

Klinik Örneklerden İzole Edilen Mycobacterium tuberculosis Kompleks İzolatlarının Primer Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Değerlendirilmesi

Evaluation of the Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates Isolated from Clinical Specimens to Primer Antituberculous Drugs

Yeliz Tanrıverdi Çaycı*, Tuğba Avan, Kemal Bilgin, Asuman Birinci

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Samsun

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, 2014 ve 2017 yılları arasında laboratuvarımızda izole edilen Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları retrospektif olarak incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Tüberküloz ön tanısı ile gönderilen örnekler Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanarak, mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca Löwenstein-Jensen besiyeri ve BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize kültür sistemine ekimleri yapılmıştır. Üreme görülen kültür tüplerinde Mycobacterium tuberculosis kompleks tanımlaması ve streptomisin, izoniazid, rifampisin, etambutol duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminde çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışmaya 78 Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatı dâhil edilmiştir. Her hasta için tek bir izolat çalışmaya alınmıştır. Isoniazid, streptomisin, rifampisine ve etambutole direnç oranları sırasıyla %2,3, %14,1, %3,8 %2,5 olarak saptanmıştır. Sadece rifampisine dirençli izolat saptanmamıştır. Hastaların %82'si tüm antibiyotiklere duyarlı olup, antimikobakteriyel ilaçlar içinde en yüksek direnç streptomisin için saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızdaki tekli ilaç direnç oranları ülkemiz 2017 tüberküloz raporu verilerine göre düşük olmakla birlikte, çoklu ilaç direnci nispeten yüksek olarak saptanmıştır. En yüksek tekli ilaç direnci streptomisine karşı saptanmıştır. Aktif sürveyansla direnç verilerin takip edilmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mycobacterium tuberculosis kompleks, antitüberküloz ilaç, direnç

ABSTRACT

Objectives: In this study, we aimed to investigate antituberculosis drug susceptibility of the Mycobacterium tuberculosis complex isolates, between 2014 and 2017 retrospectively.

Materials and Methods: The specimens from patients with a pre-diagnosis of tuberculosis were stained with Ehrlich-Ziehl-Neelsen method and evaluated microscopically. After then, specimens were inoculated onto Löwenstein-Jensen medium and BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, USA) automated culture system. If bacterial growth was detected, Mycobacterium tuberculosis complex typing was done and antituberculosis drug susceptibilities for streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol were tested at BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, USA).

Results: Totally 78 Mycobacterium tuberculosis complex isolates were enrolled in the study. A single strain from each patient was included in the study. Resistance rates of isoniazid, streptomycin, rifampicin and ethambutol were determined as 2,3%, 14,1%, 3,8% and 2,5%, respectively. And only rifampicin resistant isolate was not detected. 82% of the isolates were susceptible to all drugs and the highest resistance among antimycobacterial drugs was determined for streptomycin.

Conclusions: The single drug resistance that determined in our study was lower than 2017 tuberculosis report however the multidrug resistance rate is found partially higher. And the single drug resistance is higher for streptomycin. It is important to monitorize the resistance rates with active surveillance.

Key Words: Mycobacterium tuberculosis complex, antituberculosis drug, resistance

Giriş

Tüberküloz en ölümcül hastalıklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya nüfusunun dörtte biri tüberküloz ile enfektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2017 yılı itibarı ile dünyada 10 milyon kişi tüberküloz basili ile hastalanmış ve 1,3 milyon insan ise tüberküloz hastalığı nedeni ile hayatını kaybetmiştir (1). Türkiye verem savaş 2017 raporuna göre toplam 12,772 tüberküloz hastası 2015 yılında verem savaş dispanserleri kayıtlarına girmiştir. Toplam 12,772 hastada yeni olguların oranı %92,4 (11.803) iken önceden tedavi görmüş olguların oranı %7,6 (969)'dır (2).

Tüberküloz solunum yolu ile bulaşan, en sık akciğerleri tutan bir hastalıktır. Hastaların öksürmesi, hışırtması ve konuşması ile çevreye yayılan ve basil içeren damlacıklarının solunması ile insandan insana geçerek enfeksiyon oluşturmaktadır (3).

