

BÖLGE TÜBERKÜLOZ LABORATUVARLARINDAN GÖNDERİLEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARININ MAJÖR ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIKLARI

SUSCEPTIBILITIES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS
COLLECTED FROM REGIONAL TUBERCULOSIS LABORATORIES TO
MAJOR ANTITUBERCULOUS DRUGS

**M. Bakır SAYĞAN¹, Fatih OCAK¹, Salih CESUR¹, Gülnur TARHAN¹
İsmail CEYHAN¹, Feyzullah GÜMÜŞLÜ¹, Gülşan BEKER¹
Uğur GÜNER¹, Erol COŞKUN¹**

ÖZET: Bu çalışmada, 1999-2002 yılları arasında yedi farklı ilimizde (Aksaray, Bursa, Elazığ, Kayseri, Samsun, Trabzon, Van) bulunan tüberküloz laboratuvarından Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı'na gönderilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında majör antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık oranlarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan toplam 505 *M.tuberculosis* suşunun isoniazid (İNAH), rifampisin (RİF), streptomisin (SM) ve etambutole (EMB) karşı duyarlılıkları Löwenstein-Jensen besiyerinde orantı (proportion) metoduyla araştırılmıştır. Suşların 385'inin (%76.2) tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğu belirlenmiş, 120 (%23.7) suşta ise en az bir antitüberküloz ilaca direnç saptanmıştır. Dirençli suşlarda 14 farklı direnç paterni izlenmiştir. Majör ilaçlara direnç oranları; İNAH ve RİF için %13.3 (67'ser suş), SM için %9.1 (46 suş) ve EMB için %3.4 (17 suş) olarak bulunmuştur. Çoklu ilaç dirençli (İNAH+RİF) tüberküloz oranı ise %7.9 (40 suş) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda, İNAH, RİF ve EMB'e en yüksek direnç oranı (sırasıyla %21.2, %21.2 ve %10.6) Bursa, SM'e en yüksek direnç oranı Elazığ (%18.8), çoklu ilaç (İNAH+RİF) direnci ise en yüksek oranda (%10.6) Van ilinden gönderilen suşlarda gözlenmiştir. Tüberkülozun tedavisinde birinci ve ikinci basamak ilaçların uygunsuz kullanımı, dirençli suşların ortaya çıkması ve yayılmasına neden olacağından, tüberkülozlu olguların "direk gözetime dayalı tedavisi (DOTS)" büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla antitüberküloz ilaç duyarlılık tayini için bölge tüberküloz laboratuvarlarına gereken önemin verilmesi ve bu laboratuvarlarla referans laboratuvarı arasındaki ulusal laboratuvar ağıının işleyişinin aktif hale getirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, antitüberküloz ilaç, duyarlılık, orantı metodu.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the susceptibility rates of *Mycobacterium tuberculosis* strains sent to Refik Saydam Hygiene Center, Tuberculosis Reference and Research Laboratory, Ankara, from seven different regional tuberculosis laboratories between the 1999-2002 period against major antituberculous drugs. The sensitivities of a total 505 *M.tuberculosis* strains to isoniazid (INAH), rifampicin (RIF), streptomycin (SM) and ethambutol (EMB) were determined by using proportion method

¹ Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara. (scsur89@yahoo.com)

in Lowenstein-Jensen medium. Of the strains, 385 (76.2%) were found sensitive to all of the tested drugs, while 120 strains were resistant to at least one of the antituberculous drugs. The resistant strains showed 14 different resistance patterns. The resistance rates were detected as 13.3% for INAH and RIF (67 strains of each), 9.1% for SM (46 strains), and 3.4% (17 strains) for EMB. Multidrug resistant (INAH+RIF) *M.tuberculosis* was 7.9% (40 strains). The highest resistance rate to INAH, RIF and EMB (21.2%, 21.2% and 10.6%, respectively) was detected in the isolates which were sent from Bursa province (located in northwestern Turkey); the highest SM (18.8%) and multidrug resistance (INAH+RIF) rates (18.8% and 10.6%, respectively) were detected in the strains sent from Elazığ and Van provinces (both located in eastern Turkey). Since the inappropriate use of the first and second line antituberculous drugs leads to the development and spread of the resistant strains, "Directly Observed Therapy Shortcourse (DOTS)" is a very important practice. Therefore regional tuberculosis laboratories should be worth considering as the chains of a well-organized national laboratory network, in order to detect the antituberculous drug resistance patterns of the *M.tuberculosis* strains over the country.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosis drug, susceptibility, proportion method.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tüm dünyada mortalite oranı en yüksek enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* yılda yaklaşık 3 milyon ölüm oranıyla, tüm dünyadaki enfeksiyöz ajanlara bağlı ölümlerden en fazla sorumlu tutulan etkindir¹. 2000 yılında dünya nüfusunun üçte birinin (1.9 milyar kişi) *M.tuberculosis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir²⁻⁴. Tüm dünyada 8 milyon yeni TB olgusu ve 16 milyon önceden mevcut olgu (eski hastalık) bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2002-2020 yılları arasında, yaklaşık 100 milyon kişinin yeni enfekte olacağını, 150 milyondan fazla kişinin hastalanacağını ve kontrol önlemleri artırılmazsa 36 milyon kişinin öleceğini tahmin etmektedir³.

