

Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatlarının Antitüberküloz İlaç Duyarlılığını Saptamada İki Yöntemin Karşılaştırılması: Sensititre MycoTB MIC Plak ve İndirekt Agar Proporsiyon Yöntemleri

Comparison of Two Methods for The Detection of Antituberculous Drug Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates: Sensititre MycoTB MIC Plate and The Indirect Agar Proportion Methods

Fatma Kamer VARICI BALCI¹, Cengiz ÇAVUŞOĞLU²

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Division of Medical Virology, Izmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 05.12.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.03.2018

* Bu çalışma, 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (18-22 Kasım 2015, Antalya)'nde sözel olarak sunulmuştur.

ÖZ

Tüberküloz (TB), tüm dünyada halen en önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir. Çoklu ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) ve yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB) olgularındaki artış, TB izolatlarının ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde hızlı, kolay uygulanabilen ve standardize yöntemlerin geliştirilmesine yönelik ihtiyacı artırmıştır. Bu çalışma, Sensititre MycoTB plak yöntemini, altın standart olan agar proporsiyon yöntemi (APY) ile karşılaştırmak ve Sensititre MycoTB plak yönteminin APY'nin yerine kullanılabilir kadar etkin bir yöntem olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 36'sı farklı direnç paternine sahip 64'ü tüm birinci seçenek ilaçlara duyarlı toplam 100 *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatı kullanılmıştır. *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının tamamında rifampisin, izoniazid, etambutol, streptomisin, ofloksasin, moksifloksasin, amikasin, rifabutin, para-aminosalisilik asit, etionamid, sikloserin ve kanamisin ilaç duyarlılıkları, APY ve Sensititre MycoTB plak yöntemiyle belirlenmiştir. APY, "Clinical and

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Fatma Kamer Vancı Balcı, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340 Balçova, İzmir, Türkiye.
Tel (Phone): +90 232 412 4501, **E-posta (E-mail):** varicikamer@yahoo.com

Laboratory Standards Institute (CLSI)"ün tanımladığı şekilde, Sensititre MycoTB plak yöntemi ise üreticinin tanımladığı şekilde yapılmıştır. Sonuçlar, %95 güven aralığında değerlendirilip duyarlılık, özgüllük ve iki test arasındaki uyum hesaplanmıştır. Sensititre MycoTB plak yöntemiyle 14 günde sonuç alınmıştır. Yöntemin duyarlılığı %86-100 ve özgüllüğü %95-100 aralığında iken, iki yöntem arasındaki uyum, test edilen ilaçlar için %95-100 aralığında saptanmıştır. İlaçların duyarlılıkları, etambutol ve etionamid hariç tüm ilaçlarda %100 oranında saptanmıştır. İlaçların özgüllükleri ve iki ilaç arasındaki uyum %95 ve üzerinde bulunmuştur. Tüm ilaçlar, %95 güven aralığı içerisinde ($p < 0.001$) olup duyarlılık ve özgüllük güven sınırlarının alt ve üst noktaları arasındaki en büyük fark, etambutol ve etionamidde tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda APY ile izolatların 16'sının, Sensititre MycoTB plak yöntemiyle ise 20'sinin ÇİD-TB (en azından izoniazid ve rifampisine birlikte dirençli) izolatu oldukları anlaşılmış olup her iki yöntemle de YİD-TB [ÇİD-TB direncine ek olarak TB tedavisinde kullanılan herhangi bir florokinolona ve parenteral ikinci seçenek anti-TB ilaçlardan (amikasin, kanamisin ve kapreomisin) herhangi birisine direnç gelişmesi] izolatu saptanmıştır. İnkübasyon süresinin 14 gün olması, duyarlılığın, özgüllüğün ve testler arası uyumun yüksek olması, birinci seçenek ilaçlarla ikinci seçenek ilaçların aynı anda çalışabilmesi ve bunun yanında ilaçların kantitatif değerlerinin saptanabilmesi gibi avantajlarından dolayı Sensititre MycoTB plak yönteminin, özellikle ÇİD-TB izolatlarının yüksek oranda görüldüğü laboratuvarlarda kullanılacak etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis* kompleks; agar proporsiyon yöntemi; Sensititre MycoTB; ilaç duyarlılık testi.

