

## BİRİNCİ SEÇENEK ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLI VE ÇOK İLACA DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEKS KLİNİK İZOLATLARINDA AMİKASİN, MOKSİFLOKSASİN VE KANAMİSİN DUYARLILIKLARININ RESAZURİN MİKROTİTRE PLAK YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI\*

Mahmut ÜLGER<sup>1</sup>, Nurbanu YAŞAR<sup>2</sup>, Hamide KAYA<sup>2</sup>, Eyyüp KAYA<sup>2</sup>, Osman SEZER<sup>2</sup>, Gönül ASLAN<sup>2</sup>

M. Ülger: 0000-0001-6649-4195, N. Yaşar: 0000-0001-8461-6723, H. Kaya: 0000-0002-2956-8762, E. Kaya: 0000-0001-9328-0088, O. Sezer: 0000-0002-4938-9761, G. Aslan: 0000-0002-1221-7907

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

### ÖZ

Tüberküloz (TB) dünya çapında en yaygın ölüm nedenlerinden biridir. Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olguları düşük tedavi başarısı, kötü prognoz ve yüksek tedavi maliyetleri ile önemli bir sorundur. Çalışmamızda birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) izolatlarının ve ÇİD-TB izolatlarının amikasin (AK), moksifloksasin (MOKS) ve kanamisin (KAN) duyarlılıklarını resazurin mikrotitre plak yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır. Mikobakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan birinci seçenek ilaçlara duyarlı 19 izolat ile izoniazid ve rifampisine dirençli (ÇİD-TB) 12 izolat olmak üzere toplam 31 adet MTC izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Duyarlı izolatlarda her üç ilaca da direnç saptanmamıştır. ÇİD-TB izolatlarından üçü (3/12) AK'a, ikisi (2/12) MOKS'a ve dördü (4/12) KAN'a dirençli bulunmuştur. ÇİD-TB izolatlarından bir tanesinin her üç ilaca da dirençli olduğu saptanmıştır. ÇİD-TB izolatları arasında yaygın ilaç direnci (YİD-TB) %8 (1/12) olarak tespit edilmiştir. Çok ilaca direnç gelişiminden sonra YİD-TB görülmesi TB tedavi başarısında önemli bir sorundur ve tedavide etkin yol izleyebilmek için direnç profillerini belirlemek gereklidir. Çalışmamızda ÇİD-TB izolatlarında saptanan AK, MOKS ve KAN direncinin hem anti-TB tedavisinin daha sıkı takip edilmesine hem de yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** amikasin, kanamisin, moksifloksasin, *Mycobacterium tuberculosis*, resazurin

### ABSTRACT

#### Investigation of Amikacin, Moxifloxacin and Kanamycin Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates Susceptible and Multidrug resistant to First-Line Antituberculosis Drugs with Resazurin Microtiter Plate Method

Tuberculosis (TB) is one of the most common causes of death worldwide. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) cases are an important problem with low treatment success, poor prognosis and high treatment costs. In our study, it was aimed to investigate the susceptibility of amikacin (AK), moxifloxacin (MOX) and kanamycin (KAN) from MTC isolates susceptible to first-line anti-TB drugs and MDR-TB isolates by using the resazurin microtiter plate method.

A total of 31 MTC isolates, including 19 isolates susceptible to first-line anti-TB drugs and 12 isolates resistant to isoniazid and rifampicin (MDR-TB), from the culture collection of mycobacteriology laboratory were included in the study.

No resistance was found to all three drugs in susceptible isolates. For the MDR-TB isolates, three (3/12) were resistant to AK, two (2/12) to MOX, and four (4/12) to KAN. In the MDR-TB isolates, one of them was found to be resistant to all three drugs. Extremely drug resistant tuberculosis (XDR-TB) among MDR-TB isolates was 8% (1/12).

**İletişim adresi:** Mahmut Ülger, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir Kampüsü, 33169, Yenişehir, MERSİN

Tel: (0324) 341 28 15/12152, GSM: (0532) 408 76 03

e-posta: mahmutulg@yahoo.com.tr

Received/Geliş: 16.06.2022 Accepted/Kabul: 12.10.2022 Published Online/Online Yayın: 30.12.2022

\*Çalışmanın bir kısmı Uluslararası Mikobakteri Sempozyumu'nda sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Sözlü bildiri no.35 (28-30 Kasım 2019, Mersin)

**Atıf/Cite as:** Ülger M, Yaşar N, Kaya H, Kaya E, Sezer O, Aslan G. Birinci seçenek antitüberküloz ilaçlara duyarlı ve çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleks klinik izolatlarında amikasin, moksifloksasin ve kanamisin duyarlılıklarının resazurin mikrotitre plak yöntemi ile araştırılması. ANKEM Derg. 2022;36(3):92-100.