M.tuberculosis enfeksiyonunun uygun antitüberküloz ilaçlarla tedavisi, hem hastalığın tamamen iyileşmesi hem de sağlıklı bireylere bulaşmanın önlenmesi açısından son derece önemlidir. *M.tuberculosis*'in ilaç direncinin saptanmasına yönelik birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında, Löwenstein-Jensen ve Middlebrook 7H10-11 agarda orantı (proportion) metodu en yaygın kullanılanlarıdır^{5,6}. Son yıllarda direnç tayinine yönelik moleküler yöntemler de geliştirilmiştir; ancak bu yöntemler pahalı olmaları ve standardizasyonun sağlanamaması nedeniyle henüz rutin uygulama için kullanılmamaktadır⁷.

Bu çalışmada, ülkemizin yedi farklı bölgesindeki yerel tüberküloz laboratuvarlarından merkez referans ve araştırma laboratuvarımıza gönderilen *M.tuberculosis* suşlarının dört majör antitüberküloz ilaca karşı direnç oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya; Aksaray (n=10), Bursa (n=47), Elazığ (n=53), Kayseri (n=98), Samsun (n=40), Trabzon (n=154) ve Van (n=103) illeri tüberküloz laboratuvarlarından Refik Saydam Hıfızisihha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz

Referans ve Araştırma Laboratuvarı'na gönderilen toplam 505 *M.tuberculosis* suşu dahil edildi. Koloni morfolojisi uyumlu, pigment oluşturmeyen, ısıya dayanıklı katalaz testi negatif, nitrat redüksiyon, niasin ve üreaz testleri pozitif olan mikobakteriler *M.tuberculosis* olarak tanımlandı^{3,8}.

Suşların dört majör antitüberküloz ilaca duyarlılıklarının belirlenmesi için, Löwenstein-Jensen besiyerine izoniazid (İNAH; 0.1, 0.2, 1 µg/ml), rifampisin (RİF; 20, 40, 60 µg/ml), etambutol (EMB; 2, 4, 8 µg/ml) ve streptomisin (SM; 2, 4, 8 µg/ml) antibiyotikleri belirtilen konsantrasyonlarda eklendi. Saf kültürden 1 McFarland bulanıklığında hazırlanan süspansiyonların 10⁻³lük dilüsyonları inokulum kaynağı olarak kullanıldı ve her bir besiyerine 200 µl ekim yapıldı. Kontrol olarak antitüberküloz ilaç içermeyen besiyerleri kullanıldı. Ekim yapılan tüpler 37°C'de inkübe edilerek 28.gün ve 42.günde değerlendirildi. Sonuçların değerlendirilmesi, antibiyotiksiz kontrol besiyerlerindeki koloni sayıları ile antibiyotikli besiyerlerindeki koloni sayılarının karşılaştırılmasıyla şu formüle göre yapıldı^{9,10}: [Direnç Oranı= (Antibiyotikli ortamdaki koloni sayısı/Antibiyotiksiz ortamdaki koloni sayısı) x 100]. Hesaplanan direnç oranı %1 ve üzerinde ise suşun o antibiyotiğe dirençli olduğu kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, *M.tuberculosis* suşlarının %76.2'si (385/505) tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlı bulunmuş, %23.7'sinde (120/505) ise en az bir antitüberküloz ilaca direnç saptanmıştır. En yüksek direnç oranı %13.3 ile İNAH ve RİF'e karşı gözlenmiş, bunu SM (%9.1) ve etambutol direnci (%3.4) izlemiştir (Tablo I). En az iki ilaca (İNAH+RIF) dirençli suş oranı ise %7.9 (40/505) olarak belirlenmiştir. Dirençli suşların illere göre dağılımı, direnç paternleri ve direnç oranları Tablo I'de görülmektedir.