ABSTRACT

Tuberculosis is still one of the most important public health problems worldwide. Due to the increase of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis and extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis cases, fast, practical and standardized methods need to be developed for the determination of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. The aim of this study was to compare the Sensititre MycoTB plate method with the gold standard agar proportion method (APM); in order to determine if the Sensititre MycoTB plate method is effective enough to be used instead of the APM. A total of 100 *M. tuberculosis* complex isolates, 36 with different resistance patterns and 64 sensitive to all first-line agents stored in culture collection of Ege University Faculty of Medicine Microbiology Department Laboratory, were used in the study. The susceptibility of rifampin, isoniazid, ethambutol, streptomycin, ofloxacin, moxifloxacin, amikacin, rifabutin, para-aminosalicylic acid, ethionamide, cycloserine and kanamycin for all the isolates were determined by APM and Sensititre MycoTB plate methods. APM was performed as defined by CLSI, Sensititre MycoTB plate method was performed as instructed by the manufacturer. Results were assessed in 95% confidence interval and sensitivity, specificity and categorical agreement values were determined. Results were obtained in 14 days using the Sensititre MycoTB plate method. Sensitivity and the specificity of the Sensititre MycoTB was between 86-100% and 95-100% respectively, while the categorical agreement between the two methods were 95-100% for the drugs tested. The sensitivities of the drugs were 100% except ethambutol and ethionamide. The specificity values for both of the drugs and categorical agreement were over 95%. All the drugs were in the 95% confidence interval ($p < 0.001$) and the greatest difference between the lower and upper levels of sensitivity and specificity confidence limits was found in ethambutol and ethionamide. MDR was detected in 16 isolates with the APM and in 20 isolates with the Sensititre MycoTB plate method. None of the isolates had XDR [in addition to MDR resistance against any fluoroquinolones and at least one of the second-line parenteral drugs (amikacin, kanamycin or capreomycin)]. As a result, owing to the short incubation period (14 days), high sensitivity, specificity and categorical agreement values, and the possibility for evaluating both first- and second-line agents and the quantitative values of drugs; the Sensititre MycoTB method was determined as an effective method that can be used especially in laboratories where the rate of MDR-TB isolates are high.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex; agar proportion method; Sensititre MycoTB plate; drug susceptibility testing.

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), tüm dünyada halen en önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir. 2015 yılında, dünya genelinde yaklaşık 10.4 milyon yeni TB ve 480.000 yeni çok ilaca dirençli TB (ÇİD-TB) olgusu bildirilmiştir¹. ÇİD-TB ve yaygın ilaca dirençli TB (YİD-TB) sayısındaki artış, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde standardize, kullanışlı ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesine yönelik ihtiyacı artırmıştır. Etkisiz tedaviye ve direnç gelişimine yol açabildiğinden gecikmiş duyarlılık sonuçları, morbidite ve mortalite artışına neden olabilmektedir².

Hızlı tanının yanı sıra ilaç direncinin hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesi, TB kontrol programlarının ana hedeflerindedir. "Centers for Diseases Control and Prevention (CDC)", mikobakteriyoloji laboratuvarları için birinci seçenek ilaç duyarlılıklarının örnek kabulünden en geç 30 gün sonra bildirilmesini önermektedir. Bu amaçla, son yıllarda *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının hızlı duyarlılık sonuçları eldesi için Sensititre MycoTB (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH, ABD) gibi çeşitli ticari duyarlılık test yöntemleri geliştirilmektedir³. Sensititre MycoTB plakları, TB tedavisinde kullanılan birinci seçenek [izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (ETB)] ve ikinci seçenek [ofloksasin (OFL), moksifloksasin (MXF), streptomisin (STR), etionamid (ETH), rifabutin (RFB), amikasin (AMI), kanamisin (KAN), sikloserin (CYC), para-aminosalisik asit (PAS)] 12 liyofize antimikrobiyal ilacın farklı dilüsyonlarını ve antibiyotik içermeyen iki pozitif kontrolü içeren 96 mikrokuyucuktan oluşmaktadır (Şekil 1). Pirazinamid, birinci seçenek ilaç olmasına

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	OFL 32	MXF 8	RIF 16	AMI 16	STR 32	RFB 16	PAS 64	ETH 40	CYC 256	INH 4	KAN 40	EMB 32
B	OFL 16	MXF 4	RIF 8	AMI 8	STR 16	RFB 8	PAS 32	ETH 20	CYC 128	INH 2	KAN 20	EMB 16
C	OFL 8	MXF 2	RIF 4	AMI 4	STR 8	RFB 4	PAS 16	ETH 10	CYC 64	INH 1	KAN 10	EMB 8
D	OFL 4	MXF 1	RIF 2	AMI 2	STR 4	RFB 2	PAS 8	ETH 5	CYC 32	INH 0.5	KAN 5	EMB 4
E	OFL 2	MXF 0.5	RIF 1	AMI 1	STR 2	RFB 1	PAS 4	ETH 2.5	CYC 16	INH 0.25	KAN 2.5	EMB 2
F	OFL 1	MXF 0.25	RIF 0.5	AMI 0.5	STR 1	RFB 0.5	PAS 2	ETH 1.2	CYC 8	INH 0.12	KAN 1.2	EMB 1
G	OFL 0.5	MXF 0.12	RIF 0.25	AMI 0.25	STR 0.5	RFB 0.25	PAS 1	ETH 0.6	CYC 4	INH 0.06	KAN 0.6	EMB 0.5
H	OFL 0.25	MXF 0.06	RIF 0.12	AMI 0.12	STR 0.25	RFB 0.12	PAS 0.5	ETH 0.3	CYC 2	INH 0.03	POS	POS

