

MANİSA BÖLGESİNDE PİRAZİNAMİD-MONOREZİSTAN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

PYRAZINAMIDE MONORESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN MANISA REGION, TURKEY

Nuri ÖZKÜTÜK¹, Talat ECEMİŞ¹, Süheyla SÜRÜCÜOĞLU¹

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.
(nozcutuk@hotmail.com)

ÖZET

Pirazinamid (PZA), tüberkülozun tedavisinde kullanılan primer ilaçlardan biridir. *Mycobacterium tuberculosis*'in PZA direncini belirlemede BACTEC 460TB yöntemi referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin klasik duyarlılık yöntemlerine göre daha pahalı olması nedeniyle, PZA'nın duyarlılık testi yapılacak primer ilaçlar paneline alınıp alınmamasına, her toplum kendi koşullarına göre karar vermedir. Bu kararda göz önünde bulundurulması gereken en önemli faktör, toplumdaki PZA direnç oranı, özellikle de PZA monorezistans oranıdır. Bu çalışmada bölgemizde izole edilen *M. tuberculosis* kompleks (MTBC) klinik izolatlarında PZA monorezistans oranının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Manisa bölgesinden izole edilen, rifampisin, etambutol, izoniazid ve streptomisine duyarlı 109 MTBC suşunun PZA'ya karşı duyarlılıkları BACTEC 460TB (Becton Dickinson, MD) test yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, PZA dışındaki tüm primer ilaçlara duyarlı olan 109 MTBC izolatının 2 (%1.8)'sinde PZA'ya direnç saptanmıştır. Pirazinamid-monorezistans izolatlarından birinin *M. bovis* değerinin ise *M. tuberculosis* olduğu moleküler yöntemle (Genotype MTBC, Hain Lifescience, Germany) belirlenmiştir. Sonuç olarak, bölgemizde PZA monorezistansının düşük düzeyde olması nedeniyle, PZA'nın primer duyarlılık test paneline eklenmesine gerek olmadığı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, pirazinamid, ilaç direnci, monorezistans, Manisa.

ABSTRACT

Pyrazinamide (PZA) is a primary antituberculous drug. BACTEC 460TB is the recommended reference method for the detection of PZA resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. This method is more expensive than the conventional susceptibility methods and therefore, it is recommended that each laboratory should establish their own protocol for the inclusion of PZA in the panel of primary drugs tested.

* Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (No: 2006/TİP/071).

One of the most important factors that help this decision is the prevalence of PZA resistance, particularly PZA monoresistance in the related community. The aim of the present study was to determine the extent of PZA monoresistance in *M. tuberculosis* complex (MTBC) isolates in our region. In this study, PZA susceptibility testing of 109 MTBC strains (susceptible to isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin) isolated from Manisa province in the Aegean region of Turkey was performed by using the BACTEC 460TB radiometric system (Becton Dickinson, MD). Two (1.8%) of the 109 isolates which were susceptible to all primary drugs revealed monoresistance against PZA. One of the PZA-monoresistant isolates has been identified as *M. bovis* and the other as *M. tuberculosis* by molecular method (Genotype MTBC, Hain Lifescience, Germany). The results of our study indicated that since the rate of PZA monoresistance was low, susceptibility testing of a panel of primary drugs without PZA may be an economical alternative in our region.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, pyrazinamide, drug resistance, monoresistance, Turkey.

