

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**M.TUBERCULOSİS İLAÇ DUYARLILIĞININ LÖWENSTEİN-
JENSEN VE MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE
PROPORTİON METOD İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T-60700

Ahmet Yılmaz ÇOBAN

Samsun
Eylül-1997

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**M.TUBERCULOSİS İLAÇ DUYARLILIĞININ LÖWENSTEIN-
JENSEN VE MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE
PROPORTION METOD İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T. 60700.

Ahmet Yılmaz ÇOBAN

Danışman: Doç. Dr. Ahmet SANIÇ

Samsun
Eylül-1997

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı programında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ahmet SAĞIÇ



Üye:..... Doç. Dr. Murat GÜNAYDIN

Üye:..... Doç. Dr. Hakan LEBLEBİCİOĞLU



Üye:.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.



Prof. Dr. Sait BILGIÇ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bilimsel teşvik ve yardımları ile her konuda destek olan danışman hocam Doç.Dr. Ahmet SANİÇ'e, bilimsel teşvik ve yorumları ile her zaman yardımcı olan Prof.Dr. Belma DURUPINAR ve Doç.Dr. Murat GÜNAYDIN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın diğer öğretim elemanlarına, İnfeksiyon Hastalıkları Öğretim görevlilerine ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı asistan ve tüm personeline teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET-TÜRKÇE

ÖZET-YABANCI DİLDE

GİRİŞ VE AMAÇ.....1

GENEL BİLGİLER

Tüberküloz Bakterilerinin Tarihçesi.....	3
Tüberküloz Bakterilerinin Özellikleri.....	4
Mikobakterilerin İdentifikasyon Testleri.....	5
M.tuberculosis İlaç Direnci.....	8
Antimikobakteriyel Duyarlılık Testleri.....	13
Mikobakteriyel İlaç Direncinin Saptanmasında Yeni Yöntemler.....	20

MATERYAL VE METOD

M.tuberculosis Suşlarının Sağlanması.....	28
Besiyerlerinin Hazırlanması	28
Katalaz Testi İçin Besiyeri Hazırlanması ve Semikantitatif Katalaz Testinin Uygulanması.....	31
Niasin Toplanması Testinin Uygulanması.....	31
Nitrat Redüksiyonu Testinin Uygulanması.....	32
İnokülümün Hazırlanması.....	32
Antibiyotik Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	33
Duyarlılık Testinin (Orantı-Proportion Metod) Uygulanması.....	33
Sonuçların Değerlendirilmesi.....	34

BULGULAR

Niasin Toplanması Testi Sonuçları.....	35
Nitrat Redüksiyonu Testi Sonuçları.....	35
Semikantitatif Katalaz Testi Sonuçları.....	35
Duyarlılık Testlerinin Sonuçları.....	35
TARTIŞMA.....	40-44
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ÖZET

M.TUBERCULOSİS İLAÇ DUYARLILIĞININ LÖWENSTEİN-JENSEN VE MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE PROPORTİON METOD İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

*Ahmet Yılmaz ÇOBAN, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Eylül 1997*

İnsanlığın en eski dertlerinden biri olan tüberküloz, ülkemiz için de büyük bir problem olarak güncelliğini korumaktadır. Özellikle dirençli vakaların sayısındaki artış gelecek için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Böyle bir tehlikenin varlığına rağmen hala rutin olarak kullanılabilecek güvenli, ucuz ve standardize edilmiş bir yöntem mevcut değildir.

Çalışmada; Löwenstein-Jensen (LJ) ve Middlebrook 7H10 besiyeri kullanılarak proportion metod ile 50 hastada karşılaştırmalı duyarlılık testleri yapılmıştır. Tüm hastalarda tek, ikili, üçlü ve dördü ilaca direnç oranları karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Çalışmada; toplam direnç oranları LJ besiyeri test sonuçlarında daha yüksek bulunmuş olup, en yüksek oran %32 ile streptomisine karşı gözlenmiş, rifampisin direnci ise %26 olarak bulunmuştur. Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarına göre ise, daha düşük direnç oranları gözlenmiş olup, en yüksek %8 ile etambutole karşı bulunmuştur. LJ besiyeri test sonuçlarına göre, hastaların %48'i tüm ilaçlara duyarlı iken, Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarına göre tüm ilaçlara duyarlılık %90 bulunmuştur.

Sonuç olarak; LJ ve Middlebrook 7H10 besiyeri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Ayrıca, ülkemizde olduğu gibi, bizim yaptığımız çalışmada da yüksek antitüberkülo ilaç direnci gözlenmiştir.

ABSTRACT

THE COMPERATIVE INVESTIGATION OF THE M.TUBERCULOSIS DRUGS RESISTANCE IN LÖWENTEIN-JENSEN AND MIDDLEBROOK 7H10 MEDIUMS BY THE PROPORTION METHOD

Ahmet Yılmaz ÇOBAN, M.Sc. Thesis
University of Ondokuz Mayıs Samsun, September 1997

Tuberculosis, one of the oldest problems of the humanity, is also a current problem for our country. Especially, the increase in resistant cases is a risk for future. Although there is such a danger, we still do not have safe, cheap, and standardized method which can be used routinely.

In this study, the susceptibility tests were carried out in 50 patients by the proportion method using Löwenstein-Jensen (LJ) and Middlebrook 7H10 mediums. Single, double, triplet and quartet drug resistance ratios in all patients were investigated comperatively.

In this study, the total resistance ratios were found higher in LJ medium, the highest ratio, 32%, was observed against streptomycin and the resistance against rifampicine was found 26%. According to the Middlebrook 7H10 medium test result, lower resistance ratios were observed, the resistance against ethambutol was found 8%, being the highest. While according to the LJ medium test result, 48% of the patients were resistant against all drugs, the resistance against all drugs according to the Middlebrook 7H10 medium test result was found as 90%.

As a result, a significant difference was found between LJ and Middlebrook 7H10 mediums. In addition, a high antituberculous drugs resistance was observed in this study as it is the case in our country.

GİRİŞ VE AMAÇ

Mikobakteri infeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak bulunan, insan mortalite ve morbiditesine doğrudan etkili infeksiyonlardır. Tüm dünyada 1.7 milyar kişinin *M.tuberculosis* ile infekte olduğu ve her yıl 3 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğü bilinmektedir. Tüberküloz savaşında başarı, yeni tanı ve antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin geliştirilmesine ve yeni antimikobakteriyel ajanların bulunmasına bağlıdır (Badak, 1997; Yüce, 1997).

Son 40 yıldır tüberküloz tedavisinde kullanılmakta olan ilaçlar, aktif tüberkülozlu hastaların prognozunu kesin olarak düzeltilmiş, hatta 1980'lerin başında kısa süreli kemoterapinin devreye girmesi ile hastalığın tamamen ortadan kaldırılabilceği ümidi doğmuştur. Buna karşın, tüberküloz olgularında beklenen azalma olmamış ve Amerika'da, 1985'ten 1990'a kadar bildirilen tüberküloz olgu sayısında artış görülmüştür. Tüberküloz olgularındaki bu artma, evsizlik ve intravenöz ilaç kullanımı gibi sosyal ve medikal problemlerin yanısıra *Human Immunodeficiency Virus (HIV)* epidemisi ile paralellik göstermektedir. Bilindiği gibi HIV infeksiyonu, tüberküloz savaşında öncelikle gerekli olan gecikmiş tip aşırı duyarlılık başta olmak üzere konak defansını ciddi şekilde bozan bir hastalıktır. HIV infeksiyonlu hastalarda görülen tüberküloz, bir yandan iyi uygulanmayan tedavi rejimi sonucu iyileşmemekte, öte yandan dirençli tüberküloz basilleri ile oluşan infeksiyonlar hızla yayılmakta ve tüm dünyada sorun olmaya devam etmektedir (Vareldzis ve ark., 1994; Yüce, 1994; Zhang, ve Young, 1994).

Son yıllarda *Centers for Diseases Control (CDC)*, özellikle New York'ta *multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)* olgularında büyük artma olduğunu, olguların %80'inden çoğunu HIV ile infekte hastaların oluşturduğunu ve tüberküloz tedavisinde kullanılan en etkili ilaçlar olan izoniazid ile rifampisine karşı direnç gözlendiğini bildirmektedir. Ayrıca izolatların çoğu diğer antitüberküloz ilaçlara da dirençli bulunmuştur. İşte son 3 yılda özellikle HIV infeksiyonlu hastalarda giderek artan sıklıkta MDR-TB olgularının görülmesi ve bunların da %40 kadar ölüme sebep olması *M.tuberculosis*'te ilaç etkisinin ve direncinin moleküler mekanizmasına yönelik araştırmaları hızlandırmıştır (Yüce, 1994).

Ülkemiz de tüberküloz morbidite ve mortalitesinin düşük olmasına karşın, direnç oranları ilaçla tedavinin başladığı yıllardan beri yüksektir. Ülkemizde ilaçlar çok gelişigüzel, hiç bir disipline ve bilimsel bir kurala bağlı olmadan kullanılmaktadır. Tüberkülozun uzun, düzenli, yeterli süre ve dozda ilaç alımını gerektirmesi hekimler ve kurumlar arası çok iyi bir işbirliğini

gerekli kılmaktadır. Dirençli vakaların doğru tespiti de başarılı bir kemoterapide önemli bir basamaktır (Uçan, 1994).

Mikobakteriyel duyarlılık testlerinin yapılmasında Löwenstein-Jensen (LJ), Middlebrook 7H10 ve 7H11 besiyerleri kullanılır. LJ besiyeri, katılaştırılması sırasında uygulanan 80°C ısı ve bol protein içeriği nedeniyle antibiyotiklerin inaktivasyonuna neden olabilir. Middlebrook 7H10 besiyeri ise basit içeriği, kolay hazırlanması nedeniyle mikobakteriyel duyarlılık testleri için daha avantajlı olabilir. Ülkemizde mikobakteriyel duyarlılık testlerinde LJ besiyerinin daha sık kullanıldığı görülmektedir (Kent ve Kubica, 1985; Yüce ve ark., 1994; Arseven ve ark., 1995).

Son yıllarda, *M.tuberculosis*'in ilaç direncinin tespit edilmesine yönelik birçok metod geliştirilmiştir. Bu teknikler, çok pahalı olmaları ve kesin bir standardizasyon sağlanamaması nedeniyle halen araştırma aşamasındadırlar. Bu konudaki çalışmalar, daha çok moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve direnç genlerinin saptanması üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmaların rutin laboratuvarlarda uygulanamaması ve diğer tekniklerin de standardize olmaması, *M.tuberculosis*'in dirençli izolatlarının tespitini güçleştirmektedir. Bunun sonucunda, tüberkülozlu hastalarda uygun tedavi rejiminin seçilememesi tedavi başarısını düşürmekte ve dirençli izolatların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Çalışmamızda; dirençli tüberküloz olgularına artan ilgi ve direnç tespitinin tedavideki öneminden dolayı, rutinde kullanılmakta olan LJ besiyeri ile Middlebrook 7H10 besiyerini karşılaştırmayı ve bölgemiz tüberküloz olgularındaki ilaç direncini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

TÜBERKÜLOZ BAKTERİLERİNİN TARİHÇESİ

İnsanlığın en eski sorunlarından biri olan tüberküloz, tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere karşın, bugün de bütün dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, yaygın olarak bulunan infeksiyonlardan biridir (Bilgehan, 1994).

24 Mart 1882'de *Robert Koch*'un Berlin Fizyoloji Derneği'nde tüberküloz basilini bildirişi, bütün dünyada ve yurdumuzda çabucak duyulmuş ve daha sonraki ilerlemeler yakından izlenmiştir. Örneğin, yurdumuzda Koch basilinin klinik örneklerde en azından 1885 yılından beri arandığı bilinmektedir (Eraksoy, 1996).

Koch basilinin bulunuşunu 1921'de Fransız araştırmacılar *Albert Calmette* ve *Camille Guerin*'in tüberküloz aşısı olan BCG'yi geliştirmeleri izlemiştir. 1944'de *Selman Abraham Waksman* ve meslektaşı *Albert Schatz*, New Jersey'deki Rutgers Üniversitesi'nde ilk tüberküloz ilacı olan streptomisini bulmuştur. Bu nedenle 1944 yılı tıp tarihine "mucize yılı" (*annus mirabilis*) olarak geçmiştir (Eraksoy, 1996).

Bundan sonraki önemli gelişmeler arasında *Gerhard Domagk* tarafından Almanya'da tiosemikarbazonlarla yapılan ve daha sonra izoniazidin bulunmasına da yol açan öncü çalışma ile (ki izoniazidi aynı zamanda New Jersey'de *Dr. Herbert Fox* da idantifiye etmiştir); 1946'da İskandinavyalı *Jorgen Lergen Lehmann* tarafından PAS'ın bulunması sayılabilir (Eraksoy, 1996).

Hastalığın bulaşıcı karakterde olduğu hakkındaki kuşkular ilk defa 16. yüzyıl başlarında *Fracastorius* tarafından ileri sürülmüş, 1865'de Fransız hekimi *Villemin* infekte materyalin inokülasyonu ile hastalığı hayvanlara geçirebilmiş, *Robert Koch* 1884'de patolojik maddelerden kültürünü yapmayı başarmış ve bu kültür bakterileriyle deney hayvanlarında tüberküloz oluşturulabileceğini göstermiştir. 1896'da sığır tüberküloz basili *M.bovis* ayrı bir tür olarak *Th. Smith* tarafından ortaya çıkarılmış, 1937'de tarla farelerinde fare tüberküloz basili *M.microti* İngilizler tarafından izole edilmiştir. *Robert Koch* tüberküloz allerjisi, bu hastalıktaki özel immüniteyi ve tüberkülini tarif ederek bu konudaki değerli çalışmalarını yayınlamış ve böylece hekimlikte yeni bir çağın öncüsü olmuştur (Bilgehan, 1994).

TÜBERKÜLOZ BAKTERİLERİNİN ÖZELLİKLERİ

***M.tuberculosis* kompleksi:**

M.tuberculosis kompleksi; *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *M.africanum* ve *M.microti*'den oluşmaktadır (Lorian, 1996).

Görünüm:

İnce, bazen hafifçe kıvrık, ortalama 1-4 µm uzunluğunda ve 0.3-0.6 µm eninde hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, çomakçıklardır. *M.bovis*'in boyu diğerlerinden biraz daha kısadır. Eski kültürlerde ve uygunsuz koşullarda üreyen bakterilerin daha uzun, ipliksi ya da daha kısa hatta koklara benzer değişik şekilleri ortaya çıkabilmektedir. Balgam ve diğer materyallerden yapılan preparatlarda tek ya da ikili üçlü gruplar halinde ve birbirlerine paralel ya da uçlarından birbirlerine yaklaşarak X, V, L, harfleri oluşturacak biçimde bir arada bulunabilirler. Besiyerlerindeki kültürlerinden yapılan preparatlarda ise çoğu kez büyük kümeler oluştururlar (Bilgehan, 1994).

Hücre ve kimyasal yapıları:

Tüberküloz basillerinin hücre yapısı temelde diğer bakterilerin hücre yapısı gibidir. Önemli ayrımlar hücre çeperinin yapısı ile bu bakterilerin kimyasal yapısındadır. Mikobakterilerin sitoplazmik zarlarının dışında diğer gram olumlu bakterilerdeki gibi bir peptidoglikan katmanı bulunur. Bunun dışında ise onunla bağlantılı olarak üst üste üç katman gibi görünen ayrı bir yapı bulunmaktadır. Bu yapının temelinde mikolik asit ile çevrili bir arabinogalaktan polisakkarit yapısı bulunur. Bunların arasında bakterinin virulansı ve boyanma özellikleri ile ilgili olduğu bilinen maddeler vardır. Bu maddelerden birisi *kord faktör* (*ip faktörü*) olup bir trehaloso dimikolatdır. Bundan başka polianyonik glikolipidler (fosfolipidler ve sülfolipidler) ve peptidoglikolipidler (vax-D) bulunur. Görüldüğü gibi hücre çeperi lipidlerden zengindir. Bu lipidlerin bakterinin boyanma özelliklerinde rolü vardır. Ayrıca bu maddeler adjuvan (Freund adjuvan) özelliğinde maddelerdir (Bilgehan, 1994).