Modern tanı, tedavi ve kontrol yöntemlerinin gelişmesine rağmen tüberküloz halen dünyada ve ülkemizde halk sağlığı sorunu oluşturmaya devam etmektedir. Göçler, toplum sağlığı ile ilgili alt yapı sistemindeki yetersizlikler, HIV epidemisi, hasta takibinde yetersizlikler, yetersiz izolasyon işlemleri, tanı ve tedavide gecikmeler, kalifiye eleman yetersizlikleri ve anti-tüberküloz ilaçlara direnç gelişimi tüberküloz hastalığının önlenememe nedenleri olarak sıralanabilir (4).

Tüberküloz tedavisinde amaç; hastayı iyileştirmek, komplikasyon ve mortaliteyi önlemek, nüksleri, bulaşmayı ve dirençli izolatların yayılımını engellemektir. Tedavi çok sayıda ilacın bir arada kullanımı prensibini içerir. Tedavi uzun sürelidir ve en az altı ay süren tedavi ile bakteriyel yükün azaltılması ve sterilizasyonu ana hedefdir. Kemik tutulumu, serebral tutulum gibi bazı koşullarda daha uzun tedavi gerekebilir (5).

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar başlıca iki grupta incelenebilir. Primer ilaçlar; izoniazid (INH), rifampisin (RIF), pirazinamid (PZA), etambutol (ETM), streptomisin (SM)dir. Rifabutın, rifapentin, sikloserin, etiyonamid, amikasin, kanamisin, kapreomisin, paraaminosalisilik asit, levofloksasin ve moksifloksasin gibi daha toksik ve zor tolere edilebilen ilaçlar ise sekonder ilaçlar grubunda yer alır (4). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tüberkülozun başlangıç tedavisinde primer ilaçların kombine kullanımı önerilmektedir. Bununla birlikte antitüberküloz ilaç direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Primer antitüberküloz ilaçlardan en

azından INH ve RIF direnci gösteren izolatlar "çok ilaca dirençli (ÇİD)" olarak tanımlanmaktadır (5,6).

Tüberküloz basiline anti-tüberküloz ilaçlara karşı her geçen gün direnç sorunu artmaktadır. Bu çalışmamızda laboratuvarımızda izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTK) izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarını değerlendirmeyi ve direnç oranlarını belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına Ocak 2014- Aralık 2017 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen 78 adet MTK suşu retrospektif olarak incelenmiştir. Laboratuvara gelen örnekler %4'lük NaOH çözeltisi kullanılarak homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi uygulandıktan sonra üretici firmanın önerileri doğrultusunda BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sıvı kültür tüplerine ve Löwenstein-Jensen besiyerine (Becton Dickinson, ABD) ekilmiş ve Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ile boyamak için en az iki preparat hazırlanmıştır. Steril örnekler ise homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi uygulanmadan çalışmaya alınmıştır. Direkt yayma preparatları EZN boyası ile incelenmiştir. MGIT tüplerine kontaminasyonu önleme amacı ile ekimden önce 0,8 mL PANTA (Polimiksin B, Amfoterisin B, Nalidiksik Asit, Trimetoprim, Azlosilin) solüsyonu eklenmiştir. Aynı tüplere daha sonrasında işlenmiş klinik örneklerden 0,5'er mL ekimi yapılarak, örnekler otomatize cihazlar ile pozitif uyarı alınıncaya kadar veya sekiz hafta boyunca inkübe edilmiştir. Üreme sinyali alınan tüpler aside dirençli boyama yapılarak kontaminasyon ve pozitiflik açısından değerlendirilmiştir. Mikroskopide asidorezistan pozitif olarak tespit edilen örneklerden 100'er µl MPT64 antijenini saptayan BD MGIT TBC Tanımlama Testi (Becton Dickinson, ABD) kitlerine damlatılarak kit prosedüründe belirtilen 15 dakikalık süre sonunda pozitif sonuç veren örnekler MTK, negatif sonuç veren örnekler tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) olarak değerlendirilmiştir. MTK bulunan örneklerin INH (0,1 µg/mL), RIF (1,0 µg/mL), ETB (5,0 µg/mL) ve SM (1.0 µg/mL) antibiyotiklerine karşı oluşan duyarlılık durumları üretici firmanın önerileri doğrultusunda BACTEC MGIT 960 SIRE kit (Becton Dickinson, ABD) sistemi kullanılarak araştırılmıştır. Duyarlılık testlerinin kalite kontrolünde, denenen ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* ATCC 27294 (H37Rv) izolatı kullanılmıştır.