Şekil 1. Sensititre MycoTB plağında antibiyotikler ve konsantrasyonlarının ($\mu\text{g/ml}$) şematik gösterimi¹⁶ [OFL: Ofloksasin, MXF: Moksifloksasin, RIF: Rifampisin, AMI: Amikasin, STR: Streptomisin, RFB: Rifabutin, PAS: Para-aminosalisik asit, ETH: Etionamid, CYC: Sikloserin, INH: İzoniazid, KAN: Kanamisin, EMB: Etambutol].

rağmen asidik test koşullarına gereksinim duyduğu için bu antibiyotik plaklarında bulunmamaktadır. Sensititre MycoTB plak yöntemi çalışma amaçlı kullanılmakta olup henüz FDA onayı almamıştır.

Ulusal TB Tanı Laboratuvarları Ağı Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Tebliğde; klinik örneğin laboratuvara kabul edilmesinden itibaren en geç 30 gün içerisinde ilaç duyarlılık test sonuçlarının, tetkiki isteyen hekim, kurum veya kuruluşa bildirilmesi ve ağa katılan akredite mikobakteriyoloji laboratuvarlarının bu koşulları sağlaması beklenmektedir^{4,5}.

Bu çalışmada, *M. tuberculosis* kompleks suşlarının ilaç duyarlılıklarının belirlenmesi için altın standart olan agar proporsiyon yöntemi (APY) ile yeni geliştirilen Sensititre MycoTB plak yönteminin doğruluk ve sonuçların alınmasında gerekli olan inkübasyon süresi açısından karşılaştırılması, Sensititre MycoTB plak yönteminin, APY'nin yerine kullanılabilir kadar etkin bir yöntem olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatları

Çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 36'sı farklı direnç paternlerine sahip 64'ü tüm birinci seçenek ilaçlara duyarlı toplam 100 *M. tuberculosis* kompleks izolatı kullanıldı. Çalışma gününe kadar -80°C'de saklanan izolatlar, oda ısısında çözüldükten sonra "*Mycobacterium* Growth Indicator Tube (MGIT)" tüplerine inoküle edilerek BACTEC MGIT 960 sistemine (Becton Dickinson, ABD) yerleştirildi ve pozitif sonuç saptanana kadar izlendi. Pozitif sonuç saptanan tüpler, biyogüvenlik kabinine alındı. Steril bir pipetle tüpün dibinden yaklaşık 0.1 ml alınıp aside dirençli basil (ARB) boyaması yapıldı. Ayrıca kontaminasyon yönünden değerlendirmek için koyun kanlı agar (KKA) besiyerine ekim yapılarak, 37 ± 1°C'de %5-10 CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edildi. Çalışmada, KKA besiyerinde üremesi olmayan ve ARB yayması pozitif bulunan 100 *M. tuberculosis* kompleks izolatı kullanıldı. *M. tuberculosis* kompleks izolatlarında RIF, INH, ETB, STR, OFL, MXF, AMI, RFB, PAS, ETH, CYC ve KAN ilaç duyarlılıkları, APY ve Sensititre MycoTB plak yöntemiyle belirlendi. APY, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"ün önerdiği, Sensititre MycoTB plak yöntemi ise üreticinin tanımladığı şekilde yapıldı. Kalite kontrol incelemesi için tüm çalışmalarda *M. tuberculosis* ATCC 27294 suşu (H37Rv) kullanıldı. CLSI kılavuzunda belirtildiği şekliyle INH, RIF, ETB birinci seçenek, OFL, MXF, AMI, RFB, PAS, ETH, CYC, KAN ve STR ikinci seçenek anti-TB ilaçlar arasında alındı.

İndirekt Agar Proporsiyon Yöntemi

Standardize edilen inokulumun 10⁻² dilüsyonu, eşit miktarda test edilecek ilacı içeren ve içermeyen 7H10 agar bazlı besiyerlerindeki kadranslara 0.1 ml olacak şekilde inoküle edildi. Testin değerlendirilebilmesi için ilaç içermeyen kontrol besiyerinde en az 100 kolonilik üreme kriter olarak alındı. İlaç içeren besiyerindeki koloni sayısı, ilaçsız besiyerindeki kolonilerle karşılaştırılıp yüzde olarak ifade edildi. Bu oran, %1'den fazla olduğunda test

edilen izoaltın bu ilaca dirençli, kontrol kadranında üreme olup ilaçlı kadranlarda üreme olmadığında ise duyarlı olduğu kabul edildi. İnokülasyondan üç hafta sonra plaktaki üremeler yorumlandı.

