

Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarında İkinci Basamak Antitüberküloz İlaç Duyarlılıklarının E-Test Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Evaluation of Second-Line Antituberculosis Drug Susceptibilities of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by E-Test Method

Hülya ŞİMŞEK¹, Gülnur TARHAN², Salih CESUR³

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

¹ Public Health Agency of Turkey, Tuberculosis Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

² Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman.

² Adıyaman University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adıyaman, Turkey.

³ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

³ Ankara Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinic, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 17.07.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 15.12.2014

ÖZ

Çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz (TB), etkin bir TB tedavisini dünya genelinde kısıtlamaktadır. Hastaların erken tanı konularak uygun şekilde tedavi edilmeleri, ÇİD-TB kontrolünde en etkili stratejidir. Bu nedenle, ÇİD-TB klinik izolatlarının ilaç direnç profillerinin bilinmesi, hastalarda uygun tedavi rejiminin planlanması açısından gereklidir. Bu çalışmada, ÇİD-TB izolatlarının E-test yöntemiyle ikinci basamak anti-TB ilaçlara direnç durumunun belirlenmesi ve elde edilen sonuçların Löwenstein-Jensen (LJ) proporsiyon yöntemiyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, akciğer TB'lu hastalara ait örneklerden izole edilen ÇİD (rifampisin ve izoniyazide dirençli) 122 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) suşu dahil edilmiştir. İzolatlar konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış ve birinci basamak anti-TB ilaç duyarlılık testleri LJ besiyerinde proporsiyon yöntemiyle uygulanmıştır. İzolatların ikinci basamak anti-TB ilaçlara [kanamisin (KN), ofloksasin (OFL), etiyonamid (ETN) ve linezolid (LIN)] karşı duyarlılıkları, LJ besiyerinde proporsiyon ve Middlebrook 7H11 besiyerinde E-test yöntemleri ile araştırılmıştır. Bu amaçla KN (0.016-256 mg/ml), OFL (0.02-32 mg/ml), ETN (0.016-256 mg/ml) ve LIN (0.016-256 mg/ml) E-test şeritleri (bioMerieux, Fransa) kullanılmış; duyarlılık testleri, E-test şeritleri uygulandıktan sonra 5., 7. ve 10. günlerde, LJ agarda yapılan proporsiyon yönteminde ise 28 gün sonra değerlendirilmiştir. İkinci basamak

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Salih Cesur, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 06340, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 595 3000, **E-posta (E-mail):** scesur89@yahoo.com

anti-TB ilaç duyarlılık sonuçları, E-test yöntemiyle 5-10 gün içerisinde elde edilmiş; ÇİD MTC izolatlarının %98 (119/122)'i KN, OFL ve LIN'a duyarlı bulunurken, %2 (3/122)'sinin KN ve ETN'ye dirençli olduğu belirlenmiştir. E-test ve LJ proporsiyon yöntemleri arasındaki korelasyon sırasıyla, KN ve ETN için %96, OFL için %98, LIN içinse %100 olarak saptanmıştır. LJ proporsiyon yöntemiyle karşılaştırıldığında, E-test yönteminin KN, OFL, ETN ve LIN duyarlılığını saptamadaki özgüllüğü sırasıyla, %60, %38, %60 ve %100; duyarlılığı ise tüm ilaçlar için %100 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızın verileri, LIN için yüksek duyarlılık (%100) ve özgüllük (%100) gösteren E-test yönteminin, bu ilaca karşı duyarlılık testlerinde tek başına kullanılabileceğini, ancak OFL için özgüllüğünün düşük olması (%38) nedeniyle proporsiyon yöntemiyle birlikte kullanılmasının uygun olacağını düşündürmüştür. Sonuç olarak E-test yöntemi ile alınacak hızlı sonuçlar, ÇİD-TB olgularında erken ve etkili bir anti-TB ilaç tedavisinin başlanmasına ve enfeksiyon kontrolüne olumlu katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Çok ilaca dirençli tüberküloz; ikinci basamak antitüberküloz ilaç; direnç; E-test; Löwenstein-Jensen proporsiyon yöntemi.