Bulgular

Ocak 2014-Aralık 2017 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 78 adet MTK izolatu retrospektif olarak incelenmiştir. MTK izolatları en sık olarak bronkoalveolar lavaj sıvısından (%37,1), aklık mide sıvısından (%16,6) ve balgamdan (%14,1) izole edilmiştir. Bu örneklerden 19'u pediatrik hastalara aitken, kalan 59 örnek yetişkin hastalara aitti. Etkenlerin izole edildiği klinik örneklerin dağılımı tablo 1'de sunulmuştur.

Çalışılan 78 izolattan, 64 (%82) tanesi tüm anti-tüberküloz ilaçlara duyarlı bulunurken 14 (%18) örnekte direnç saptanmıştır. Tek ilaca direnç oranları değerlendirildiğinde en yüksek oran SM ile elde edilirken (%8,9), iki ilaca dirençte INH+SM (%2,5); üç ilaca dirençte ise INH+RIF+SM (%1,2) ile en yüksek oranlar gözlenmiştir. INH ve RIF direnci saptanan ÇİD-MTK sayısı 2 (%2,5) olarak bulunurken tüm ilaçlara dirençli izolat sayısı 1 (%1,2) olarak tespit edilmiştir (tablo 2).

Tartışma

Tüberküloz önemli ve öncelikli bir toplum sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Hızlı ve doğru tanı ile birlikte uygun ilaç tedavisi hastalığın kontrolünde büyük öneme sahiptir. Tüberküloz tedavisinin ana ilkeleri; kısa süreli standart tedavi rejimleri seçilmesi, ilaçların doğrudan gözetimli tedavi (DGT) ile düzenli kullanılması, ilaçların yeterli süre kullanılması şeklinde sıralanabilir (7). Tüberküloz tedavisinde en önemli faktörün ilaçlar olduğu; dinlenme, beslenme ve iklim gibi diğer faktörlerin etkilerinin önemsiz olduğu belirtilmiştir (8).

Tedavinin başlangıcında basil sayısı en yüksek düzeyde olduğundan dirençli mutant suşların ortaya çıkma olasılığı en yüksektir. Tüberküloz ilaçları, basilleri hızla öldürür (erken bakterisidal aktivite), ilaç direnci gelişimini önler (direnç gelişimini önleyici aktivite) ve hastanın vücudundaki basilleri sterilize eder (sterilize edici aktivite). Bu etkiler için, özellikleri olan ilaçlar bir arada ve yeterli süre kullanılmalıdır. Sonuçta hastada hem kür sağlanması ve hem de nüks etme olasılığının düşük olması amaçlanmaktadır (9).

INH ve RIF en az yan etkiye sahip en etkili antitüberküloz ilaçlardır (10). Tüberküloz tedavisinde RIF ve INH'a karşı direnç birlikteliğinin olduğu, diğer kullanılan primer ilaçlardan da bu direnç durumlarına dâhil olabildiği suşlar çoklu ilaca dirençli (ÇİD) olarak değerlendirilmektedir. INH ve RIF direncine ek olarak bir kinolona ve parenteral yolla kullanılan kanamisin, kapreomisin, amikasin gibi ilaçlardan en az birine karşıda direnç görülen izolatlar

yaygın ilaç dirençli (YİD) şeklinde tanımlanmıştır (9,10). ÇİD ve YİD'e sahip izolatlar tedavide önemli soruna neden olmaktadır. Bundan dolayı tedavinin doğru planlanması, bulaşmanın ve direnç yayılımının engellenmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Dünyada ve ülkemizde tüberküloz ilaçlarına karşı direnç önemli sorunlar oluşturur. DSÖ'nun "Küresel Tüberküloz 2018 Raporu"na göre dünyada 2017 yılında 160684 ÇİD olgusu tespit edilmiş ve 2016'ya göre az artış olduğu tespit edilmiştir. Aynı raporda Türkiye için 2017 yılında yeni ÇİD olgu oranı %3,3 olarak belirtilmiştir. (1). Sağlık Bakanlığı'na yayınlanan "Türkiye'de Verem Savaşı 2017 Raporu"nda ülkemizdeki 2015 yılındaki direnç oranları INH için %11,8; RIF için %3,6; EMB için %3,6; SM için %10,3 olarak verilirken ÇİD-TB oranı %2,5 olarak verilmiştir. Bu verilerde en yüksek direnç oranına sahip olan birinci seçenek anti-TB ilaç INH'dır (2). Çalışmamızda, elde edilen izolatlarda direnç oranları, INH için %2,3, RIF için %3,8, SM için %14,1, EMB için %2,5 olarak tespit edilmiştir. ÇİD-TB oranı %3,6 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda birinci seçenek anti-TB ilaçlar içinde en yüksek direnç SM için saptanmış olup, ÇİD-TB oranı ise Türkiye ortalamasının üzerinde bulunmuştur. Çalışmamızda izole streptomisin direncinin yüksek olması dikkat çekmektedir. Streptomisin direnci ribozomda meydana gelen mutasyonlar ile olmaktadır, mutasyon başlıca rpsL geninde olmaktadır, rrs geni sekonder mutasyon yeridir (11).