*The emergence of XDR-TB after the development of multi-drug resistance is an important problem in the success of TB treatment and it is necessary to determine the resistance profiles in order to follow an effective treatment. We believe that the AK, MOX and KAN resistance detected in MDR-TB isolates in our study will contribute to the closer follow-up of anti-TB treatment and further studies.*

**Keywords:** amikacin, kanamycin, moxifloxacin, *Mycobacterium tuberculosis*, resazurin

## GİRİŞ

Tüberküloz (TB) dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve dünya genelinde 1.7 milyar insan TB ile enfektir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2020 yılında 9.9 milyon yeni TB olgusu olduğu; HIV pozitif vakalarda 214.000 vakanın, HIV negatif vakalarda ise 1.3 milyon insanın TB nedeniyle öldüğü bildirilmiştir. Ülkemizde TB insidansı yıllar içinde düşüş göstermesine rağmen, orta düzeyde TB insidansının olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. TB için endemik bölgelerden göç, HIV enfeksiyonu, kötü yaşam koşulları, düşük sosyoekonomik düzey gibi durumlar risk faktörleri arasında değerlendirilmektedir<sup>(29)</sup>.

TB hastalığı gelişen kişilerin yaklaşık %85'i 6 aylık bir ilaç rejimi ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilirken ilaca dirençli TB halk sağlığı için tehdit olmaya devam etmektedir. İsoniazid (INH) ve rifampisin (RİF)'e karşı direnç büyük bir endişe kaynağıdır. Çok İlaça Dirençli TB (ÇİD-TB) en güçlü anti-TB ajanlardan RİF ve INH'ye karşı direnç olarak tanımlanmaktadır ve TB tedavisinde önemli bir engeldir. ÇİD-TB izolatlarının sebep olduğu olgularda düşük tedavi başarısı, yüksek tedavi maliyetleri, ilaçların istenmeyen yan etkileri ve kötü prognoz gelişmesi önemli bir sorundur<sup>(3)</sup>. DSÖ 2020 yılında 159.359 ÇİD-TB olgusunun tedaviye alındığını belirtmiştir<sup>(29)</sup>. TB insidansının artmasının en önemli nedeni anti-TB ilaçlara karşı direnç gelişmesidir. ÇİD-TB olarak tanımlanmış izolatlarla enfekte olan bazı hastalar birinci seçenek ilaçlarla tedavilere cevap vermemektedir<sup>(10)</sup>. ÇİD-TB ve RİF dirençli TB'nin tedavisi daha uzundur, daha pahalı ve daha fazla yan etkileri olan ikinci seçenek ilaçların kullanımını gerektirir<sup>(29)</sup>. TB basit bir enfeksiyon olmayıp ölümcül bir hastalık olduğu için ilaca dirençli TB hastalarında, ilaca dirençli latent TB enfeksiyonu olanlarda veya birinci seçenek TB ilaçlarını tolere edemeyen hastalarda florokinolonların kullanımı kesinlikle gereklidir<sup>(7)</sup>. Yaygın İlaça Dirençli (YİD)-TB, INH ve RİF direncine ek olarak herhangi bir florokinolona ve parenteral verilen ikinci seçenek anti-TB ilaçlardan (amikasin, kanamisin veya kapreomisin [KAP]) en az birisine direnç gelişmesi durumudur<sup>(8)</sup>. Bazı hastalarda daha fazla anti-TB ilaca direnç gösteren YİD-TB görülebilmekte ve az sayıda ilaca yanıt vermektedir. YİD-TB izolatlarının varlığı dünya genelinde 109 ülkede rapor edilmiştir<sup>(29)</sup>.