GİRİŞ

Önemli bir halk sağlığı sorunu olma özelliğini koruyan tüberküloz (TB) ile savaşta en etkili yol, hastaların erken saptanması ve etkili tedavisi ile bulaş zincirinin kırılmasıdır. Ancak artan ilaç direnci, etkin tedaviyi zorlaştırmaktadır¹. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün gelişmekte olan ülkelerde uyguladığı "Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DOTS)"nin çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) prevalansının yüksek olduğu bölgelerde başarısız olduğu görülmüştür². Bunun üzerine uygulanmaya başlanan DOTS-plus'da standart ilaç tedavisi yerine, antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre tedavinin düzenlenmesi önerilmiştir. Ayrıca, "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" da, her hastadan izole edilen ilk *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) izolatına primer antitüberküloz ilaçlar için duyarlılık testi yapılmasını ve örnek laboratuvara kabul edildikten sonra 30 gün içinde duyarlılık sonuçlarının rapor edilmesini önermektedir²⁻⁵.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan primer ilaçlardan olan pirazinamid (PZA), "Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI)" tarafından duyarlılık testinde ilk çalışılması gereken antitüberküloz ilaçlar arasında bildirilmektedir⁵. PZA düşük pH'da (pH= 5.5) aktif bir ilaçtır. Antitüberküloz ilaçların duyarlılık testinde referans yöntem olarak kullanılan agar proporsiyon yöntemi ile besiyerinin pH'sını hem mikobakterilerin üreyebileceği, hem de PZA'nın aktivitesini gösterebileceği bir düzeyde tutmak zor olmaktadır. CLSI, PZA'ya karşı MTBC izolatlarının duyarlılığını belirlemede, ticari BACTEC 460TB duyarlılık test yöntemini referans yöntem olarak kabul etmiştir. Ancak bu yöntem, agar proporsiyona göre daha pahalı bir yöntemdir^{5,6}. Üstelik BACTEC 460TB yönteminde de PZA diğer ilaçlardan farklı malzeme ve işlem gerektirmekte, bu durum da maliyeti ve iş yükünü daha da artırmaktadır. Bu nedenlerle ülkemizde çoğu tüberküloz laboratuvarında PZA'ya karşı duyarlılık testi uygulanmamaktadır.

ABD'deki tedavi rejimleri ve direnç oranları göz önüne alınarak CLSI, MTBC izolatları için duyarlılık testinde kullanılacak primer ilaçları; izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB) ve PZA olarak önermiş, streptomisin (SM) ise sekonder ilaçlar grubuna dahil edilmiştir. Buna karşın her toplumun kendi koşullarına göre, enfeksiyon ve göğüs hastalıkları uzmanlarının da görüşü alınarak, çalışılacak primer ilaç panelini belirlemesi ge-

rektiği de vurgulanmıştır. Laboratuvar sorumluları duyarlılık testi yapılacak primer ilaç paneline karar verirken; hizmet verilen hasta grubu, uygulanan ilaç rejimleri, toplumdaki ilaç direncinin prevalansı ve ilaç direnci görüldüğünde uygulanacak ek testlerin gerektirdiği süre gibi çeşitli faktörleri göz önünde bulundurulmalıdır. Örnek olarak, PZA monorezistansının (tek başına PZA direnci) nadir olduğu toplumlarda PZA'nın primer ilaçlar içine dahil edilmemesinin ekonomik bir alternatif olabileceği bildirilmektedir^{5,7}.

Ülkemizde rutin tüberküloz laboratuvarlarında PZA için duyarlılık testi yapılmadığından, ülkemiz ve bölgemiz için MTBC izolatlarının PZA'ya direnç oranlarını yansıtan veriler yetersizdir. Bu nedenle PZA'nın duyarlılık testi yapılacak primer ilaçlar paneline alınıp alınmayacağına sağlıklı karar vermek zordur. Bu çalışmada Manisa ve çevresinden izole edilen MTBC izolatları arasında PZA monorezistansı oranının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, 1 Ocak 2004-31 Aralık 2007 tarihleri arasında, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikobakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen farklı hastaların klinik örneklerinden izole edilen, PZA dışında tüm primer antitüberküloz ilaçlara (SM, INH, RIF, EMB) duyarlı 109 MTBC izolatı test edildi. Çalışmaya alınan tüm izolatlar, daha önce tanımlanan ve PZA dışındaki diğer primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıkları saptanarak -70°C'de kültür koleksiyonu olarak saklanan suşlardı. İzolatların MTBC olarak tanımlanmasında, BACTEC 460TB NAP testi (Becton Dickinson, Sparks, MD), ayrıca gerektiğinde genotipik yöntem (Genotype *Mycobacterium* CM, Hain Lifescience, Germany) ve konvansiyonel biyokimyasal yöntemler kullanılmıştı. Suşların tüm primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılıkları BACTEC 460TB radyometrik kültür sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD) ile saptanmıştı^{6,8}.