Sensititre MycoTB Plak Yöntemi

Çalışmaya beş haftadan daha genç kültürler alındı. Çalışmaya başlamadan önce kitin içinde hazır bulunan oleik asit-albumin-dekstroz-katalaz (OADC) içerikli 7H9 sıvı besiyeri ve cam boncuk içeren Sensititre saline Tween sıvılarının oda ısısına gelmesi beklenildi. MGIT besiyerinde üremiş basillerden, enjektörle bir miktar Sensititre saline Tween içine alındı ve 30 saniye vortekslendi. Türbidite, McFarland 0.5 olacak şekilde ayarlandı ve çökmesi için 15 dakika beklenildi. Çökeltiden 100 µl, 11 ml'lik 7H9 sıvı besiyerine eklenip 30 saniye vortekslendi. Bu aşamaya kadar işlemler, 30 dakika içerisinde tamamlandı. Daha sonra 7H9 sıvı besiyerinden 100 µl, çoklu pipet yardımıyla Sensititre MycoTB plağındaki her çukurcuğa dağıtıldı. Plak üzerine plastik kağıt yapıştırılarak çukurların üzeri kapatıldı. İnkübatöre koymadan önce yapışkan plastik kağıdın üzeri tüberkülosit dezenfektanla temizlendi. En fazla iki plak üst üste olacak şekilde ağzı kapalı plastik poşete konularak etüve kaldırıldı. Kontaminasyon kontrolü için KKA plaklarına ekim yapıldı. KKA besiyerleri, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de %5-10 CO_2 'li etüvde 24 saat inkübe edilip üreme gözlenmeyenler çalışmaya alındı. Sensititre MycoTB plakları, aerobik ortamda $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de %5-10 CO_2 'li etüvde inkübe edildi. Yedinci, 14. ve 21. günlerde üreme kontrolü yapıldı ve 14. günde plaklarda yeterli üreme saptandı. Üreme, kuyucukların dibinde çökelti ve bulanıklık şeklinde görüldü. Üremeler, manuel olarak üreticinin kılavuzda belirttiği şekilde değerlendirildi. Kontrol kuyucuklarında üremesi olanlar geçerli sayılıp minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), üremenin görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu olarak alındı.

İstatistiksel Analiz

Veri analizinde, 20.0 IBM SPSS paket programı kullanıldı. Sensititre MycoTB plak yönteminin özgüllük, duyarlılık ve APY ile uyum yüzdeleri hesaplandı. Sonuçlar, %95 güven aralığında değerlendirilip, $p < 0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

APY ile izolatların 16'sında RIF, 29'unda düşük düzey INH (0.2 µg/ml), 23'ünde yüksek düzey INH (1 µg/ml), 21'inde STR, dokuzunda ETB direnci saptanırken izolatların altısında OFL, birinde MXF, beşinde AMI, sekizinde RFB, dördünde PAS, 14'ünde ETH, üçünde CYC ve üçünde KAN direnci bulunmuştur. Test edilen 100 *M.tuberculosis* kompleks izolatının üçünde INH, RIF, STR ve ETB kombine direnci, dokuzunda INH, RIF ve STR kombine direnci, dördünde INH, RIF ve ETB kombine direnci yani tüm birinci seçenek ilaçlara direnç saptanmıştır. On altı izolatın ÇİD-TB izolatı olduğu anlaşılmıştır.

Sensititre MycoTB yöntemi ile izolatların 17'sinde RIF, 31'inde INH (0.2 µg/ml), 25'inde INH (1 µg/ml), 22'sinde STR, 11'inde ETB, dokuzunda OFL, altısında MXF, beşinde AMI, 11'inde RFB, sekizinde PAS, 14'ünde ETH, beşinde CYC ve altısında KAN direnci bulun-

muştur. Test edilen 100 *M.tuberculosis* kompleks izolatının dördünde INH, RIF, STR ve ETB kombine direnci, 11'inde INH, RIF ve STR kombine direnci, beşinde INH, RIF ve ETB kombine direnci yani tüm birinci seçenek ilaçlara direnç saptanmıştır. Çalışmada, 20 izolatın ÇİD-TB izolatı olduğu anlaşılmıştır. Her iki yöntemle de PRE-YİD-TB ve YİD-TB izolatı saptanmamıştır.

APY'nin dirençli, Sensititre MycoTB plak yönteminin duyarlı (yalancı duyarlı) olarak saptadığı sonuçlar, "çok büyük hata" olarak tanımlanmış olup üç farklı izolatta çok büyük hata saptanmıştır. Çok büyük hatalar, bir izolatta ETB, iki izolatta ETH şeklinde saptanmıştır. APY'nin duyarlı Sensititre MycoTB plak yönteminin dirençli (yalancı dirençli) saptadığı sonuçlar, "büyük hata" olarak tanımlanmış olup AMI dışındaki tüm ilaçlarda büyük hata saptanmıştır. On sekiz farklı izolatta 31 ilacın duyarlılığında büyük hata bulunmuştur. Büyük hata saptanan ilaçların dağılımları; RIF'da bir, INH (0.2 µg/ml)'de iki, INH (1 µg/ml)'de iki, STR'de bir, ETB'de üç, OFL'de üç, MXF'de beş, RFB'de üç, PAS'da dört, ETH'de iki, CYC'de iki, KAN'da üç izolat şeklindedir.

