

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS İZOLATLARININ PRİMER ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIKLARININ ÇİKOLATALI AGARDA SAPTANMASI: BİR ÖN ÇALIŞMA

SUSCEPTIBILITY TESTING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATES TO PRIMARY ANTITUBERCULOUS DRUGS ON CHOCOLATE AGAR: A PRELIMINARY STUDY

Ahmet Yılmaz ÇOBAN¹, Kemal BİLGİN¹, Alper AKGÜNEŞ², Belma DURUPINAR¹

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
(cobanay2003@yahoo.com.tr)

² Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Samsun.

ÖZET

Bu çalışmada, *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniazid (INH), rifampisin (RIF), streptomisin (STR) ve etambutol (ETM)'e karşı duyarlılıklarının saptanmasında, Middlebrook 7H10 agar yerine, daha ekonomik olması nedeniyle çikolatalı agarın kullanılması ve sonuçların BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) sisteminin sonuçları referans kabul edilerek karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 25 *M. tuberculosis* klinik izolatı alınmış ve malaşit yeşili eklenmiş çikolatalı agarda duyarlılık yöntemi, NCCLS'nin önerdiği proporsiyon yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Çalışmamızda, çikolatalı agarda elde edilen sonuçlarla BACTEC 460 TB sisteminin sonuçları karşılaştırıldığında, her iki yöntem arasındaki uyum INH ve RIF için %88, STR için %84, ETM için %72 olarak saptanmıştır. Çikolatalı agarda duyarlılık yönteminin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla; INH için %82.3, %100, %72.7, %100; RIF için %78.5, %100, %78.5, %100; STR için %83.3, %84.2, %94.1, %62.5; ETM için %25, %94.1, %72.7, %66.6 olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlarda sonuçlar 21. günde elde edilmiştir. Sonuç olarak bu ön çalışma, *M. tuberculosis*'in duyarlılık testi için çikolatalı agarın kullanılabilirliğini düşündürmekle birlikte, daha fazla izolatla ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, antitüberküloz ilaç, çikolatalı agar, duyarlılık testi.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of chocolate agar as an alternative medium instead of Middlebrook 7H10 agar, for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains against isoniazid (INH), rifampicin (RIF), streptomycin (STR) and ethambutol (ETM). The susceptibility results obtained by chocolate agar were compared with the results of BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) system which was accepted as the reference method. A total of 25 *M. tuberculosis* clinical iso-

lates were included to the study and susceptibility testing was performed on malachite green added-chocolate agar with some modifications of proportion method recommended by NCCLS. In our study when comparing the results obtained by chocolate agar with the results of BACTEC 460 TB system, the concordance rates for INH, STR, RIF and ETM were found as 88%, 88%, 84% and 72%, respectively. The specificity, sensitivity, positive and negative predictive values of susceptibility testing on chocolate agar have been detected as 82.3%, 100%, 72.7% and 100% for INH; 78.5%, 100%, 78.5% and 100% for RIF; 83.3%, 84.2%, 94.1% and 62.5% for STR; 25%, 94.1%, 72.7% and 66.6% for ETM, respectively. The results of the susceptibility testing performed on chocolate agar were obtained on the 21st day of incubation for all isolates. In conclusion, the data from our study suggested that chocolate agar can be used as an alternative medium for the susceptibility testing of *M. tuberculosis*, however, further studies with more isolates are needed for the standardisation of the method.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosis drugs, chocolate agar, susceptibility testing.

GİRİŞ

Günümüzde hâlâ ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam eden tüberküloz ile mücadelede, etkenin hızla saptanarak antibiyotik duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi en önemli basamaktır. Bu basamak, çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olgularının yayılımını önlemede önemli bir yere sahiptir¹⁻⁴. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının anti-tüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının araştırılması amacıyla çeşitli yöntemler ve farklı besiyerleri denenmektedir. Drancourt ve arkadaşları⁵, *M. tuberculosis* suşlarının kanlı agar-da 1-2 hafta içinde pigmentsiz, R tipi, küçük koloniler oluşturdıklarını göstermiştir. Çoban ve arkadaşları⁶ ise ilk kez, proporsiyon yönteminde Middlebrook 7H10 agar yerine kanlı agar kullanarak *M. tuberculosis* izolatlarının izoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) duyarlılıklarında güvenli sonuçların alınabileceğini bildirmiştir.