ABSTRACT

Multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB) constitutes a restricting factor for the effective treatment of TB worldwide. Early diagnosis and appropriate treatment of patients are the most effective strategy in the control of MDR-TB. Therefore, knowledge of drug resistance patterns of the MDR-TB clinical isolates are necessary in planning of an appropriate treatment regimen for the patient. The aims of this study were to detect the susceptibilities of MDR-TB isolates to second-line anti-TB drugs by E-test method, and to compare their results with Löwenstein-Jensen (LJ) proportion method. A total of 122 MDR (resistant to isoniazid and rifampicin) *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) strains isolated from samples of patients with pulmonary TB were included in the study. The isolates were identified by conventional methods and first-line anti-TB drug susceptibility testing was performed by the proportion method using LJ medium. The susceptibilities of the isolates to second-line anti-TB drugs [kanamycin (KN), ofloxacin (OFL), ethionamid (ETN), linezolid (LIN)] were tested by proportion method on LJ medium and E-test method on Middlebrook 7H11 medium. For this purpose, E-test strips (bioMerieux, Fransa) of KN (0.016-256 mg/ml), OFL (0.02-32 mg/ml), ETN (0.016-256 mg/ml), and LIN (0.016-256 mg/ml) were used. The susceptibility tests were evaluated in 5., 7., and 10. days after application of the E-test strips, and proportion method on LJ medium was evaluated 28 days later. Second line-anti-TB drug susceptibility results were obtained in 5 to 10 days by E-test. Of the MDR MTC strains 98% (119/122) were susceptible to KN, OFL and LIN, while 2% (3/122) of the strains were resistant to KN and ETN. The correlation between E-test and LJ proportion method was estimated as 96% for KN and ETN, 98% for OFL, and 100% for LIN. When compared with LJ proportion method, the specificity of E-test in the detection of susceptibility to KN, OFL, ETN and LIN were 60%, 38%, 60%, and 100%, respectively, while the sensitivity was 100% for all drugs. Our results indicated that E-test method exhibited high sensitivity and specificity (100%) for LIN, so it may be used alone in susceptibility testing for this drug, however since the specificity is low (38%) for OFL it should be used together with the proportion method. In conclusion, E-test method might contribute for initiation of an early and effective anti-TB drug treatment and control of infection by rapid diagnosis in MDR-TB cases.

Keywords: Multi-drug resistant tuberculosis; second-line antituberculosis drugs; resistance; E-test; Löwenstein-Jensen proportion method.

GİRİŞ

Çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz (TB) olguları ve tedavileri tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunudur¹⁻⁵. ÇİD-TB, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

(MTC) izolatlarının birinci basamak (majör) antitüberküloz (anti-TB) ilaçlardan olan izoniazid ve rifampisine birlikte dirençli olması olarak tanımlanır. ÇİD-TB olgularında, tedaviye ikinci basamak (minör) anti-TB ilaçların eklenmesi ve daha uzun süreli tedavi gerekir. Gerek tedaviye toksik etkileri daha fazla olan ikinci basamak anti-TB ilaçların eklenmesi, gerekse tedavi süresinin daha uzun olması, hem hastalarda daha fazla yan etki oluşmakta, hem de hasta uyumunu olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle ÇİD-TB olgularında tedavi başarısı düşük, kullanılan ilaçlardan dolayı ise tedavi maliyeti yüksektir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), yeni olguların %3.7'sinde, önceden tedavi görmüş olguların ise %20'sinde ÇİD-TB olduğunu bildirmektedir. DSÖ'nün raporuna göre, Doğu Avrupa ve Orta Asya ülkelerinde yeni tanı almış olgularda ÇİD-TB oranı %9-32, önceden tedavi almış olgularda ise %50'den fazladır²⁻⁶. Ülkemizde Verem Savaş Daire Başkanlığı verilerine göre ise, 2010 yılında ÇİD-TB olgu sayısı, yeni olgularda 110 (%2.5), önceden tedavi görmüş olgularda 140 (%22.8) olmak üzere toplam 250 (%5)'dir¹.