Tek başına INH direnci olan izolatlar gözlenirken RIF direncine genel olarak INH direncinin eşlik ettiği tespit edilmiştir. ETH, KAN, AMI, CYC gibi ikinci seçenek ilaçlarda tek ilaç direnci gözlenmiştir. Sensititre MycoTB plak yöntemiyle MİK değerleri florokinolonlardan OFL ve MXF dirençli suşlarda 4 µg/ml saptanırken aminoglikozidlerden KAN dirençli suşlarda 10 µg/ml ve AMI dirençli suşların %80'inde ise 4 µg/ml olarak bulunmuştur. Tablo I'de APY kritik konsantrasyonları, Sensititre MycoTB ile saptanan ilaç MİK değer aralıkları ve APY'ye en yakın konsantrasyon gösterilmiştir.

Altın standart olan APY sonuçları esas alındığında Sensititre MycoTB yönteminin duyarlılık, özgüllük ve APY testi uyum yüzdeleri Tablo II'de sunulmuştur.

Sensititre MycoTB plak yönteminin duyarlılıkları, birinci seçenek ilaçlar (INH, RIF, ETB) için %89-100, ikinci seçenek ilaçlar için %86-100 arasındadır. Söz konusu testin duyarlılığı, birinci seçenek ilaçlar arasında en düşük ETB (%89)'de, en yüksek INH (%100)'de (0.2 µg/ml ve 1 µg/ml) ve RIF'da saptanmışken, ikinci seçenekler arasında ETH (%86) hariç hepsinde %100 olarak bulunmuştur.

Sensititre MycoTB plak yönteminin özgüllük değerleri, birinci seçenek ilaçlar için %97-99, ikinci seçenek ilaçlar için %95-100 arasında saptanmıştır. Söz konusu testin özgüllüğü, birinci seçenek ilaçlar arasında en düşük ETB (%97)'de, en yüksek RIF (%99)'da saptanmışken, ikinci seçenek ilaçlar arasında en düşük MXF (%95)'de, en yüksek AMI (%100)'da tespit edilmiştir.

Tüm antibiyotiklerin, %95 güven aralığı içerisinde ($p < 0.001$) olduğu bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllük güven sınırlarının alt ve üst noktaları arasındaki en büyük fark, ETB ve ETH'de saptanmıştır.

Sensititre MycoTB plak yönteminin altın standart test olan APY sonuçları ile tüm ilaçlar için uyumunun %95-100 arasında olduğu saptanmıştır. Söz konusu uyumun, birinci seçenek ilaçlarda %96-99 arasında iken, ikinci seçenek ilaçlarda %95-100 arasında olduğu

Tablo 1. Agar Proporsiyon Yöntemi (APY) Kritik Konsantrasyonları ve Sensititre MycoTB Plak Yöntemi Konsantrasyon Aralığının Karşılaştırılması

Antibiyotikler	APY kritik konsantrasyonları (µg/ml)	Sensititre MycoTB plak yöntemi konsantrasyon aralığı (µg/ml)	Sensititre MycoTB plak yöntemi ile saptanan konsantrasyon aralığı ve APY kritik konsantrasyonuna yakın değerleri (µg/ml)
Birinci seçenek ilaçlar			
Rifampisin	1	0.12-16	1 (< 0.12-8)
İzoniazid	0.2, 1.0	0.03-4	0.2, 1.0 (< 0.03-4)
Etambutol	5	0.5-32	5 (< 0.5-8)
İkinci seçenek ilaçlar			
Amikasin	5	0.12-16	4 (< 0.12-16)
Sikloserin	25	2.0-256	32 (< 2-32)
Etionamid	5	0.3-40	5 (< 0.3-40)
Kanamisin	5	0.6-40	5 (< 0.6-10)
Moksifloksasin	2	0.06-8.0	2 (< 0.06-4)
Ofloksasin	2	0.25-32	2 (0.25-4)
Para-aminosalisilik asit	2	0.5-64	2 (< 0.5-4)
Rifabutin	0.5	0.12-16	0.5 (< 0.12-4)
Streptomisin	2	0.25-32	2 (< 0.25-32)

tespit edilmiştir. İlaç bazında değerlendirildiğinde Sensititre MycoTB plak yönteminin uyumu, birinci seçenek ilaçlar arasında en düşük ETB (%96)'de, en yüksek RIF (%99)'da; ikinci seçenek ilaçlar arasında en düşük MXF (%95)'de, en yüksek AMI (%100)'da olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Her yıl yaklaşık dokuz milyon yeni TB olgusunun ortaya çıkması, dünya genelinde HIV epidemileri ile birlikte son yıllarda ÇİD-TB ve YİD-TB olgularında artış izlenmesi, yılda yaklaşık iki milyon kişinin TB hastalığından ölmesi, dikkatlerin yeniden TB hastalığına yönelmesine neden olmuştur^{1,6}. TB tedavisinde %95 ve üzeri başarı sağlanırken, ÇİD-TB olgularında tedavi başarısı %60-70'lere düşmektedir. ÇİD-TB, morbidite ve mortaliteyi artırmakta, tedavi süresini uzatmakta, ilaç yan etkisini artırmaktadır. ÇİD-TB izolatları ile enfekte olguların kısa sürede belirlenerek uygun ilaçlarla tedavi edilmesi, hem tedavi maliyetlerinin azalmasını hem de bulaş zincirinin kırılarak toplumdaki dirençli TB hastalarının kontrol altına alınmasını ve yeni olguların önlenmesini sağlamaktadır^{1,6,7}.