Mikobakteriyel antijenler:

Mikobakterilerin fiziksel, kimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre farklılık gösteren çok sayıda antijenik yapısı mevcuttur. Mikobakteriyel antijenler, pek çok lipid, protein ve

polisakkaritten oluşur. Antijenlerin sayısı tam olarak bilinmemektedir. Duyarlı yöntemlerle şimdiye kadar bilinenlerin sayısı yaklaşık 90'dır. Mikobakteriyel antijenler, sitoplazma (solubl) ve hücre duvarında lipidlere bağlı (insolubl) olarak bulunurlar (Durupınar, 1996).

Mikobakteriyel antijenlerin bazıları immün sistemi baskılayıcı işlev görürken, diğerleri granülom oluşumuna yol açma, makrofajları aktive etme, konakçı toksisitesi oluşturma ve adjuvan aktivite gösterme gibi işlevlerde bulunmaktadır (Durupınar, 1996).

Son yıllarda, immünolojik tanımayı sağlayan hücrelerle, mikobakteriyel genlerin klonlanması gibi tekniklerin geliştirilmesi, antijenlerin saflaştırılması çalışmalarına büyük katkı sağlamış ve mikobakteriler ile ilgili antijen ve antikorların ayrımı daha kolaylaşmıştır. Bu konudaki çalışmalar, tüberküloz patogenezinin daha iyi anlaşılması yanı sıra, tüberküloz tanısında daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmesine ve tüberküloza karşı çok daha güçlü aşılardan bulunmasına yardımcı olacaktır (Durupınar, 1996).

MİKOBAKTERİLERİN İDANTİFİKASYON TESTLERİ

Mikobakteriler, eğer mümkünse daima türlere göre idantifiye edilmelidir. Kompleks isminin kullanılması (örn: *M.avium complex*, *M.terrae complex*, *M.tuberculosis complex*), klinik önemi az olduğu zaman diğer türlerle birlikte karşılaştırılarak tıbbi önemi olan türlerden ayrılmasına imkan verir. Yeni izolatlar veya bilinmeyen organizmalar sıklıkla fotokromojen, skotokromojen, nonfotokromojen ve hızlı gelişenler olarak adlandırılır ki, bu da izolatların idantifikasyonuna yol gösterir. İlk sınıflandırmada mikobakterilerin pigmentasyon ve gelişme hızları temel alındı. Daha sonraları idantifikasyon testleri yapılarak mikobakterilerin tiplendirilmesi yapılmaya başlanmıştır (Isenberg, 1992).

Mikobakterilerin idantifikasyon testleri:

- 1- Arilsülfataz testi,
- 2- Katalaz testi,
- 3- Gelişme hızı ve pigment oluşumu,
- 4- Kristal violetsiz MacConkey agarda üreme,
- 5- Demir tutulumu,
- 6- Niasin toplanması,
- 7- Nitrat redüksiyonu,

- 8- Pirazinamidaz,
- 9- Sodyum klorid tolerans testi,
- 10- Tiyofen-2-karboksilik asit (T₂H) ile gelişimin inhibisyonu,
- 11- Tellürit redüksiyonu,
- 12- Tween 80 hidrolizi,
- 13- Üreaz: Wayne metodu (Koneman ve ark., 1992).

***M.tuberculosis*'in idantifikasyonu:**

1-İzolasyon için optimal sıcaklık ve gelişimin hızı:

M.tuberculosis optimum 37°C'de gelişir. Koloniler yumurtalı besiyerinde en erken inokülasyondan 12 gün sonra tespit edilebilmektedir. Ortalama gelişme süresi 21 gündür. 7H10 veya 7H11 besiyeri kullanıldığında ve kültür petrileri günlük disseksiyon mikroskobu ile tarandığında 8-10 gün gibi daha kısa bir zamanda tespit edilebilir. Az rastlanan türlerin tespiti için 6 hafta veya daha fazla zaman gerekmektedir (Koneman ve ark., 1992).

Gelişim hızının değerlendirilmesi için, çoğu standart tüplerde veya petrilerdeki nonselektif besiyerleri kullanılabilir. Petrilerdeki besiyerleri tercih edilir çünkü, koloni gelişimleri disseksiyon mikroskobu ile incelenebilir (Koneman ve ark., 1992).

2-Pigment oluşumu:

Mikobakterilerin pigment üretimi ayırıcı tanıda önemlidir. Skotokromojenlerde karanlıkta inkübasyondan sonra renk oluşmu gözlenir. Fotokromojenlerde ise yalnızca ışığa maruz bırakılınca renk gelişimi uyarılır. *M.tuberculosis* çoğu pigmenti üretmede yetersizdir. Yalnızca ışıkta, hatta parlak ışıkta açık kahve renkli pigment oluşturur (Koneman ve ark., 1992).

3-Niasin toplanması:

M.tuberculosis ve diğer birkaç mikobakteri türü serbest niasini, niasin ribonükleotide çeviremez. Böylece yumurtalı besiyerinde su-solubl niasinin toplanması *M.tuberculosis* idantifikasyonunda değerli ayırt edici bir özelliktir (Koneman ve ark., 1992).

4-Nitratların nitritlere redüksiyonu:

M.tuberculosis ve diğer birkaç mikobakteri türü nitratın nitrite redüksiyonunu kataliz eden nitroredüktaz enzimi üretir. Ayıracın ilavesinden sonra kırmızı renk oluşması nitrit varlığını gösterir ve test sonucu pozitifdir (Koneman ve ark., 1992).

5-Katalaz aktivitesi:

Mikobakterilerin çoğu katalaz üretir; bununla birlikte, katalaz formları farklıdır. Test kültürleri 68°C'de 20 dakika ısıtıldığı zaman inaktive edilebilir. Böylece mikobakterilerin ısıtmadan önceki ve sonraki katalaz üretimini kantitatif ölçümü ayırım testlerine yardımcı olur. Bu özellik genellikle *M.tuberculosis*'nin izoniazid-dirençli suşlarının idantifikasyonunda faydalıdır. Isı-stabil katalaz testi yavaş gelişen mikobakterilerin idantifikasyonunda çok faydalı bulunmuştur. Katalaz testi semikantitatif olarak da değerlendirilebilir. Değerlendirmede hidrojen peroksid kullanılır (Koneman ve ark., 1992).

6-Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (T₂H) tarafından gelişimin inhibisyonu:

Tiyofen-2-karboksilik asit hidrazid (T₂H) *M.bovis*'in gelişimini selektif inhibe eder, oysa çoğu diğer mikobakteriler bu maddeyi içeren besiyerlerinde gelişebilir. Bu özellik, *M.bovis* ve diğer benzerlerinin *M.tuberculosis*'den ayırımında kullanılır (Koneman ve ark., 1992).

Tablo 1. *M.tuberculosis* kompleks üyelerinin idantifikasyon testleri

	<i>Optimum üreme ısı ve süresi</i>	<i>Pigmentasyon</i>		<i>Niasin testi</i>	<i>Nitrat redüksiyonu</i>	<i>Tween 80 hidrolizi</i>
		<i>Işık</i>	<i>Karanlık</i>			
<i>M.tuberculosis</i>	37°C, 12-15 gün	AK	AK	+	+	V
<i>M.africanum</i>	37°C, 31-42 gün	AK	AK	V	V	-
<i>M.bovis</i>	37°C, 24-40 gün	AK	AK	V	-	-

AK: açık kahverengi

Tablo 2. *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin idantifikasyon testleri

	<i>Katalaz</i>		<i>Arilsülfataz</i> 3 gün	<i>Üreaz</i>	<i>Pirazinamidaz</i>	<i>Demir tutulumu</i>
	Semikantitatif	pH 7.0 68°C				
<i>M. tuberculosis</i>	<45	-	-	+	+	-
<i>M. africanum</i>	>45	-	-			
<i>M. bovis</i>	<45	-	-	+	-	-

Tablo 3. *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin idantifikasyon testleri

	<i>Üreme</i>		
	<i>T₂H</i> 1µg/ml	%5 NaCl 28°C	<i>MacConkey agar</i>
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-
<i>M. africanum</i>			
<i>M. bovis</i>	-	-	-

M. TUBERCULOSIS İLAÇ DİRENCİ

Yılda 2-7 milyon ölümle tüberküloz, dünyadaki infeksiyon hastalıklarından ölümlerin başını çekmektedir. İnfeksiyon ve müteakip klinik hastalıklarla alakalı olan durumlar aşırı kalabalıklaşma ve yoksukluk, HIV ile infekte olma, göçler ve damar içi (IV) ilaç bağımlılığıdır (Zhang ve Young, 1994; Drobniowski, 1995). İlaç direnç oranları, 1962'den 1985'e kadar gelişmekte olan ülkelerde düşük olduğu halde son verilere göre direncin artmış olabileceği ileri sürülmektedir. Dirençte görülen ilk düşük oran "*National Tuberculosis Control Programmes*" (NTP)'in çalışmalarındaki başarı ile birlikte olduğu halde son verilerdeki artmaya eleman yetersizliği, yetersiz kaynak programları veya HIV epidemilerinin etkileri neden olabilir (Vareldzis ve ark., 1994; Yüce, 1994).

Tüberkülozlu hastalar içinde *M. tuberculosis*'in multi-drug resistance (MDR) suşlarındaki mevcut bir artışın yeni raporları, ciddi genel bir kaygıya neden olmaktadır.

Verilerin çoğu 5 yılı aşkın bir süredir pozitif örneklerin toplandığı hastalardan çıkarılmıştır (Hanna ve ark., 1993).

İlaç direnci ile ilgili tanımlamalar:

Antitüberküloz kemoterapi: İzoniazid (H), rifampisin (R) , streptomisin (S), pirazinamid (Z), etambutol (E) ve tiasetazon gibi en çok kullanılan ilaçlarla yapılan tedavidir. İlk 2 ay H,R,Z ve buna eklenen dördüncü bir (S ve E gibi) ilacı takiben 4 ay süreyle H ve R kullanılması WHO'nun tavsiye ettiği kısa dönem tedavi protokolüdür. 4 ay H ve R kullanımının alternatifi H,E ya da tiasetazonun 6 ay kullanımudur (Vareldzis ve ark., 1994).

Vahşi suş: Daha önce antitüberküloz ilaçla karşılaşmamış olan bir *M.tuberculosis* kompleksidir (Vareldzis ve ark., 1994).

Doğal dirençli suşlar: Belli bir ilaçla daha önceden karşılaşmamış olmasına rağmen o ilaca dirençli suşlardır. Doğal dirençli basil taşıyan konak ve onun infeksiyon kaynağı geçmişte kemoterapi almamıştır. Bu tip direncin örnekleri *M.bovis*'in Z direnci ve tiasetazona dirençli *M.africanum*'dur (Vareldzis ve ark., 1994).

İnisiyal direnç: Yeni bir tüberküloz hastasında bir ya da daha fazla antitüberkülo ilaca karşı direncin varlığı olarak tanımlanır. Bu kategori, daha önceki tedavisi hakkında bilgi vermekten çekinen ya da geçmiş tedavi hikayesi yeterince sorgulanmayan ve bu nedenle açığa çıkmamış kazanılmış direnci olan hastaları da kapsar. İnisiyal direnç kronik hastaları kapsamaz (Vareldzis ve ark., 1994).

Primer direnç: Daha önce tüberküloz kemoterapisi hiç almamış olan bir tüberküloz hastasında bir ya da daha fazla ajana karşı ilaç direncinin varlığıdır. Bunun nedeni, ilaca dirençli organizmalarla infekte olmuş başka bir hastadan infeksiyonun kapılmasıdır. Popülasyon içerisindeki dirençli basilin sıklığı önceden tedavi almamış hastalarda %1'den büyüktür (Vareldzis ve ark., 1994; Lorian, 1996).

Kazanılmış direnç: Verilen tedavi rejimine uymamak ya da yanlış reçete sonucu tedavinin seyri sırasında bir ya da daha fazla ilaca direnç olarak tanımlanır. Sekonder direnç de denilir.

İlk izolasyonlarında duyarlı olan basiller, daha sonraki izolasyonlarında dirençli olarak gözlenir. Programatik açıdan bu tip direncin yüksekliği, mevcut NTP'nin fonksiyon görmediğinin bir işaretidir (Vareldzis ve ark., 1994; Lorian, 1996).

Kronik hasta: Uygun irregüler tedavi süreçlerinin başarısızlığa uğradığı hastadır. 5 yıl geçmesine karşın tedavi edilememiş hastaları kapsar. Bir ya da daha fazla antitüberküloz ilaca kazanılmış direnç vardır. Alternatif olarak kontrol altında verilen yeni bir tedavi rejiminin sonunda yayma preparat pozitifliği devam eder (Vareldzis ve ark., 1994).

MDR: Birden fazla antitüberküloz ilaca direnç vardır. Bu tip direnç hem primer hem de sekonder olabilir. Ve genellikle HIV enfeksiyonlu ya da kronik hastalarla ilişkilidir. HIV enfeksiyonlu kişilerdeki MDR ciddi sorunlara yol açabilir ve kısa zamanda ölümle sonuçlanabilir (Vareldzis ve ark., 1994).

İlaç direnç mekanizmaları:

1950 ve 1960'larda tüberküloz için efektif tedavinin girişi ile çok geçmeden hastalığın kontrol edileceği ve hatta elimine edileceği umutları artmıştır. İnsidanstaki dramatik azalma endüstrileşmiş ülkelerde başarılıken, *M.tuberculosis* dünyada enfeksiyöz ölümlerin en büyük nedeni olarak kalmıştır. Tüberküloz insidansında son zamanlardaki canlanma, bir dereceye kadar HIV pandemileri, ilgili toplumları yeniden uyandırdı (Yüce, 1994; Zhang ve Young, 1994).

Başlıca *M.tuberculosis*, *M.leprae*, *M.avium-intracellulare* olmak üzere mikobakteriyel patojenler yavaş üremeleri, kalın hücre duvarları ve kültürlerinde tek tek hücre süspansiyonlarından ziyade kümeler oluşturmaları nedeniyle bakteri genetikçilerine çok sayıda deneysel zorluk çıkarırlar. Bugün *M.tuberculosis* ve *M.leprae*'nin genom yapıları ile ilgili önemli miktarda bilgi mevcuttur ve asıl çaba bu organizmanın nükleotid dizilerini tayin etmek için yapılmaktadır (Zhang ve Young, 1994).

M.tuberculosis'te klinik açıdan ilaç direnci primer ya da sekonder olarak gelişir. Hiç bir tüberküloz ilacı ile karşılaşmadığı halde tüberküloz basili toplulukları içinde doğal olarak her 10^5 - 10^8 basilde bir oranında tek bir ilaca dirençli mutantlar bulunur. Tüberküloz basilinin kromozomunda oluşan mutasyonlar sonucu gelişen bu dirence mutasyonel direnç denir (Yüce, 1994).

Mutasyonel ilaç direncinin ilaç kullanımını ile ilgisi yoktur, çünkü ilaçlarla karşılaşmak mutasyona yol açmaz. Eksik ya da uygunsuz ilaç kullanıldığında duyarlı basillerin ortadan kalkarak, dirençli mutantların sayıca artmasına bağlı olarak gelişen direnç sekonder ya da kazanılmış dirençtir. Bu şekilde dirençli hastanın basilleri ile infekte olmuş ve hiç ilaç kullanmamış kişilerde görülen direnç ise primer direnç olarak bilinir (Yüce, 1994).

Rifampisin ve streptomisin için direnç mekanizmaları diğer bakterilerde bulunanlara benzer iken, H (İzoniazid) için duyarlılık ve direnç *M.tuberculosis*'de farklıdır (Zhang ve Young, 1994).