Hastaların erken tanı konularak antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre uygun şekilde tedavi edilmeleri, ÇİD-TB kontrolünde en etkili stratejidir. ÇİD *M.tuberculosis* izolatlarında ilaç duyarlılık paterninin bilinmesi, hastalarda uygun tedavinin planlanması ve reçetelenmesi için gereklidir. ÇİD-TB olguları, uygun sürede ve uygun ilaçlarla tedavi edilmezler ise tedavisi oldukça güç olan yaygın ilaca dirençli (YİD) TB olguları şeklinde karşımıza çıkabilir^{6,7}. Anti-TB ilaç duyarlılık testleri, tedavi başarısızlıklarını önleyerek ÇİD-TB olgu sayısının azalmasına ve bu olguların bir kısmının YİD-TB'ye dönüşümünün engellenmesine katkı sağlar^{7,8}. Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından *M.tuberculosis* izolatları için önerilen duyarlılık testi, modifiye agar proporsiyon testidir⁹. Bu amaçla BACTEC™ otomatize sistemi de yaygın şekilde kullanılır. Proporsiyon yöntemi, ucuz ve nispeten basit bir yöntem olup, kültür izolatlarında yaklaşık üç haftada sonuç elde edilir. E-test yöntemi, bir diğer duyarlılık yöntemi olup, kültürde üreyen örneklerde yaklaşık 5-10 gün içerisinde kantitatif sonuç elde etmeyi sağlayan, uygulaması kolay ve proporsiyon yöntemine göre daha hızlı sürede sonuç veren bir yöntemdir^{2,8,10,11}. Günümüzde ÇİD-TB izolatlarında ikinci basamak anti-TB ilaç direncini saptamaya yönelik standardize ve hızlı bir yöntem mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı, ÇİD-TB izolatlarında E-test yöntemiyle ikinci basamak anti-TB ilaç (kanamisin, ofloksasin, etionamid ve linezolid) direncinin belirlenmesi ve sonuçların Löwenstein-Jensen proporsiyon yöntemiyle karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarında 01.02.2007-31.12.2009 tarihleri arasında akciğer örneklerinden izole edilen 122 adet ÇİD MTC izolatı kullanıldı. Klinik örneklerin %4 NaOH-NALC yöntemi ile dekontaminasyon ve homojenizasyon işleminden sonra, aside dirençli boyama (ARB) ile mikroskopik inceleme ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde kültürleri yapıldı. Kültürde üremiş izolatlarda konvansiyonel biyokimyasal testler (niasin, nitrat, katalaz ve 68°C'de uygulanan katalaz testleri) kullanılarak tür tanımlaması yapıldı.