Özellikle ÇİD-TB ve YİD-TB olmak üzere ilaca dirençli TB olgularında izlenen artış, *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde standardi-

Tablo II. 100 *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks İzolatının Sensititre MycoTB Plak Yöntemi ve Agar Proporsiyon Yöntemi (APY) ile Yapılan Duyarlılık Test Sonuçları

Antibiyotik	APY konsantrasyonu (µg/ml)	Sensititre MycoTB plak sonuçları	APY ile dirençli saptanan	APY ile duyarlı saptanan	Duyarlılık yüzdesi (%95 güven aralığı)	Özgüllük yüzdesi (%95 güven aralığı)	Uyum yüzdesi
Rifampisin	1	Dirençli Duyarlı	16 0	1 83	100.0 (100, 100)	98.8 (93.5, 99.9)	99
İzoniazid	0.2	Dirençli Duyarlı	29 0	2 69	100.0 (100, 100)	97.2 (90.2, 99.7)	98
İzoniazid	1	Dirençli Duyarlı	23 0	2 75	100.0 (100, 100)	97.4 (90.9, 99.7)	98
Etambutol	5	Dirençli Duyarlı	8 1	3 88	88.9 (51.7, 99.7)	96.7 (90.7, 99.3)	96
Streptomisin	2	Dirençli Duyarlı	21 0	1 78	100.0 (100, 100)	98.7 (93.1, 99.9)	99
Ofloksasin	2	Dirençli Duyarlı	6 0	3 91	100.0 (100, 100)	96.8 (90.9, 99.3)	97
Moksifloksasin	2	Dirençli Duyarlı	1 0	5 94	100.0 (100, 100)	94.9 (91.2, 99.3)	95
Amikasin	5	Dirençli Duyarlı	5 0	0 95	100.0 (100, 100)	100.0 (100, 100)	100
Rifabutın	0.5	Dirençli Duyarlı	8 0	3 89	100.0 (100, 100)	96.7 (90.7, 99.3)	97
Paraaminosalisilik asit	2	Dirençli Duyarlı	4 0	4 92	100.0 (100, 100)	95.8 (89.7, 98.8)	96
Etionamid	5	Dirençli Duyarlı	12 2	2 84	85.7 (57.2, 98.2)	97.7 (91.8, 99.7)	96
Sikloserin	25	Dirençli Duyarlı	3 0	2 95	100.0 (100, 100)	97.9 (93.7, 99.7)	98
Kanamisin	5	Dirençli Duyarlı	3 0	3 94	100.0 (100, 100)	96.9 (91.2, 99.3)	97

ze, kullanışlı ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesine yönelik ihtiyacı artırmıştır⁸⁻¹⁰. Duyarlılık testinde altın standart olan APY, kalitatif bir yöntemdir ve sonuçlanması, 21 gün sürmektedir. Sonuçların geçersiz olmasına yol açan kontrol plaklarında çok fazla veya yetersiz üreme olması, bakteri kontaminasyonu, uzamış inkübasyona bağlı olarak ilaçların inaktive olması, APY'nin en önemli dezavantajlarıdır¹¹. Ayrıca emek-yoğun olması, uygulama zorlukları, geç sonuç vermesi gibi rutin kullanımında sınırlayıcı birçok faktöre sahiptir^{12,13}. APY'de agar plakları, buzdolabında saklanmakta ve kullanım süresi iki hafta ile bir ay arasında değişmekte; buna karşın MycoTB plakları, oda ısısında 24 aya kadar saklanabilmektedir².

Çalışmamızda APY'le 21 günde, Sensititre MycoTB plak yöntemiyle 14 günde sonuçlar elde edilmiştir. Konuyla ilgili yapılmış çalışmalarda MycoTB plak yöntemiyle 10-14 günde duyarlılık sonuçları elde edilmiştir^{2,14,15}. Lee ve arkadaşları¹⁶, Sensititre MycoTB plak yönteminde sonuçların alınması için gereken medyan süreyi 10 gün ($p < 0.0001$) olarak belirtmişlerdir. Bu verilerle, sonuçların alınması için gereken inkübasyon süresinin, APY'ye nazaran Sensititre MycoTB plak yönteminde daha kısa olduğu anlaşılmaktadır.

