

Dokuz Eylül Üniversitesi'nde İzole Edilen Mycobacterium tuberculosis İzolatlarında İlaç Direnci (2000 - 2002)(*)

Nuran ESEN(**), Ayрыз Tuba GÜNDÜZ(**)

(*) 4. Ulusal Mikrobiyoloji Sempozyumu'nda (31 Ekim-2Kasım 2002, Abant) sunulmuştur.

(**) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olan tüberkülozda dirençli suşların yaygınlaşması hastalığın kontrolüyle ilgili çalışmalara tehdit oluşturmaktadır. Antitüberküloz duyarlılık test sonuçlarına göre yapılacak etkin tedavi, dirençli suşların yayılımını önleyebilir. Bu çalışma, 2000-2002 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüberküloz Laboratuvarında üretilen Mycobacterium tuberculosis izolatlarında birincil ilaçlara direncin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Toplam 5853 klinik örnekten M. tuberculosis olarak tanımlanan 237 (% 4.5) izolatın, agar proporsiyon yöntemiyle yapılan streptomisin, izoniyazid, rifampisin ve etambutol için duyarlılık testleri değerlendirilmiştir. 2000, 2001 ve 2002 yıllarına ait izolatlar da sırasıyla, streptomisin direnci %1.5, %3.4, %9.8; izoniazid direnci %0, %7.9, %11.0; rifampisin direnci %1.5, %10.1, %14.6; etambutol direnci ise %3.0, %4.5, %4.9 olarak bulunmuştur. Bu yıllara ait izolatlarda en az bir antitüberküloz ilaca direnç %6.0, %12.4, %25.6 olarak bulunurken, çok ilaca direnç %0, %1.1 ve %3.7 olarak saptanmıştır. 2000 ile 2002 yıllarına ait izolatlar, streptomisin, izoniazid ve rifampisin dirençleri yönünden karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Çalışmamızda izole edilen M. tuberculosis suşlarında ilaç direncinin giderek arttığı gözlenmektedir. Ulusal tüberküloz kontrol programının başarılı olması için direncin ülke çapında belirlendiği geniş kapsamlı çalışmalara da gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Mycobacterium tuberculosis, agar proporsiyon yöntemi, streptomisin, izoniazid, rifampisin, etambutol, tek ilaca direnç, çok ilaca direnç.

SUMMARY

Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis Strains isolated in Dokuz Eylül University (2002 - 2002)

Tuberculosis is an important world-wide public health problem. Drug resistant tuberculosis threatens efforts to control the disease. Effective treatments according to susceptibility testing can also inhibit the spread of resistant isolates. This study was done to determine the resistant M. tuberculosis strains isolated in the tuberculosis laboratory of Dokuz Eylül University Hospital to first line drugs. Drug susceptibility testing was performed by agar proportion method with streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol against 237 isolates identified as Mycobacterium tuberculosis complex from 2000 through 2002. From 2000 to 2002, while the proportion of monoresistance was 6.0%, 12.4%, 25.6%; multidrug resistance was 0%, 1.1%, 3.7%, respectively. The proportion of M. tuberculosis strains resistant to streptomycin were 1.5%, 3.4%, 9.8%; to isoniazid 0%, 7.9%, 11.0%; to rifampin 1.5%, 10.1%, 14.6% and to ethambutol 3.0%, 4.5%, 4.9% in 2000, 2001, and 2002 respectively. The resistance of the strains to streptomycin, isoniazid, and rifampin obtained from patients in 2000 and 2002 were compared with each other and this difference was statistically significant. In this study, it was shown that there was an increase in the proportion of M. tuberculosis strains resistant to primary drugs during 2000-2002. To be successful in national tuberculosis control programs, extended studies are needed to determine the drug resistance

Key words: Mycobacterium tuberculosis, agar proportion method, streptomycin, isoniazid, rifampicin, ethambutol, monodrug resistance, multidrug resistance