İzoniazid direnci:

İzonikotinic asit hidrazid, tüberküloz tedavisine 1952'de giren sentetik bir antimikrobiyal ajandır. Çok düşük MIC (0.02 mg/ml) değerlerinde bile *M.tuberculosis*'e karşı spesifitesi yüksektir ve bakterisidal etkilidir. H'in özellikle mikolik asitlerin biyosentezini inhibe ettiği düşünülmektedir. Son çalışmalarda, H'e karşı dirençli izolatlarda iki mikobakteriyel direnç geni tespit etmiştir (Zhang ve Young, 1994; Inderlied ve Salfinger, 1995).

a) Kat G: Çok uzun zamandan beri H'e karşı direnç gelişiminin sıklıkla katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin kaybı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Son genetik delillerde de açık bir şekilde H ile katalaz-peroksidaz enzimi arasında bir ilişki olduğu anlaşılmıştır. H etkisinde *kat G*'nin rolü henüz tespit edilememiştir ancak, ilacın hücre içinde aktif bir aracı tarafından peroksidazla değişmesi önemli bir hipotezdir (Zhang ve Young, 1994; Inderlied ve Salfinger, 1995).

b) inhA: Benarje ve arkadaşları, DNA klonlarını direnç genlerini transfer etme yetenekleri yönünden taramışlardır. Bir çok kez kopyalanmış plazmid üzerinde tek bir genin (*inhA geni*) varlığında H direncinin arttığı bulunmuştur. *M.smegmatis* ve *M.bovis* izolatlarında *inhA* geninin dizi analizinde tek bir nokta mutasyonu gözlenmiştir. Bütün bu gözlemleri birarada ele alırsak; *inhA*'nın H için bir hedef enzim kodladığı kuvvetle düşünülür. *inhA* ile ilgili çok daha ilginç bir yön; H'e karşı olan direncin etionamid'e karşı dirençle bir arada olmasıdır. Etionamid yapısal olarak H ile benzerliği olan antimikobakteriyel bir ilaç olup, mikolik asit sentezini inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir. *inhA* tarafından kodlanan enzim iki ilaç için de ortak bir hedefi temsil edebilir (Zhang ve Young, 1994; Inderlied ve Salfinger, 1995).

Rifampisin (R) direnci:

Rifampin veya rifampisin 3,4-(metilpiperazinil-iminometilidin) rifampisin SV'dir. 1968'de etkili bir antitüberküloz ajan olarak kullanıma girmiştir. R, H'in yanısıra bugünkü

tüberküloz tedavisinin ana iskeletini oluşturan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. RNA polimeraz β -subuniti ile etkileşime girerek RNA sentezini inhibe etmektedir. β -subunitini kodlayan küçük *rpoB* geni içinde oluşan nokta mutasyonları R'e direnci meydana getirir. *M.leprae* ve *M.tuberculosis*'in R'e duyarlı ve dirençli suşlarından *rpoB* genleri klonlanmış ve analize edilmiştir. R'e dirençli izolatların yarısında tek bir nokta mutasyonu olup, 531 pozisyonda serin yerine lösin aminoasiti gelmiştir. *rpoB*'nin ikinci bölgesindeki mutasyonlar *E.coli*'deki R direnci ile biraradadır (Telenti ve ark., 1993; Miller ve ark., 1994; Zhang ve Young., 1994; Williams ve ark., 1994; Inderlied ve Salfinger, 1995).

Streptomisin (S) direnci:

S, bir aminosiklitoldür ve tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılır. İlaç 16S rRNA'ya bağlanır, translasyon düzenine engel olur ve bu suretle protein sentezini inhibe eder. S direnci ile birlikte olan mutasyonlar 16S rRNA (*rrs*) ve ribozomal protein S12 (*rpsL*)'yi kodlayan genlerde tespit edilmiştir. Ribozomal protein S12, 16S rRNA'nın oluşturduğu yapıyı stabilize eder. *rpsL*'deki aminoasitin yer değiştirmesi 16S rRNA'nın yapısına etki eder ve S direncinden sorumludur. 16S rRNA'daki değişiklik, 16S rRNA ve S arasındaki etkileşimi bozar ve bu yol dirençle sonuçlanır. *rrs*'deki mutasyonların çoğu ribozomal protein S12 ile etkileştiği 530 bölgesindedir (Zhang ve Young, 1994; Inderlied ve Salfinger, 1995; Cooksey ve ark., 1996; Meier ve ark., 1996; Sreevatsan ve ark., 1996).

Pirazinamid (PZA) direnci:

PZA, kısa süreli tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci-kuşak bir ilaçtır. PZA'e direnç genellikle *M.tuberculosis*'deki pirazinamidaz (Pzase) aktivitesinin kaybı ile birlikte dir. Pzase, PZA'ı bakterisidal pirazinoik asite çevirir. *M.tuberculosis* Pzase'ını kodlayan gen (*pncA*) son zamanlarda tespit edilmiştir. Tüm PZA-duyarlı organizmaların *pncA* allelleri benzerdir (Inderlied ve Salfinger, 1995; Scorpio ve ark., 1997; Sreevatsan ve ark., 1997).

Etambutol (E) direnci:

E [dekstro-2,2-(etilendiimino)-di-1-butanol-dihidroklorid], 1961'de tanımlanan etkili sentetik bir antitüberküloz bileşiktir. Arabinogalaktan sentezinde spesifik bir etki noktası gösterilmesine rağmen primer etki mekanizması hücre duvar sentezinin bakteriyostatik inhibisyonudur. *M.tuberculosis*'de E direncine neden olan mutasyonların sıklığı 10^{-5} 'de birdir. Forbes ve ark. (1965) E'un *M.smegmatis*'deki RNA sentezini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Takayama ve ark. (1979) ise, E'un *M.smegmatis*'in hücre duvarı içindeki mikolik asitlerin taşınmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir (Rastogi ve David, 1994; Inderlied ve Salfinger, 1995).

Takayama ve Kilburn (1989), 3µg/ml E'un ilaca duyarlı *M.smegmatis* suşlarında, arabinogalaktanın D-arabinoz çökeltisi içindeki işaretli D-¹⁴C-glukozun taşınmasını inhibe ettiğini fakat, ilaca dirençli mutantlarda inhibe etmediğini göstermişlerdir (Rastogi ve David, 1994).

ANTİMİKOBAKTERİYEL DUYARLILIK TESTLERİ

Son 15 yılda özellikle HIV ile infekte hastalarda MDR-TB olgularının hızla artması, bu olguların %40'nın ölmesi ve sağaltımın başarısız olması, hastane kaynaklı bulaşların gözlenmesi, primer ve sekonder ilaç direncinin artması tüberküloz kontrol çabalarını sonuçsuz bırakmakta ve tüberküloz tüm insanlık için büyük bir sağlık sorunu olma özelliğini korumaktadır. İlaçlara duyarlı mikobakteriler ile oluşan hastalıklarda uygun ilaç kombinasyonu ile olguların %88-98'nin sağaltılabilmesine karşın, MDR-TB olgularında sağaltım büyük sorun olmaktadır (Yüce, 1997).

Tüberküloz savaşında başarı, yeni tanı ve antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin geliştirilmesine ve yeni antimikobakteriyel ajanların bulunmasına bağlıdır. *M.tuberculosis*'de ilaç direncinin moleküler temelini anlaşılmaması, yeni ve hızlı duyarlılık testlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bilindiği gibi, *M.tuberculosis*'de ilaçlara karşı direnç gelişimi, bakteri kromozomunda spontan olarak oluşan çeşitli mutasyonlarla ilgilidir ve aktarılamaz (Vareldzis ve ark., 1994; Yüce, 1997).

M.tuberculosis'de ilaçlara karşı duyarlılığı saptamada 1960'lardan beri kullanılan geleneksel yöntemlere ek olarak, son 5-6 yılda kromozomal mutasyonların saptanmasına yönelik birçok yeni moleküler yöntem geliştirilmiştir (Yüce, 1997).

Duyarlılık testinde kullanılan besiyerleri:

Mikobakteri türlerine bağlı infeksiyonların mikrobiyolojik tanısında kültürün mutlak bir yeri vardır. Bunun nedeni, direkt mikroskopiden daha duyarlı olması ve tür tayini ile antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlamasıdır. Bu yöntemin duyarlılığı %76, özgüllüğü %100'dür. Uzun süreli inkübasyon gerektirmesi en önemli olumsuz özelliği olmakla

birlikte, henüz geliştirilmekte olan testlerin güvenilirlikleri de kültür sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmektedir (Arıkan, 1996). Mikobakteri türlerinin izolasyonunda kullanılmakta olan birçok besiyeri vardır. Genellikle yumurtalı besiyeri olarak *Löwenstein-Jensen (LJ)* besiyeri ve agarlı besiyeri olarak da *Middlebrook 7H11* besiyerine olmak üzere iki besiyerine ekim yapılmaktaysa da, 7H11 besiyerinin rutin kullanım için LJ besiyerinden daha başarılı olduğunu ve her iki besiyerine de ekim yapmanın gereksizliğini öne süren araştırmacılar vardır. LJ besiyerinin opak görünümü nedeniyle bu besiyerinde üremenin fark edilmesi daha zor ve bu nedenle inkübasyon süresi daha uzundur. Middlebrook 7H10 veya 7H11 besiyerinde ise kolonilerin görülmesi daha kolaydır ve daha kısa sürede gerçekleşir (Arıkan, 1996).

Middlebrook 7H11, içerdiği kazein hidrolizatın izoniazide dirençli mikobakteri suşlarının da üremelerine yardımcı olması nedeniyle 7H10 besiyerinden üstündür. *M. bovis* ilk izolasyonda gliserollü ortamda zayıf üreme gösterdiğinden, ek olarak gliserolsüz LJ besiyerine de ekim yapılabilir. Bunun dışında LJ, 7H11, çikolata agar ve 7H9 sıvı besiyerini birlikte içeren bifazik kültür sistemleri de mevcuttur. Bu sistemler, duyarlı ve hızlı tanı açısından değer taşır (Arıkan, 1996).

Yumurtalı besiyerinin avantajları:

- 1-Buzdolabında birkaç ay saklanabilir, taze yumurtadan hazırlanmalıdır ve eğer kapağı sıkıca kapatılırsa buharlaşmaya bağlı kuruma minimumdur,
- 2-Hazırlanması sırasında kontaminasyon oranı düşüktür,
- 3-Çoğu mikobakterilerin üremesini kolaylaştırır (Kent ve Kubica, 1985).

Yumurtalı besiyerinin dezavantajları:

- 1-Kontamine olduğunda genellikle besiyerinin tüm yüzeyini kaplar,
- 2-İlaç duyarlılık testleri yumurtalı besiyerinde çok zordur. Çünkü temel ilaç konsantrasyonlarında, ilaç, yumurtanın fosfolipid gibi temel komponentleri ile ilişki kurar veya sıcaklıkla miktarları azalır (Kent ve Kubica, 1985).

Agarlı besiyerinin avantajları:

- 1-Kontaminasyon oranı düşüktür çünkü, kimyasal formülasyonun basit olması kontaminasyona olanak vermemektedir,

- 2-Genellikle temiz bir ortam olması koloni morfolojisinin incelenmesine olanak verir. Yumurtalı besiyeri opak kontrastadır, ışığa geçirgen agarlı besiyeri bir disseksiyon mikroskobu (30-60X) ile incelenebilir,
- 3-İlaç duyarlılık testlerinde performans iyidir. Çünkü besiyeri formülasyonu yumurtalı besiyerinden daha basittir,
- 4-Eğer %10 atmosfer CO₂'inde inkübe edilirse, agarlı besiyerindeki kültür inokülasyonların (Middlebrook 7H10-7H11) %99'u 3-4 hafta içinde pozitifleşir (Kent ve Kubica, 1985).

Agarlı besiyerinin dezavantajları:

- 1-Petrilerde bulunan besiyerleri plastik kaplarda saklanıp nem kaybı geciktirilmezse, uzun süre inkübasyon ve saklamada kurumaya meyillidir,
- 2-Besiyerinin gün ışığına maruz kalması mikobakterilerin gelişimini inhibe edecek konsantrasyonda formaldehid salınımına neden olur,
- 3-Eğer %0.1 L-aspartik asit, agarlı besiyerinde gelişen *M.tuberculosis*'in yüksek oranda niasin oluşturması durumunda ilave edilirse, ilaçların aktivitesini değiştirir,
- 4-Besiyerinin hazırlanmasında özen göstermek gereklidir (özellikle aseptik zenginleştirici ilavesi gibi) (Kent ve Kubica, 1985).

Ekim yapmak için kullanılan materyal çok kontamine olmadığı müddetçe selektif besiyerine gerek yoktur ve dekontaminasyon işlemi yeterlidir. Kontaminasyonun yoğun olduğu örnekler, selektif 7H10, 7H11, veya LJ besiyerine de ekilebilir (Koneman ve ark., 1992; Bilgehan, 1995; Arıkan, 1996).

Kültürler, 3-6 hafta süreyle 37°C'de inkübe edilir. İlk 4-10 gün ortamda %5-10 CO₂ olmasının üremeyi hızlandırıcı etkisi varsa da bu, rutinde genellikle uygulanmaz. *M.haemophilum*, *M.marinum* veya *M.ulcerans* infeksiyonu şüphesi varsa inkübasyon sıcaklığı 30°C olmalıdır. Ayrıca *M.haemophilum* üremesi için ortama çikolata besiyeri gibi demir bileşikleri sağlayacak bir kaynak eklenmesi gerekir. Üreme olduğunda koloniler, üreme hızı, büyüklük, görünüm ve pigment oluşumu açısından değerlendirilerek, biyokimyasal testler ve hızlı yöntemlerle tür tayini yapılır (Arıkan, 1996).

Mikobakterilerin üretiminde kullanılan selektif ve nonselektif besiyerleri tablo 4 ve 5'de sunulmuştur.

Tablo 4. Nonselektiv Mikobakteriyel İzolasyon Besiyerleri

<i>Besiyeri</i>	<i>Komponentleri</i>	<i>İnhibitör Ajan</i>
Löwenstein-Jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0.025g/100ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, dekstroz	Malaşit yeşili, 0.0025g/100ml

Tablo 5. Selektiv Mikobakteriyel İzolasyon Besiyerleri

<i>Besiyeri</i>	<i>Komponentler</i>	<i>İnhibitör Ajanlar</i>
Löwenstein-Jensen	Koagüle tam yumurta, bazı tuzlar, gliserol, patates unu	Malaşit yeşili, 0.025 g/100ml Sikloheksimid, 400 µg/ml Linkomisin, 2 µg/ml Nalidiksik asit, 35 µg/ml
Middlebrook 7H10	Bazı tuzlar, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, glukoz	Malaşit yeşili, 0.0025 g/100ml Sikloheksimid, 360 µg/ml Linkomisin, 2 µg/ml Nalidiksik asit, 20 µg/ml

ANTİMİKOBAKTERİYEL DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Tüberküloz tedavisi için kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı *M.tuberculosis*'in duyarlılığı rutin laboratuvar uygulamalarında dört metod ile ölçülür;

1-Orantı (proportion) metodu

2-Absolu konsantrasyon (MIC) metodu

3-Direnç-oran metodu

4- Radyometrik metod (NCCLS document, 1994; Vareldzis ve ark., 1994; Lorian, 1996).

Orantı ve radyometrik metodun performansı iyidir. Orantı metodu direkt ve indirekt test için kullanılabilir. Direkt testte, aside dirençli basiller için yayma preparat pozitif olan bir örnek inokülüm kaynağı olarak kullanılır ve örnekler besiyeri ortamına direkt inoküle edilir. İndirekt teste, *M.tuberculosis*'in saf bir kültürü duyarlılık testi için inokülüm kaynağı olarak kullanılır. Direkt testin avantajı, özellikle süre açısından olup, indirekt teste göre 3-4 hafta önce sonuçlanır. Direkt test, Bactec prosedürü kullanımı ile yapılabilmekte ise de sonuçların

doğruluğu tartışmalıdır. Agarlı besiyerinde uygulanan direkt teste bir üstünlüğü yoktur (Lorian, 1996).

Orantı (proportion) metod:

Bu metod için basiller, biri ilaç içeren, diğeri içermeyen iki vasata inoküle edilir. İnokülüm miktarı dikkatle kontrol edilmelidir. Fazla yapılan inokülasyon yanlış dirence neden olurken, inokülasyonun az olması yanlış duyarlılığa neden olabilir. İlaç içeren vasattaki koloni sayısının, ilaç içermeyen vasattaki koloni sayısına oranı, dirençli basillerin oranını gösterir. Belirli oranın altındaki suş duyarlı, üstündeki suşlar ise dirençli olarak değerlendirilir (NCCLS document, 1994; Vareldzis ve ark., 1994; Lorian, 1996).

a) Direkt test: Orantı (proportion) metodunun direkt test versiyonu aside dirençli basil (asit-fast basil) için yayma preparat pozitif olan örnekler ile yapılmalıdır.