Çalışmamızda, İNAH, RİF ve EMB'e en yüksek direnç oranı Bursa, SM'e en yüksek direnç oranı Elazığ, çoklu ilaç (İNAH+RIF) direnci ise en yüksek oranda Van ilinden gönderilen suşlarda gözlenmiştir (Tablo I). Her ne kadar Aksaray ilindeki oranlar daha yüksek görünse de, gönderilen suş sayısının az olması nedeniyle yüzde alınmış olmasına rağmen karşılaştırma yapılmamıştır.

TARTIŞMA

Tüberküloz (TB), tüm dünyada özellikle de az gelişmiş ülkelerde en sık görülen ve mortalite ve morbidite oranı en yüksek olan enfeksiyon hastalığıdır¹⁻⁴. Ülkemiz tüberküloz yönünden hiperendemik ülkeler içinde yer almaktadır. Verem Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre, 1999 yılındaki yeni olgu sayısı 18.418, insidans ise 27/100.000 olup, bu sayılar 2000 yılı için 18.038 ve 26.6/100.000'dir (<http://www.saglik.gov.tr/VSDB>).

Günümüzde özellikle HIV ile enfekte hastalarda çoklu ilaç dirençli (ÇİD) TB olgularının hızla artması, bu olgularda tedavi başarısızlığının ve mortalite oranlarının yüksek olması, sosyoekonomik bozulmaya paralel olarak tüberküloz kontrolüne yönelik alt yapı çalışmalarına yeterince kaynak ayrılmaması, bölgesel

Tablo I. Yedi Farklı İlden Gönderilen ve Majör Antitüberküloz İlaçlara Dirençli Bulunan *M.tuberculosis* Suşlarının Dağılımı ve Direnç Oranları

	İller (Gönderilen Toplam Suş Sayısı)						
	Trabzon (154)	Samsun (40)	Aksaray (10)	Bursa (47)	Kayseri (98)	Van (103)	Elazığ (53)
Antitüberküloz ilaçlar ^a (Toplam dirençli suş sayısı; yüzde ^b)	Dirençli Suş Sayısı (%)						
İNAH (67; 13.3)	17 (11)	4 (10)	3 (30)	10 (21.2)	17 (17.3)	13 (12.6)	3 (5.7)
RİF (67; 13.3)	14 (9)	2 (5)	3 (30)	10 (21.2)	12 (12.2)	18 (17.4)	8 (15)
SM (46; 9.1)	13 (8.4)	2 (5)	0	3 (6.4)	6 (6.1)	12 (11.6)	10 (18.8)
EMB (17; 3.4)	2 (1.3)	0	2 (20)	5 (10.6)	3 (3.1)	3 (2.9)	2 (3.8)
İNAH+RİF (40; 7.9)	12 (7.7)	2 (5)	2 (20)	3 (6.4)	6 (6.1)	11 (10.6)	4 (7.5)
İNAH+EMB (3; 0.6)	2 (1.3)					1 (0.97)	
SM+RİF (12; 2.4)	9 (5.8)						3 (5.7)
İNAH+SM (8; 1.6)					4 (4.1)		4 (7.5)
EMB+RİF (1; 0.2)				1 (2.1)			
İNAH+EMB+RİF (6; 1.2)			1 (10)	3 (6.4)			2 (3.8)
SM+EMB+RİF (2; 0.4)						2 (1.9)	
İNAH+SM+RİF (14; 2.8)	8 (5.2)	1 (2.5)		1 (2.1)		1 (1)	3 (5.7)
İNAH+SM+EMB (3; 0.6)					3 (3.1)		
İNAH+SM+EMB+RİF (4; 0.8)	1 (0.6)			1 (2.1)		1 (1)	1 (1.9)

^a İNAH: İzoniazid, RİF: Rifampisin, SM: Streptomisin, EMB: Etambutol.