GİRİŞ

Tüm dünyada 1980'li yıllardan itibaren tüberküloz hastalığının yeniden artış göstermesinde endemik bölgelerden göçler ve HIV epidemisi yanında izonia-

zid ve rifampisin direncinin birlikte bulunduğu çok ilaca dirençli (ÇİD) izolatlar da etkin olmuştur (1). Hastaların tedaviye uyumsuzluğu veya etkin olmayan ilaç kombinasyonları, giderek artan direnç sorununa neden olduğundan 1993 yılından itibaren izole

edilen *M. tuberculosis* suşları için duyarlılık testlerinin uygulanması önerilmektedir (2,3). Dirençli suşlar bölgeler arasında farklı olabildiği gibi aynı bölgede yıllar içinde de değişiklikler gösterebilmektedir (1). Bu nedenle, 2000-2002 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tüberküloz Laboratuvarında üretilen streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutole dirençli *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının belirlenmesine, yıllar arasında dağılım farklılığının değerlendirilmesine ve benzer yöntemle yapılan çalışmalarda elde edilen verilerle karşılaştırılmasına karar verilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

2002-2002 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüberküloz Laboratuvarına, tüberküloz ön tanısı ile gönderilen toplam 5853 klinik örneğin Löwenstein Jensen ve BACTEC 460 yöntemleriyle yapılan kültürlerinde üreyen aside dirençli bakterilere firma önerileri doğrultusunda BACTEC p-nitro-alpha-acetyl-amino-beta-hydroxy-propionophenone (NAP) deneyi uygulanmıştır (4). *M. tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanan 237 izolat çalışma kapsamına alınmış ve agar proporsiyon yöntemiyle streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutole karşı duyarlılıkları araştırılmıştır.

Agar proporsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen duyarlılık testlerinde, NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) önerilerine uygun olarak %10 OADC (BBL) eklenmiş Middle brook 7H10 (Difco) agar kullanılmıştır (5). Antibiyotik içeren besiyerleri, streptomisin 2 µg/ml, izoniazid 0.2µg/ml, rifampisin 1.0.µg/ml ve etambutol 5.0.µg/mL kon-

santrasyonlarında hazırlanmıştır. Her çalışmada izolatların yanısıra antibiyotiklere duyarlı H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu da test edilmiştir. McFarland No:1 bulanıklığına göre hazırlanan bakteri suspansiyonlarından 10⁻² ve 10⁻⁴ dilüsyonları hazırlanarak, antibiyotik içeren besiyerlerine 10⁻², antibiyotik içermeyen kontrol besiyerlerine ise 10⁻² ve 10⁻⁴ dilüsyonlarından ekim yapılmıştır. Üç hafta süreyle 37°C'de %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edildikten sonra kontrol besiyerine göre antibiyotikli besiyerlerinde %1 veya üzerindeki üremeler dirençli olarak kabul edilmiştir.

İstatistiksel analizler için Epiinfo 6 programı kullanılarak gruplar arasındaki karşılaştırmalar kıkare ve Fisher'in kesin ki-kare testleri ile yapılmıştır.

BULGULAR

2000 - 2002 yılları arasında tüberküloz öntanısı ile laboratuvarımıza gönderilen 5853 örnek incelenmiştir. Bunlardan toplam 135 hastaya ait 237 izolat (%4.5) *M. tuberculosis* kompleksi olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların %87.5'i balgam, bronkoalveolar lavaj, bronş lavaj ve plevral sıvı gibi solunum yoluna ait ve %12.5'i ise idrar, lenf nodu, apse ve BOS gibi solunum dışı örneklerden soyutlanmıştır.

Genel olarak 237 izolat değerlendirildiğinde, streptomisine %5.1, izoniazide %6.8, rifampisine %9.3, etambutole ise %4.2 oranında direnç saptanmıştır. 237 izolatın %15.2'sinde tek ilaca direnç (TİD), %1.7'sinde ise ÇİD saptanmıştır (Tablo 1). Toplam 237 izolatın soyutlandığı hastaların 24'ünde geçirilmiş tüberküloz öyküsü bulun-maktaydı. Bu izolatlar-

Tablo 1: 2000-2002 yıllarına ait *M. tuberculosis* izolatlarında ilaç dirençleri ve yüzdeleri