1- Materyal sindirim-dekontaminasyon işleminden geçirilir.

2- Preparat hazırlanır, florokrom veya karbolfuksin metodlardan biri kullanılarak boyanır ve incelenir. 20 alanın herbirindeki basil sayısı not edilir ve her alandaki basil miktarının ortalaması hesaplanır. Hazırlanan süspansiyonun homojen olmasına dikkat edilir (NCCLS document, 1994; Lorian, 1996).

Tablo 6. Duyarlılık test besiyerine inokülasyon için balgam konsantrasyonunun dilüsyonu

<i>Dilüsyonlar</i>	<i>Aside dirençli boyama</i>	<i>Florokrom boyama</i>
Andilüe, 1:100	≤1	≤10
1:10, 1:1000	1-10	10-100
1:100, 1:10000	≥10	≥100

3- Dört bölmeli petrilerin her bir bölmesine her bir dilüsyonun üç damlası inoküle edilir. İnokülümün absorpsiyonu için 1 saat petriler bekletilir. Eğer hasta antitüberkülo ilaç ile tedavi almış ise, yayma preparat sonuçları önemsenmeyerek andilüe bir inokülüm kapsama alınır, çünkü, tedavi alan hastalarda incelenen aside dirençli basiller canlı olmayabilir.

4- Petriler CO₂-geçirgen polietilen kaplara yerleştirilir. %5-10 CO₂'li ortamda 35-37°C'de inkübe edilir.

5- Petriler üç hafta sonra okunur (duyarlılık sonuçları 3 haftadan önce verilmez). Dirençli izolatların kolonileri duyarlı izolatların kolonilerinden daha yavaş gelişir. Eğer gelişme görülüyorsa, yavaş gelişmiş mikrokolonilerin gösterilmesi için disseksiyon mikroskop (30X-

60X büyütme) ile petrinin her bir bölmesi incelenir; bununla birlikte, bu sonuçların yorumlanması dikkate alınmaz. Çünkü ilaçların bozulması mikrokolonilerin görülmesine yol açabilir. Sonuçların derecesi, her bir dilüsyonda şu kriterlere uygundur:

- +3, +4 → 100-200 koloni
- +2 → 50-100 koloni
- +1 → 50'den az koloni

Kontrol petrilerinin bir veya daha fazlası 50-100 koloni içermelidir. Çünkü, dirençli kolonilerin yüzdesi bu koloni sayısı temel alınarak hesaplanır. Eğer kontrol petride üreme yetersiz ise test tekrarlanmalıdır. Duyarlılık testi 3 haftada sonlandırılmalıdır, çünkü duyarlı izolatlar 3 haftadan sonra üreme gösterebilir (NCCLS document, 1994; Lorian, 1996).

b) İndirekt test: Klinik örneklerden izolasyonu takiben, *M.tuberculosis*'in saf kültürleri için uygulanır. Direkt testte olduğu gibi inokülümün hazırlanması, fazla veya az inokülümden sakınılarak dikkatle hazırlanmalıdır (Lorian, 1996).

- 1- İlaçsız katı besiyeri yüzeyinden kazınan koloniler ile hazırlanır,
- 2- Bakteriyel kitle, içerisinde 8-9 adet cam veya plastik boncuk ve 3-4 ml Middlebrook 7H9 veya Tween-albumin sıvı besiyeri içeren vidalı kapaklı tüplere aktarılır,
- 3- Birkaç dakika bir vorteks mikser kullanılarak karıştırılıp homojenize edilir (bu basamak bir maske ile biyolojik güvenlik kabiniinde yapılmalıdır),
- 4- Karışım 30 dakika karıştırılmadan dik tutulur. Büyük partiküllerin yerleşmesine ve aerosollerin oluşumunun azaltılmasına çalışılır. Vidalı kapaklı tüplerin ağzı absolü alkol ile silinir,
- 5- 7H9 sıvı besiyeri kullanılarak bulanıklık McFarland 1 standardına ayarlanır. Süspansiyon yaklaşık olarak 10^7 CFU/ml basil içermektedir,
- 6- 7H9 sıvı besiyeri kullanılarak standardize süspansiyonun 10^{-2} ve 10^{-4} dilüsyonları hazırlanır. Dilüsyonlardan petrilerin her bir bölmesine bir damla ($\cong 33\mu\text{l}$) inoküle edilir,
- 7- Direkt test için anlatıldığı gibi test yürütülür (NCCLS document, 1994; Lorian, 1996).

Eğer kültür eski ise, ilaçsız 7H9 sıvı besiyerine bir miktar koloni aktarmak suretiyle izolat subkültüre edilir (35°C 'de 7 gün veya McFarland 1 standart bulanıklığına eşit olana kadar inkübe edilmesi zorunludur) (NCCLS document, 1994; Lorian, 1996).

Mutlak konsantrasyon (MIC) metodu:

Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilen izolatlar kullanılır. 37°C'de inkübe edilir. İlk değerlendirme 2. hafta sonunda yapılır. Son değerlendirme 4. hafta sonunda yapılır. Üreme 4. haftanın sonunda 20 veya daha fazla koloninin varlığı olarak değerlendirilir. Bu tekniği kullanarak direncin tarifi; ilaç içeren ortamlarda 20 veya daha fazla koloni gelişmesidir (NCCLS document, 1994; Vareldzis ve ark., 1994).

Direnç-oran metodu:

Bu metodun uygulanması ve değerlendirilmesi diğerleri ile aynıdır. Üreme, 4 hafta sonunda 20 veya daha fazla koloninin varlığı olarak tanımlanır. Direnç oranı, test ortamındaki gelişimin kontrol ortamındaki gelişime oranı ile hesaplanır. 8 veya daha fazla bulunan oranlar dirençli, 2 veya daha az bulunan oranlar duyarlı olarak yorumlanır (NCCLS document, 1994; Vareldzis ve ark., 1994).

BACTEC yöntemi:

10 yılı aşkın süredir yapılan çeşitli düzenlemeler bu testi hızlı ve güvenilir bir yöntem haline getirmiştir. NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Yüce, 1997).

Besiyeri olarak kullanılan Bactec 12B şişeleri ¹⁴C işaretli palmitik asit içerir. Üreyen mikobakteriler bu substratı primer karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak ¹⁴CO₂ açığa çıkarır. Metabolik son ürün olarak oluşan ¹⁴CO₂ sıvı besiyeri üzerindeki boşlukta toplanır. Bactec 460[®] aleti ile şişelerde oluşan radyoaktiviteyi ölçer, her şişede ortaya çıkan radyoaktivite 0-999 sınırları içinde bir sayı olarak belirlenir. Bu sayılar üreme indeksi (GI, Growth Index) olarak değerlendirilir. Oluşan ¹⁴CO₂'in oran ve miktarı, üremenin oranı ve miktarı ile doğrudan orantılıdır. Örnekler, bilinen yöntemlerle dekontaminasyon ve konsantrasyon işleminden sonra 0.5 ml miktarında 12B şişelerine ekilir; 37°C'de inkübe edilir. Ortalama üreme süresi 7-12 gündür. Şişeler 24 saatlik aralarda en az 4 gün GI yönünden kontrol edilir ve kontrol şişesinin GI'yi 30 olana kadar sürdürülür. GI>10 ise örnek pozitif olarak kabul edilir. Kontrol GI 30 olduğunda, her şişe için bir önceki güne göre GI farkı hesaplanır ve bu fark ΔGI olarak değerlendirilir. Buna göre indirekt testte;

Kontrol ΔGI > ilaçlı ΔGI = *duyarlı*

Kontrol ΔGI < ilaçlı ΔGI = *dirençli*

Kontrol ΔGI = ilaçlı ΔGI = *sınırdadır (test tekrarlanmalıdır)*

direkt testte;

Kontrol Δ GI > ilaçlı Δ GI = *duyarlı*

Kontrol Δ GI < ilaçlı Δ GI = *dirençli*

- Kontrol Δ GI = ilaçlı Δ GI = *dirençli* olarak yorumlanır.

Bu yöntemde öncelikle 1. kuşak tüberküloz ilaçlarına karşı duyarlılık test edilebilir ve sonuçlar 3-5 günde alınır. Bu yöntemin en önemli dezavantajları, dirençli basillerin oranını belirleyememesi ve radyoaktif madde kullanılmasıdır. Ancak sonuçların agar oranı (proportion) metod ile %90 uyumlu olması yanısıra hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeni ile NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak önerilmekte ve birçok merkezde kullanılmaktadır (NCCLS document, 1994; Alp, 1996; Yüce, 1997).

MİKOBAKTERİYEL İLAÇ DİRENCİNİN SAPTANMASINDA YENİ YÖNTEMLER

M.tuberculosis'de ilaçlara karşı duyarlılığı saptamada 1960'lardan beri kullanılan geleneksel yöntemlere ek olarak, son 5-6 yılda kromozomal mutasyonların saptanmasına yönelik bir çok yeni moleküler yöntem geliştirilmiştir. Bu yeni yöntemleri iki grupta incelemek mümkündür:

- 1-Moleküler yöntemler,
- 2-Kültür veya bakteri varlığına dayalı yöntemler.

MOLEKÜLER YÖNTEMLER

M.tuberculosis'de ilaç direnci; ilacın bağlandığı hedef bölgede oluşan mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Moleküler yöntemler, oluşan mutasyonların saptanması esasına dayanırlar.

a) *Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):*

Bu yöntem DNA dizilerinin, diziye özgü öncüller (primer) ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılması yöntemidir. İlaç direncinden sorumlu gen bölgesi

PCR ile çoğaltıldıktan sonra direkt dizi analizi yapılarak mutasyonlar saptanmaktadır (Yüce, 1997)

Bu amaçla PCR yönteminin çeşitli modifikasyonları kullanılmaktadır.

1) Single-tube heminested PCR: Nested PCR; iki set amplifikasyon ürünü kullanılarak yapılır. Setlerden biri, diğerinin amplifikasyon ürününün içinde hedeflenmiştir. İki çeşit nested PCR yöntemi vardır:

- 1)İki tüp yöntemi,
- 2)Tek tüp yöntemi

Nested PCR, duyarlılığı artırmak amacı ile tasarlanmıştır. *M.tuberculosis*'de rifampisin direncinden sorumlu olan gen bölgesi (*rpoB*) direkt olarak saptanabilir. Sonuçlar kültür ile paralellik gösterir ve aside dirençli basil negatif örneklerde de olumlu sonuç alınabilir. *M.tuberculosis* varlığı ve antibiyotik duyarlılığını anda saptamak mümkündür. Çok duyarlı ve özgül bir yöntemdir (Yüce, 1997).

2) Multipleks PCR: Bu yöntemde örnekteki iki veya daha fazla hedef DNA sekansı, birden çok primer kullanılarak aynı anda amplifiye edilir. Bu şekilde büyük DNA parçaları, mutasyonlar yönünden tanınabilir (Yüce, 1997).

Multipleks PCR'ın başarılı olması için bazı faktörlerin dikkate alınması gerekir. Bu faktörler; a) primer setleri benzer annealing ısılarına sahip olmalıdır, b) annealing ısı farklarına dikkat edilmelidir. Primer setleri arasında 10°C'lik annealing ısı farkları, çok farklı miktarlarda amplifiye ürünlerin eldesine neden olabilir veya amplifiye ürünler saptanamayabilir (Yüce, 1997).

b) Restriction fragment length polymorphism (RFLP):

Bu yöntemde pürifiye edilmiş DNA, bir restriksiyon enzimi (RE) ile sindirilir ve oluşan parçaların büyüklük ve sayısı karşılaştırılır. Enzim, DNA'yı genellikle 4-6 baz çiftinden oluşmuş bir spesifik tanıma bölgesi içinde değişmez pozisyonda keser. Band dizilerindeki değişiklikler RFLP olarak bilinir. RFLP; DNA'nın delesyonu, insersiyonu, yeni dizi düzenlenmesi veya bazların yer değiştirmesinden oluşur. Bu parçalar genellikle 1000-20000 baz çiftinden oluşur. Agaroz jelde elektroforez ile ayrılır ve etidiyum bromit boyama ile görülebilir (Pfaller, 1993; Yüce, 1997).

RFLP yaygın olarak uygulanan duyarlı ve kolay bir yöntemdir. Aynı anda bir çok örnek çalışılabilir. Kültür ve klinik örnekler ile çalışılabilir. PCR ile birlikte yapıldığında, önce hedef bölgenin amplifikasyonu yapılır, sonra RE ile sindirim ve elektroforez gerçekleştirilir. PCR-RFLP, RFLP'ye göre daha avantajlıdır, çünkü hem hedef bölge amplifiye edilerek genetik farklılıklar kolaylıkla saptanır hem de RFLP'de gözlenen nükleotit metilasyonu nedeni ile RE inhibisyonu olmaz (Pfaller, 1993; Yüce, 1997).

c) Single-strand conformation polymorphism (SSCP):

Bir DNA ipçiginde oluşan tek bir baz değişikliği, bu ipçigin elektroforetik hareketini ve yapısını değiştirebilir. Bu yöntem, 100-600 baz çiftinden oluşan tek zincir DNA'nın sekonder yapısında, tek bir baz değişikliği veya kaybı ile oluşan konformasyonel değişikliklerin nondenatüre jel elektroforezi ile saptanması temeline dayanır. Bilinen suş ile mutant suşlardan DNA denatürasyonu yapılarak iplikçiklerin birbirinden ayrılması sağlanır. Daha sonra nötral poliakrilamid jelde elektroforez yapılır. Vahşi tip ile mutant zincirlerin jeldeki hareketi farklıdır. Standart otoradyografik yöntemlerle bantlar saptanır. Çok sayıda örneğin çalışılabildiği basit, hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Sonuçlar 48-72 saatte elde edilir. PCR-SSCP ile gerek kültür gerekse aside dirençli basil pozitif (3+, 4+) örneklerde *M.tuberculosis* suşlarındaki mutasyonlar hızlı bir şekilde taranarak izoniazid, rifampisin, streptomisin, kinolon duyarlılıkları saptanabilir (Telenti ve ark., 1993; Yüce, 1997).

d) Heterodupleks analiz:

Kontrol bir DNA ile normal tip DNA karşılaştırılarak, bir gende mutasyon olup olmadığını gösteren hızlı bir yöntemdir. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı bir kontrol *M.tuberculosis* suşu ile dirençli olduğu düşünülen test suşunun DNA'ları denatüre edildikten sonra, bu ürünler yeni bir tüple renatüre edilebilir. Birbirine uygunluk gösteren DNA dizileri yeniden bir araya gelerek homodupleks meydana getirirken, mutasyonların bulunduğu DNA dizilerinde tam olarak düzgün şekilde birleşme olamayacağı için heterodupleks oluşacaktır. Bu DNA parçaları nondenatüre poliakrilamid jelde elektroforez ile ayrıştırıldığında; homodupleks ve heteroduplekslerin farklı hızda yürüdükleri ve farklı düzeyde bantlar oluşturdukları gözlenir. Etidiyum bromit ile boyanan ve UV ışığı altında incelenen jelde mutasyonların saptanması olanaklıdır (Alp, 1996; Yüce 1997).

