

# Afyon Bölgesinde Löwenstein-Jensen, Bactec ve TK Medium Yöntemleri İle İzole Edilen *Mycobacterium Tuberculosis* Suşlarının Dört Major İlaç Karşı Dirençlerinin Belirlenmesi

*Identification of Resistance of Mycobacterium Tuberculosis Species Isolated By Lowenstein-Jensen, Bactec and TK Medium Methods To Four Major Anti-Tuberculosis Drugs in The Region of Afyon*

Murat İŞİTEZ<sup>1</sup>, Zafer ÇETİNKAYA<sup>1</sup>, Mustafa ALTINDIŞ<sup>1</sup>, İ.Hakkı ÇİFTÇİ<sup>1</sup>, Fatma FİDAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

**ÖZET:** Bu çalışmada 280 klinik örnek farklı yöntemlerle incelemeye alınıp tüberküloz açısından değerlendirilmiş ve saptanan *M. tuberculosis* kökenlerinde temel antitüberküloz etkenlere karşı direnç durumları araştırılmıştır.

İncelenen 280 klinik örneğin 41'inden (%14.6) çalışılan yöntemlerle pozitif sonuç alınmıştır. Pozitif bulunan 41 örneğin 31'i (%75.6) Erlich Ziehl Neelsen, 38'i (%92.7) Löwenstein-Jensen, 23'ü (%56.1) BACTEC 460TB ve 21'i de (%51.2) TK MEDIUM yöntemleri ile pozitif bulunmuştur.

Uygulanan niasin ve NAP identifikasyon testleri sonrasında 41 suşun 26(%63.4) adedinin *M. tuberculosis* kompleksi, 15(%36.6) adedi *M. tuberculosis* dışında *Micobacterium* (veya atipik *Micobacterium*) basili olarak tanımlanmıştır.

İzole edilen 26 *M. tuberculosis* suşunun 16'sında (%61.5) ilaç direncine rastlanmazken kalan 10 suşa; izoniazid'e direnç 1(%3.8), etambutol'e direnç 2(%7.7), streptomisin'e direnç 1(%3.8), iki ilaca birden direnç 5(%19.2) ve tüm ilaçlara direnç 1(%3.8) olguda bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *M. tuberculosis*, Löwenstein-Jensen, BACTEC TB460, TK MEDIUM, Major İlaç Direnci.

**ABSTRACT:** In this study, 280 clinic specimens were investigated for assignment of tuberculosis by various methods and resistance patterns against antituberculosis drugs are examined.

Forty one of 280 clinic specimens (14.6%) were positive by these methods. 31(75.6%) of these specimens found by Erlich Ziehl Nielsen smear strain method, 38(92.7%) by Löwenstein-Jensen, 23 by (56.1%) BACTEC 460TB and 21 by (51.2%) TK MEDIUM.

NAP and niacin identification test was applied for *Mycobacterium* strains. 26(63.4%) of 41 isolates were identified as *M. tuberculosis* complex and 15(%36.6) were as *Micobacterium* other than tuberculosis bacilli.

Sixteen (61.5%) of 26 isolated *M. tuberculosis* complex strains were not resistant to any major drug. But 10 of these isolates were resistant to the isoniazid, etambutol and streptomycin are 1(3.8%), 2(7.7%) and 1(3.8%) strains respectively. There were 5(19.2%) strains resistant to two of the drugs and 1(3.8%) strain was resistant to four of the drugs.