MTC olarak saptanan izolatların birinci ve ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılık testleri, LJ besiyerinde proporsiyon yöntemi ile yapıldı. Duyarlılık testleri, Canetti ve arkadaşlarının¹² tanımladıkları gibi, belirli oranlarda ilaç ilave edilmiş LJ besiyerlerinin yüzeyine inoküle edilerek gerçekleştirildi. Birinci basamak anti-TB ilaçların proporsiyon duyarlılık yöntemi için önce ilaçlı (rifampisin için 40 mg/ml; isoniazid için 0.2-1 mg/ml konsantrasyonları kullanılarak) LJ besiyerleri hazırlandı ve 85°C'de koagülatörde 50 dakika bekletildi. Tüm besiyerlerin kontrolü için standart suşlar kullanıldı¹³⁻¹⁵. İnokülümün hazırlanması için LJ besiyerinde saf olarak üreyen kolonilerden çok sayıda bakteri, 6-8 adet cam boncuk içeren ve steril distile su bulunan tüpe alındı. Bakteri süspansiyonu, vorteks ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Büyük parçaların ve aerosolün çökmesi için 15 dakika beklendi ve McFarland 1 bulanıklığı (yaklaşık 10^7 CFU/ml bakteri) sağlandı. Bu süspansiyondan 10^{-2} ve 10^{-4} dilüsyonları hazırlandı. Ekimler yapıldıktan sonra besiyerleri, %5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de dört hafta inkübe edildi¹⁵. Eğer ilaçlı besiyerindeki koloni yüzdesi, ilaç ilave edilmemiş kontrol besiyerindeki üremenin %1'inden fazla ise izolatlar dirençli olarak kabul edildi. İlaç konsantrasyonları sırasıyla isoniyazid 0.2 µg/ml, rifampisin 40 µg/ml, streptomisin 4.0 µg/ml ve etambutol 2.0 µg/ml olarak test edildi. Anti-TB ilaç duyarlılık testlerinin kalite kontrolü için *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) suşu (isoniazid, rifampisin, streptomisin ve etambutole duyarlı) kullanıldı.

ÇİD olduğu saptanan 122 MTC suşunda E-test (bioMerieux, Fransa) yöntemi önceden tanımlandığı gibi uygulandı^{9,11}. İzolatlar LJ agarda 37°C'de üç hafta inkübe edildi. Taze koloniler, 3 mm çapında cam boncuklar içeren tüplerin içerisine aktarıldı ve tüpler bir dakika vorteksledi. Tüplere %5 fosfat tamponlu tuzlu su-Tween 80 (PBS-T80) ilave edildikten sonra büyük partiküllerin dibe çökmesi için beklendi. Hazırlanan süspansiyonun bulanıklığı, PBS-T80 ilave edilerek McFarland 4 standardına göre ayarlandı. Yüzelli mm çaplı petri kutularına %10 oleik asit-albumin-dekstroza-katalaz (BBL) ve %0.2 tyloxapol (Sigma, ABD) ilaveli Middlebrook 7H11 besiyerinden 50 ml ilave edildi. Bu agarların yüzeyine eküvyonla mikobakteri süspansiyonlarından inokülasyon yapıldı. Petri kutularının etrafları parafillenerek 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda bir gece inkübasyona bırakıldı. Böylece E-test ile kanamisin (0.016-256 mg/ml), ofloksasin (0.02-32 mg/ml), etiyonamid (0.016-256 mg/ml) ve linezolid (0.016-256 mg/ml) şeritleri kullanılarak, suşların ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılık testleri yapıldı. Duyarlılık testleri, E-test şeritleri uygulandıktan sonra 5., 7. ve 10. günlerde değerlendirildi. MİK değeri, E-test şeritlerinin etrafında oluşan inhibisyon elipsinin, şeritlerin üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta ile saptandı⁹.

BULGULAR

Çalışmamızda, E-test yöntemiyle 122 ÇİD MTC izolatının 119 (%98)'ü kanamisin (KN), ofloksasin (OFL), etionamid (ETN) ve linezolid (LIN)'e duyarlı, 3 (%2)'ü ise ETN ve KN'ye dirençli bulunmuştur. E-test yöntemi ve LJ proporsiyon yöntemi arasındaki korelasyon, KN ve ETN için %96, OFL için %98, LIN içinse %100 olarak saptanmıştır. Test edilen dört ilaç için E-test yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo 1. ÇİD MTC Suşlarında LJ Proporsiyon ve E-test Yöntemleri ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması ve E-test Yönteminin Duyarlılık, Özgüllük, PPD ve NPD Değerleri (n= 122)

İlaç	LJ proporsiyon		E-test				Korelasyon (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Dirençli n (%)						
KN	117 (96)	5 (4)	119 (98)	3 (2)		96	100	60	98	100	
OFL	114 (93)	8 (7)	119 (98)	3 (2)		98	100	38	96	100	
ETN	117 (96)	5 (4)	119 (98)	3 (2)		96	100	60	98	100	
LIN	119 (98)	3 (2)	119 (98)	3 (2)		100	100	100	100	100	

LJ: Löwenstein-Jensen; KN: Kanamisin; OFL: Ofloksasin; ETN: Etionamid; LIN: Linezolid; PPD: Pozitif prediktif değer; NPD: Negatif prediktif değer; n: İzolat sayısı.