Bu çalışmada, malaşit yeşili eklenmiş çikolatalı ağarda proporsiyon yöntemi ile, klinik *M. tuberculosis* izolatlarının INH, RIF, streptomisin (STR) ve etambutol (ETM)'e duyarlılıkları saptanarak, BACTEC 460 TB sisteminin sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Samsun Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda klinik örneklerden izole edilen 25 *M. tuberculosis* suşu dahil edildi. Çalışmada Sigma'dan satın alınan INH, RIF STR ve ETM kullanıldı. INH, STR ve ETM distile su, RIF metanol ile belirli oranlarda çözülerek stok solüsyonlar hazırlandı. INH, STR ve ETM filtre ile steril edildi ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Çikolatalı agar, "Blood Agar Based Medium" (Oxoid, İngiltere) kullanılarak üretici firmanın tarifine göre hazırlandı. Zengin bir besiyeri olan çikolatalı ağarda kontaminasyon riskinin yüksek olduğu dikkate alınarak, besiyerine kontaminasyonu engellemek için Middlebrook 7H10 agar için tavsiye edilen oranda (%0.0025) malaşit yeşili (Merck, Almanya) eklendi. İlaç son konsantrasyonları; INH için 0.2 µg/mL, RIF için 1 µg/mL, STR için 2 µg/mL ve ETM için 5 µg/mL^{6,7} olarak hazırlanan çikolatalı agar, kapaklı tüplere yaklaşık 5 mL olacak şekilde dağıtıldı ve yatık olarak katılaşmaya bırakıldı. Bunlara ek olarak, herhangi bir antibiyotik içermeyen malaşit yeşilli çikolatalı agar kontrol besiyeri olarak hazırlandı. Hazırlanan besiyerleri katılaştıktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları BACTEC 460 TB sistemi ile tespit edildi. Çikolatalı agarda duyarlılık yöntemi NCCLS'in önerdiği proporsiyon yöntemi modifiye edilerek yapıldı⁷. Modifikasyonun temelini, Middlebrook 7H10 agar yerine malaşit yeşili eklenmiş çikolatalı agarın kullanılması oluşturmaktaydı.

Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde yeni üremiş *M. tuberculosis* suşlarına ait koloniler alınarak, 3-4 mL 7H9 buyyon ve dört-beş steril cam boncuk içeren falkon tüplerine aktarıldı. Koloniler vortekslenerek homojen hale getirildi. Oluşan süpernatant 1 McFarland'a ayarlandı ve 7H9 buyyon ile 100 kat sulandırılarak her suş için inokulum hazırlandı. İnokulümlerden 100'er µl, antibiyotik içeren ve içermeyen (kontrol) çikolatalı agar besiyerlerine ekildi. Besiyerleri 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İlk hafta kontaminasyon kontrolü için iki günde bir kontrol edildi. Daha sonra 14. ve 21. günlerdeki üremelere bakılarak sonuçlar kaydedildi. İlaçlı besiyerindeki koloni sayısının, ilaç içermeyen besiyerindeki koloni sayısına oranı %1'den büyük olduğunda, izolat dirençli olarak rapor edildi^{6,7}.

BULGULAR

Çalışmamızda, çikolatalı agarda elde edilen sonuçlarla BACTEC 460 TB sisteminin sonuçlarının karşılaştırılması Tablo I'de sunulmuştur. Toplam 25 suşun hiçbirinde 14. günde üreme görülmezken, 21. günde tüm suşlardan sonuç alınmıştır. BACTEC 460 TB sisteminin sonuçları referans kabul edildiğinde, çikolatalı agarda her antibiyotik için elde edilen sonuçların uyumu Tablo I'de; çikolatalı agarda antitüberküloz duyarlılık yönteminin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise Tablo II'de görülmektedir.

Tablo I. *M. tuberculosis* İzolatları ile Çikolatalı Agar ve BACTEC 460 TB Sisteminde Alınan Sonuçların Karşılaştırılması (n= 25)

Antitüberküloz ilaç	Çikolatalı agar sonuçları	BACTEC 460 TB sistemi sonuçları		Uyum (%)
		Dirençli	Duyarlı	
INH	Dirençli	14	0	88
	Duyarlı	3	8	
RIF	Dirençli	11	0	88
	Duyarlı	3	11	
STR	Dirençli	5	3	84
	Duyarlı	1	16	
ETM	Dirençli	2	1	72
	Duyarlı	6	16	

INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin, STR: Streptomisin, ETM: Etambutol.

Tablo II. Çikolatalı Agarda Antitüberküloz Duyarlılık Yönteminin Validite Değerleri

İlaç	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	PPV (%)	NPV (%)
INH	82.3	100	72.7	100
RIF	78.5	100	78.5	100
STR	83.3	84.2	94.1	62.5
ETM	25	94.1	72.7	66.6

INH: İzoniazid, RIF: Rifampisin, STR: Streptomisin, ETM: Etambutol, PPV: Pozitif prediktif değer, NPV: Negatif prediktif değer.