**Key Words:** *M. tuberculosis*, Löwenstein-Jensen, BACTEC TB460, TK MEDIUM, Major Drug Resistant.

## GİRİŞ

Tüberküloz, geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Tüberküloz basiline kısa sürede tanımlanması, ilaç direncinin saptanması ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi etkin bir tedavi için çok önemlidir. Bu nedenle klasik laboratuvar tanı yöntemleri yanında hızlı sonuç veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir yeni kültür yöntemleri ile moleküler biyoloji teknikleri geliştiril-

mektedir(1). BACTEC TB460 sistemi ile mikobakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve ilaç duyarlılıkları diğer konvansiyonel yöntemlere göre iki-üç hafta daha erken yapılabilmekte ve kısa sürede uygun ve etkili tedaviye başlanabilmektedir (2). Bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, hazırlanan preparatlarda mikobakterilerin görülmesi ve ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ile mümkün olur (1,3). Tüberkülozun laboratuvar tanısındaki başarı; klinik örneğin uygunluğuna, örneklerin alınmasına ve örneğin laboratuvara gönderilme koşullarına bağlıdır (2,4,5).

Bu çalışmada Afyon bölgesinde tüberküloz ön tanımlı örneklerde *M. tuberculosis*'in "Löwenstein-Jensen:L-J", BACTEC TB460 ve TK MEDIUM yöntemleri ile saptanıp dört major ilaca karşı dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzole edilen *M. tuberculosis* kompleks suşlarının tedavide kullanılan primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı incelenmiştir.

### GEREÇ ve YÖNTEM

Tüberküloz ön tanımlı hastalardan elde edilen 280 klinik örnek, 01/01/2002-31/03/2003 tarihleri arasında mikobakteriyolojik inceleme amacı ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalına ait laboratuvara gönderilmiştir. Laboratuvara gönderilen örneklerin dekontaminasyon, homojenizasyon, nötralizasyonunun yapılmasında ticari kit kullanılmıştır (Dio-Safeprocess, Dio-Med AŞ.). Örneklerden Erlich Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi ile hazırlanan preparatlarda Aside rezistan bakteri (ARB) varlığı araştırılmıştır. Gönderilen balgam, mide açlık sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, idrar, BOS, abse materyali, kan, vücut sıvıları (plevra, perikard, periton, asit sıvısı, sinovyal sıvı, kemik iliği) ve diğer örnekler mikroskopik inceleme ek olarak 2 katı 1 sıvı, 3 farklı kültür vasatına (L-J besiyeri, hazırlanmış yoksa hazırladığımızı, BACTEC 12B besiyeri (Becton Dickinson) ve TK-MEDIUM kültür besiyerleri (Dio-Med) ekilmiştir. İzole suşların *M. tuberculosis* kompleks ve atipik mikobakteri ayırımı niasin ve para-nitro-asetiaminobetahidroksipropiyofenon (NAP) testleri ile yapılmıştır.

Bu çalışmada antitüberküloz ilaç direnci L-J proporsiyon yöntemi ile yapılmıştır (kaynak). Test edilen antitüberküloz ilaçlar isoniasid (INH), etambutol (EMB), rifampisin (RIF) ve streptomisin (SM) olarak alınmış ve özetle aşağıdaki gibi çalışılmıştır. İlaç derişimleri; INH 0.2µg/ml, 1µg/ml, RIF 40µg/ml, 20µg/ml, SM 4µg/ml, 8µg/ml, EMB 2µg/ml, 4µg/ml olarak alınmıştır. Üremiş taze kültürden birkaç koloni öze ile alıp süspansiyon tüpündeki boncuklar arasına karıştırılıp vorteks ile iyice çalkaladıktan sonra yaklaşık 0.5 Mc Farland bulanıklık değerinde süspansiyon elde edildi. Süspansiyon tüpünden steril pipet ucu ile 100µl alarak 10<sup>-2</sup> seyreltim tüpüne aktarılıp vorteksle çalkalanmıştır. 10<sup>-2</sup> seyreltim tüpünden 100µl alarak 10<sup>-4</sup> seyreltim tüpüne eklenmiş ve vorteksle çalkalandıktan sonra 10<sup>-2</sup> seyreltim tüpünden, ilaçsız ve ilaçlı L-J

besiyerlerine 100µl ekim yapılmıştır. 10<sup>-4</sup> seyreltim tüpünden ilaçsız L-J besiyerine 100µl ekim yaptıktan sonra besiyerleri normal L-J kültürü gibi inkübe edilmiş yaklaşık 30 gün sonunda üremeleri değerlendirilerek antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Çalışmanın tüm aşamaları Class II tipi güvenlik kabini içinde gerçekleştirilmiştir.