PCR-heterodupleks ile de mutasyon olduğu düşünülen gen bölgesi duyarlı ve dirençli suşlardan PCR ile ayrı ayrı çoğaltıldıktan sonra aynı işlem yapılabilir. Bu yöntemle aside

dirençli basil pozitif örnekte aynı anda *M.tuberculosis* varlığının ve rifampisin direncinin 6 saat içinde saptandığı bildirilmektedir (Alp, 1996; Yüce 1997).

e) Dideoksi fingerprinting (ddF):

Amplifiye edilmiş bir DNA (amplikon)'da nükleotit dizileri konusundaki bilgiler çeşitli moleküler teknikler ile incelenebilir. Bu yöntemler arasında dizi spesifik oligonükleotidlerin kullanıldığı hibridizasyon tekniği ile nokta mutasyonları saptanabilir. Restriksiyon endonükleaz ile spesifik bir dizide nokta mutasyonları saptanabilir ve bu mutasyon spesifik bir primer kullanılarak PCR ile çoğaltılabilir. Tüm bu yöntemler yalnızca iyi tanımlanmış bir kaç mutasyonu araştırmak içindir. Eğer amplikon içinde çok miktarda dizi çeşitliliği (polimorfizm) var ise, o zaman tüm DNA parçası konusunda dizi bilgisi verecek yöntemler kullanılır. Bunlardan biri de dideoksi DNA sıralamasıdır. Dideoksi dizi analizi (ddF); konformasyonel analiz yöntemi olup amplikon içindeki nokta mutasyonlarının durumu konusunda bilgi verir. Bu yöntemde DNA zincirlerinin konformasyonu nondenatüre jelde elektroforez ile araştırılır (Yüce, 1997).

Analiz için aside dirençli basil pozitif balgam örnekleri ile aside dirençli basil negatif balgam veya diğer örnekler kullanılır. Dekontaminasyondan sonra PCR için DNA ekstraksiyonu yapılır. PCR için ortama deoksinükleozit trifosfatlar ve dideoksi trifosfat konur. PCR'ı takiben ürünün analizi yapılır. PCR pozitif reaksiyon örneklerine ³²P işaretli primerler kullanılarak ddF analizi ve jel elektroforezi uygulanır. Dideoksi dizi analizi mutasyonların saptanmasında en kesin yöntem olup, sonuçların yorumlanması SSCP'den daha kolaydır. Rifampisin dirençli *M.tuberculosis* suşları 2 günde saptanabilir. DNA dizi analizi ile paralellik gösterir (Yüce, 1997).

f) Automated DNA sequencing:

Bakteri türlerinin direkt genomik DNA baz dizilerinin karşılaştırılması, iki suşun benzer mi yoksa farklı mı olduğunu kantitatif olarak saptayan en iyi yoldur. *M.tuberculosis* izolatlarında ilaçların bağlandığı gen bölgelerindeki mutasyonlar, ilaçlara dirençten sorumludur. Örneğin, streptomisin direncinden, ilacın bağlandığı ribozomal protein S12 (*rpsL* gen) veya 16S rRNA (*rrs* gen) genindeki değişiklikler sorumludur. Yine aynı şekilde, klaritromisine dirençte 23S rRNA (*rml* gen) genindeki tek nokta mutasyonlarının sorumlu olduğu saptanmıştır. Bu gen bölgeleri PCR ile uygun primerler kullanılarak amplifiye

edildikten sonra direkt DNA dizi analizleri yapılarak nokta mutasyonlarının saptanması olasıdır. Örnekler ya bir sıvı kültürden veya Löwenstein-Jensen gibi katı besiyerinden alınabilir. Alınan örnekte ilaç direncinden sorumlu olduğu düşünülen (*rpoB*, *gyrA*, *katG*, *rpsL*, *rrs* v.b.) gen bölgeleri amplifiye edilebilir. Ürünün dizi analizi, otomatik veya manuel olarak yapılır (Yüce, 1997).

Bu teknik pahalı otomatik aygıtlar gerektiren kompleks bir yöntemdir. Altın standart olarak kabul edilir. Sonuçlar 48 saatte elde edilir. 300-500 baz çiftlik DNA parçalarının 24 saatte dizi analizi yapılabilir (Musser ve ark., 1996; Yüce, 1997).

g) Solid faz hibridizasyon:

Revers hibridizasyon prensibine dayalı bir yöntemdir. İşaretli hedef bölge PCR ile amplifiye edilir. Önceden normal ve mutant tipe ait spesifik oligonükleotid problemlerin immobilize edildiği nitroselüloz membran stripler ile amplifiye ürün denatüre edildikten sonra hibridize edilir (Yüce, 1997).

Eğer hibridizasyon olursa ortama eklenen substrat ve konjugat eklenmesi ile renklenme gözlenecek ve herhangi bir mutasyon olmadığı anlaşılacaktır. Hibridizasyonun olmadığı bölgelerde ise mutasyon varlığı düşünülecektir. Hızlı ve duyarlı bir yöntem olup sonuçlar 48 saatte elde edilir. Aside dirençli basil pozitif ve negatif örneklerde ve kültürde çalışılabilir. Radyoaktif değil kolorimetrik saptama yapılır. Klinik örneklerde aynı anda *M.tuberculosis* varlığını ve rifampisin direncini saptayabilir. Aynı anda 50 kadar örnek çalışılabilir ve komplike aygıtları gerektirmez (Yüce, 1997).

KÜLTÜR VEYA BAKTERİ VARLIĞINA DAYALI YÖNTEMLER:

a) Sıvı besiyeri kullanılan kültür yöntemleri

- Radyometrik yöntem (BACTEC®)
- Mikobakteri büyüme indikatör tüp yöntemi (MGIT®)
- Kolorimetrik yöntem (Alamar blue)

b) Katı besiyeri kullanılan kültür yöntemleri

- Modifiye agar-dilüsyon yöntemi (mikrokoloni saptama)
- E testi (Epsilometer)

c) Bakteri varlığına dayalı yöntemler

- Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi (LPR)

- Biyoluminesans yöntem (hücrese ATP ölçümü)
- Flow sitometri yöntemi

a) Sıvı besiyeri kullanılan kültür yöntemleri

BACTEC yöntemi: 10 yılı aşkın süredir yapılan çeşitli düzenlemeler bu testi hızlı ve güvenilir bir yöntem haline getirmiştir. NCCLS tarafından standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Yüce, 1997).

Mikobakteri büyüme indikatör tüp yöntemi (MGIT®): Klinik örneklerden mikobakteri izolasyonunu gerçekleştirmede hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Her MGIT® tüpü 4 ml modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri ve %0.25 gliserol içerir. Tüpün dip kısmında ise oksijene duyarlı bir floresan indikatör bulunur. Klinik örnekler; içinde belli konsantrasyonlarda ilaç içeren tüplerle birlikte ilaçsız kontrol tüplere de inoküle edilir. Üreme olursa; üreyen bakteriler oksijeni kullanacakları için, oksijene duyarlı floresan indikatör 365 nm dalga boyunda UV ışığı altında veya Wood lambasında parlak portakal renginde floresans verir. İlaçlı tüplerde; duyarlı bakteriler inhibe olacak, dirençli bakteriler ise üreyerek floresan vereceklerdir. Oluşan floresan derecesi antibiyotiksiz negatif kontrol ve %0.4'lük sodyum sülfid içeren pozitif kontrol tüpleri ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Manuel ve non-invaziv bir yöntem olup 5-6 gün gibi kısa bir sürede üremeyi saptar (Alp, 1996; Yüce, 1997).

Kolorimetrik yöntem (Alamar Blue): Alamar mavisi, üreme indikatörü olarak kullanılan bir oksidasyon-redüksiyon boyası olup bakterilerin üremesi sonucu rengi pembeye dönüşür. Diğer bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarında başarı ile kullanılan bu testin *M.tuberculosis* ve *M.avium* için de kullanılabilceği gösterilmiştir (Alp, 1996; Yüce, 1997).

Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde üretilen *M.tuberculosis* kültüründen, McFarland 1'e göre bir süspansiyon hazırlanır ve buyyonda 1:5 oranında sulandırılır. Test edilecek antitüberküloz ilaçların da sıvı besiyerinde çift kat sulandırılmaları yapılır. Dilüe ilaç içeren tüplere, dilüe edilmiş kültür süspansiyonlarından eklenir. Tüplerdeki son bakteri konsantrasyonu 6×10^5 CFU/ml'dir. Aynı şekilde üç ilaçsız kontrol tüpüne de ekim yapılır ve tüm tüpler 35°C'de inkübe edilir. İlaçlı tüplerin okunmaya hazır olup olmadığını anlamak için kontrol tüpleri 7.,10. ve 14 günlerde test edilir Bunun için kontrol tüpüne 0.02 ml Alamar mavisi solüsyonu ile 0.05ml %5 Tween 20 veya Tween 80 eklenir ve 2 saat 50°C'de inkübe

edilir. İnkübasyon sonunda tüpün rengi maviden pembeye dönerse, ilaçlı besiyerine de aynı maddeler eklenerek yine 2 saat 50°C'de inkübe edilir. Renk değişimini önleyen ilaç konsantrasyonu MIC olarak değerlendirilir. Bu yöntem hızlı, kantitatif ve non-radyometrik bir yöntem olup sonuçlar 7-10 günde alınır. Yorumlar agar oranı (proportion) metod ile %97 oranında uyumludur (Yajko ve ark., 1995; Alp, 1996; Collins ve Franzblau, 1997; Yüce, 1997).

b) Katı besiyeri kullanılan kültür yöntemleri

Modifiye agar-dilüsyon yöntemi (mikrokoloni saptama): Middlebrook 7H11 agar ve %10 OADC içeren katı besiyerinde mikrokoloni oluşumunun gözlenmesi ile ilaçlara karşı hızlı duyarlılık saptanabilir. Klinik örneklerden hazırlanan inokülüm belli konsantrasyonlarda ilaç içeren ve kontrol için ilaç içermeyen ince dökülmüş 7H11 agar besiyerine ekilir. Ekili plaklar mikroskop altında X40-X100 büyütmede her iki günde bir mikrokoloni oluşumu yönünden kontrol edilir. Sonuçlar 10-12 günde elde edilir. Hızlı, pratik ve ucuz bir yöntemdir (Yüce, 1997).

E testi (Epsilometer): Daha çok hızlı üreyen mikobakteriler için kullanılmakta ise de, son zamanlarda *M.tuberculosis* ve *M.avium-intracellulare* için de kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bu yöntemde, besiyerinde üremiş ve McFarland 3'e göre bulanıklığı ayarlanmış bakteri süspansiyonu agar yüzeyine yayılır. Üzerine, değişen oranlarda antimikobakteriyel ilaç içeren E test şeritleri konur. Plaklar 5-7 gün süre ile 37°C'de inkübe edilir. Üremenin kuvvetle inhibe olduğu çizginin E test şeridini kestiği nokta, MIC değerini verir. Uygulanması kolay, ucuz ve ümit verici bir yöntemdir (Koontz ve ark., 1994; Biehle ve ark., 1995; Alp, 1996; Wanger ve Mills, 1996; Yüce, 1997).

c) Bakteri varlığına dayanan yöntemler

Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi (LRP): Bu yöntemde, ateş böceğinin lusiferaz genini taşıyan bir mikobakteri fajı kullanılmaktadır. Bilindiği gibi, fajlar kendilerine özgü canlı bakterileri infekte ederler. Lusiferaz geni taşıyan bir faj ile infekte olan mikobakterilerde lusiferaz geninin transkripsiyonu ve faj çoğalması ile bol miktarda lusiferaz eksprese edilir. Ortama lusiferaz enziminin substratı olan lusiferin eklendiğinde, mikobakteri hücre duvar ve

membranını hızla geçen lusiferin, adenozin trifosfat (ATP) varlığında lusiferazın katalize ettiği bir kimyasal reaksiyon sonucunda oksilusiferine dönüşür ve ışık oluşur. Oluşan ışık bir luminometre veya fotometre ile ölçülebilir. Oluşan ışığın miktarı faj infeksiyonu ve hücresel ATP miktarına yani ortamdaki canlı mikobakteri sayısına bağlıdır. Antitüberküloz ilaçlara duyarlı bakteriler ışık oluşturmaz iken dirençli olanlar ışık oluşturmaya devam eder (Cooksey ve ark., 1993; Alp, 1996; Yüce, 1997).

Hızlı bir yöntem olup fajla infeksiyondan bir kaç dakika sonra ışık üretimi saptanabilir ve 2 saat içinde 1000 kat artış gözlenir. Özellikle yeni ilaçların geliştirilmesinde büyük umutlar veren bir yöntemdir (Cooksey ve ark., 1993; Alp, 1996; Yüce, 1997).

Biyoluminesans yöntem (hücresel ATP ölçümü): Yaşayan tüm canlılarda ATP varlığına dayanan bir yöntem olup bakteriyel kültürlerden ATP ekstraksiyonu ve ölçülmesi ile yapılır. Uygun konsantrasyonlarda McFarland 0.5'e göre bulanıklığı ayarlanmış süspansiyondan ilaçlı tüplere eklenir. İlaç içermeyen kontrol tüpleri ile birlikte 35°C'de 10 gün inkübe edilir. Daha sonra bu kültürlerden alınan bir miktar sıvı, 0.1µ TRİS tamponu ve EDTA içeren cam tüplerde 5 dakika kaynatılarak hücreler parçalanır, oda ısısında soğutulur ve üzerine ATP monitörize edici madde eklenerek ışık üretimi yönünden luminometre ile incelenir. Oluşan ışık miktarı, hücresel ATP ile doğru orantılıdır. Ortamda ne kadar çok canlı hücre var ise ışık üretimi o kadar fazladır. Antimikobakteriyellere duyarlı olanlar ışık üretimi yapamaz. ATP aktivitesinin kontrol suşuna göre %40 veya daha altına inmesi, o ilaca karşı duyarlılığı gösterir. Sonuçlar ortalama 1 haftada alınır (Alp, 1996; Yüce, 1997).

Flow Sitometri yöntemi: Flow sitometri, bir sıvı akımı içinde tek tek geçmekte olan hücreler veya biyolojik partiküllerin, fizik ve kimyasal özelliklerini sensörler aracılığı ile ölçebilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, *M.tuberculosis*'in floresein diasetat (FDA)'ı hidrolize etmesi ve oluşan floresent mikobakterilerin flow sitometrik analiz ile saptanması esastır. Çeşitli konsantrasyonlarda antitüberküloz ilaç içeren ve kontrol olarak ilaç içermeyen Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde 24-48 saat inkübe edilen bakteri kültürüne FDA eklenir ve canlı mikobakterilerin FDA'ı hidrolize etmesi sonucu oluşan floresent mikobakteriler flow sitometri ile saptanır. Antimikobakteriyel ajanlara duyarlı mikobakteriler FDA'ı daha az hidrolize eder. Bakteri üremesi gerekmediği için 24 saat gibi kısa sürede sonuç alınır (Norden ve ark., 1995; Alp, 1996; Badak, 1997; Yüce, 1997).

MATERYAL METOD

***M.tuberculosis* suşlarının sağlanması:**

Duyarlılık testi yapılan *M.tuberculosis* suşlarının 14'ü Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Tüberküloz Ünitesi'ne gelen hastalardan elde edilen suşlardı. Suşların 34'ü ise Samsun Verem Savaş Derneği'nde takip edilen hastalardan elde edildi. 47'sini balgamdan izole edilen ve 3'ünü idrardan izole edilen suşlar oluşturdu. Duyarlılık testi uygulanan suşlar LJ besiyerinde üretildi.

Besiyerlerinin hazırlanması:

Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinin hazırlanması:

Besiyerinin içeriği;

a) Temel besiyeri:

Asparajin	3.6 g
KH_2PO_4	2.4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.24 g
Magnezyum sitrat	0.6 g
Gliserol	12 ml
Saf su	600 ml

b) Malaşit yeşili:

2 g malaşit yeşili 18 ml saf su içinde eritildikten sonra temel besiyerine eklendi. Maddeler karıştırılarak 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

c) Homojenize yumurta emülsiyonu (1000 ml):

Yumurtalar (taze olmalarına dikkat edilmeli) önce sabunlu suda 15 dakika tutulup temizlendi. Bol su ile durulandı. Sonra yumurtalar %70'lik etil alkol içerisine kondu ve 15 dakika bekletildi. İçerisinde cam boncuklar bulunan steril bir balona konularak elde çalkalanıp homojenize edildi. Dört katlı steril gazlı bezden süzüldü ve temel besiyerine eklendi (Koneman ve ark., 1992; Bilgehan, 1995). Bu işlemde sonra besiyerlerine tablo 7'de belirtilen miktarlarda test edilecek antibiyotikler eklendi.