DSÖ'nün TB için yayınladığı teknik kılavuzda kültüre dayalı fenotipik ilaç duyarlılık test (İDT) yöntemlerini ilaç direnci tespitinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Kültüre dayalı yöntemler Löwenstein Jensen (LJ) besiyeri, Middlebrook 7H10 ve 7H11 agar ve BACTEC MGIT 960 otomatize sistemi (Becton Dickinson and Company, ABD) ile yapılmaktadır. Bu yöntemlerin geçerli olmasını sağlayan en önemli unsurlar güvenli ve tekrarlanabilir olmasıdır. Kültüre dayalı fenotipik yöntemlerin zorlukları ise; kompleks bir laboratuvar alt yapısı gereksinimi ile birlikte kalifiye personel ihtiyacı, zaman alıcı yöntemler oluşu ve sıkı kalite kontrol gerektirmesidir<sup>(27)</sup>. Katı ortam kullanan geleneksel fenotipik yöntemler daha yaygındır. Dünyada yumurta veya agar bazlı ortam kullanan üç katı kültür yöntemi kullanılmaya devam edilmektedir. Bunlar proporsiyon yöntemi, direnç oranı yöntemi ve mutlak konsantrasyon yöntemidir. Üç yöntemden proporsiyon yönteminin yakın zamana kadar dünyada en yaygın kullanılan yöntem olduğu bildirilmiştir<sup>(30)</sup>. İkinci seçenek ilaçlar için İDT kritik konsantrasyonları, direnç oranı ve mutlak konsantrasyon yöntemleri için henüz yeterince doğrulanmamıştır. DSÖ, kültüre dayalı yöntemleri gerçekleştirme kapasitesi olmayan ülkelerde etkenin hızlı tanımlanmasına olanak sağladıkları, standardize sonuç vermeleri ve daha düşük düzey biyogüvenliğe gereksinim duymaları nedeniyle bazı nükleik asit amplifikasyon testlerini (NAAT) önermektedir<sup>(28)</sup>. Anti-TB ilaçların duyarlılık testlerinde, oksidasyon-redüksiyona dayalı kolorimetrik yöntemler birinci seçenek ilaçların minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır<sup>(6)</sup>.

Bu çalışmada birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı ve ÇİD-TB olan klinik izolatlarda ikinci seçenek anti-TB ilaçlardan amikasin (AK), moksifloksasin (MOKS) ve kanamisin (KAN) ilaç duyarlılıklarının resazurin mikrotitre plak yöntemi (Resazurin Microtiter Assay, REMA) ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 03/03/2021 tarihli ve 2021/217 sayılı kurul kararı ile onay alınmıştır.

### Klinik Örneklerden Elde Edilen *Mycobacterium* türlerinin Tanımlanması ve Birinci Seçenek Anti-TB İlaç Duyarlılıklarının Belirlenmesi:

Mersin Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na 2014-2019 yılları arasında TB şüphesi ile gönderilen klinik örnekler, homojenizasyon dekontaminasyon işlemi sonrası asidorezistan boyama ve kültür işlemleri gerçekleştirilmiştir<sup>(25)</sup>. Kültürde üremesi olan izolatlarda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) tanımlaması mikroskopik ve makroskopik koloni morfolojisi ile MTC'ye ait MPT64 antijenini saptayan "TBC Identification Test" (Becton Dickinson and Company, ABD) testi ile yapılmıştır<sup>(11)</sup>. MTC izolatlarında birinci seçenek anti-TB ilaçlardan streptomisin, INH, RIF ve etambutole karşı duyarlılık BACTEC MGIT 960 sıvı otomatize sistemi ile belirlenmiştir<sup>(15)</sup>.

### Çalışılacak Örneklerin Belirlenmesi:

Mersin Üniversitesi Hastanesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda +4°C'de saklanan ve çalışmaya dahil edilen klinik izolatların LJ besiyerine pasajları yapılmış ve üç haftalık inkübasyon sonrasında taze koloniler elde edilmiştir. Çalışmamıza birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı 19 izolat ve ÇİD-TB olduğu tespit edilen 12 izolat dahil edilmiştir.

### REMA Yöntemi:

Çalışmaya dahil edilen 31 izolatın AK, MOKS ve KAN ilaç duyarlılıkları kolorimetrik bir yöntem olan ve oksidasyon-redüksiyon prensibi ile çalışan REMA yöntemi ile iki tekrar olacak şekilde belirlenmiştir<sup>(17)</sup>. Plaklarda her bir izolat için 12 kuyudan oluşan bir sıra ayrılarak, %0.1 kaziton, %0.5 gliserol ve %10 oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (Becton Dickinson) ile zenginleştirilmiş Middlebrook 7H9 besiyeri (Becton Dickinson) bazlı 7H9-S besiyeri kullanılmıştır. Plak kuyularına 100 µl 7H9-S besiyeri ilave edilmiştir ve birinci kuyuya 100 µl ilaç süspansiyonu eklenerek ilacın iki kat seri dilüsyonu yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen örneklerin taze üremiş kültürlerinden yaklaşık bir öze dolusu bakteri (~4 mg) alınarak<sup>(4)</sup>, içerisinde bir miktar steril 2 mm çapında cam boncuk (Sigma solid-glass beads, Z273627) bulunan 5 ml 7H9-S besiyerinde süspansiyon edilmiş ve bu süspansiyon iki dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 30 dk hareket ettirilmeden bekletilerek büyük partiküllerin ve besiyeri kalıntılarının dip kısma çökmesi sağlanmış ve süre sonunda süpernatant yeni bir steril tüpe aktarılmıştır. Besiyeri ile McFarland 1 bulanıklık değerinde süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon 7H9-S besiyeri ile 1/20 oranında dilüe edilmiş ve her bir kuyuya bu son dilüsyondan 100'er µl inoküle edilmiştir. Böylece AK için 250-0.12 µg/ml, MOKS için 250-0.12 µg/ml ve KAN için 80-0.03 µg/ml son konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Plaklar yapışkan plastik film ile kapatılıp yedi gün boyunca 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Sekizinci günde, taze hazırlanan ve 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilip steril edilen resazurin solüsyonundan (%0.01 a/h) her kuyuya 30 µl eklenmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında duyarlılık sonuçları renk değişimine göre değerlendirilmiştir. Maviden pembeye renk değişimine göre MİK değerleri belirlenmiştir. AK, MOKS ve KAN için kritik konsantrasyonlar sırasıyla 1 µg/ml, 1 µg/ml ve 2.5 µg/ml kabul edilmiştir<sup>(27)</sup>. Duyarlılık kontrol suşu olarak *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kullanılmıştır.