	2000		2001		2002		Toplam	
İzolat sayısı	66		89		82		237	
Dirençli İzolatlar	4	(%6,0)	17	(%19,1)	24	(%29,3)	45	(%19,0)
Streptomisin direnci	1	(%1,5)	3	(% 3,4)	8	(% 9,8)	12	(% 5,1)
İzoniazid direnci	0	(%0)	7	(% 7,9)	9	(%11,0)	16	(% 6,8)
Rifampisin direnci	1	(%1,5)	9	(%10,1)	12	(%14,6)	22	(% 9,3)
Etambutol direnci	2	(%3,0)	4	(% 4,5)	4	(% 4,9)	10	(% 4,2)
Tek ilaca direnç	4	(%6,0)	11	(%12,4)	21	(%25,6)	36	(%15,2)
Çok ilaca direnç	0	(%0)	1	(% 1,1)	3	(% 3,7)	4	(% 1,7)

Tablo 2: 2000-2002 yılları arasında dirençli M.tuberculosis izolatlarının dağılım farklılığının belirlenmesi

	2000 - 2001	2000 - 2002	2001 - 2002
	p değeri*		
Dirençli İzolatlar	0.02	0.003	0.100
Streptomisin direnci	0.40	0.030	0.080
İsoniazid direnci	0.02	0.004	0.500
Rifampisin direnci	0.02	0.005	0.300
Etambutol direnci	0.60	0.600	0.900
Tek ilaca direnç	0.20	0.001	0.003
Çok ilaca direnç	0.60	0.200	0.200

*Ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testleriyle belirlenmiştir.

dan beşinde saptanan TİD pateni incelendiğinde izolatlardan birinin (% 4.2) etambutole, ikisinin (%8.3) rifampisine, ikisinin (%8.3) streptomisine dirençli olduğu görülmüştür. Primer ve edinsel gruplar arasında TİD, streptomisin, rifampisin ve etambutol dirençleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

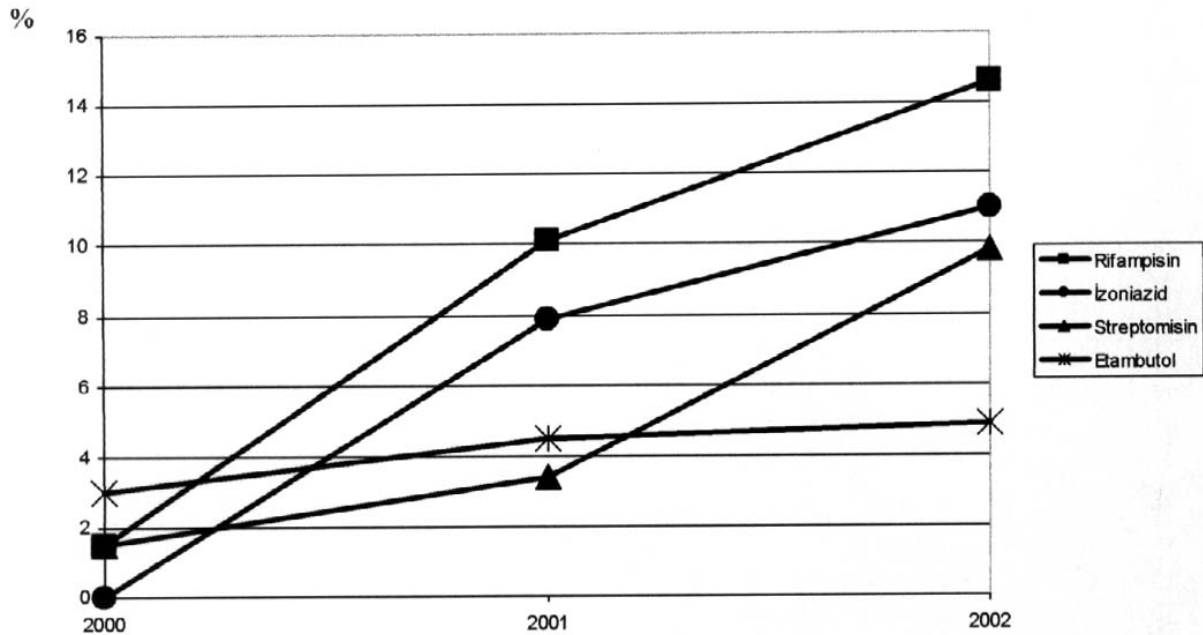
Sonuçları yıllara göre değerlendirdiğimizde sırasıyla 2000, 2001 ve 2002 yıllarına ait izolatlarda streptomisin direnci %1.5, %3.4, %9.8; isoniazid direnci %0, %7.9, %11.0; rifampisin direnci %1.5, %10.1,

%14.6; etambutol direnci ise %3.0, %4.5, %4.9 olarak bulunmuştur. Bu izolatlarda TİD sırasıyla %6.0, %12.4, %25.6 bulunurken, ÇİD %0, %1.1 ve %3.7 olarak saptanmıştır (Tablo 1, Şekil 1). Özellikle 2002 yılına ait izolatlarda streptomisin, isoniazid ve rifampisin direncinin, 2002 yılına ait izolatlara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (p<0.05) (Tablo 2).

