..... 7.5 mcg/ml
Rifampin ..... 2.0 mcg/ml
Streptomisin ..... 6.0 mcg/ml

GI≥500-800 olan kültürlerin antibiyotik duyarlılık deneyi:

Her ilaç konsantrasyonu için bir besiyeri ve kontrol için ayrı bir besiyeri kullanılmıştır.

1- Her 12B besiyeri şişesine yukarıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmış ilaçlardan 0.1 ml ilave edilir,

2- Bu ilaçları bulunduran besiyerlerinin herbirine bakteri süspansiyonundan (muayene maddesinin ürediği orijinal 12B besiyeri) 0.1 ml ekilir,

3- Kontrol şişesinin hazırlanması için 9.9 ml özel dilüsyon sıvısına (DF) bakteri süspansiyonundan 0.1 ml ekilerek 1/100 oranında sulandırım sağlanır. İyice karıştırıldıktan sonra bu süspansiyondan kontrol şişesine (ilaçsız) 0.1 ml ilave edilir.

Ekimleri tamamlanmış Bactec 12B besiyerleri 37±1°C' de inkübe edilmiş ve Bactec TB 460 cihazında günlük kontrole alınarak 4-5 gün GI'leri takip edilmiştir.

GI≥999 olduğunda, farklı olarak, muayene maddesinin ürediği orijinal kültürü direkt kullanmak yerine, özel sulandırım sıvısı ile 1/1 oranında sulandırım yapılmış ve orijinal kültür olarak bu sulandırım kullanılmıştır.

Sonuçların yorumlanması:

Bir önceki güne göre GI değerleri arasındaki fark delta GI olarak ifade edilir. Kontrol şişesinin delta GI değeri ≥30 olduğunda sonuçlar aşağıdaki şekilde yorumlanmıştır.

Delta GI (kontrol) > delta GI (ilaç bulunan şişe) = Duyarlı
Delta GI (kontrol) < delta GI (ilaç bulunan şişe) = Dirençli
Delta GI (kontrol) = delta GI (ilaç bulunan şişe) = Sınırda.

BULGULAR

Çalışmada izole edilen 154 *M. tuberculosis* kompleks suşunun antitüberkülo ilaçlara duyarlılık sonuçları tabloda bildirilmiştir.

Tablo. M.tuberculosis kompleks suşlarının duyarlılığı.

	INH	Etambutol	Rifampin	Streptomisin
M.tuberculosis kompleks (n=154)	103(67)[x]	147 (95)	147 (95)	151 (98)

[x] Duyarlı suş sayısı (yüzde oranı).

TARTIŞMA

Son on yıl içindeki gelişmelerle tüberküloz tanısı ve mikobakterilerin antitüberkülo ilaçlara duyarlılığı daha kısa sürede yapılabilmektedir. Bu sürenin kısalması laboratuvar için önemli olduğu kadar hasta ve klinisyen açısından da faydalıdır. Bu şekilde duyarlılık deneyinin sonucuna göre etkili bir tedavi rejimi uygulanabilmektedir (1).

Bactec TB sistemi ile uygulanan mikobakteri duyarlılık deneyi sadece *M.tuberculosis* kompleks suşları için önerilmekte ve MOTT basillerine de uygulanması için çalışmalar sürdürülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda izole edilen 17 MOTT basili duyarlılık deneyi kapsamına alınmamıştır.

Yurdumuzda Bactec sistemi ile yapılmış duyarlılık deneyi sonuçlarını bildiren bir yayına rastlanmamıştır. Konvansiyonel yöntemlerle Bactec sisteminin karşılaştırıldığı çalışmalarda, aralarında uyumluluk olmakla birlikte Bactec sisteminin daha üstün ve standart bir yöntem olduğu bildirilmektedir (5, 8, 10).

Roberts ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmada, Bactec sistemi ile konvansiyonel yöntemleri karşılaştırmışlar ve izoniazid dışındaki diğer antitüberkülo ilaçlara duyarlılık oranını daha yüksek bulmuşlardır.

Laszlo ve arkadaşları (4), standart PR metodunu kullandıkları çalışmalarında suşların % 55'inde en az bir ilaca karşı direnç saptadıklarını belirtmişler ve bu dirençlilik oranlarını INH için % 36, etambutol için % 8.5, rifampin için % 9 ve streptomisin için % 31 olarak bildirmişlerdir.

Siddiqi ve arkadaşları (10), Bactec yöntemini kullandıkları çalışmalarında 106 *M. tuberculosis* kompleks suşunu denemişler ve streptomisine karşı 2 µg/ml'de 10, 4 µg/ml'de 5 suşu, INH'a karşı 16 suşu, rifampine karşı 5 ve etambutole karşı 3 suşu dirençli bulmuşlardır.