### İstatistiksel Analiz

Bulgular yüzde/frekans verilerek değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı 19 izolatın tamamı AK, MOKS ve KAN'a duyarlı bulunmuştur (Tablo 1). ÇİD-TB olan 12 izolattan üç (%25) izolat AK'a, iki (%16) izolat MOKS'a, dört (%33) izolat KAN'a dirençli bulunmuştur. Dirençli izolatlardan bir izolatın AK ve KAN'a, başka bir izolatın da her üç ilaca birden dirençli olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Çalışmaya dahil edilen ÇİD-TB izolatları arasında YİD-TB oranı %8 (1/12) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen tüm izolatlar (n=31) üzerinden yapılacak değerlendirmede YİD-TB oranının %3 (1/31) olduğu gözlenmiştir. İzolatların AK, KAN ve MOKS için duyarlılıkları belirlenmiş MİK değerlerine göre izolat sayıları ve yüzde değerleri ile ilgili bilgiler ise Tablo 3'te verilmiştir.

M. Ülger ve ark., Birinci Seçenek Antitüberküloz İlaçlara Duyarlı ve Çok İlaça Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* Kompleks Klinik İzolatlarında Amikasin, Moksifloksasin ve Kanamisin Duyarlılıklarının Resazurin Mikrotitre Plak Yöntemi ile Araştırılması

**Tablo 1.** Birinci seçenek anti-TB ilaçlara duyarlı klinik izolatların AK, MOKS ve KAN'a karşı MİK değerleri.

İzolat No	AK (µg/ml)	MOKS (µg/ml)	KAN (µg/ml)
DY-1	0.97	<0.12	0.31
DY-2	0.48	<0.12	0.03
DY-3	0.48	<0.12	0.03
DY-4	0.48	<0.12	0.03
DY-5	<0.12	<0.12	0.03
DY-6	0.24	<0.12	0.03
DY-7	0.48	<0.12	0.03
DY-8	<0.12	<0.12	0.07
DY-9	0.97	0.48	0.15
DY-10	0.48	<0.12	0.03
DY-11	0.97	<0.12	0.07
DY-12	0.97	<0.12	0.03
DY-13	0.48	<0.12	1.25
DY-14	0.97	0.97	0.03
DY-15	0.48	<0.12	0.15
DY-16	0.97	<0.12	0.31
DY-17	0.48	<0.12	0.03
DY-18	0.97	0.48	0.03
DY-19	0.24	<0.12	0.03
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<0.12	<0.12	0.03

AK: Amikasin, MOKS: Moksifloksasin, KAN: Kanamisin

**Tablo 2.** ÇİD-TB klinik izolatlarının AK, MOKS ve KAN'a karşı MİK değerleri.

İzolat No	AK (µg/ml)	MOKS (µg/ml)	KAN (µg/ml)
DR-1	0.48	<0.12	0.03
DR-2	0.97	<0.12	0.03
DR-3	0.48	<b>1.95</b>	0.03
DR-4	0.48	<0.12	0.03
DR-5	<b>15.62</b>	<0.12	<b>20</b>
DR-6	<b>125</b>	<b>62.5</b>	<b>10</b>
DR-7	<0.12	<0.12	<b>80</b>
DR-8	0.97	<0.12	0.03
DR-9	<0.12	<0.12	0.03
DR-10	0.97	<0.12	0.15
DR-11	0.48	<0.12	<b>80</b>
DR-12	<b>1.95</b>	<0.12	0.62