### BULGULAR

Tüberküloz ön tanısıyla laboratuvara gönderilen 280 klinik örneğin 41'inde mikobakteri suşu üretilmiştir (Tablo ).

**Tablo: İncelenen Örnekler ve Kültür Pozitifliğine Göre Dağılımları**

Klinik Örnek	İncelenen Örnek Sayısı	(%)	Kültür pozitifliği	(%)
Balgam	167	59,7	26	9.3
Beyin Omurilik Sıvısı	11	3,9	3	1.1
İdrar	31	11	4	1.4
Bronkolalvoel Lavaj	6	2,1	3	1.1
Plevral Sıvı	12	4,3	1	0.35
Açlık Mide Sıvısı	18	6,4	2	0.7
Eklemler Sıvısı	18	6,4	-	-
Periton Sıvısı	15	5,5	1	0.35
Püü	2	0,7	1	0.35
TOPLAM	280	100	41	14.65

Üreme saptanan örneklerin 29'u (%70.7) akciğer kaynaklı, 12'si (%29.3) akciğer dışı örneklerden oluşmaktadır.

Üretilen suşların niasin ve NAP tanımlama testleri kullanılarak yapılan identifikasyonunda 26/280 (%9.3) *M. tuberculosis*, 15/280 (%5.4) atipik mikobakteri basilleri olarak tanımlanmıştır. Mikobakteri yönünden anlamlı bulunan 41 örneğin, 31(%75.6)'inde EZN boyama yöntemi ile, 38(%92,7)'inde L-J kültür yöntemi ile, 23(%56.1)'inde BACTEC TB460 hızlı tanı kültür yöntemi ve 21(%51.2)'inde yeni bir kültür sistemi olan TK MEDIUM ile pozitiflik bulunmuştur.

Çalışma kapsamına alınan 280 örneğin incelenmesi sırasında L-J kültür yönteminde 4 (%1.4), BACTEC TB460'da 10 (%3.6) ve TK-MEDIUM kültür yönteminde 8 (%2.9) örnekte kontaminasyon saptanmıştır.

L-J proporsiyon yöntemine göre , izole edilen 26 *M. tuberculosis* suşunun 16'sında (% 61.5) ilaç direncine rastlanmazken kalan 10 suşta; Isoniazid'e direnç 1 (%3.8), Etambutol'e direnç 2 (%7.7), Streptomisin'e direnç 1 (%3.8), iki ilaca birden direnç 5 (%19.1) [Isoniazid-streptomisin, streptomi-

sin-rifampisin, streptomisin-etambutol ve rifampisin-etambutol'a birlikte direnç gösteren suş sayıları ve oranları ise sırası ile 2 (%7.7), 1 (%3.8), 1 (%3.8) ve 1 (%3.8)] ve tüm ilaçlara direnç 1 (%3.8) oranında bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Tüberkülozun tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen bütün dünyada özellikle gelişimini tamamlamamış ülkelerde halen yaygın bir hastalıktır. Günümüzde immün sistemi baskılayan infeksiyon ve malignitelerin oranındaki artışla doğru orantılı olarak tüberküloz infeksiyonu taşıyan birey sayısında da artış görülmektedir. Tüberküloz hastalığında tedavinin hızı ve çabukluğu oldukça önemli bir noktadır ve tedaviye başlanılabilmesi içinde tanının konulması gerekmektedir. Bunun için duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanı yöntemleri kullanılması gereklidir (2,6,7).