Sensititre MycoTB plak yönteminde, birinci (pirazinamid hariç) ve ikinci seçenek ilaçların duyarlılıkları aynı anda bakılmaktadır. Altın standart yöntem olan APY ile sadece duyarlı veya dirençli olarak kalitatif sonuç alınabilirken Sensititre MycoTB plak yöntemi ile antibiyotiklerin MİK konsantrasyonları (kantitatif) elde edilebilmektedir.

Çalışmamızda APY sonuçları esas alındığında, Sensititre MycoTB plak yönteminin duyarlılığı %86-100 arasında saptanmıştır. Diğer çalışmalarda bu yöntemin duyarlılığı sırasıyla %93-100, %18-100 ve %65-100 olarak saptanmıştır^{14,16,17}. Çalışmamızda Sensititre MycoTB plak yönteminin duyarlılığı, birinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek INH (%100) ve RIF (%100)'da, en düşük ETB (%89)'de bulunmuşken, ikinci seçenek ilaçlar arasında ETH (%86) hariç tümünde %100 olarak saptanmıştır. Hall ve arkadaşları¹⁴, söz konusu yöntemin duyarlılığını, birinci seçenek ilaçlar için en yüksek RIF (%99)'da, en düşük INH (%93)'de; ikinci seçenek ilaçlar için en yüksek CYC, KAN ve RFB (%100)'de, en düşük PAS (%94)'da saptamıştır. Lee ve arkadaşları¹⁶, bu yöntemin duyarlılığını, birinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek INH (%100)'de, en düşük ETB (%64)'de; ikinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek OFL (%100)'de; en düşük CYC (%18)'de bulmuştur. Yu ve arkadaşları¹⁷, bu yöntemin duyarlılığını, birinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek RIF (%98)'da, en düşük ETB (%65)'de; ikinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek CYC (%100)'de, en düşük PAS (%93)'da saptamıştır. Sensititre MycoTB plak yönteminin duyarlılığı, birinci seçenek ilaçlar arasında genel olarak en yüksek INH ve RIF'da, en düşük ETB'de saptanırken, bulgular ikinci seçenek ilaçlar için farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda APY sonuçları esas alındığında, Sensititre MycoTB plak yönteminin özgüllüğü %95-100 arasında bulunmuştur. Yapılan diğer yayınlarda bu yöntemin özgüllüğü, sırasıyla %90-100, %81-100 ve %93-100 arasında değişmektedir^{14,16,17}. Çalışmamızda Sensititre MycoTB plak yönteminin özgüllüğü, birinci seçenek ilaçlar arasında en

yüksek RIF (%99)'da, en düşük ETB (%97)'de, ikinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek AMI (%100)'da, en düşük MXF (%95)'de saptanmıştır. Hall ve arkadaşları, söz konusu yöntemin özgüllüğünü, tüm birinci seçenek ilaçlar için %100, ikinci seçenek ilaçlar içerisinde ise en yüksek %100 ile STR'de, en düşük %90 ile RFB'de saptamıştır. Lee ve arkadaşları¹⁶, bu yöntemin özgüllüğünü, birinci seçenek ilaçlar arasında en yüksek RIF (%100)'da, en düşük ETB (%96)'de, ikinci seçenek ilaçlar arasında ise en yüksek %100 ile AMI'da, en düşük %81 ile MXF'de saptamıştır. Yu ve arkadaşları¹⁷, bu yöntemin özgüllüğünü, tüm birinci seçenek ilaçlarda %100, ikinci seçenek ilaçlar içerisinde ise en yüksek (%100) OFL, MXF (0.75 µg/ml), AMI ve KAN'da, en düşük (%90) CYC'de saptamıştır. RIF, tüm çalışmalarda en yüksek özgüllüğe sahip ilaç olmakla birlikte genel olarak tüm ilaçların özgüllük değerleri çalışmalarda yüksek (\leq %90) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda Sensititre MycoTB plak yönteminin APY ile uyum yüzdeleri, birinci seçenek anti-TB ilaçlar için %96-99 arasında iken ikinci seçenek anti-TB ilaçlar için %95-100 arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo II). Diğer çalışmalarda Sensititre MycoTB plak yönteminin uyumu, sırasıyla birinci seçenek ilaçlar arasında %98-100, %96-99, %80-99, %87-99 ve ikinci seçenek ilaçlar arasında %95-100, %94-100, %82-99, %94-99 olarak bulunmuştur^{2,14,16,17}. Bu sonuçlara göre çalışmamız bulgularının, diğer çalışmalarla uyum yüzdeleri açısından benzer değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda birinci seçenek anti-TB ilaçlar için iki test arasındaki en yüksek uyum RIF (%99)'da, en düşük uyum ETB (%96)'de saptanmıştır. İkinci seçenek ilaçlar arasındaki en yüksek uyum, AMI (%100)'da, en düşük uyum MXF (%95)'de saptanmıştır. Genel olarak tüm çalışmalarda RIF'in, birinci seçenek anti-TB ilaçlar arasında en yüksek uyuma sahip olduğu belirlenmiştir^{2,14,16}. Birinci seçenek anti-TB ilaçlar arasında en düşük uyum, Lee ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁶ ETB için, diğer yayınlarda ise INH için saptanmıştır^{2,14}. İkinci seçenekler arasında iki testin en yüksek uyumu, Lee ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁶ AMI için, Abuali ve arkadaşları² ile Hall ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁴ ise CYC için saptanmıştır. Diğer bir çalışmada¹⁷ ise iki test arasındaki en yüksek (%99) uyum RIF, OFL, AMI, KAN ve CYC için saptanmıştır. Bunu %98 ile INH ve PAS takip ederken, %87 ile ETB, uyumun en düşük görüldüğü ilaç olmuştur. En düşük uyum, tüm çalışmalarda genelde farklı ilaçlarda saptanmış olup en çok ETH, ETB, PAS ve CYC için gözlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, Lee ve arkadaşlarının çalışması¹⁶ ile ikinci seçenek ilaçlardaki en düşük uyum bulgusu dışında benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda PRE-YİD-TB ve YİD-TB izolati saptanmamıştır. Ancak uygun ilaçlarla tedavi edilmeyen veya tedavisi tamamlanmayan ÇİD-TB hasta kaynaklı yeni YİD-TB izolatlarının her zaman gelişebileceği asla unutulmamalıdır. ÇİD-TB direncine ek olarak herhangi bir florokinolona veya aminoglikozide karşı direnç olması, PRE-YİD-TB olarak tanımlanmaktadır. Bu tedavi rejimi verilen ÇİD-TB'li hastalarda PRE-YİD-TB izolatının bulunmaması, tedavi başarısı açısından önem arz etmektedir¹⁵.