AK: Amikasin, MOKS: Moksifloksasin, KAN: Kanamisin

**Tablo 3.** Klinik izolatların AK, MOKS ve KAN'a Duyarlılık Frekans Dağılım Tablosu.

Etken Madde	MİK (µg/ml)	İzolat Sayısı, n (%)
AK * (n=31)	<0.12	4 (12)
	0.24	2 (6)
	0.48	12 (38)
	0.97	10 (32)
	<b>1.95</b>	<b>1 (3)</b>
	<b>15.62</b>	<b>1 (3)</b>
	<b>125</b>	<b>1 (3)</b>
MOKS* (n=31)	<0.12	26 (83)
	0.48	2 (6)
	0.97	1 (3)
	<b>1.95</b>	<b>1 (3)</b>
	<b>62.5</b>	<b>1 (3)</b>
KAN** (n=31)	<0.03	18 (58)
	0.07	2 (6)
	0.15	3 (9)
	0.31	2 (6)
	0.62	1 (3)
	1.25	1 (3)
	<b>10</b>	<b>1 (3)</b>
	<b>20</b>	<b>1 (3)</b>
	<b>&gt;80</b>	<b>2 (6)</b>

AK: Amikasin, MOKS: Moksiflokasin, KAN: Kanamisin, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

\*Kritik konsantrasyon 1 µg/ml olarak değerlendirme yapılmıştır.

\*\*Kritik konsantrasyon 2.5 µg/ml olarak değerlendirme yapılmıştır.

## TARTIŞMA

TB'de ilaç direnci basilin genetik mutasyonları sonucu oluşur. Bu mutasyonlar, doğada son derece düşük oranda ortaya çıkarken, tedavide yapılan hatalar nedeniyle klinikte anlamlı oranlara ulaşırlar. Klinikte dirençli TB'nin ortaya çıkmasına standart ilaç rejimlerinin kullanılmaması, yetersiz ilaç kombinasyonu ve dozları, ilaçların düzensiz kullanımı, iyileşmeyen rejime ilaç ekleme, düşük doz ilaç kullanımı ya da hastanın gastrointestinal emilim sorunları, kullanım süresi geçmiş ya da uygun koşullarda saklanmamış ilaçların kullanımı neden olmaktadır. Aynı zamanda dirençli TB hastalarının basili bulaştırmaya devam etmeleri ve bunun sonucunda enfekte olanlarda ilaca dirençli basille enfeksiyon gelişmesi ve hasta olanlarda da dirençli TB görülmesi, tedavi sürecinin çok uzun olması ve tanı koymadaki zorluklar direnç gelişimini hazırlayıcı nedenler arasında sıralanabilir<sup>(25)</sup>. Birinci seçenек ilaçlara direnç gelişmesi ve ÇİD-TB olguları, ikinci seçenек ilaçların kullanımını yaygınlaştırmış, daha sonra ikinci seçenек ilaçlara da direnç gelişmesi ile YİD-TB izolatlarının görülme sıklığı artmıştır. TB'li hastalardan izole edilen klinik izolatlarda ilaç duyarlılığı araştırması çalışmalarında katı ortam kullanan geleneksel fenotipik yöntemler başarılı olmaktadır<sup>(28)</sup>. ÇİD-TB olgularının ortaya çıkması, anti-TB ilaç duyarlılık testlerinde daha düşük maliyetli ve hızlı yöntemlere duyulan ihtiyacı arttırmıştır. Tetrazolium ya da alamar mavisi gibi indikatörlerle duyarlılık testleri hızlı bir şekilde başarılı sonuçlar vermektedir<sup>(6)</sup>.

Yurt dışında ve ülkemizde ikinci seçenек anti-TB ilaçlara karşı duyarlılık saptanmasında resazurin ve tetrazolium moru testinin kullanıldığı çalışmalara daha az rastlanılmaktadır. Singh ve ark.<sup>(22)</sup> Hindistan'da tetrazolium morunu menadion ile modifiye ederek *M. tuberculosis* H37Ra, *Mycobacterium smegmatis* ve

*Mycobacterium bovis* BCG suşlarında birinci ve ikinci seçenek toplam 10 farklı anti-TB ilaca karşı duyarlılık profilini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda mikrodilüsyon, resazurin ve tetrazolium moru yöntemleri arasında uyumlu sonuçlar bulmuşlar; tetrazolium moru yöntemiyle en az 12 saat süren test prosedürünün menadion ile modifikasyon sonrası *M. smegmatis* için 20 dakikaya, *M. tuberculosis*/*M. bovis* BCG için ise 40 dakikaya kadar düştüğünü bildirmişlerdir. Bwanga ve ark.'nın<sup>(5)</sup> Uganda'da 31 MTC klinik izolatında ÇİD-TB oranını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, resazurin testinin ÇİD-TB saptamadaki duyarlılığını %86, özgüllüğünü %92 ve testin proporsiyon yöntemi ile uyum oranını %67 olarak bildirilmiştir.