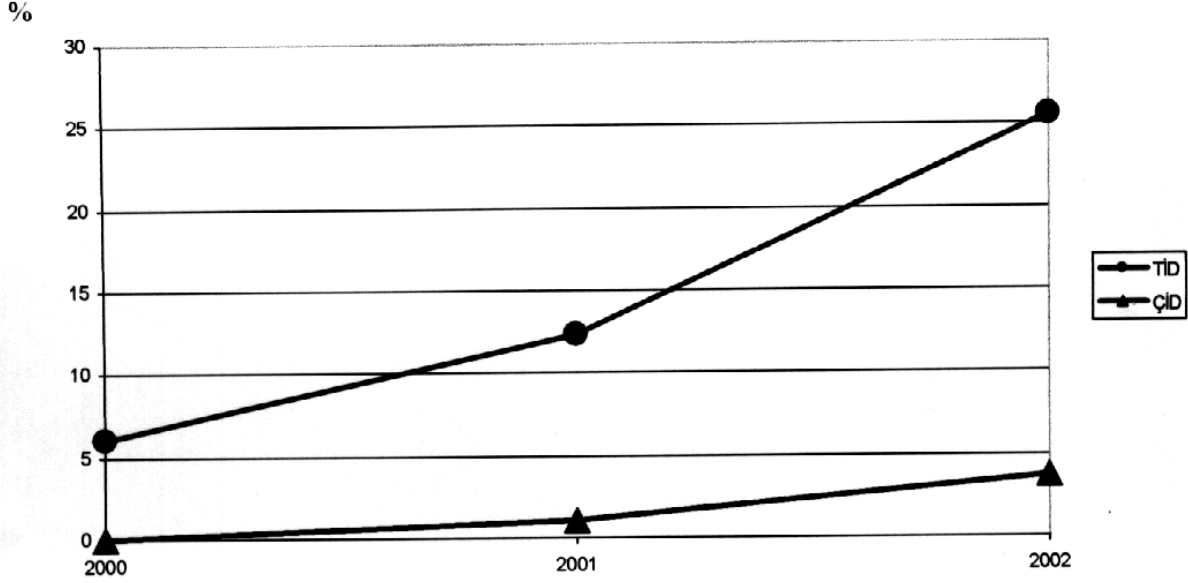
TARTIŞMA

Tüm dünyada yaygın olarak görülen tüberküloz hasta-

Şekil 1 2000-2002 yıllarında streptomisin, isoniazid, rifampisin ve etambutole dirençli izolatların yüzdeleri



Şekil 2: 2000-2002 yıllarında tek ve çok ilaca dirençli M.tuberculosis izolatlarının yüzdeleri



lığı, son yıllarda izoniazid ve rifampisine direncin birlikte bulunduğu ve ÇİD olarak tanımlanan şuşların ortaya çıkması ve HIV ile infekt bireylerin sayısındaki artışa bağlı olarak gittikçe önem kazanmıştır. Ülkemizde direkt gözetimli kısa tedavi programı henüz uygulanmamakta, rifampisin dahil tüm tüberküloz ilaçları serbestçe satılmakta ve kullanılmaktadır (6). Modern kemoterapi ile ucuz, toleransı nispeten kolay ilaçlar ile yaklaşık altı aylık sürede iyileşebilecek olan tüberküloz hastalığı, yanlış ve yetersiz tedavi uygulamaları ile yerini kötü prognozlu, çok uzun süren, toksik, pahalı ilaçlar ve cerrahi gerektiren bir hastalığa bırakmıştır. Dirençli şuşlarla infekte hastalar, uygun olmayan ilaçlarla tedavi edilmeleri sırasında bakteriyi çıkarmaya ve bulaş kaynağı olmaya devam etmektedir. Bu nedenlerle Amerika Birleşik Devletlerinde, Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) 1993 yılından itibaren her hastadan soyutlanan ilk izolata duyarlılık testinin yapılmasını, tedavinin üçüncü ayında kültürün negatifleşmediği olgularda ise tekrarlanmasını önermektedir (2,3). Tedavinin şuşun duyarlı olduğu ilaçlarla yapılması hem maliyeti düşürmekte, hem de bulaş zincirini kırmaktadır.