Çalışmada kontrol suşu olarak *M.tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) (PZA duyarlı) ve *M.bovis* BCG (PZA dirençli) suşları kullanıldı. MTBC izolatlarının PZA duyarlılıkları, CLSI tarafından standart yöntem olarak kabul edilen, BACTEC 460TB duyarlılık test yöntemi kullanılarak saptandı. Duyarlılık testi, üretici firmanın önerilerine göre ve 100.0 µg/ml PZA kritik konsantrasyonu kullanılarak uygulandı^{6,8}.

BULGULAR

Çalışmamızda, PZA dışındaki tüm primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı olan 109 MTBC izolatından 2 (%1.8)'sinin PZA'ya dirençli olduğu (PZA-monorezistan), diğer 107 (%98.2) izolatın ise PZA'ya duyarlı olduğu belirlenmiştir. PZA monorezistansı saptanan bu 2 izolat geriye dönük olarak incelendiğinde, birinin *M.bovis*, diğerinin ise *M.tuberculosis* olduğu genetik (Genotype MTBC, Hain Lifescience, Germany) olarak doğrulanmıştır.

TARTIŞMA

PZA, güçlü bakterisidal etkisi ve etkisini hem çoğalmakta hem de yarı-uykuda olan basillere göstermesi nedeniyle tüberküloz tedavisinde kullanılan önemli bir primer ilaçtır. CLSI, her hastadan izole edilen ilk MTBC izolatının, primer ilaç paneli olarak INH, RIF ve EMB ile birlikte PZA için de duyarlılık testinin yapılmasını önermiştir. Bu öneri-

lere göre test edilen izolat RIF'a veya diğer primer ilaçlardan en az ikisine dirençli ise, sekonder ilaçlara karşı da duyarlılık testinin yapılması gerekmektedir. Ancak laboratuvarlar, kendi koşullarına göre test edilecek primer ilaç panelini değiştirebilir. Örneğin; PZA duyarlılığını belirlemek için önerilen BACTEC 460TB yöntemi hızlı ama pahalı bir ticari kültür sistemidir. Bu yüzden tek başına PZA direncinin görülmediği veya nadir görüldüğü toplumlarda, PZA'yı test edilecek primer ilaçlar panelinden çıkarmanın ekonomik bir alternatif olacağı düşünülmektedir^{5,7}.

Bu çalışmada, Manisa bölgesinde farklı hastalardan izole edilen ve PZA dışındaki tüm primer antitüberküloz ilaçlara duyarlı 109 MTBC klinik izolatının PZA duyarlılık testi yapılmış ve 107 (%98.2)'sinin PZA-duyarlı, 2 (%1.8)'sinin ise PZA-dirençli (PZA-monorezistan) olduğu görülmüştür. Ülkemizdeki ve diğer birçok ülkedeki tüberküloz laboratuvarları, maliyet ve teknik problemler nedeniyle rutin olarak PZA duyarlılık testini uygulamamaktadır^{9,10}. Bu nedenle ülkemizdeki PZA-monorezistans oranları ile ilgili veriler yetersizdir. Yolsal ve arkadaşlarının¹¹ yaptığı bir meta-analizde, ülkemizde PZA direnç oranının 1984-1989 yılları arasındaki çalışmalara göre %1.6, 1990-1995 yılları arasında ise %6.5 olduğu belirtilmektedir. Ancak bu direnç oranları PZA monorezistansı olmayıp, tüm izolatlar içindeki PZA direnç oranlarıdır. Karadağ ve arkadaşları¹² Samsun bölgesinden izole edilen 50 MTBC izolatının sadece 1 (%2)'inde PZA direnci saptamışlar, ancak bu izolatın aynı zamanda INH'ye de dirençli olduğu görülmüştür. Farklı ülkelerden bildirilen çalışmalarda; Louw ve arkadaşları¹³ Güney Afrikada %2.1, Heffenan ve arkadaşları¹⁴ Yeni Zelanda'da %4.1, Cheng ve arkadaşları⁹ ise Kanada'da %2.8 PZA-monorezistansı bildirmişlerdir. Manisa bölgesindeki %1.8'lik düşük PZA monorezistansı, bölgemizde PZA'nın test edilecek primer ilaçlar panelinden çıkartılabileceğini düşündürmektedir.