Van Ingen ve ark.'nın<sup>(26)</sup> yapmış olduğu farklı İDT yöntemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada; fenotipik yöntemlerin (MGIT 960 ve 7H10 agar dilüsyon) farklı kritik konsantrasyonlarda (MGIT 960 sisteminde AK: 1 µg/ml ve MOKS: 1 µg/ml; 7H10 agar dilüsyon yönteminde AK: 5 µg/ml ve MOKS: 1 µg/ml) duyarlılık profillerinin varyasyon gösterdiği belirtilmiştir. Fenotipik İDT sonuçlarının AK, KAP, linezolid ve rifabutin için iki yöntem arasında tamamen uyumlu bulunduğu; MOKS için kritik konsantrasyon 0.5 µg/ml kabul edildiğinde iki yöntem arasında İDT sonuçlarının uyumlu olduğu ifade edilmiştir.

Ülkemizde Ruh ve ark.'nın<sup>(20)</sup> yaptığı çalışmada, 30 MTC klinik izolatında siprofloksasin direncinin hızlı saptanmasında tetrazolium moru ve resazurin kolorimetrik testlerinin etkinliği değerlendirilmiş ve çalışma sonucunda hem tetrazolium moru hem de resazurin testinin *M. tuberculosis* varlığının gösterilmesi ve siprofloksasin direncinin saptanması açısından hızlı ve etkin testler olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda bu yöntemlerin diğer ikinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığın belirlenmesinde de pratik ve hızlı testler olarak kullanım alanı bulabileceği vurgulanmıştır. Çoban ve ark.'nın<sup>(9)</sup> 50 MTC klinik izolatında resazurin testinin ÇİD-TB saptamadaki etkinliğini BACTEC sistemi ile karşılaştırdıkları çalışmada, INH için duyarlılığın %100, özgüllüğün %91.7, RIF için duyarlılığın ve özgüllüğün %100 olduğu ve her iki yöntemin sonuçlarının uyumlu olduğu belirtilmiştir. Duyarlılık testi sonuçlarının 42 izolat için inkübasyonun 8. gününde ve diğer sekiz izolat için 9. günde elde edildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre resazurin yönteminin ucuz, hızlı ve uygulanması kolay olduğu için gelişmekte olan ülkelerde INH ve RIF direncinin erken saptanmasında uygun olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda inkübasyonun 9. gününde AK, MOKS ve KAN için duyarlılık sonuçları elde edilmiştir. Bu bulgular sonucunda REMA yönteminin ikinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığın belirlenmesinde pratik ve hızlı testler olarak kullanılabilirliği kanaatindeyiz.

Zheng ve ark.'nın<sup>(32)</sup> çalışmasında 88 ÇİD-TB izolatında en yüksek direnç oranının %50 ile levofloksasine (44/88) ve sonrasında %38 (34/88) ile MOKS'a olduğu bildirilmiştir. Bozok ve ark.'nın<sup>(4)</sup> LJ proporsiyon yöntemi ile klinik izolatlarda MOKS duyarlılığını araştırdıkları çalışmada ÇİD-TB olmayan izolatların %17'sinde (17/100), ÇİD-TB izolatlarının %21'inde (8/37), toplam örneklemin %18'inde (25/137) MOKS'a karşı fenotipik direnç tespit edilmiştir. Çalışmamızda MOKS için kritik konsantrasyon 1 µg/ml olarak kabul edilmiş<sup>(27)</sup> ve çalışmaya dahil edilen 12 ÇİD-TB izolatının %16'sında (2/12) MOKS direnci belirlenmiştir. Duyarlı izolatlarda ise MOKS direnci saptanmamıştır. Çalışmamızda ÇİD-TB izolatlarındaki MOKS direnç oranı diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur.