Çalışmamızda 78 olgudan 64 (%82)'ü tüm ilaçlara duyarlı bulunmuştur. Bu konuda ülkemizde 2002-2017 yılları arasında değişik bölgelerde yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (5,12-21). Bu çalışmalar tüm ilaçlara duyarlılık yönünden incelendiğinde en yüksek oran Özmen ve ark. (21) 2017 yılında Erzurum'da yaptıkları çalışmada %88,3, en düşük oran da Orhan ve ark. (13) 2002 yılında Gaziantep'te yaptıkları çalışmada %59,2 olarak bulunmuştur. Ülkemizin sosyoekonomik durumu, iklim şartları, gelişmişlik seviyesi bölgeler arasında farklılık göstermesi nedeniyle direnç değerlerinde farklılıklar görülmektedir. Ayrıca incelenen hasta grupları, kullanılan duyarlılık yöntemleri ve ilaç konsantrasyonlarındaki değişimler de farklı sonuçların elde edilmiş olmasına sebep olabilmektedir.

Sonuç olarak önemli bir halk sağlığı sorunu olan tüberkülozda direncin gelişimini ve yayılımını izlemenin, hastalığı ülkemizdeki durumunu takip edebilmek için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca direnç oranlarının doğru ve düzenli takibi, *M. tuberculosis*'in doğal olarak yavaş üremesi nedeniyle zaman alan antibiyotik duyarlılık testlerinden dolayı uygulanmak zorunda kalınabilecek olan ampirik tedavi protokollerine de katkı sağlanabilecektir. Çalışılan

Tablo 1. *M. tuberculosis* kompleks kökenlerinin izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı n (%)

BAL	AMS	Balgam	Apse	Plevral Sıvı	Ameliyat Materyali	BOS	Diğer	Toplam
29 (37,1)	13 (16,6)	11 (14,1)	7 (8,9)	6 (7,6)	5 (6,4)	1 (1,2)	6 (7,6)	78 (100)

BAL: bronkoalveolar lavaj sıvısı, AMS: açlık mide sıvısı, BOS: beyin omurilik sıvısı

Tablo 2. Antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları

	2014	2015	2016	2017	Toplam
Tüm ilaçlara duyarlı	14 (82)	13(92,8)	17 (80,9)	20 (76,9)	64 (82)
Herhangi bir ilaca direnç					
INH	1 (16,6)	1 (50)	2 (33,3)	2 (25)	6 (2,3)
RIF	1 (16,6)	0 (50)	0	2 (25)	3 (3,8)
ETM	1 (16,6)	0 (50)	0	1 (12,5)	2 (2,5)
SM	3 (50)	1 (50)	4 (66,6)	3 (37,5)	11 (14,1)
Tek ilaca direnç					
INH	0	0	1 (2,1)	0	1 (1,2)
RIF	0	0	0	0	0 (0)
ETM	0	0	0	1 (3,8)	1 (1,2)
SM	2 (11,7)	0	2 (19)	3 (14,2)	7 (8,9)
Çok ilaca direnç (ÇİD)					
INH+RIF	0	0	0	1 (3,8)	1 (1,2)
INH+RIF+SM	0	0	0	1 (3,8)	1 (1,2)
INH+RIF+SM+ETM	1 (5,8)	0	0	0	1 (1,2)
Diğer direnç paterni					
INH+SM	0	1 (7,2)	1 (2,1)	0	2 (2,5)
Toplam	17 (100)	14 (100)	21(100)	26 (100)	78 (100)

INH: izoniazid, RIF: rifampisin, ETM: etambutol, SM: streptomisin

örnek sayısı, direnç durumunu tespit etmek için yetersiz olsa da tedaviye yön vermek için ilaç duyarlılık testi çalışmalarının yapılması gerektiğini göstermektedir. Doğru tanı ve tedavi için klinik ve laboratuvar dalları iş birliği içinde çalışmalıdır.