LJ: Löwenstein-Jensen; KN: Kanamisin; OFL: Ofloksasin; ETN: Etionamid; LIN: Linezolid; PPD: Pozitif prediktif değer; NPD: Negatif prediktif değer; n: İzolat sayısı.

TARTIŞMA

Günümüzde TB hastalığında uygun tedavi ile iyileşme olanağı olmasına rağmen, uygunsuz ilaç rejimleri ve hastaların tedaviyi uygun süre ve dozda kullanmamaları sonucunda ortaya çıkan tedavi başarısızlığı ve ikinci basamak anti-TB ilaç direnci, TB tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunların başında gelmektedir²⁻⁶. ÇİD-TB'li hastalara erken tanı konulup uygun anti-TB tedavinin başlanması, hem hasta yakınlarına hem de toplumdaki sağlıklı bireylere ÇİD-TB bulaşının önlenmesini sağlayacaktır^{5,6}. ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci basamak anti-TB ilaçlar için kullanılan duyarlılık testlerinin uygulanması zor ve pahalıdır; ayrıca tam olarak standardize edilmemiştir. DSÖ ve Amerikan Toraks Derneği, bu testlerin sadece deneyimli ve/veya referans laboratuvarlar tarafından yapılmasını uygun bulmaktadır. Anti-TB ilaç duyarlılık testlerinin iç kalite kontrolünde, test edilen tüm anti-TB ilaçlara duyarlı olan *M.tuberculosis* H37Rv suşu (ATCC 27294) kullanılabilir¹⁶.

Konvansiyonel kültür temelli duyarlılık test yöntemleri, genellikle katı kültür ortamında mikobakterilerin üremesini gerektirmektedir. Anti-TB ilaç duyarlılık testinde altın standart, agar proporsiyon yöntemidir. Ancak bu yöntemin uzun sürede sonuç vermesi, hastaların uygun tedaviyi almalarında gecikmelere neden olmaktadır¹⁶. Konvansiyonel yöntemlerden LJ besiyerinde proporsiyon yöntemi ile anti-TB ilaç duyarlılığının saptanması en yaygın kullanılan testlerden biri olup, en erken sonuç dört haftada alınmaktadır¹⁵. Bu sebeple özellikle ÇİD-TB olgularının tedavisi planlanırken hızlı ve güvenilir ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılıklarını saptamaya yönelik testlere ihtiyaç vardır. Günümüzde, ÇİD-TB izolatlarında ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılığını daha erken saptamaya yönelik olarak, E-test (bioMérieux, Fransa) ve MycoTB plate (TREK Diagnostic, İngiltere) gibi testler geliştirilmiştir^{11,17}. E-test ile birinci basamak ve birkaç ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılığının araştırıldığı çalışmalar olmakla birlikte, birden fazla ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılığının çalışıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Sunduğumuz çalışma bu yönüyle diğer çalışmalardan farklıdır. Çalışmamızda, 122 ÇİD MTC izolatının 119 (%98)'ü E-test yöntemiyle KN, OFL, ETN ve LIN'a duyarlı saptanırken, 3 (%2)'ü ETN ve KN'ye dirençli olarak bulunmuştur. E-test ve LJ proporsiyon yöntemi arasındaki korelasyon; KN ve ETN için %96, OFL için %98, LIN içinse %100 olarak saptanmıştır. E-test yönteminin KN, OFL, ETN ve LIN duyarlılığını saptamadaki özgüllüğü sırasıyla %60, %38, %60 ve %100 olarak belirlenmiş; duyarlılığının ise hepsi için %100 olduğu izlenmiştir (Tablo I). Çalışmamızın sınırlayıcı yönü; YİD-TB tanısı için gerekli ikinci basamak anti-TB ilaçlardan sadece KN ve OFL duyarlılıklarının saptanması, ancak diğer ikinci basamak ilaçlardan amikasin (AMK) ve kapreomisin (CPM) duyarlılıklarının test edilmemiş olmasıdır. Çalışmamızın güçlü yönü; ÇİD-TB olgularının tedavisinde kullanılabilen ve etkili bir ilaç olan LIN duyarlılığının E-test yöntemiyle ÇİD-TB izolatlarında çalışılmış olmasıdır. Zira ÇİD-TB olgularında LIN duyarlılığının BACTEC™ MGIT 960 ve BACTEC™ 460 sistemleri ile çalışıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur^{18,19}. Bektöre ve arkadaşları¹⁸ İstanbul, İzmir ve Manisa illerinde yaşayan ÇİD-TB hastalarından izole edilen 81 ÇİD-TB izolatının birinci ve ikinci basamak anti-TB ilaçlara duyarlılık durumlarını tam otomatize BACTEC MGIT 960 sistemi ile araştırmışlar; ikinci basamak anti-TB ilaçlara direnç oranlarını, AMK ve KN