Sensititre MycoTB plak yönteminde pirazinamid gibi birinci seçenek bir ilacın bulunması ve yüksek maliyet (güncel birim fiyatı 310 TL), yöntemin dezavantajları arasında

sayılabilir. Buna karşın inkübasyon süresinin 14 gün gibi kısa olması, duyarlılığın, özgüllüğün ve uyumun yüksek olması, birinci seçenek ve ikinci seçenek ilaçlar duyarlılığının aynı anda değerlendirilmesi ve ilaçların kantitatif olarak MİK değerlerinin saptanması, uygulama kolaylığı, raf ömrünün uzun olması gibi avantajlardan dolayı Sensititre MycoTB plak yönteminin, özellikle ÇİD *M.tuberculosis* kompleks izolatlarının yüksek oranda görüldüğü ve iş yükünün fazla olduğu laboratuvarlarda kullanılacak etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim (BAP Proje No:13-TIP-016). Ayrıca çalışmada bilgisi ve desteğiyle yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU'na, teknik yardımları için Şenay YILDIRIM'a ve Onur UĞUR'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: WHO; 2015. <http://www.who.int/tb/publications/global-report/gtbr15-main-text.pdf>
2. Abuali MM, Katariwala R, LaBombardi VJ. A comparison of the Sensititre MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(5): 835-9.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) April 15, 2005/54(RR06); 1-12. National Plan for Reliable Tuberculosis Laboratory Services Using a Systems Approach. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5406a1.htm>
4. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ankara. Aydoğdu Ofset Matbaacılık, 2014. <http://tb.thsk.gov.tr/UTTR.pdf>
5. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, 2011. http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/30102014133530-tuberkuloz_tani_ve_tedavi_rehberi.pdf
6. World Health Organization. Multidrug and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response. WHO/HTM/TB/ 2010.3. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44286/1/9789241599191_eng.pdf
7. World Health Organization. Drug Resistance Tuberculosis Surveillance and Response. Supplement: Global Tuberculosis Report 2014. WHO, Geneva. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14-supplement_web_v3.pdf
8. Baylan O. İlaça dirençli tüberkülozun tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2012; 32(3): 788-804.
9. Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının sekonder anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılık sonuçları. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17(3): 313-5.
10. 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.
11. Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, Girmachew F, Demessie D, Lemma E. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4): 1093-7.
12. Ermertcan S, Hosgor-Limoncu M, Erac B, Taşlı H, Çavuşoğlu C, Bozkurt H. In vitro activity of linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Western Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(5): 384-5.
13. Mitchison DA. Drug resistance in tuberculosis. *Eur Respir J* 2005; 25(2): 376-9.

14. Hall L, Jude KP, Clark SL, et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex against first- and second-line agents. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3732-4.
15. Jubulis J, Dionne K, Osterhout G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* resistance in pulmonary TB patients in Cameroon: a phenotypic susceptibility assay. Int J Tuberc Lung Dis 2015; 19(7): 823-7.
16. Lee J, Armstrong DT, Ssenogooba W, et al. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58(1): 11-8.
17. Yu X, Ma YF, Jiang GL, Chen ST, Wang GR, Huang HR. Sensititre MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2016; 20(3): 329-34.