Bolivya, Peru ve Doğu Avrupa'da %50'si ÇİD-TB olan 150 klinik izolatın 29'unun (%19) KAN'a dirençli olduğu belirtilmiştir<sup>(14)</sup>. Zhang ve ark.'nın<sup>(31)</sup> yaptığı çalışmada 158 ÇİD-TB izolatı arasında KAN ve AK dirençli izolat oranı sırasıyla %10 ve %5 olarak tespit etmiştir. Hindistan'da yapılan çalışmalarda, ÇİD-TB vakalarında KAN direncinin %4-11 arasında değiştiği belirtilmektedir<sup>(18,19,21)</sup>. Toungousova ve ark.'nın<sup>(24)</sup> 77 ÇİD-TB izolatında BACTEC 460 TB sistemi ile yaptıkları çalışmada KAN'a %41 ve KAP'a %42 yüksek direnç oranları bildirilmiştir. Çalışmamızda ÇİD-TB izolatları arasında KAN'a direnç %33 (4/12) değeri ile başka çalışmalardaki oranlardan daha yüksek olarak tespit edilmiş; ancak, çalışmaya dahil edilen tüm örneklem (n=31) içinde KAN direnç oranı %12 (4/31) ile literatürde belirtilen oranlara yakın bulunmuştur. Jain ve ark.'nın<sup>(12)</sup> çalışmasında *M. tuberculosis* kültür pozitif izolatların %26'sında ofloksasine ve %13'ünde KAN'a direnç tespit edildiği ve ÇİD-TB izolatların %42'sinin ofloksasin veya KAN'a dirençli bulunarak yaygın ilaç direnci öncesi (Pre-XDR) tanımlaması yapılmıştır. TB'nin endemik olduğu bölgelerde ÇİD-TB olguları için kinolonlara ve aminoglikozitlere direncin rutin olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Avkan Oğuz ve ark.'nın<sup>(2)</sup> LJ besiyerinde proporsiyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada, 32 ÇİD-TB izolatında KAN'a %9 ve KAP'a %12 direnç tespit edilmiştir. Bektöre ve ark.'nın<sup>(3)</sup> BACTEC MGIT 960 ve modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmada 81 ÇİD-TB izolatında AK'a ve KAN'a %1.2 direnç ifade edilmiştir. Kayalı ve ark.'nın<sup>(13)</sup> LJ besiyerinde proporsiyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada 50 ÇİD-TB izolatında KAN'a %6 direnç tespit edildiği vurgulanmıştır. Özkütük ve ark.'nın<sup>(16)</sup> BACTEC 460 TB radyometrik sistem kullanarak yaptıkları çalışmada 40 ÇİD-TB izolatında KAN ve AK'a %5 direnç bildirilmiştir. Aslan ve ark.'nın<sup>(1)</sup> agar proporsiyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada 48 dirençli MTC

izolatında AK'a %2 (n=2) direnç gözlenmiştir. Şatana ve Yeğenoğlu<sup>(23)</sup> BACTEC 460 radyometrik ve agar proporsiyon yöntemleriyle yaptıkları çalışmada ise 75 ÇİD-TB izolatının tümünün KAN'a duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda 12 ÇİD-TB izolatının üçü (%25) AK'a dirençli olarak tespit edilmiştir. Duyarlı izolatlarda ise AK direnci saptanmamıştır. Tespit ettiğimiz bu direnç oranının ülkemizde bildirilen direnç oranlarından daha yüksek bulunması, çalışmaya dahil edilen ÇİD-TB izolat sayısının diğer çalışmalardakilere oranla daha az sayıya olmasından kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

TB tedavisinde etkin yol izleyebilmek için direnç profillerini belirlemek gereklidir. ÇİD-TB izolatlardaki ikinci seçenek ilaçlara gelişen direnç tedavide önemli bir sorundur. Birinci seçenek en az bir anti-TB ilaca dirençli izolatlarda ikinci seçenek anti-TB ilaçlara direnç oranlarının doğru tespiti, uygun tedavi seçeneklerinin belirlenmesi için gereklidir. Çalışmamızda kullandığımız resazurin mikrotitre plak yöntemi, maliyeti yüksek tanı ve duyarlılık testlerinin aksine ekonomik olarak düşük gelirli bölgelerde de uygulanabilir bir yöntemdir. Elde ettiğimiz veriler, bu testin ikinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığın belirlenmesinde pratik ve hızlı bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca fenotipik İDT çalışmalarında standardizasyon sağlanması için birden çok anti-TB ilacın aynı anda farklı yöntemlerle duyarlılık testlerinin uygulandığı kapsamlı çalışmaların yapılmasına olan ihtiyaç devam etmektedir.

**Etik Kurul Onayı:** Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 03/03/2021 tarihli ve 2021/217 sayılı kurul kararı ile onay alınmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Proje için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

**Ethics Committee Approval:** Approval was obtained from the Mersin University Clinical Research Ethics Committee with the board decision dated 03/03/2021 and numbered 2021/217.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Financial support:** No financial support was received for the Project.