için %1.2, OFL ve levofloksasin (LVX) için %2.5, CPM için %14.8, ETN için %37 olarak belirlemişler ve LIN'a karşı direnç saptamamışlardır¹⁸. Çalışmada ayrıca, LVX-OFL, AMK-KN ve streptomisin (SM)-ETN arasında izolatların direnç durumları açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uyum bulunduğu belirlenmiş; ÇİD-TB izolatlarında YİD-TB'nin görülmediği, ETN ve CPM'e karşı direncin yüksek bulunduğu, ÇİD-TB tedavisinde parenteral aminoglikozid grubundan AMK veya KN ile birlikte, kinolonların ve klinik çalışmalar sonrasında LIN'ın güvenle kullanılabileceği ifade edilmiştir¹⁸. Erturan ve Uzun¹⁹ ise, 39 ÇİD-TB izolatının LIN'a duyarlılığını BACTEC 460 sistemi ile araştırmışlar; LIN için MIC_{50} ve MIC_{90} değerlerini sırasıyla 4 mg/dl ve 8 mg/dl olarak belirlemişler ve tüm izolatların in vitro olarak LIN'a duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada, 20 ÇİD-TB izolatının birinci ve ikinci basamak anti-TB ilaçlara karşı duyarlılığının belirlenmesinde E-test yönteminin kullanılabiliği araştırılmış ve referans yöntem olan BACTEC 460 TB sistemi ile karşılaştırılmıştır²⁰. Bu çalışmada, her iki yöntem için direnç yüzdeleri; rifampisin (RMP) için %100, izoniyazid (INH) için %100, SM için %27 iken, BACTEC yöntemiyle etambutol (EMB) için %27 ve E-test yöntemiyle %33 bulunmuştur. İkinci basamak ilaçlar için yine her iki yöntemin direnç yüzdeleri sırasıyla, AMK için %13'e karşı %20, OFL için %33'e karşı %40, LVX için %27, moksifloksasin için %27, LIN içinse %7 olarak belirlenmiştir²⁰. Çalışmada referans yöntem ile sonuçlar 21 günde elde edilirken, E-test yöntemiyle 10 günde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, E-test yönteminin birinci ve ikinci basamak anti-TB ilaç duyarlılığını belirlemede kolay ve doğru tanı sağlayan hızlı bir duyarlılık yöntemi olduğunu belirtmişlerdir²⁰. Kayalı ve arkadaşları²¹ da, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanmış 50 ÇİD *M.tuberculosis* suşunda ikinci basamak ilaç duyarlılıklarını LJ besiyerinde proporsiyon yöntemiyle araştırmışlar ve ETN, sikloserin, KN, p-aminosalisilik asit (PAS), OFL, tiasetazon ve CPM için direnç oranlarını sırasıyla %22, %8, %6, %6, %2, %2 ve %0 olarak bildirmişlerdir. Çavuşoğlu ve arkadaşlarının²² çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen 100 *M.tuberculosis* suşunda ikinci basamak ilaçlardan OFL ve siprofloksasin duyarlılığı hem standart proporsiyon dilüsyon hem de E-test yöntemiyle araştırılmış; her iki yöntem ile de iki suşta (%2) bu ilaçlara karşı direnç saptanmış ve yöntemler arasındaki uyum %100 olarak belirlenmiştir. Yaşar ve arkadaşları¹¹ 59 *M.tuberculosis* izolatının birinci basamak ilaçlardan INH, RMP, EMB ve ST'ye karşı duyarlılığını E-test ve LJ proporsiyon yöntemi ile araştırmışlar; yöntemler arasındaki uyumun INH ve EMB için %95, RMP için %86 ve ST için %85 olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, proporsiyon yöntemine kıyasla daha kısa sürede sonuç veren E-test yönteminin antimikobakteriyel duyarlılık tespitinde hızlı tanı testi olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır¹¹.