Kaynaklar

1. Global Tuberculosis Report 2018, World Health Organization, https://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/publication/WHO_Global_TB_Report_2018_summary.pdf (ET: 05.11.2019)
2. Türkiye'de Verem Savaşı 2017, T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/haberler/verem-savas-raporu-20162017/Turkiyede_Verem_Savasi_2017_Raporu.pdf (ET:1.11.2018)
3. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi 2014, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/12112014161127-UTTR.pdf> (ET:1.11.2018)
4. Durmaz R. Mycobacterium tuberculosis'de direnç sorunu. ANKEM Derg 2005; 19(2): 107-110.
5. Öz Y, Aslan M, Akşit F, Durmaz G, Kiraz N. Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2012; 26(1): 20-24.
6. Global Tuberculosis Report 2005, World Health Organization <http://library.cphs.chula.ac.th/Ebooks/AnnualReport/TB/TB2005.pdf> (ET:1.11.2018)
7. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi 2011, TC Sağlık Bakanlığı, http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/30102014133530tuberkuloz_tani_ve_tedavi_rehberi.pdf (ET:1.11.2018)
8. Fox W, Mitchison DA. Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1975; 111:325-353.
9. Baylan O. İlaça dirençli tüberkülozun tedavisi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012; 32(3): 788-804.
10. Özkara S. Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİDTB). Solunum Hastalıkları 2007; 18: 88-92.
11. Acıcan T, Kaya A. Tüberkülozda direnç gelişme mekanizmaları. Tüberküloz ve Toraks 1998; 46: 12-17.

12. Kısa Ö, Albay A, Baylan O, Doğancı L. Mycobacterium tuberculosis suşlarında antitüberküloz ilaç direnç oranlarının BACTEC 460 TB kültür sistemi ile değerlendirilmesi. Flora Derg 2002; 7(3):171-176.
13. Orhan G, Zer Y, Bayram A, Balcı İ, Korkmaz G. Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 32(3): 225-229.
14. Kocazeybek B. Tüberküloz tanısında BBL-“Mycobacteria-Growth Indicator Tube (MGIT)” Yönteminin “Löwenstein Jensen” besiyeri ile karşılaştırılması ve izole edilen suşların dört majör ilaca karşı dirençlerinin değerlendirilmesi. Flora Derg 2002; 7(2): 112-119.
15. Özekinci T, Özbek E, Gedik M, Temiz H, Atmaca S. 2001-2003 yılları arasında izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarında ilaç direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36(1): 31-34.
16. Günlügör U, Bakıcı Z, Günlügör T, Hasbek M. Sivas ilinde antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Mikrobiyol Bul 2007; 41(3):459-463.
17. Dündar D, Sönmez G. Mycobacterium tuberculosis kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnc oranları. Klimik Derg 2009; 22(2): 52-54.
18. Atalay M, Çolakođlu S, Delice S, Durmaz S, Koç A, Kılıç H. Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen Mycobacterium tuberculosis kompleks suşlarının major anti-tüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2011; 41(2):57-60.
19. Alışkan H, Bostanođlu E, Turunç T, Çolakođlu Ş, Demirođlu Y, Kurşun E ve ark. Retrospektif olarak tüberküloz laboratuvarının altı yıllık sonuçları ve antimikobakteriyel ilaçlara direnc oranları. Turk Toraks Derg 2013; 14: 53-58.
20. Taşbent F, Dođan M. Konya ilinde klinik örneklerden izole edilen Mycobacterium tuberculosis kompleks suşlarının birinci seçenek anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2016; 46(4):165-171.
21. Özmen E, Aslan A, Uçar M. Erzurum Bölge Tüberküloz Laboratuvarında izole edilen Mycobacterium tuberculosis kompleksi suşlarının primer anti-tüberküloz ilaçlara direnç oranları. ANKEM Derg 2017; 31(2): 53-58.