^b Yüzdeleer toplam suş sayısına (505) göre alınmıştır.

göçlerle ÇİD-TB olgularının yayılması, hastane kaynaklı olguların gözlenmesi, primer ve sekonder ilaç dirençlerinin artması gibi nedenlerle tüberküloz kontrol programları başarısızlıkla sonuçlanmaktadır¹⁻⁵. Son yıllarda ÇİD-TB olgularının sayısındaki artış önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ancak tüberküloz duyarlılık testlerinin standardizasyonundaki güçlükler, ülkemizdeki gerçek ilaç direnç oranları konusunda kuşklar yaratmaktadır⁵. Tüm dünyada, özellikle ilk basamak ilaçlar olan izoniazid (İNAH) ve rifampisin (RİF) direnci büyük bir kaygı uyandırmaktadır. DSO'nün küresel TB programı verilerine göre, primer çoklu ilaç direnci tüm dünyada %1.3-16 arasında değişen oranlardadır⁴. Ancak bu oranlar, bireysel çalışmalarda farklı yöntemler kullanıldığı ve çalışılan alanlardaki seçilmiş gruplar oldukça değişken olduğundan dikkatli yorumlanmalıdır. Genellikle kazanılmış ilaç direnç (sekonder direnç) oranı, primer ilaç direncinden daha yüksektir. Örneğin en az iki ilaca (İNAH ve RİF) direnç oranı çeşitli ülkelerde %0-11 arasında değişirken, sekonder direnç Nepal'de %48, Hindistan'da %33 ve New York City'de %30 oranında bildirilmektedir¹. Direnç oranları, ülkeden ülkeye ve aynı ülke içerisinde farklı bölgelere göre farklılıklar göstermektedir (Tablo II)¹¹. Dünyada ÇİD-TB olgularının prevalansının yüksek olduğu ülkeler Çin, İran ve Eski Sovyetler Birliğinden ayrılan cumhuriyetlerdir¹.

Tablo II. Dünyanın Çeşitli Ülkelerinde Saptanan *M.tuberculosis* Direnç Oranları¹⁵

Ülke	Yıl	İNAH	RİF	SM	EMB	ÇİD-TB
Kanada	1997	4.1	0.1	2.3	0.3	1.1
Şili	1997	1.2	0.1	4.9	0	0.4
ABD	1997	4.4	0.4	3	0.5	1.2
Peru	1999	3.6	0.7	6.8	0.8	3
Belçika	1997	8.6	0.4	—	—	2
İngiltere	1997	2.9	0.1	3.6	0	0.8
İtalya	1999	2.9	0.9	5.3	0.4	1.2
İspanya	1998	1.9	0	1.3	0	0.3
Mozambik	1999	7.9	1.8	2.5	0	3.5
Uganda	1997	3.2	0.3	7	2.4	0.5
Çin	1999	2.7	1.6	3.7	0.2	4.5
İran	1998	2.7	0.9	4.2	0.3	5
Nepal	1999	1	0	3.8	0	1
Avusturalya	1996	7.2	0.1	2.4	0.1	2

İlaça dirençli TB olguları uygunsuz veya kısmi tedavi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Dirençli suşların artışı, tedavi başarısızlığına ve enfeksiyonun yayılımının artmasına yol açmaktadır. Duyarlı suşlarla oluşan enfeksiyonun tedavisinde %88-98 oranında başarı elde edilirken, ÇİD-TB olgularında iyileşme oranı düşük, mortalite oranı yüksektir^{3,5}. Sekonder ilaç direnci, güçlendirilmiş kontrol programları ve "direk gözetime dayalı tedavi stratejisi" (DOTS; Directly Observed Therapy Shortcourse) sonucunda azalmıştır.

Çalışmamızda, yedi farklı ildeki bölge TB laboratuvarlarından gönderilen *M.tuberculosis* suşlarının İNAH ve RİF direnci %13.3, SM direnci %9.1 ve EMB direnci %3.4 oranında saptanmış, en az iki ilaca dirençli (İNAH ve RİF) ÇİD-