Ülke genelinde yoğun hizmet veren Verem Savaş Dispanserleri, tüberküloz hastalarının tanı, takip ve genelinde duyarlılık testleri yapılmaksızın tedavilerini üstlenmektedir. Ülkemizde değişik zaman dili-

minde yapılan bölgesel ve hastane bazındaki çalışma sonuçlarında farklılıklar dikkati çekmektedir. İzolat sayısı ve izlem süresi yönünden çalışmamıza benzer olan Saraçlı ve ark.'nın (7) araştırmasında 1998-2000 yılları arasında ordu mensuplarından soyutlanan izolatların direnç paterninin, yıllar içinde istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği belirtilmiştir. Arseven ve ark.(8) ise Karadeniz bölgesinde toplam 930 izolat ile yaptıkları çalışmada 1993-1995 yıllarının direnç oranlarını karşılaştırmışlar ve direncin tüm ilaçlar için belirgin olarak arttığını gözlemişler, özellikle rifampisin direncinin %12.5'dan %25.2'ye yükselmesinin tedavi açısından büyük olumsuzluk yaratacağını vurgulamışlardır. Çalışmamızda 2000, 2001 ve 2002 yıllarına ait streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutole dirençli bulunan (Şekil 1) ve TİD, ÇİD saptanan izolat yüzdelerinin giderek arttığı gözlenmektedir (Şekil 2). Özellikle 2002 yılına ait izolatlarında streptomisin, izoniazid ve rifampisine dirençlilerin oranının 2000 yılına ait izolatlarla oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 2). Yolsal ve ark. (9) Türkiye'de yapılan 21 çalışmanın sonuçlarını derledikleri makalelerinde streptomisin, izoniazid, rifampisin ve etambutol için toplam direnç oranları 1984-1989 yıllarına ait izolatlarda %22.5, %27.8, %22.3 ve %7.8; 1990-1995 yıllarına ait izolatlarda ise %17.9, %23.8, %22.1 ve %7.7 olarak belirtmişlerdir. İzolatların sı-

rasıyla %40.6'sı ve %37.6'sının en az bir ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar gerek veri toplama gerekse laboratuvar olanakları nedeniyle, farklı dönemlerde yapılan bu çalışmaları karşılaştırmanın gerçek durumu yansıtmaktan uzak olduğunu belirtmişlerdir (9). Çalışmamızda izolatların %19'unda saptanan en az bir ilaca direnç oranı, Yolsal ve ark.'nın 1990-1995 yılları arasında dokuz araştırmadan elde ettikleri en az bir ilaca primer direnç oranı olan %18.9'a çok yakındır. Çalışmamızda elde edilen izolatlardan 24'ünün (%10.1) tüberküloz öyküsü olan hastalardan soyutlanması ve bunlardan sadece beşinin dirençli olması edinsel ve primer dirençli gruplar arasında güvenilir karşılaştırmalar yapmamızı engellemektedir. Bu izolatlardan hiçbirinde izoniazide direnç ve ÇİD saptanmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1994-1997 yılları arasında 35 ülke verileriyle elde edilen antitüberküloz ilaç direnci sürveyans çalışmasında yeni olgularda ilaç direnci %9.9, ÇİD ise %1.4 oranında saptanmış, edinsel dirençte ise bu oranlar sırasıyla %36.0 ve %13.0 olarak bulunmuştur (1). Çalışmamızda iki grup arasında TİD, streptomisin, rifampisin ve etambutol dirençleri yönünden anlamlı fark saptanmamasını, edinsel dirençli izolat sayısının düşük olmasına bağlamaktayız.