Mikobakterilerin kültür ortamında üretilmesinde değişik kültür ortamlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda; Abe ve ark. (8), 245 balgam örneğinden 86 (%35.1) mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların %93'ünü BACTEC ve %75.6'sının da yumurtalı Ogawa besiyerinde ürediğini, Somoskovi ve ark. (9), 357 klinik örnekten 57 (%15.9) mikobakteri suşu izole etmişler ve bu suşların %93'ünü BACTEC ve %80.7'sini L-J besiyerinde izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kirihara ark. (10), tarafından yapılan çalışmada, solunum yollarına ait 56 örneğin %98'i BACTEC ve %76'sının da L-J besiyerinde ürediği belirlenmiştir.

Uzun (5), 346 klinik örnekten 36 mikobakteri suşu izole etmiş ve bu suşların %94.4'ünü BACTEC ve %47.2'sini L-J besiyerinde üretmiş, Koç ve ark. (11), 2254 klinik örnekten 102 mikobakteri suşu izole etmişler, bunların %76.5'ini BACTEC ve %49'unu da L-J besiyerinde ürediğini görmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda izole edilen 41 örneğin, 38'i (%92.7) Löwenstein-Jensen, 23'ü (% 56,1) BACTEC 460TB ve 21'i de (%51,2) TK MEDIUM kültür yöntemleri ile üretilmiştir.

Çalışmamızdaki L-J ve BACTEC 460TB kültür sonuçları ile diğer araştırmacıların elde ettiği sonuçlar arasında farklar söz konusudur. BACTEC 460TB sistemindeki oranın benzer çalışmalara göre L-J'den düşük bulunması; laboratuarda L-J kültür yönteminin uzun süredir rutinde kullanılıyor olması, BACTEC 460TB sisteminin yeni kurulması, örnekendirme hataları ve gönderilen klinik örneklerin çeşitliliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Yeni bir kültür sistemi olan TK MEDIUM pozitiflikleri-

nin ise beklentilerin altında gerçekleşmiş olup bunun daha geniş kapsamlı çalışmalarda değerlendirilmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır.

Çalışmalardaki kontaminasyon oranları; Somoskovi ve ark. (9), BACTEC sisteminde %2.9, L-J besiyerinde %1.2, Kirihara ark. (10), BACTEC sisteminde %1.6, L-J besiyerinde ise %5.5 olarak bildirmişlerdir. Uzun (5), BACTEC sisteminde %6, L-J besiyerinde % 7, Koç ve ark. (11), BACTEC'de %8 ve L-J besiyerinde %4.3 ve Özekinci (2), BACTEC'de %6.4, L-J besiyerinde %7.3 şeklinde olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda L-J kültür yönteminde 4(%1.4), BACTEC TB460'da 10(%3.6) ve TK-MEDIUM kültür yönteminde 8(%2.9) örnek de kontaminasyon saptanmıştır. Benzer çalışmalara göre kontaminasyon oranı daha düşük bulunmuştur.