TARTIŞMA

Günümüzde *M. tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının belirlenmesinde, Middlebrook 7H10 agarda proporsiyon metodu, BACTEC 460 TB sistemi ve MGIT 960 yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Bunlardan BACTEC 460 TB ve MGIT 960 sistemleri hızlı yöntemler olmakla birlikte, pahalı olmaları dezavantaj oluşturmaktadır. Middlebrook 7H10 agarda proporsiyon metodu, BACTEC 460 TB ve MGIT 960 sistemlerine göre daha ekonomiktir; ancak sonuç alma süresi diğerlerinden daha uzun olmaktadır¹⁻⁴. Bu sebeplerden dolayı *M. tuberculosis*'in ucuz ve kolay elde edilebilir besiyerlerinde üretilmesi ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çikolatalı agar da, ucuz ve kolay elde edilebilir bir besiyeri olduğu için birçok laboratuvar da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kılıçturgay ve arkadaşları⁸ ile Arvand ve arkadaşlarının⁹ yaptıkları çalışmalarda, *M. tuberculosis*'in kanlı agarda ürettiği gösterilmiştir. Çoban ve arkadaşları⁶ da çalışmalarında, kanlı agarı INH ve RIF duyarlılığını belirlemede kullanmış ve INH için özgülülüğü %71.4, duyarlılığı %100, RIF için ise duyarlılık ve özgülülüğü %100 olarak tespit etmiştir. Çoban ve arkadaşlarının¹⁰ yapmış oldukları başka bir çalışmada, INH, RIF, STR ve ETM'nin duyarlılığı kanlı agarda araştırılmış ve uyum oranı INH için %91.1, STR için %97, RIF ve ETM için ise %100 olarak saptanmıştır. Yine bu çalışmada suşların çoğunun (22/34) sonuçları 14. günde elde edilmiştir¹⁰. Çoban ve arkadaşları¹¹ konu ile ilgili diğer çalışmalarında, 50 *M. tuberculosis* klinik izolatının duyarlılığını kanlı agar kullanarak araştırmışlar, INH ve RIF için %100, STR için %92, ETM için %96 uyum bulmuşlardır. Araştırmacılar bu çalışmada da sonuçlarını 14. günde elde ettiklerini belirtmişlerdir¹¹.

Sunulan bu ön çalışmada, *M. tuberculosis* klinik izolatlarının duyarlılığı çikolatalı agar kullanılarak araştırılmış ve alınan sonuçların BACTEC 460 TB sistemi ile uyum oranları INH ve RIF için %88, STR için %84, ETM için %72 olarak saptanmıştır (Tablo I). Çalışmamızda özgülülük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla; INH için %82.3, %100, %72.7, %100; RIF için %78.5, %100, %78.5, %100; STR için %83.3, %84.2, %94.1, %62.5, ETM için %25, %94.1, %72.7, %66.6 olarak belirlenmiştir (Tablo II). Tüm izolatlar için sonuçlar 21. günde elde edilmiştir. Sonuç olarak, *M. tuberculosis* suşlarının antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde, çikolatalı agar alternatif ve ekonomik bir besiyeri olarak kullanılabilir görünmekle birlikte, konu ile ilgili daha çok sayıda izolatın araştırıldığı geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Coban AY, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by the broth microdilution method with 7H9 broth. Mem Ins Oswaldo Cruz 2004; 99: 111-3.
2. Coban AY, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. Int J Antimicrob Agents 2004; 24: 106-8.
3. De Logu A, Uda P, Pellerano ML, Pusceddu MC, Saddi B, Schivo ML. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid, and streptomycin in liquid medium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 33-9.
4. De Logu A, Pellerano ML, Sanna A, Pusceddu MC, Uda P, Saddi B. Comparison of the susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by the XTT colorimetric method and the NCCLS standards method. Int J Antimicrob Agents 2003; 21: 244-50.

5. Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, Raoult D. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. J Clin Microbiol 2003; 41: 1710-1.
6. Coban AY, Bilgin K, Uzun M, et al. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin on blood agar. J Clin Microbiol 2005; 43: 1930-1.
7. National Commmittee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and Other Aerobic *Actinomycetes*. Approved Standard, Document M24-A. 2003. NCCLS, Wayne, Pa.
8. Kilicturgay K, Gumrukcu E, Tubluk F, Sağlam M. The results in our tuberculosis laboratory with penicillin blood agar medium. Mikrobiyol Bul 1977; 11: 29-33.
9. Arvand M, Mielke ME, Weinke T, Regnath T, Hanh H. Primary isolation of *Mycobacterium tuberculosis* on blood agar during the diagnostic process for cat scratch disease. Infection 1998; 26: 254.
10. Coban AY, Darka Ö, Fişgin NT, et al. *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinin primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının kanlı agarda saptanması. Enfeksiyon Derg 2005; 19: 211-4.
11. Coban AY, Cihan CC, Bilgin K, et al. Blood agar for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first-line drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 450-3.