Tablo 7. M.tuberculosis duyarlılık testleri için 7H10 agar ve Löwenstein-Jensen besiyerinde antimikrobiyal ajanların konsantrasyonları

<i>Konsantrasyonlar (µg/ml)</i>		
	<i>7H10 agar</i>	<i>Löwenstein-Jensen</i>
İzoniazid	0.2, 1.0	0.2, 1.0
Rifampin	1.0	40.0
Etambutol	2.0	2.0
Streptomisin	2.0, 10.0	4.0

Antibiyotikler eklendikten sonra besiyerleri, vidalı kapaklı tüplere yatık olarak dağıtıldı. Eşit miktarda kontrol için antibiyotiksiz besiyerleri de hazırlandı. 3 gün ard arda birer defa 75°C'de 1 saat bekletilerek katılaştırıldı. Besiyerleri, kullanılabileceği kadar ağızları parafilm ile iyice kapatılarak (kurumalarını önlemek için) +4°C'de saklandı. En fazla üç hafta bekletildi ve 3 haftayı geçen besiyerleri test için kullanılmadı. Yerlerine yeni besiyerleri hazırlandı (Bilgehan, 1995).

Ekimler, besiyeri yüzeyine hazırlanan inokülümünden 150 µl otomatik mikropipet ile yapıldı. Besiyerleri 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inokülümün absorbe edilmesi için 24 saat yatık pozisyonda bekletildi. İnokülümün absorpsiyonundan sonra besiyerlerinin ağız kurumasının önlenmesi için parafilm ile sarıldı. Besiyerleri tekrar 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 3 hafta inkübe edildi. 3 hafta sonra sonuçlar değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

Middlebrook 7H10 besiyerinin hazırlanması:

Besiyerinin içeriği;

Amonyum sülfat	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Na ₂ HPO ₄	1.5 g
Sodyum sitrat	1 g
Magnezyum sülfat	0.025 g
CaCl ₂	0.0005 g
ZnSO ₄	0.001 g
CuSO ₄	0.001 g
L-Glutamik asit	0.5 g
Ferrik amonyum sitrat	0.04 g
Piridoksin	0.001 g
Biotin	0.0005 g
Malaşit yeşili	0.00025 g
Agar	15 g
Saf su	900 ml
pH: 6.6	

Bu maddeleri içeren toz halde Middlebrook 7H10 besiyeri ticari olarak sağlandı. Firma tarafından belirtilen oranlarda distile su ile hazırlanan besiyerinin 900 ml'sine 5 ml gliserol eklendi ve otoklavda 121°C'de 15 dakikada steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyerine yine firma tarafından belirtilen oranda (900 ml'sine 100 ml olacak şekilde) OADC (oleik asit, sığır albumin V fraksiyonu, dekstroz, katalaz) zenginleştirici sıvı eklendi. Daha sonra tablo 7'de belirtilen oranlarda antibiyotik eklenerek (50°C'ye soğutulduktan sonra) besiyerleri yatık olarak vidalı kapaklı tüplere dağıtıldı ve katılaşması bekledi. Katılaştıktan sonra besiyerlerinin ağızları parafilm ile iyice kapatılarak plastik torbalarda, karanlıkta ve +4°C'de saklandı (en fazla 3 hafta saklanabilir) (Bilgehan, 1995).

Ekimler, besiyeri yüzeyine hazırlanan inokülümünden 150 µl otomatik mikropipet ile yapıldı. Besiyerleri 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inokülümün absorbe edilmesi için 24 saat yatık pozisyonda bekletildi. İnokülümün absorpsiyonundan sonra besiyerlerinin ağız kurumasının önlenmesi için parafilm ile sarıldı. Besiyerleri tekrar 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 3 hafta inkübe edildi. 3 hafta sonra sonuçlar değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinin hazırlanması:

Besiyerinin içeriği;

L-glutamik asitin sodyum tuzu	0.5 g
Amonyum sülfat	0.5 g
Sodyum sitrat	0.1 g
Piridoksin	1 mg
Biotin	1 mg
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Ferrik amonyum sitrat	0.04 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 mg
Saf su	900 ml

Bu maddeleri içeren toz haldeki Middlebrook 7H9 besiyeri ticari olarak sağlandı. Firmanın belirttiği oranda toz besiyeri distile suda karıştırılıp, eritildi ve 900 ml içerisine 2 ml gliserol eklendi. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra

soğutulup içerisine 100 ml OADC (oleik asit, sığır albumin V fraksiyonu, dekstroz, katalaz) zenginleştirici sıvı eklendi (Bilgehan, 1995).

Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri, inokülüm ve dilüsyonların hazırlanmasında kullanıldı. Ayrıca, yeterince koloni olmadığında Middlebrook 7H9 sıvı besiyerine 1-2 koloni inoküle edildi. McFarland 1 standart bulanıklığı elde edilinceye kadar 37°C'de inkübe edildi ve inokülüm kaynağı olarak kullanıldı (Bilgehan, 1995).

Katalaz testi için besiyeri hazırlanması ve semikantitatif katalaz testinin uygulanması:

Yukarıda anlatılan geleneksel metodlar ile hazırlanan antibiyotiksiz Löwenstein-Jensen besiyerleri vidalı kapaklı tüplere dağıtılarak dik konumda katılaştırıldı. Saklanması antibiyotikli besiyerlerinde olduğu gibidir (Jo Baron ve ark., 1994).

Kullanılan ayıracın hazırlanması:

%10 Tween 80 ayıracı:

Tween 80 10ml

Saf su 90 ml

Süperoksol:

%30 hidrojen peroksit

Tween-peroksit ayıracı deney anında taze olarak hazırlandı. 1 kısım %10'luk tween 80 ayıracı, 1 kısım süperoksol ayıracı ile karıştırıldı (Bilgehan, 1994).

Dik olarak katılaştırılmış LJ besiyerlerine test edilecek saf *M.tuberculosis* kolonilerinden inokülasyon yapıldı ve 3 hafta 37°C'de inkübe edildi. 3 hafta sonra gelişen kolonilerin üzerine 1ml tween-peroksit ayıracı damlatıldı ve oda ısısında 5 dakika bekletildi. Sonuçlar 45 mm'nin altında ve üzerinde olarak not edildi ve 45mm'nin üzerinde olanlar pozitif olarak kabul edildi (Jo Baron ve ark., 1994).

Niasin toplanması testinin uygulanması:

Kullanılan stripler ticari olarak Becton Dickinson®'dan sağlandı ve kullanılmaya kadar 2-8°C'de saklandı.

Testin yapılışı:

1-LJ besiyerinde üremiş saf bir *M.tuberculosis* izolatu test için kullanıldı. LJ besiyerinin yüzeyine 1ml steril distile su eklendi,

- 2-Yatık pozisyonda 15-30 dakika oda ısısında bekletildi. Besiyeri üzerine salınan niasin sıvı içerisinde çözüldü,
- 3-Sıvının 0.6ml'si alınarak steril bir vidalı kapaklı tüpe konuldu ve üzerine niasin strip (Becton Dickinson®) dik olarak batırıldı,
- 4-Oda ısısında 20 dakika bekletildi (bekleme sırasında hafifçe sallanarak karıştırıldı),
- 5-20 dakika sonra tüp beyaz bir zemin önüne tutularak değerlendirildi,
- 6-Sıvı kısımda sarı renk oluşması pozitif olarak değerlendirildi. Eğer sıvı kısım berrak ise negatif olarak değerlendirildi.
- 7-Stripler imha edilmeden önce, %10'luk NaOH ile nötralize edildi (Jo Baron ve ark., 1994).

Nitrat redüksiyonu testinin uygulanması:

Kullanılan stripler ticari olarak Becton Dickinson®'dan sağlandı ve kullanılıncaya kadar 2-8°C'de saklandı.

Testin yapılışı:

- 1-Steril bir vidalı kapaklı tüpe 1 ml tuz solusyonu (serum fizyolojik) konuldu,
- 2-4 haftada üremiş bir *M.tuberculosis* izolatından birkaç tane koloni alınıp tuz solusyonu içinde emülsiyon hazırlandı,
- 3-Emülsiyon içine nitrat strip (Becton Dickonson®) dik olarak batırıldı,
- 4-Stripin sıvı ile teması sağlandı ancak çalkalanmadı,
- 5-Tüpler 35°C'de 2 saat inkübe edildi ve 1. saat sonunda tüpler yavaş bir şekilde çalkalamadan karıştırıldı,
- 6-2. saatin sonunda tüpler 6 kez çalkalamadan alt-üst edilerek karıştırılıp sıvının strip yüzeyine teması sağlandı ve 10 dakika yatay pozisyonda bekletildi,
- 7- Stripin tepesinde mavi renk oluşumunun gözleendiği tüpler pozitif olarak değerlendirildi, negatif olanlarda ise renk değişimi gözlenmedi yani, nitroredüktaz enzimine sahip değildiler (Jo Baron ve ark., 1994).

İnokülümün hazırlanması:

Vidalı kapaklı tüplere 3ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri konuldu. Besiyeri içerisine 3-4 adet steril cam boncuk atıldı. Saf *M.tuberculosis* kültürlerinden bol miktarda koloni öze ile alınıp boncuk içeren sıvı besiyeri içerisine koyuldu. Daha sonra kolonileri parçalayıp homojen bir süspansiyon sağlamak için 5-10 dakika vorteks ile karıştırıldı. Vorteksleme işleminden sonra partiküllerin çökmesi için 10 dakika tüpler dik bir şekilde bekletildi. Ayrıca, vortekslemeye

bağlı oluşabilecek aerosoller ile bulaşmanın önlenmesi için de tüplerin ağzı %70'lik alkol ile silindi. Partiküllerin üzerindeki süspansiyon tekrar steril bir vidalı kapaklı tüpe alınarak McFarland 1 standardına (10^7 CFU/ml) ayarlandı. Bu standart solüsyondan Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri kullanılarak 10^{-2} ve 10^{-4} olmak üzere iki dilüsyon hazırlandı. Duyarlılık testlerinde hazırlanan bu iki dilüsyon inokülüm kaynağı olarak kullanıldı (Kent ve Kubica, 1985; Bilgehan, 1995; Lorian, 1996).

Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması:

Stok konsantrasyonları ilacın etki ve saflığı temel alınarak hazırlandı (Lorian, 1996).

Stok solüsyonların hazırlanmasında şu formüller kullanıldı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \text{Volüm (mL)}$$

$$\times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) / \text{etki } (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Volüm (mL)} =$$

$$\frac{\text{Ağırlık (mg)}}{X}$$

$$\text{X etki } (\mu\text{g/mg}) / \text{konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) \text{ (NCCLS document, 1994;}$$

Lorian, 1996).

Rifampisin, etambutol, izoniazid, streptomisin toz olarak Sigma®'dan sağlandı. Her bir ilacın stok çözeltisi, tartılan ilacın her mg'ına eşit ml çözücü ile hazırlandı. Çözücü olarak, rifampisin hariç diğerlerinde steril distile su kullanıldı. Rifampisin, bir miktar metanol ile çözüldükten sonra üzeri steril distile su ile tamamlandı. Daha sonra ilaçların tamamen çözülmesini sağlamak için bir süre vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan stok çözeltilerden besiyerlerine ilave edilecek miktarlar tablo 7'de gösterilmiştir (NCCLS document, 1994; Lorian, 1996).

Duyarlılık testinin (Orantı-Proportion Metod) uygulanması:

McFarland 1 standardına göre hazırlanan inokülümden 10^{-2} ve 10^{-4} dilüsyonlar hazırlandı. Sırası ile, bu dilüe inokülümlerden 150 µl, otomatik pipet ile ilaçlı Middlebrook 7H10 ve yine ilaçlı Löwenstein-Jensen besiyerine inoküle edildi. Kontrol olarak her hasta için birer tane ilaçsız besiyerine inokülasyon yapıldı. İnokülasyondan sonra besiyerleri 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inokülümün absorbe edilmesi için 24 saat yatık pozisyonda bekletildi. İnokülümün absorpsiyonundan sonra besiyerlerinin ağzı, kurumaması için parafilm ile sarıldı ve besiyerleri yine, 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Besiyerlerinin kontrolü her

hafta yapıldı. Dirençli basiller duyarlı basillere göre daha geç üredikleri için Middlebrook 7H10 besiyerleri diseksiyon mikroskopu ile haftalık takip edildi. Sonuçlar, 3 hafta sonra değerlendirildi. 3 haftadan sonra besiyeri içerisindeki antibiyotik miktarı azalmakta ve özellikle Middlebrook 7H10 besiyerinde mikrokoloni oluşumu gözlenmektedir (mikrokoloniler değerlendirmeye alınmadılar). Bu yüzden, 3 haftayı geçen sürelerde yapılan değerlendirmeler yanlış sonuç eldesine neden olmaktadır (Kent ve Kubica, 1985; NCCLS document, 1994; Bilgehan, 1995; Lorian, 1996).

Sonuçların değerlendirilmesi:

Sonuçların değerlendirilmesi, antibiyotiksiz kontrol besiyerlerindeki koloni sayıları ile, antibiyotikli besiyerlerindeki koloni sayılarının karşılaştırılması suretiyle yapıldı. Antibiyotikli ortamdaki üreme kontrole göre baskılanmamış ve koloni sayısı fazla ise dirençli olarak değerlendirildi. Koloni sayısı kontrole yakın veya az ise direnç oranı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$\text{Antimikrobikli ortamdaki koloni sayısı} / \text{Antimikrobiksiz ortamdaki koloni sayısı} \times 100 \\ = \text{Direnç yüzdesi}$$

Testte kullanılan suşlarda hesaplanan direnç yüzdesi 1 veya daha fazla ise suşun test edilen antibiyotiğe dirençli olduğu sonucuna varıldı (Kent ve Kubica, 1985; NCCLS document, 1994; Bilgehan, 1995; Lorian, 1996).

BULGULAR

Niasin toplanması testi sonuçları:

Ticari olarak sağlanan stripler (Becton Dickinson®) ile yapılan niasin toplanması testi tüm suşlarda pozitif bulunmuştur.

Nitrat redüksiyonu testi sonuçları:

Ticari olarak sağlanan stripler (Becton Dickinson®) ile yapılan nitrat redüksiyonu testi tüm suşlarda pozitif bulunmuştur.

Mikobakteriler içinde yalnızca *M.tuberculosis* niasin toplanması ve nitrat redüksiyonu testlerinin her ikisinde de pozitif sonuç verir. Çalışmada; testlerin tümünün pozitif olması duyarlılık testi uyguladığımız suşların tümünün *M.tuberculosis* olduğunu desteklemiştir.

Semikantitatif katalaz testi sonuçları:

Tüm *M.tuberculosis* suşları katG genlerinin varlığı ile katalaz-peroksidaz enzimi oluştururlar. İsoniazide dirençli *M.tuberculosis* suşları ise, katG genlerindeki mutasyonlar nedeni ile katalaz-peroksidaz enzimi üretemezler. Çalışmada; duyarlılık testi uygulanan tüm suşların semikantitatif katalaz test sonuçları 45 mm'nin altında bulunmuştur.

Duyarlılık testlerinin sonuçları:

Bu çalışmada; tüberküloz hastalarından izole edilen 50 *M.tuberculosis* suşu kullanılmış ve duyarlılık testleri karşılaştırılmalı olarak LJ ve Middlebrook 7H10 besiyerinde yapılmıştır. Tablo 8-9'de çalışma grubunu oluşturan olguların adı, soyadı, protokol no., yaş, cinsiyetleri ve duyarlılık test sonuçları sunulmuştur.

Tablo 8-9'da görüldüğü gibi, 50 olgunun LJ besiyeri test sonuçlarına göre 7'sinde, Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarına göre ise 3'ünde iki veya daha fazla ilaca direnç (çoklu ilaç direnci) saptanmıştır.