Dirençli olgular tüberküloz kontrol programları iyi olan batılı ülkelerde başlıca halk sağlığı sorunu olmasa da göç gibi nedenlerle her zaman dikkatli olunması gerektiği vurgulanmaktadır (10). Djuretic ve ark. (10) 1993-1999 yılları arasında İngiltere'de yeni tanı konulan olgulardan soyutlanan 25217 izolatın duyarlılık sonuçlarını değerlendirmişler, yıllar arasında anlamlı fark saptamamışlardır. Çalışmalarında streptomisine %5.9, izoniazide ise %5.6 oranında saptadıkları direnç ve %1.2 oranında ÇİD çalışmamız sonuçlarıyla benzerlik göstermekteyse de, rifampisin, etambutol dirençleri ve TİD izolatlar çalışmamızda elde edilen değerlerden oldukça düşük bulunmuştur. Tüberküloz, Asya'nın birçok bölgesinde endemik olmaya devam etmekte ve tüberküloz kontrol programlarının kalitesi ilaç direncine etki etmektedir (1). Wang ve ark. (11) suşların çoğunluğunun dirençli olduğu Çin'in 91 milyon nüfuslu Henan bölgesinde çalışmışlar, edinsel direnci %68.2, primer

direnci ise %43.0 olarak saptamışlardır. Daha önce tedavi almayan 916 yeni olgunun %16.5'inde ÇİD saptanırken, %32.5 streptomisin, %31.0 izoniazid, %20.7 rifampisin, %10.3 etambutol direnci belirlemişlerdir.

Sepkowitz ve ark. (12) 1987-1991 arasındaki beş yıllık dönemde New York şehrinde soyutlanan 11680 izolatın direnç durumlarını karşılaştırmışlar, toplam direnç, TİD ve ÇİD oranlarının yıllar arasında içinde istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğunu ve çalışmamızda olduğu gibi tüberküloz direncinin sürekli arttığını saptamışlardır.

İlaç direnci tüm dünyada tüberküloz kontrol programlarında potansiyel tehdit olarak kabul edilmektedir. Bir çok çalışmada gösterildiği gibi laboratuvarımızda izole edilen M. tuberculosis suşlarında da ilaç direnci giderek artmaktadır. Ülkemizde tüberküloz direnci ile ilgili daha güvenilir veriler elde etmek için gerek izolat sayısı ve izole edildikleri bölgeler, gerekse süre yönünden daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır. Standart protokollerle yapılacak geniş kapsamlı araştırmalar tüberküloz eradikasyonu için yapılan çalışmalara temel oluşturacak ve ileride elde edilecek verilerle karşılaştırma imkanı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Pablos-Mendez A : Raviglione MC, Laszlo A at al. Global surveillance for antituberculosis drug resistance 1994-1997. NEJM 338: 164 (1998).
2. Centers for Disease Control and Prevention. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis. MNWR 42 (RR-7):1 (1993).
3. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR Jr, Good RC : The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready?. J Clin Microbiol 31:767 (1993).
4. Siddiqi SH: Bactec TB system. Product and procedure manual. Revision B. Becton Dickinson Diagnostic Instruments System, Towson, Md (1995).
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and ot-

her aerobic Actinomycetes; Tentativ Standard - Second Edition NCCLS document M24T2., Pensylvania USA (2002).

6. Otkun M: Tüberküloz tedavisinde temel ilkeler ve direnç sorunu Klimik Derg. 14: 71 (2001).

7. Saracli MA, Albay A, Guney C, Alpt A, Ciftci F, Doganci L: Resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis complex isolates in the Turkish Army from 1998 to 2000. Mil Med Jan 168: 24 (2003).

8. Arseven O, Eraksoy H, Uzun Y ve ark: Doğu Karadeniz bölgesinde tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. Klimik Derg. 8:63 (1995).

9. Yolsal N, Malat G, Dişçi R, Örkün M, Kılıçaslan Z: Türkiye'de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-Analiz. Klimik Derg. 11:6 (1998).

10. Djuretic T, Herbert J, Drobniewski F et al. Antibiotic resistant tuberculosis in the United Kingdom. Thorax 57:477 (2002).

11. Wang G, Peng YL, Zhang G et al. Sample survey of drug resistant tuberculosis in Henan, China, 1996. Respirology 7:67 (2002).

12. Sepkowitz KA, Telzak EE, Recalde S, Armstrong D. Trends in the susceptibility of tuberculosis in New York city, 1987-1991. Clin Infect Dis. 18:755 (1994).