Tüberküloz olguları incelendiğinde 1986 yılı CDC (Center of Diseases Control) verilerine göre olguların %17.5'inin akciğer dışı tüberküloz olguları oldukları görülmektedir. Son yıllarda tanısının ve bildirim oranının artması nedeniyle akciğer dışı tüberküloz olgularının özellikle gelişmiş ülkelerde arttığı bildirilmektedir (12). Bizim olgularımızda akciğer dışı tüberküloz oranının yüksek olması bölgemiz içinde akciğer dışı tüberkülozun önemli bir sağlık sorunu olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalardaki ilaç duyarlılıkları; Karabay ve ark. (13), 214 *M. tuberculosis* suşunda %20.1 bir ilaca, %22.4 iki ilaca, %6.4 üç ilaca ve %0.5 dört ilaca direnç bulmuşlar, Balcı ve ark. (14), 199 suşda %17.6 tek ilaca, %15.6 iki ilaca, %12 üç ilaca ve dört ilaca birden direnç gösteren suş tespit edememişlerdir. Kısa ve ark. (15), *M. tuberculosis* izolatların %14.4'ü en az bir ilaca dirençli bulurken dört ilacın tümüne birden dirençlilik oranını %0.5 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda izole edilen 26 *M. tuberculosis* suşunun antibiyogram sonuçlarına 16'sında (%61.5) herhangi bir ilaç direncine rastlanmaz iken 4(%15.3) suşun tekli, 5(%19.2) suşun ikili ve 1 (%3.8) suşun da dörtlü ilaç direncine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Ülkemizde antibiyotik duyarlılığı üzerine yapılmış olan çalışmalar ve araştırmamız incelendiğinde bir ve ikili ilaç dirençlerinin benzeştiği, 1(%3.8) suşun major ilaçların tümüne direnç göstermesi oransal olarak benzer çalışmalardan biraz yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin diğer çalışmalara göre çalışılan suş sayısının azlığından kaynaklanabileceği kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak tüberküloz hastalığının tanısında birden fazla tanı yönteminin birlikte uygulanması

hastalığın saptanabilirliğini artırmaktadır. Bununla birlikte etkili ve başarılı bir tedavi yürütülebilmesinde erken tanı konulmasının yanında etkili tedavisi önemlidir. Etkili tedavi için bölgesel direnç oranlarının bilinmesi yararlıdır. Bölgemizde direnç oranlarının sorun oluşturabileceği kanısına varılmıştır. Tedavi yanıtı durumu ilaç duyarlılıklarının belirlenmesi ve tedavinin antibiyogram sonuçlarına göre yapılması düşünülmelidir.

### KAYNAKLAR

1. Tekerekoğlu S, Durmaz R, Özerol İ. *Mycobacterium tuberculosis*'in laboratuvar tanısı. Turgut Özal Tıp Merkezi Derg, 2000;7; 171-76.
2. Özekinci T. Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, fluokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. 2000.
3. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 1996;26; 11-15.
4. Ustaçelebi Ş, (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. In: Kıyan M. *Mycobacteriaceae*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999.
5. Uzun M. Tüberküloz tanısında Erlich-Ziehl-Nielsen, fluokrom boyama yöntemleri ile BACTEC ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi. İst. Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. 1994.
6. Anđ Ö, Uzun M. Türkiye'de tüberkülozun son durumu. Klimik Derg, 1999;11; 3-5.
7. Kocagöz T. Tüberküloz tanısındaki yenilikler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji. Nobel Kitabevi. 2002.
8. Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, et al. Comparison of MB-Check BACTEC and Egg-Based media for recovery of *mycobacteriae*. J. Clin Microbiol, 1992; 30; 878.
9. Somoskövi A, Ködmon C, Lantos A et al. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BATEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium. J. Clin Microbiol, 2000; 38; 2395-97.
10. Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium complex* and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. J. Clin Microbiol, 1985; 22; 841.
11. Koç AN, Özcan M, Özbal Y, ve ark. Comparison of BACTEC TB system and conventional methods for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens. İnfeksiyon Derg, 1996; 10; 65-6.
12. Rieder HL, Snider DE Jr, Cauthen GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. Am Rev Respir Dis, 1990;141(2):347-51.
13. Karabay O, Otkun M, Akata F, ve ark. Trakya bölgesinde antitüberküloz ilaç direnci ve ilişkili risk faktörleri. İnfeksiyon Derg, 1999; 13; 43-50.
14. Balcı İ, Bayram A, Filiz A. *Mycobacterium tuberculosis*'de birinci seçenek ilaçlara direnç. İnfeksiyon Derg, 1999; 13; 521-25.
15. Kısa Ö, Albay A, Baylan O, ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında antitüberküloz ilaç direnç oranlarının BACTEC 460 TB kültür sistemi ile değerlendirilmesi. Flora Derg, 2002; 7; 171-76.