Yapılan birçok çalışmada E-test yöntemiyle standart proporsiyon yöntemi arasında iyi bir korelasyon ve yüksek uyum (%87-%100) olduğu bildirilmektedir^{11,22-28}. E-test yönteminin avantajları; kolay uygulanması, uzmanlık ve çok özel bir ekipman (CO_2 'li etüv dışında) gerektirmemesi ve sonuçların bir hafta gibi kısa bir sürede değerlendirilebilmesidir¹¹. Buna karşın bazı çalışmalarda, E-test yönteminin proporsiyon yöntemine göre dezavantajları olduğu ifade edilmekte ve E-test yönteminde belirli sayıda yanlış duyarlı ve yanlış dirençli suşların saptandığı bildirilmektedir^{29,30}. Bu yöntemin başlıca

dezavantajları, maliyetinin proporsiyon yöntemine göre daha yüksek olması ve CO₂'li etüv gerektirmesidir³¹.

Sonuç olarak sunduğumuz çalışmada, E-test ile proporsiyon yöntemi arasında ikinci basamak anti-TB ilaçlardan linezolid, kanamisin ve etionamid duyarlılıklarını belirlemede iyi bir korelasyon bulunmuş, dolayısıyla E-test yönteminin bu ilaçlar için hızlı duyarlılık saptama testi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak ofloksasin için özgüllük oranını düşük bulmamız nedeniyle, bu ilaç için E-testin başka bir yöntem (örneğin proporsiyon yöntemi) ile birlikte kullanılması uygun olacaktır. E-test yöntemi ile alınacak hızlı sonuçlar, ÇİD-TB olgularında erken ve etkili bir anti-TB ilaç tedavisinin başlanmasına ve enfeksiyon kontrolüne olumlu katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye'de Verem Savaşı 2012 Raporu, s: 67. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüberküloz Daire Başkanlığı, Sağlık Bakanlığı Yayını No: 884, 2013. Anıl Matbaacılık, Ankara.
2. Nachega JB, Chaisson RE. Tuberculosis drug resistance: a global threat. Clin Infect Dis 2003; 36(Suppl 1): 24-30.
3. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response. WHO/HTM/TB/2010.3. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf
4. White VL, Moore-Gillon J. Resource implications of patients with multidrug resistant tuberculosis. Thorax 2000; 55(11): 962-3.
5. Mahmoudi A, Iseman MD. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. Common errors and their association with the acquisition of drug resistance. JAMA 1993; 270(1): 65-8.
6. Abubakar I, Zignol M, Falzon D, et al. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership. Lancet Infect Dis 2013; 13(6): 529-39.
7. Jassal M, Bishai WR. Extensively drug-resistant tuberculosis. Lancet Infect Dis 2009; 9(1): 19-30.
8. Nathanson E, Lambregts-van Weezenbeek C, Rich ML, et al. Multidrug-resistant tuberculosis management in resource-limited settings. Emerg Infect Dis 2006; 12(9): 1389-97.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard Document no. M24-A2. 2011, Second ed. CLSI, Wayne, PA.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *M. tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006; 55(11): 301-5.
11. Yaşar KK, Şengöz G, Pehlivanoğlu F, Bakar M, Tozalğan Ü. Akciğer ve akciğer dışı kaynaklı 229 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının majör antitüberküloz ilaçlara duyarlılık oranları ve E-test ile standart proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011; 31(5): 1132-8
12. 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.
13. Canetti G, Froman S, Grosset J, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull World Health Organ 1963; 29: 565-78.
14. Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969; 41: 21-43.
15. Inderlied CB, Nash KA. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, pp: 127-76. In: Lorian V (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine. 1995, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