TB oranı ise %7.9 olarak belirlenmiştir. İki majör ilaç olan İNAH ve RİF'e karşı tek tek saptanan yüksek direnç oranına (%13.3) paralel olarak ÇİD-TB oranı da yüksek bulunmuştur. Belirlediğimiz bu oranlar, ülkemiz için bildirilen oranlarla uyumludur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, ortalama primer direnç oranları İNAH için %9.1, RİF için %10.8, ÇİD-TB için ise %17.3 olarak verilmektedir¹². Çoban ve arkadaşları⁵, 50 *M.tuberculosis* suşunda yaptıkları çalışmada İNAH, EMB, RİF ve SM direnç oranlarını sırasıyla %6, %8, %4 ve %2 olarak rapor etmişlerdir. Yüce ve arkadaşlarının¹³ yaptığı çalışmada da, İNAH'a %9, RİF'e %27, SM'e %32 ve EMB'e %3 oranında direnç saptanmıştır. Baysal ve arkadaşları¹⁴ ise bu oranları sırasıyla %22, %66, %50 ve %12 olarak vermektedirler. Arseven ve arkadaşlarının¹⁵ çalışmasında, İNAH'a %29.6 ve SM'e %23.3 oranında direnç belirlenmiştir.

Çalışmamızda, İNAH, RİF, ETM ve SM'e direnç oranlarının bölgeler arasında belirgin farklılık gösterdiği izlenmiştir. Tüm majör antitüberküloz ilaçlar göz önüne alındığında en yüksek direnç oranları Bursa, Elazığ ve Van illerinde gözlenirken, en düşük direnç oranları Samsun ilinde gözlenmiştir. Sonuçlarımız, ülke çapında majör antitüberküloz ilaç sürveyansının DSÖ ve IUATA (Uluslararası Akciğer Hastalıkları ve Tüberkülozla Mücadele Derneği) önerileri doğrultusunda yapılmasının ne derece önemli olduğunu göstermektedir. Tüberkülozun tedavisinde birinci ve ikinci basamak ilaçların uygunsuz kullanımı hastalığın tedavisini başarısız kılacağı gibi, hastalığın yayılmasına da neden olacaktır. Bu nedenle tüberkülozlu olgularda "direk gözetime dayalı tedavi"nin önemli basamaklarından olan mikroskopik inceleme ve antitüberküloz ilaç duyarlılık tayini için bölge tüberküloz laboratuvarlarına gereken önemin verilmesi ve bu laboratuvarlar ile referans laboratuvarı arasındaki ulusal laboratuvar ağıının işleyişinin aktif hale getirilmesi gerektiği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Ostroff SM, Leduc JW. Global epidemiology of infectious diseases, pp: 67-175. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Disease. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye'de tüberküloz epidemiyolojisi ve kontrolü, s: 821-33. Uzun Ö, Ünal S (ed), Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları. 2001, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (eds). *Mycobacterium*, pp: 366-77. In: Medical Microbiology. 2002, 4th ed. Mosby Inc, USA.
4. World Health Organization (WHO). Tuberculosis fact sheet No. 104, revised March 2004. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en>.
5. Çoban AY, Saniç A, Eroğlu C, Günaydın M, Durupınar B. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküz ilaçlara duyarlılıkları. Mikrobiyol Bül 2000; 34: 279-84.
6. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Public Health Service, Centers for Disease Control, 1985. Atlanta, Georgia.
7. Caws M, Drobniewski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and detection of drug resistance. Ann N Y Acad Sci 2001; 953: 138-45.
8. Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (eds). Mycobacteria, pp: 893-952. In: The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 1997, 5th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.

9. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz Laboratuvar Rehberi, s: 45-60. 1998, 1.baskı. T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Ankara.
10. Canetti G, Rist N, Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. Rev Tuberc Pneumol (Paris) 1963; 27: 217-72.
11. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, et al: Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N Engl J Med 2001; 344: 1294-303.
12. Çalışır H. Tüberkülozda direnç sorunu ve dirençli tüberküloz tedavisi, s: 887-901. Uzun Ö, Ünal S (ed), Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları, Cilt 2. 2002, Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara.
13. Yüce A, Hatipoğlu O, Uçan ES ve ark. Tüberküloz ilaçlarına karşı primer direnç durumu. İnfeksiyon Derg 1994; 8: 95-8.
14. Baysal B, Şengil AZ, Saniç A, Özerol İH. Tüberküloz olgularında, basillerin isoniasid, streptomycin, ethambutol ve rifampicin'e duyarlılıkları. Ankem Derg 1990; 4: 311.
15. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y ve ark. Doğu Karadeniz Bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. Klimik Derg 1995; 8: 63-67.