Tablo 8. Tüberküloz olgularının duyarlılık test sonuçları

Sıra No	Ad Soyad	Protokol No	Yaş	Cinsiyet	H		R		S		E	
					LJ	M	LJ	M	LJ	M	LJ	M
1	Ş.Ç.	36585	35	E	S	S	S	S	S	S	S	S
2	B.Ş.	36696	18	E	S	S	S	S	R	S	S	S
3	E.Ç.	36660	25	E	S	S	S	S	R	S	S	S
4	M.T.	36659	25	E	S	S	S	S	R	S	S	S
5	K.Ç.	28076	65	E	S	S	R	S	R	S	R	S
6	B.A.	29827	39	K	S	S	S	S	R	S	S	S
7	R.E.	4655	30	E	S	S	S	S	S	S	S	S
8	B.M.	36721	46	E	S	S	S	S	S	S	S	S
9	K.I.	36701	44	E	S	S	S	S	S	S	S	S
10	A.O.	32370	28	K	S	S	S	S	S	S	S	S
11	K.K.	37626	16	K	S	S	S	S	S	S	S	S
12	İ.Ö.	37665	30	E	S	S	S	S	R	S	S	S
13	N.K.	37622	25	K	S	S	S	S	S	S	S	S
14	R.D.	37674	40	E	S	R	R	R	S	S	S	R
15	M.G.	37578	45	E	S	S	R	S	S	S	S	S
16	R.E.	4445	30	K	S	S	S	S	S	S	S	S
17	İ.E.	3450	35	E	S	S	S	S	R	S	S	S
18	N.K.	37622	25	K	S	S	S	S	S	S	S	S
19	R.E.	4445	30	K	S	S	S	S	S	S	S	S
20	E.A.	37640	27	K	S	S	S	S	S	S	S	S
21	H.Ö.	35705	68	E	R	S	S	S	S	S	S	S
22	M.G.	37578	45	E	S	S	R	S	S	S	S	S
23	N.A.	3470	38	E	S	S	S	S	S	S	S	S
24	A.A.	32491	24	E	R	S	R	S	S	S	S	S
25	E.B.	37655	55	K	S	S	S	S	S	S	S	S
26	K.A.	37604	13	K	S	S	S	S	S	S	S	S
27	İ.Ö.	37665	30	E	S	S	S	S	R	S	S	S
28	A.B.	32254	25	E	R	S	R	S	R	S	R	S
29	E.A.	32613	27	E	S	S	R	S	S	S	S	S
30	Y.A.	37533	35	E	S	S	S	S	S	S	S	S
31	A.G.	78220	72	K	S	S	S	S	R	S	S	R
32	A.Ö.	511954	31	E	S	S	S	S	S	S	S	S
33	Y.K.	46776	20	K	S	S	S	R	R	S	S	R
34	C.K.	572965	45	E	S	S	S	S	S	S	S	S
35	H.E.	49991	42	E	S	S	S	S	S	S	R	S
36	M.G.	37523	44	E	S	S	R	S	S	S	R	S
37	A.A.	37616	49	E	S	S	S	S	R	S	S	S
38	Y.A.	37533	35	E	S	S	S	S	S	S	S	S
39	M.A.	37565	33	E	S	S	R	S	R	S	S	S
40	E.A.	32613	27	E	S	S	S	S	S	S	S	S
41	H.Y.	29946	51	K	S	S	R	S	S	S	S	S
42	H.K.	37489	36	E	S	R	R	S	R	R	R	R
43	N.K.	37622	25	K	S	S	S	S	S	S	S	S
44	F.M.	37621	33	E	S	S	R	S	R	S	S	S
45	A.A.	32491	24	E	S	S	R	S	S	S	S	S

H:İzoniazid, R:Rifampisin, S:Streptomisin, E:Etambutol

LJ:Löwenstein-Jensen, M:Middlebrook 7H10

S:Sensitiv (duyarlı), R:Resistant (dirençli).

Tablo 9. Tüberküloz olgularının duyarlılık test sonuçları

Sıra No	Ad Soyad	Protokol No	Yaş	Cinsiyet	H		R		S		E	
					LJ	M	LJ	M	LJ	M	LJ	M
46	K.A.	37604	13	K	S	S	S	S	R	S	S	S
47	H.S.	37561	65	E	S	R	S	S	S	S	S	S
48	F.M.	37621	33	E	S	S	S	S	S	S	S	S
49	F.A.	32254	24	E	S	S	S	S	S	S	S	S
50	İ.C.	37595	31	E	S	S	S	S	S	S	S	S

H:İzoniazid, R:Rifampisin, S:Streptomisin, E:Etambutol

LJ:Löwenstein-Jensen, M:Middlebrook 7H10

S:Sensitiv (duyarlı), R:Resistant (dirençli).

Tablo 8-9'da duyarlılık test sonuçları verilmiştir. Tabloda LJ besiyeri test sonuçlarında elde edilen direnç oranlarının, Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarından daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

Tablo 10-12'de tek, iki ve üç ilaca direnç oranları ayrı olarak sunulmuştur. Suşlarda tek ilaca direnç oranları LJ ve Middlebrook 7H10 besiyerlerinde farklıdır. LJ besiyerinde saptanan direnç oranı (%38), Middlebrook 7H10 besiyerinde saptanan direnç oranından (%4) daha yüksek olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). En yüksek direnç, LJ besiyerinde (%22) S'e karşı gözlenmiştir (Tablo 10).

Tablo 11 ve 12'de aynı anda 2 ve 3 ilaca direnç oranları görülmektedir. LJ ve Middlebrook 7H10 besiyerlerinde saptanan direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Aynı anda 4 ilaca direnç yalnız 1 suşta ve LJ besiyerinde saptanmıştır (Tablo 13).

Tablo 10. Tek bir ilaca direnç durumu

İlaçlar	İzoniazid (H)	Rifampisin (R)	Streptomisin (S)	Etambutol (E)	Toplam
Löwenstein-Jensen	1 (%2)	6 (%12)	11 (%22)	1 (%2)	19 (%38)
Middlebrook 7H10	1 (%2)	-	-	1 (%2)	2 (%4)

H: İzoniazid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E: Etambutol

n=50

t = 4.52

p<0.001

Tablo 11. İki ilaca direnç durumu

İlaçlar	H+R	H+S	R+S	R+E	S+E	H+E	Toplam
Löwenstein-Jensen	1 (%2)	-	2 (%4)	1 (%2)	-	-	4 (%8)
Middlebrook 7H10	-	-	-	1 (%2)	-	-	1 (%2)

H: İzoniazid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E: Etambutol

n=50

t = 1.376

p>0.05

Tablo 12. Üç ilaca birden direnç durumu

İlaçlar	H+R+S	H+R+E	H+S+E	R+S+E	Toplam
Löwenstein-Jensen	-	-	-	2 (%4)	2 (%4)
Middlebrook 7H10	-	1 (%2)	1 (%2)	-	2 (%4)

H: İzoniazid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E: Etambutol

n=50

t = 0

p>0.05

Tablo 13. Dört ilacın tümüne direnç durumu

İlaçlar	H+R+S+E
Löwenstein-Jensen	1 (%2)
Middlebrook 7H10	-

H: İzoniazid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E: Etambutol

n=50

Tüberküloz olgularından izole edilen 50 suşun tüm ilaçlara duyarlılık durumu tablo 14'de sunulmuştur. Tabloda da görüldüğü gibi, LJ besiyeri test sonuçlarına göre 24 (%48) suş tüm ilaçlara duyarlı iken, Middlebrook 7H10 besiyeri sonuçlarına göre 45 (%90) suş tüm ilaçlara duyarlı bulunmuştur. İki besiyeri sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

Tablo 14. Tüm ilaçlara duyarlılık durumu

Tüm ilaçlar (H+R+S+E)	Duyarlı
Löwenstein-Jensen	24 (%48)
Middlebrook 7H10	45 (%90)

H: İzoniazid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E: Etambutol

n=50

t = 5.41

p<0.001

M.tuberculosis suşlarının H, R, S ve E'e direnç durumları tablo 15'da sunulmuştur. Çalışmada; LJ besiyerinde yapılan duyarlılık testi sonucuna göre; en yüksek direnç %32 oranı ile S'e karşı gözlenmiş, bunu R (%26), E (%10) ve H (%6) izlemiştir. Middlebrook 7H10 besiyerinde yapılan duyarlılık testi sonucuna göre ise; en yüksek direnç %8 oranı ile E'e gözlenmiş ve bunu, H (%6), R (%4) ve S (%2) dirençleri izlemiştir (Tablo15).

Tablo 15. Toplam ilaç direnci durumu

İlaçlar	H	R	S	E
Löwenstein-Jensen	3 (%6)	13 (%26)	16 (%32)	5 (%10)
Middlebrook 7H10	3 (%6)	2 (%4)	1 (%2)	4 (%8)

H: İzoniazid, R: Rifampisin, S: Streptomisin, E: Etambutol

n=50

TARTIŞMA

Tüberküloz, insanlığın en eski dertlerinden biri olan, tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere karşın, bugün bütün dünyada özellikle az gelişmiş olan ülkelerde yaygın olarak bulunan bir enfeksiyondur. 1950 ve 1960'lı yıllarda tüberküloz için efektif tedavinin girişi ile çok geçmeden hastalığın kontrol edileceği ve hatta elimine edileceği umutları artmıştır. Endüstrileşmiş ülkelerde insidansta azalma başarılırken, *M.tuberculosis* dünyada enfeksiyöz ölümlerin en büyük nedeni olarak kalmıştır (Yüce, 1994; Zhang ve Young, 1994).

Son 15 yılda özellikle HIV ile enfekte hastalarda MDR-TB olgularının hızla artması, bu olguların %40'ının ölmesi ve sağaltımın başarısız olması, hastane kaynaklı bulaşların gözlenmesi, primer ve sekonder ilaç direncinin artması gibi nedenler tüberküloz kontrol çalışmalarını sonuçsuz bırakmıştır. Günümüzde tüberküloz tüm insanlık için büyük bir sağlık sorunu olma özelliğini korumaktadır. İlaçlara duyarlı mikobakteriler ile oluşan hastalıklarda uygun ilaç kombinasyonu ile olguların %88-98'nin sağaltılabilmesine karşın, MDR-TB olgularında sağaltım büyük bir sorun olmaktadır (Yüce, 1994-1997; Vareldzis ve ark., 1994).

Tüberküloz tanısı klinik bulgular, radyolojik görünüm, tüberkülin deri testi sonucunun değerlendirilmesi, klinik örneklerden hazırlanan preparatlarda mikobakteri görülmesi ve besiyerinde üretilmesiyle mümkün olmaktadır. Mikobakteriyel enfeksiyonların laboratuvar tanısında kültür yöntemleri uzun zaman (3-8 hafta) gerektirmelerine karşın bakterinin kendisinin elde edilebilmesine ve duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak sağlarlar. Bu nedenle uygulanmaları gerekli olan tek yöntemdirler (Kasımoğlu, 1996; Badak, 1997).

Ülkemiz tüberküloz yönünden hiperendemik ülkeler grubuna girmektedir. Son yıllarda tüberküloz sıklığının artışı yanında çoklu ilaç direnci de önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ancak tüberküloz duyarlılık testlerinin standardizasyonundaki güçlükler ülkemizdeki gerçek ilaç direnç oranları konusunda kuşkular yaratmaktadır (Otkun ve ark., 1997).

Tüberküloz olgularında primer ilaç direnci; daha önce hiç antitüberküloz tedavi görmemiş olgulardan izole edilen dirençli suşların varlığı olarak tanımlanır (Vareldzis, 1994). Ülkeden ülkeye ve değişik sosyal gruplar arasında farklılık gösterir. Gelişmiş ülkelerde primer direnç oranları düşük iken, gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir. Yetersiz ve düzensiz tedaviler, sekonder ilaç direnci yanında bu basillerle enfekte olan toplumlarda primer ilaç direncinde de artmaya neden olmaktadır (Yüce ve ark., 1994).

Tüberküloz olgularında inisiyal direnç, yeni bir tüberküloz olgusunda bir ya da daha fazla antitüberküloz ilaca karşı direncin varlığı olarak tanımlanır. Bu kategori, daha önceki tedavisi hakkında bilgi vermektten çekinen ya da geçmiş tedavi hikayesi yeterince sorgulanmayan ve bu nedenle açığa çıkmamış kazanılmış direnci olan olguları kapsar. Daha önce tüberküloz kemoterapisi hiç almamış olan bir tüberküloz hastasında görülen direnç, primer direnç olarak değerlendirilir. Uygun tedavinin başarısızlığa uğradığı olgular kronik olgu olarak; birden fazla antitüberküloz ajana dirençli olgular ise, MDR-TB olarak tanımlanır (Vareldzis ve ark., 1994).

M.tuberculosis'in *M.tuberculosis kompleks*'den ayırımında niasin toplanması ve nitrat redüksiyonu testleri kullanılır. *M.tuberculosis*'de kompleksin diğer üyelerinden farklı olarak aynı anda her iki test de pozitifdir (Koneman ve ark., 1992). Bizim çalışmamızda da teste alınan 50 suşun niasin toplanması ve nitrat redüksiyonu testleri pozitif bulunmuştur.

Mikobakteri türlerinin çoğu katalaz enzimi üretirler ve bu enzim *M.tuberculosis*'in çoğu suşu ve *M.tuberculosis kompleks*'in diğer üyelerinde ısıya duyarlıdır. Ancak, H-dirençli *M.tuberculosis* suşlarının yaklaşık %70'i sıcaklık-stabil katalaz enzimi üretirler. Semikantitatif katalaz testi ise, tüm mikobakterilerde olumlu olup, yalnızca *M.tuberculosis*'in H'e direnç kazanmış suşları ve bazı mikobakteriler katalaz olumsuzdurlar (Koneman ve ark., 1992). Çalışmada; suşların tümünün semikantitatif katalaz testi pozitif olarak bulunmuştur ve katalaz testi ile H-direnci arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

Çalışmada; *M.tuberculosis* ilaç duyarlılığını tespit etmede Löwenstein-Jensen (LJ) ve Middlebrook 7H10 besiyerleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, tek, iki, üç ve dört ilacın tümüne dirençli suşlar ve her bir ilaca dirençli suşlar olarak ayrı ayrı sunulmuştur (Tablo 10-15).

Çalışmada; LJ besiyerinde yapılan duyarlılık testleri sonucunda elde edilen tüm direnç oranlarının beklenildiği gibi Middlebrook 7H10 besiyerinde elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğu görülmüştür. LJ besiyeri katılaştırılması sırasında uygulanan 80°C ısı nedeniyle ilaçların inaktive olmasına neden olabilmektedir. Ek olarak, besiyerinin bol protein içeriği de antibiyotiklerin bağlanarak inaktive olmasına neden olabilir. Bu dezavantajlardan dolayı mikobakteriyel duyarlılık testlerinde LJ besiyeri önerilmemektedir (Kent, 1985; Lorian, 1996). Ülkemizde halen mikobakteriyel duyarlılık testlerinde LJ besiyerinin tercih edildiği görülmektedir (Yüce ve ark., 1994; Arseven ve ark., 1995). Çalışmamızda; duyarlılık testlerinin her iki besiyerinde de karşılaştırılmalı olarak yapılmasının nedeni besiyerleri arasındaki farkı ortaya koymaktır.

Çalışmamızda; LJ besiyerinde izoniazide %6, rifampisine %26, streptomisine %32 ve etambutole %10 direnç oranları bulunmuştur. Yüce ve ark. 1994'de yaptıkları çalışmada; izoniazide %9, etambutole %3, streptomisine %32 ve rifampisine %27 oranında direnç saptamışlardır. Yüce ve ark.'nın çalışmaları, bizim bulgularımıza benzer şekilde en yüksek direnç streptomisine ve rifampisine karşı bulunmuştur. Baysal ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, en yüksek direnç (%66) rifampisine, en düşük direnç ise (%12) etambutole karşı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada izoniazide %22, streptomisine %50 oranında direnç saptanmıştır. Arseven ve ark.'nın 1995'te yaptığı çalışmada ise en yüksek direnç oranları (%29.6) izoniazide, (%23.3) streptomisine karşı bulunmuştur. Diğer çalışmalarda, izoniazide %10-19, etambutole %1, streptomisine %8 ve rifampisine %1-12 arasında değişen direnç oranları saptanmıştır (Yüce ve ark., 1944). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan direnç oranları tablo 16'de özetlenmiştir.

Tablo 16'de, etambutole 1988-90 yılları arasında %3-14 arasında bir direnç saptandığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda; LJ besiyerinde etambutole benzer şekilde %10 direnç saptanmıştır. Tabloda görüldüğü gibi, en yüksek direnç streptomisine karşı saptanmış olup, bizim çalışmamızda da benzer şekilde streptomisine karşı bulunmuştur. Rifampisin direncinde de 1990'lı yıllara doğru belirgin bir artış gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda da, rifampisine direnç oranı %26 ile ikinci sırayı almaktadır.