16. Baylan O. Çok ilaca dirençli tüberkülozdan sonra yaygın ilaca dirençli ve tüm ilaçlara dirençli tüberküloz formları: Eski hastalığın yeni yüzleri. Mikrobiyol Bul 2011; 45(1): 181-95.
17. Cavusoglu C, Gulpinar T, Ecemis T. Evaluation of antimicrobial susceptibilities of rapidly growing mycobacteria by Sensititre RAPMYCO panel. New Microbiol 2012; 35(1): 73-6.
18. Bektöre B, Haznedaroğlu T, Baylan O ve ark. Çok ilaca dirençli tüberküloz izolatlarında yaygın ilaca direncin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 59-70.
19. Erturan Z, Uzun M. In vitro activity of linezolid against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Int J Antimicrob Agents 2005; 26(1): 78-80.
20. García-Escribano N, Ruiz-Serrano MJ, Jiménez S, et al. Second-line antituberculous drugs: usefulness of the E-test for susceptibility testing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect 2005; 11(Suppl 2):153, P566.
21. Kayali R, Cöplü N, Ceyhan I, Ocak F, Citiş BE, Esen B. The rates of resistance to second-line drugs in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Mikrobiyol Bul 2006; 40(1-2): 1-7.
22. Çavuşoglu C, Saydam CC, Burhanoğlu D ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında ofloksasin ve siprofloksasin duyarlılığının saptanmasında standart orantı dilüsyon testi ile E-test yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2001; 35(4): 505-11.
23. Hazbon MH, del Socorro Orozco M, Labrada LA, Tovar R, Weigle KA, Wanger A. Evaluation of E-test for susceptibility testing of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4599-603.
24. Joloba ML, Bajaksouzian S, Jacobs MR. Evaluation of E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38(10): 3834-6.
25. Akcalı S, Cicek C, Surucuoglu S, Ozbakkaloglu B. E-test: an alternative method for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Med Princ Pract 2005;14(4): 264-7.
26. Kakkar N, Sharma M, Ray P, Sethi S, Kumar S. Evaluation of E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to primary anti tubercular drugs. Indian J Med Res 2000; 111(1): 168-71.
27. Birinci A, Coban AY, Ekinci B, Durupinar B. Comparison of the proportion method with mycobacteria growth indicator tube and E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(3): 351-2.
28. Muralidhar S, Srivastava L. Evaluation of three methods to determine the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. Indian J Med Res 2004; 120(5): 463-7.
29. Freixo IM, Caldas PC, Martins F, et al. Evaluation of E-test strips for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2282-4.
30. Hausdorfer J, Sompek E, Allerberger F, Dierich MP, Rüsche-Gerdes S. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2(9): 751-5.
31. Verma JS, Rawat D, Hasan A, et al. The use of E-test for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* - a solution or an illusion? Indian J Med Microbiol 2010; 28(1): 30-3.