## KAYNAKLAR

1. Aslan G, Direkel Ş, Otağ F, Akdenizli E, Emekdaş G. Mersin Bölgesinde izole edilen Mycobacterium tuberculosis suşlarında amikasin ve siprofloksasin duyarlılığı. ANKEM Derg. 2006;20(3):164-8.
2. Avkan Oğuz V, Akbal H, Sarıbaş S, Karagöz T, Öztürk R. Edinsel çok ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis suşlarının major ve minör antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı. İnfeksiyon Derg. 2000;14(3):383-6.
3. Bektöre B, Haznedaroğlu T, Baylan O, ve ark. Çok İlaça Dirençli Tüberküloz İzolatlarında Yaygın İlaç Direncinin Araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2013;47(1):59-70.
4. Bozok T, Kayar B, Yakıcı G, ve ark. Klinik Örneklerden Elde Edilen Mycobacterium tuberculosis İzolatlarının Moksifloksasin MİK Değerlerinin Tespiti ve Moleküler Analizi. Mikrobiyol Bul. 2019;53(3):245-53.
5. Bwanga F, Joloba ML, Haile M, Hoffner S. Evaluation of seven tests for the rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Uganda. Int J Tuberc Lung Dis. 2010;14(7):890-5.
6. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1873-4.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Drug Resistant TB. <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/default.htm>. (Erişim tarihi: 26.09.2022)
8. Centers for Disease Control and Prevention. Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR TB) Fact Sheet. <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/drtb/mdrtb.htm>. (Erişim tarihi: 26.09.2022)
9. Coban AY, Cekiç Cihan C, Bilgin K, et al. Rapid susceptibility test for Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin with resazurin method in screw-cap tubes. J Chemother. 2006;18(2):140-3.
10. Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. JAMA. 2000;283(19):2537-45.
11. Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 2, ASM Press, Washington, ABD, (2004).

12. Jain A, Dixit P, Prasad R. Pre-XDR & XDR in MDR and Ofloxacin and Kanamycin resistance in non-MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Tuberculosis*. 2012;92(5):404-6.
13. Kayali R, Cöplü N, Ceyhan I, Ocak F, Cital 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.
14. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3616-9.
15. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*, Tentative standard M24-T, Wayne, PA, ABD, (1995).
16. Özkütük N, Sürücüoğlu S, Gazi H, Coşkun M, Özkütük A, Özbakkaloğlu B. Second-line drug susceptibilities of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Aegean region-Turkey. *Turk J Med Sci*. 2008;38(3):245-50.
17. Palomino JC, Martin, A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(8):2720-2.
18. Paramasivan CN, Rehman F, Wares F, et al. First-and second-line drug resistance patterns among previously treated tuberculosis patients in India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(2):243-6.
19. Ramachandran R, Nalini S, Chandrasekar V, et al. Surveillance of drug-resistant tuberculosis in the state of Gujarat, India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(9):1154-1160.
20. Ruh E, Öcal HY, Yurdakul P, Saribaş Z, Alp A. Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında Siprofloksasin Direncinin Saptanmasında Tetrazolyum Moru ve Resazurin Testlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bul*. 2013;47(1): 49-58.
21. Sharma SK, George N, Kadiravan T, Saha PK, Mishra HK, Hanif M. Prevalence of extensively drug-resistant tuberculosis among patients with multidrug-resistant tuberculosis: A retrospective hospital-based study. *Indian J Med Res*. 2009;130(4):392-5.
22. Singh U, Akhtar S, Mishra A, Sarkar D. A novel screening method based on menadione mediated rapid reduction of tetrazolium salt for testing of anti-mycobacterial agents. *J Microbiol Methods*. 2011;84(2):202-7.
23. Şatana D, Yeğenoğlu Y. Çoğul ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının sekonder ilaçlara duyarlılığının BACTEC ve agar proporsiyon yöntemleri ile araştırılması, 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Kitabı, s. 198, Abant, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No: 45, İstanbul, (2002).
24. Toungoussova OS, Mariandyshev AO, Bjune G, Caugant DA, Sandven P. Resistance of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from the Archangel oblast, Russia, to second-line anti-tuberculosis drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(3):202-6.
25. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi (UTTR). T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ankara 2019. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz\\_db/haberler/Tuberkuloz\\_Tani\\_Ve\\_Tedavi\\_Rehberi\\_Tuberkuloz\\_Tani\\_ve\\_Tedavi\\_Rehberi.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/haberler/Tuberkuloz_Tani_Ve_Tedavi_Rehberi_Tuberkuloz_Tani_ve_Tedavi_Rehberi.pdf). (Erişim tarihi 25.09.2022)
26. Van Ingen J, Simons S, de Zwaan R, et al. Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2749-53.
27. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>. (Erişim tarihi 14.3.2022)
28. World Health Organization. Guidance for the surveillance of drug resistance in tuberculosis, sixth edition. 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018020> (Erişim tarihi 25.09.2022)
29. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-5<sup>th</sup> ed. 2015. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549134> (Erişim tarihi 1.1.2019).



30. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. World Health Organization, 2018. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514842>. (Erişim tarihi 1.11.2019)
31. Zhang Z, Liu M, Wang Y, Pang Y, Kam KM, Zhao Y. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(11):1959-66.
32. Zheng H, He W, Jiao W, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant tuberculosis against levofloxacin, moxifloxacin, bedaquiline, linezolid, clofazimine, and delamanid in southwest of China. *BMC Infectious Diseases*. 2021;21:330.