Vincké ve arkadaşları (13), 321 suşla yaptıkları çalışmalarında, streptomisine 7 suşu, izoniazide 16 suşu, rifampin ve etambutole 2'şer suşu dirençli bulmuşlar ve dirençlilik oranını (toplam dirençlilik oranı) % 8.4 olarak bildirmişlerdir.

Heifetz (3), 0.2 µg/ml'de INH'a % 26.7, 2 µg/ml'de streptomisine % 7.8, 1 µg/ml'de rifampine % 20 ve 7.5 µg/ml'de etambutole % 5.3 direnç saptamıştır.

Rastogi ve arkadaşları (7) 500 suşu denedikleri çalışmalarında, 7H11 agarda yaptıkları duyarlılık deneyi sonuçları ile radyometrik sistem sonuçlarını karşılaştırmışlar ve INH'a karşı 59 suşun her iki yöntemde de duyarlı, 46 suşun her iki yöntemde de dirençli; etambutole karşı 90 suşun duyarlı, 24 suşun dirençli; rifampine karşı 74 suşun duyarlı, 34 suşun dirençli ve streptomisine karşı 60 suşun duyarlı, 41 suşun dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Yukarıda belirtilen çalışmaların tümünde INH'a karşı diğer antitüberkülo ilaçlara göre daha yüksek direnç saptanmış ve çalışmamızdan elde edilen sonuç da buna paralellik göstermiştir. Denediğimiz suşların INH'a duyarlılık oranı % 67, direnç oranı % 33 olarak saptanmıştır.

INH'a karşı elde edilen sonucun, çeşitli çalışmalarda gösterdiği uyumluluk diğer üç antitüberkülo ilaçta saptanmamıştır. Çalışmamızda streptomisine %98, etambutole %95 ve rifampine % 95 oranında duyarlılık belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda antitüberkülo tedavi görmüş olma, kronikleşme gibi faktörlerin ilaç duyarlılığına etkin olduğu saptanmıştır (2). Bu nedenle sonuçlar arasındaki farklılığın bu faktörlere bağlı olduğu düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1- Berlin O G W:Mycobacteria "E J Baron, S M Finegold (eds): *Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology*, 8. baskı " kitabında s 597, St Louis, Baltimore (1990).

2- Hawkins JE: Rapid mycobacterial susceptibility tests, *Clin Microbiol Newslett 8*:101 (1986).

3- Heifetz LB: Rapid automated methods (Bactec system) in clinical mycobacteriology, *Seminars in Respiratory Infections 1*:242 (1986).

4- Laszlo A, Gill P, Handzel V, Hodgkin MM, Helbecque DM: Conventional and radiometric drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex, *J Clin Microbiol 18*:1335 (1983).

5- Laszlo A, Siddiqi S H: Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the Mycobacterium tuberculosis complex by selective inhibition with p-nitro- alpha -acetylamino-beta-hydroxypropiophenone, *J Clin Microbiol 19*:694 (1984).

6- Morgan M, Doerr K A, Hempel H O, Goodman N L, Roberts G D: Evaluation of the p-nitro-alpha acetylamino-beta-hydroxypropiophenone differential test for identification of Mycobacterium tuberculosis complex, *J Clin Microbiol 21*:634 (1985).

7- Rastogi N, Goh K S, David H L: Drug susceptibility testing in tuberculosis: A comparison of the proportions methods using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method, *Res Microbiol 140*:405 (1989).

8- Roberts G D, Goodman N L, Heifetz L, Larsh H W, Lindner T H, McClatchy J K, McGinnis M R, Siddiqi S H, Wright P: Evaluation of the Bactec radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear positive specimens, *J Clin Microbiol 18*:689 (1983).

9- Roberts G D, Koneman E W, Kim Y K: Mycobacterium "A Balows (ed): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı "kitabında s 304, Am Soc Microbiol, Washington (1991).

10- Siddiqi S H, Libonati J P, Middlebrook G: Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis, *J Clin Microbiol 13:*908 (1981).

11- Siddiqi S H: *Bactec TB system, Product and Procedure Manual,* Becton Dickinson (1989).

12- Sommers H M, McClatchy J: Laboratory diagnosis of the Mycobacterioses, *Cumitech 16*, Am Soc Microbiol, Washington (1983).

13- Vincké G, Yegers O, Vanachter H, Jenkins P A, Butzler JP: Rapid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by a radiometric technique, *J Antimicrob Chemother 10*:351 (1982).