MTBC kompleks üyeleri içinde *M.bovis* PZA'ya karşı intrensek dirençlidir, ancak günümüzde nadiren insanda hastalığa neden olmaktadır. *M.tuberculosis*'de ise PZA-monorezistansı nadirdir^{15,16}. Bu çalışmada PZA-monorezistansı saptanan iki izolat geriye dönük olarak değerlendirildiğinde, birinin *M.bovis*, diğerinin ise *M.tuberculosis* suşu olarak moleküler yöntemle tanımlandığı görülmüştür. *M.bovis*'in balgam örneğinden, *M.tuberculosis*'in ise plevral sıvı örneğinden izole edildiği belirlenmiştir. PZA duyarlılık testi ile PZA-monorezistansını belirlemenin, *M.bovis* türü için bir belirteç olarak kullanılmasının uygun olmayacağı bazı çalışmacılar¹⁶ tarafından belirtilmektedir ve çalışmamızın sonuçları da bu veriyi doğrular niteliktedir.

Günümüzde tüberkülozun tedavi ve kontrolündeki başarısızlıkların en önemli nedenlerinden biri ÇİD-TB'dir¹⁷. ÇİD-TB'nin tedavi rejiminde sekonder ilaçlarla birlikte PZA da kullanılmaktadır¹⁸⁻²⁰. Ancak ÇİD-TB olgularında PZA direncinin çok daha sık görüldüğü bildirilmektedir^{13,21}. Güney Afrika'da 127 ÇİD-TB olgusunun 68 (%53.5)'inin PZA'ya karşı dirençli olduğu saptanmış ve PZA direnci ile ÇİD-TB arasında sıkı bir ilişki olduğu vurgulanmıştır¹³. Bu nedenle, izolatın çok ilaca dirençli olduğu saptandığında PZA duyarlılık testinin yapılması uygun tedavinin seçiminde yol gösterici olacaktır.

Sonuç olarak, Manisa bölgesinde PZA monorezistansının düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu nedenle bölgemizde duyarlılık testinde uygulanacak primer ilaç paneline PZA'yı dahil etmenin iş yükü ve ekonomik faktörler de göz önüne alındığında gereksiz olacağı düşünülmüştür. Benzer çalışmaların diğer bölgelerde ve daha fazla suş sayısı ile tekrarlanarak PZA direnç oranlarının belirlenmesi ile ülke çapında bir duyarlılık testi politikası geliştirmenin mümkün olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. World Health Organization, Geneva. WHO/HTM/TB/2007, 376.
2. 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. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993; 42 (RR-7): 1-8.
3. Walton D, Farmer P. The new white plague. JAMA 2000; 284: 2789.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Controlling Tuberculosis in the United States. Recommendations from the American Thoracic Society, CDC, and the Infectious Diseases Society of America. Morb Mortal Wkly Rep 2005; 54 (RR-12): 1-81.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes. Approved Standard, CLSI/NCCLS Document M24-A, 2003. Wayne, PA.
6. Della-Latta P. Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, pp: 7.7.1-7.8.5. In: Isenberg HD (ed-in-chief), Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2004, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
7. Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis 2000; 31: 209-11.
8. Siddiqi SH. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual. 1996. Becton Dickinson and Company, Maryland, USA.
9. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 528-32.
10. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*'de direnç sorunu. Ankem Derg 2005; 19: 107-10.
11. Yolsal N, Malat G, Dişçi R, Örkün M, Kılıçaslan Z. Türkiye'de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-analiz. Klimik Derg 1998; 11: 6-9.
12. Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, Sünbül M, Günaydın M, Saniç A. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz basili kompleksinin majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Ankem Derg 2004; 18: 189-92.
13. Louw GE, Warren RM, Donald PR, et al. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 802-7.
14. Heffernan H. Antituberculosis drug resistance in New Zealand. Antibiotic Reference Laboratory Communicable Disease Group ESR, 2006, Porirua.
15. Inderlied CB, Pfyffer GE. Susceptibility test methods: mycobacteria, pp: 1149-77. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington DC.
16. Hannan MM, Desmond EP, Morlock GP, Mazurek GH, Crawford JT. Pyrazinamide-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. J Clin Microbiol 2001; 39: 647-50.
17. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No: 3. 2004, Geneva.
18. American Thoracic Society Documents. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/ Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167: 603-62.

19. World Health Organization. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. 1997. WHO, Geneva.
20. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı, 2003. Sağlık Bakanlığı, Verem Savaş Daire Başkanlığı, Ankara.
21. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, et al. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2317-9.