Tablo 16. Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan toplam direnç oranları (%).

Yazar/Yıl	H	E	S	R
Özgen				
1956	23		53	
1960	23		49	
1964	30		57	
Saygun				
1968	9		5	
1970	7		11	
1972	12		9	
Gürsel ve ark.				
1971	8		4	
Saygun ve ark.				
1976	10		4	5
1978	9		4	5
1980	5		17	8
Yüce ve ark.				
1988	42	3	45	45
Osmanoğlu ve ark.				
1989	26	14	30	26
1989	39	11	30	41
Aysev				
1992	9	4	17	9

Direnç oranları, ülkeden ülkeye ve aynı ülke içerisinde sosyo-ekonomik düzey ile yakın ilişki göstermektedir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda elde edilen direnç oranları tablo 17’de özetlenmiştir. Tabloda görüldüğü gibi, direnç daha çok gelişmekte olan ülkelerden kaynaklanmaktadır. Örneğin, en yüksek direnç oranları Kore’de saptanmıştır. Hawaii gibi sosyo-ekonomik düzeyi yüksek bölgelerde ise direnç oranları düşüktür. Tabloda, ayrıca rifampisin ve etambutol direncinin giderek arttığı görülmektedir. İzoniazid ve streptomisin direnci ise yıllara göre dalgalanmalar göstermektedir. Ortalama izoniazid direnci %0.8-33, rifampisin direnci ise %0-14 arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda ise, streptomisin direnci daha yüksek (%32) bulunmakla birlikte en az direnç izoniazide (%6) karşı bulunmuştur.

Tablo 17. Çeşitli ülkelerde saptanan direnç oranları (%).

Yazar/Yıl/Ülke	H	E	S	R
Steiner ve ark./1993/ABD				
1961-64	6		3	
1965-68	9		9	
1969-72	15	1	13	0
1973-76	10	0	7	0
1977-80	4	0	2	4
Pien ve ark./1982/Hawaii				
1977-1981	0.8	2	1	0
Carpenter ve ark./1982/ABD				
Koreliler	33	13	22	5
ABD'liler	6	4	5	0
Carpenter ve ark./1983/ABD				
Orta Amerika	7	4	8	10
ABD (Texas)	9	3	7	10
Barnes ve ark./1987/ABD (Kökenleri farklı olan göçmenler)				
Latin Amerika/Afrika/Asya	3		1	1
ABD/Avrupa/Kanada	11		0	14

Çalışmada; Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarına göre, en yüksek direnç %8 ile etambutole karşı saptanmıştır. İsoniazid direnci ise her iki besiyerinde de eşit olarak bulunmuştur. Badak ve ark., 1997'de Middlebrook 7H10 besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmada en yüksek direnci (%9.6) rifampisine karşı bulmuşlardır. Etambutol ve streptomisine ise %3.2 oranında direnç saptamışlar, izoniazide karşı ise direnç gözlememişlerdir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları şu şekilde sıralayabiliriz:

- 1- İdentifikasyon test sonuçlarında, çalışma kapsamına alınan tüm suşların *M.tuberculosis* olduğu saptanmıştır.
- 2- Çalışmaya alınan 50 suşun izoniazid direnci ile semikantitatif katalaz testi arasında bir ilişki saptanamamıştır.
- 3- Proportion metod kullanılarak her iki besiyerinde yapılan duyarlılık testleri sonuçları farklı bulunmuş olup, Löwenstein-Jensen besiyeri kullanılarak alınan test sonuçlarına göre antitüberkülo ilaçlara direnç oranı daha yüksek bulunmuştur.
- 4- Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında sonuçlar genel olarak uyumlu bulunmuştur. Bir çok çalışmada farklı MIC değerlerinin kullanılmış olması kıyaslamayı güçleştirse de çalışmamızda da direnç oranları oldukça yüksek bulunmuştur.
- 5- Tüberküloz tedavisi sırasında, direnç durumunun gerçek göstergesi için Löwenstein-Jensen ve Midllebrook 7H10 besiyeri kullanılarak uygulanan proportion metod, sıvı besiyerleri (BACTEC®, BacTAlert® vs) ve Etest gibi yeni teknikler ile alınan sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenerek, bunlar arasından en ucuz, en güvenli ve en kısa sürede sonuç veren bir test seçilerek rutin olarak kullanılması önerilebilir.
- 6- Direnç oranlarındaki artışın önlenmesi, için uygun tedaviler duyarlılık test sonuçları dikkate alınarak seçilmelidir.

KAYNAKLAR

- 1-Alp, A. (1996). *Mycobacterium tuberculosis*'in antimikobakteriyel ajanlara karşı duyarlılık tespitinde yeni yöntemler. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **30 (4)**, 409-417.
- 2-Arıkan, S. (1996). Tüberküloz Tanısında Direkt Mikroskopik İnceleme ve Kültür. *İnfeksiyon Bülteni*, **1**, 9-13.
- 3-Arseven, O., Eraksoy, H., Uzun, Y., Sepkin, C., Kalaycıoğlu, A., Özmenoğlu, M., Bölükbaşı, O. (1995). Doğu Karadeniz Bölgesinde Tüberküloz İlaçlarına Direnç Durumu. *Klinik Dergisi*, **8 (2)**, 63-67.
- 4-Badak , F.Z. (1997). Tüberküloz tanısında yeni yöntemler. 3. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik- Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:31*, 89-97.
- 5-Baysal, B., Şengil, A.Z., Saniç, A., Özerol, İ.H. (1990). Tüberküloz Olgularında, Basillerin Isoniasid, Streptomycin, Ethambutol ve Rifampicin'e Duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*, **4 (2)**, 311.
- 6-Biehle, J.R., Cavalieri, S.J., Saubolle, M.A., Getsinger, L.J. (1995). Evaluation of Etest for Susceptibility Testing of Rapidly Growing Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **33 (7)**, 1760-1764.
- 7-Bilgehan, H. (1994). *Klinik Mikrobiyoloji, Sekizinci Baskı, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları* 343-372.
- 8-Bilgehan, H. (1995). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 2. Baskı*, 567-585.
- 9-Collins, L.A., Franzblau, S.G. (1997). Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41 (5)**, 1004-1009.

- 10-Cooksey, R.C., Crawford, J.T., Jacobs, W.R., JR, Shinnick, T.M. (1993). A Rapid Method for Screening Antimicrobial Agents for Activities against a Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Expressing Firefly Luciferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37 (6)**, 1348-1352.
- 11-Cooksey, R.C., Morlock, G.P., McQueen, A., Glickman, S.E., Crawford, J.T. (1996). Characterization of Streptomycin Resistance Mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients in New York City. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, **40 (5)**, 1186-1188.
- 12- Drobniowski, F. (1995). Tuberculosis in prisons-forgotten plague. *The Lancet*, **346**, 948-949.
- 13-Durupınar, B. (1996). Mikobakteriler ve Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, **13 (4)**, 297-304.
- 14-Eraksoy, H. (1996). Tüberküloz: Geçmişten Günümüze. *İnfeksiyon Bülteni*, **1**, 38-40.
Jo Baron, E., Peterson, L.R., Finegold, S.M. (1994). *Diagnostic Microbiology*, **9 th Ed.**, 590-633.
- 15-Hanna, B.A., Bonk, S., Tick, L.K. (1993). Drug-resistant tuberculosis. *The Lancet*, **342**, 1496.
- 16-Inderlied, C.B., Salfinger, M. (1995). Antimicrobial Agents and Susceptibility Test: Mycobacteria. *Manual of Clinical Microbiolgy*, **6 th Ed.**, 1385-1404.
- 17-Isenberg, H.D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook. Section 3.*
- 18- Jo Baron, E., Peterson, L.R., Finegold, S.M. (1994). *Diagnostic Microbiology*, **9 th Ed.**, 590-633.
- 19-Kasımoğlu, Ö. (1996). Tüberküloz Tanısında Yeni Gelişmeler. *Türk Mikrobiyoloji Yayını*, **No:26**, 11-16.

ÖZET

M.TUBERCULOSIS İLAÇ DUYARLILIĞININ LÖWENSTEİN-JENSEN VE MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİNDE PROPORTION METOD İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

*Ahmet Yılmaz ÇOBAN, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Eylül 1997*

İnsanlığın en eski dertlerinden biri olan tüberküloz, ülkemiz için de büyük bir problem olarak güncelliğini korumaktadır. Özellikle dirençli vakaların sayısındaki artış gelecek için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Böyle bir tehlikenin varlığına rağmen hala rutin olarak kullanılacak güvenli, ucuz ve standardize edilmiş bir yöntem mevcut değildir.

Çalışmada; Löwenstein-Jensen (LJ) ve Middlebrook 7H10 besiyeri kullanılarak proportion metod ile 50 hastada karşılaştırmalı duyarlılık testleri yapılmıştır. Tüm hastalarda tek, ikili, üçlü ve dördü ilaca direnç oranları karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Çalışmada; toplam direnç oranları LJ besiyeri test sonuçlarında daha yüksek bulunmuş olup, en yüksek oran %32 ile streptomisine karşı gözlenmiş, rifampisin direnci ise %26 olarak bulunmuştur. Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarına göre ise, daha düşük direnç oranları gözlenmiş olup, en yüksek %8 ile etambutole karşı bulunmuştur. LJ besiyeri test sonuçlarına göre, hastaların %48'i tüm ilaçlara duyarlı iken, Middlebrook 7H10 besiyeri test sonuçlarına göre tüm ilaçlara duyarlılık %90 bulunmuştur.

Sonuç olarak; LJ ve Middlebrook 7H10 besiyeri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Ayrıca, ülkemizde olduğu gibi, bizim yaptığımız çalışmada da yüksek antitüberkülo ilaç direnci gözlenmiştir.

ABSTRACT

THE COMPERATIVE INVESTIGATION OF THE M.TUBERCULOSIS DRUGS RESISTANCE IN LÖWENTEIN-JENSEN AND MIDDLEBROOK 7H10 MEDIUMS BY THE PROPORTION METHOD

Ahmet Yılmaz ÇOBAN, M.Sc. Thesis

University of Ondokuz Mayıs Samsun, September 1997

Tuberculosis, one of the oldest problems of the humanity, is also a current problem for our country. Especially, the increase in resistant cases is a risk for future. Although there is such a danger, we still do not have safe, cheap, and standardized method which can be used routinely.

In this study, the susceptibility tests were carried out in 50 patients by the proportion method using Löwenstein-Jensen (LJ) and Middlebrook 7H10 mediums. Single, double, triplet and quartet drug resistance ratios in all patients were investigated comperatively.

In this study, the total resistance ratios were found higher in LJ medium, the highest ratio, 32%, was observed against streptomycin and the resistance against rifampicine was found 26%. According to the Middlebrook 7H10 medium test result, lower resistance ratios were observed, the resistance against ethambutol was found 8%, being the highest. While according to the LJ medium test result, 48% of the patients were resistant against all drugs, the resistance against all drugs according to the Middlebrook 7H10 medium test result was found as 90%.

As a result, a significant difference was found between LJ and Middlebrook 7H10 mediums. In addition, a high antituberculous drugs resistance was observed in this study as it is the case in our country.

- 20-Kent, P.T., Kubica, G.P. (1985). Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Public Health Service Centers for Disease Control Atlanta, Georgia, 1-180
- 21-Kiehn, T.E., Cynamon, M.H., Inderlied, C.B., Roberts, G.D., Siddiqi, S.H., Wallace, R.J., Warren, N.G. (1994). Antimycobacterial Susceptibility Testing For *Mycobacterium tuberculosis*; Tentative Standard. *NCCLS Document, M24-T*.
- 22-Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1992). *Diagnostic Microbiology, Fourth Ed.*, 703-756.
- 23-Koontz, F.P., Erwin, M.E., Barrett, M.S., Jones, R.N. (1994). Etest for Routine Clinical Antimicrobial Susceptibility Testing of Rapid-Growing Mycobacteria Isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 19*, 183-186.
- 24-Lorian, V. (1996). *Antibiotics in Laboratory Medicine, Fourth Ed.*, 127-145.
- 25-Meier, A., Sander, P., Schaper, K.J., Scholz, M., Böttger, E.C. (1996). Correlation of Molecular Resistance Levels in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 40 (11)*, 2452-2454.
- 26-Miller, P.L., Crawford, J.T., Shinnick, T.M. (1994). The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 38 (4)*, 805-811.
- 27-Musser, J.M., Kapur, V., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., Soolingen, D., Embden, J.D.A. (1996). Characterization of the Catalase-Peroxidase Gene (*katG*) and *inhA* Locus in Isoniazid-Resistant and -Susceptibility Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Automated DNA Sequencing: Restricted Array of Mutations Associated with Drug Resistance. *The Journal of Infectious Diseases, 173*, 196-202.
- 28-Norden, M.A., Kurzynski, A., Bownds, S.E., Callister, S.M., Schell, R.F. (1995). Rapid Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by Flow Cytometry. *Journal of Clinical Microbiology, 33 (5)*, 1231-1237.
- 29-Otkun, M., Akata, F., Karabay, O., Tabakoğlu, E., Tuğrul, M., Dündar, V. (1997). Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne 1996 Yılı İçinde Başvuran Tüberkülozlu Olgularda

Antitüberküloz İlaçlara Direnç Sorunu. 3. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:31*, 331.

- 30-Pfaller, M.A. (1993). Application of New Technology to the Detection, Identification, and Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacteria. *American Journal of Clinical Pathology*, **101 (3)**, 329-337.
- 31-Rastogi, N., David, H.L. (1993). Mode of action of antituberculous drugs and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Research Microbiology*, **144 (2)**, 133-143.
- 32-Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M., Zhang, Y. (1997). Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, **41 (3)**, 540-543.
- 33-Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. (1996). Characterization of *rpsL* and *rrs* Mutations in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Diverse Geographic Localities. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, **40 (4)**, 1024-1026.
- 34-Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. (1997). Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, **41 (3)**, 636-640.
- 35-Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Schmidheini, T., Bodmer, T. (1993). Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, **37 (10)**, 2054-2058.
- 36-Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*, **341**, 647-650.

- 37-Uçan, E.S. (1994). Tüberkülozda klinik direnç ve tedavi problemleri. *ANKEM Dergisi* 8 (3):207-215.
- 38-Vareldzis, B.P., Grosset, J., Kantor, I., Crofton, J., Laszlo, A., Felten, M., Raviglione, M.C., Kochi, A. (1994). Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. *Tubercle and Lung Disease*, 75, 1-7.
- 39-Wanger, A., Mills, K. (1996). Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by Using Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (7), 1672-1676.
- 40-Williams, D.L., Waguespack, C., Eisenach, K., Crawford, J.T., Portaels, F., Salfinger, M., Nolan, C.M., Abe, C., Sticht-Groh, V., Gillis, T.P. (1994). Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, 38 (10), 2380-2386.
- 41-Yajko, D.M., Madej, J.J., Lancaster, M.V., Sanders, C.A., Cawthon, V.L., Gee, B., Babst, A., Hadley, W.K. (1995). Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (9), 2324-2327.
- 42-Yüce, A. (1994). Mycobacterium tuberculosis'te antibiyotik direnç mekanizmaları. *ANKEM Dergisi* 8 (3): 203-206.
- 43-Yüce, A., Hatipoğlu, O., Uçan, E.S., Kırdar, S., Akkoçoğlu, A. (1994). Tüberküloz ilaçlarına karşı primer direnç. *İnfeksiyon Dergisi* 8 (3-4): 95-98.
- 44-Yüce, A. (1997). Mikobakteriyel direncin saptanmasında yeni yöntemler. 3. *Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:31*, 98-108.
- 45-Zhang, Y., Young, D. (1994). Molecular genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34, 313-319.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Fatsa-Ordu'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Fatsa'da, Liseyi Samsun Mithat Paşa Lisesi'nde bitirdim. 1989 yılında İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'ne başladım ve 1993 yılında mezun oldum.

1994 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 1995 Mayıs ayında da aynı anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen aynı görevi sürdürmekteyim.

