

KLASİK ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

Y. Doç. Dr Özlem Tansel

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne

Antitüberküloz ilaç direncinin sürveyansı tüberküloz kontrol programlarının başarısını değerlendirmede önemli bir yöntemdir. Duyarlılık sonuçları olmaksızın yapılan tüberküloz tedavileri, tedavi başarısızlığı riskini ve antitüberküloz ilaçlarına karşı direnç gelişimini arttırmaktadır.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) kültüründe *Mycobacterium tuberculosis* izole edilen her hastaya, üç aylık bir tedaviden sonra yayma ve kültür pozitifliği devam eden veya tedaviye klinik yanıtsızlık olan bütün hastalara direnç testi yapılmasını önermektedir (7). Ayrıca dirençli tüberküloza sahip bir hasta ile temas öyküsü bulunanlar, HIV ile enfekte olup kaviter lezyonları olanlar, düşük sosyoekonomik koşullarda yaşayanlar, yüksek ilaç direnci bulunan (primer izoniazid direni % 4'den fazla) bölgelerde olanlar tedaviye başlamadan önce mutlaka direnç varlığı yönünden incelenmelidir (5). CDC, materyal laboratuvara kabul edildikten sonra ortalama 28-30 günde *M. tuberculosis* kompleks için duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını önermektedir (14). Bu amaçla çok sayıda duyarlılık testi yöntemleri geliştirilmektedir.

Antitüberküloz İlaçlara Karşı Duyarlılık Testlerinin Amacı:

1-Kullanılacak antibiyotiğin, mikroorganizmaya karşı etkisini ortaya çıkarmaktır (3).

2-Mikobakteri popülasyonu içinde herhangi bir ilaca karşı, ilaçla hiç karşılaşmadığı halde doğal (mutasyonel) dirençli olan bakteri sayısını ortaya çıkarmaktır (3).

Antitüberküloz İlaçlara Karşı Duyarlılık Testlerinin Temeli:

1-Mutlak Konsantrasyon Yöntemi:

Antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyerlerine, 2×10^3 - 1×10^4 cfu / ml mikobakteri içeren inokulum ekilir. İnokulum miktarı olarak 100.000 basili geçmemelidir (8). İlaçlı besiyerinde 20 koloniden fazla olması o ilaca bakterinin dirençli olduğunu gösterir. Yeterli metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir. Ekim örneğinin bu kadar hassas bir şekilde hazırlanması en önemli zorludur (3).

2-Direnç Oranı Yöntemi:

İlaçlı besi yeri içeren tüplerin bir sırasına da antitüberküloz ilaçların hepsine duyarlı olduğu bilinen

M. tuberculosis H37Rv ile inokule edilir. Bu yöntemde 10^5 cfu / ml'lik inokulum kullanılır (8).

Farklı dilüsyonlarda ilaç içeren besiyerlerine ekilen bakteriler için ilaçların minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) saptanabilmektedir. Test edilen suşun MİK değeri, *M. tuberculosis* H37Rv'nin MİK değerinden 8 kat veya daha fazla yüksekse o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Değerlendirilmesi zordur, yeterli metodolojik çalışmalar yapılmadığından hata oranı yüksektir (3).

3-Proporsiyon Yöntemi:

Antitüberküloz ilaçlara dirençli basil oranı, yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak % 1 düzeyi kriter alınarak ayarlanır. Direncin % 1 oranını tayin etmek için kontrol besiyerinde kullanılan bakteri miktarı ilaçlı besiyerindekinden 100 defa daha azdır. İlaçlı besiyerinde üreyen kolonilerin sayısı, kontrol besiyerindeki kolonilerin sayısı ile karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu test için koagulasiyondan önce ilaç eklenmiş Loweinstein Jensen (LJ) besiyeri, Middlebrook 7H10 kullanılabilir (3). İlaçsız kontrol besiyerinde 200-300 koloni oluşturan ekim örneği, bu yöntem için en uygun olanıdır. Bu yoğunlukta basil içeren örneğin elde edilebilmesi için önce kültürde üretilmiş bakteriden 1.0 Mc Farland bulanıklığında süspansiyon hazırlanır. Hazırlanmış homojen süspansiyondan 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} veya 10^{-2} , 10^{-4} 'lük dilüsyonlar hazırlanmaktadır. Bu dilüsyonlardan ilaçsız kontrol besiyerine ve ilaçlı besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılmış tüpler 3-4 hafta inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılır. Test edilen suş belli bir antibiyotiğe karşı % 1 veya daha yüksek oranda dirençli

ise sonuç dirençli; % 1'in altındaki oranlarda dirençliyse sonuç duyarlı olarak yorumlanır (8). Bu yöntem indirekt olarak primer kültürde üremiş bakteriden veya direkt olarak mikroskopide aside dirençli bakteri görülen hasta materyalinden yapılabilir (3, 8). Önceki testlerde olduğu gibi 100.000 basilden daha az ekilmesi gerekmez. Uzun yıllar test edilmiş, metodolojik çalışmalar yapılmış, uluslararası komitelerce onaylanmıştır. Mutant bakteri proporsiyonunun kantitatif olarak hesap edilmesini sağladığından değerli bir yöntemdir (3). Tablo 1 'de primer antitüberküloz ilaçların farklı besiyerlerindeki eşdeğer son ilaç konsantrasyonları görülmektedir (3, 8).

Hızlı Duyarlılık Testleri

1-Radyometrik Kültür Sistemi (BACTEC 460- Becton Dickinson):

Homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemlerinden geçirilen klinik örneklerden, zenginleştirilmiş 14C işaretli palmitik asit içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri bulunan şişelere (Middlebrook 7H12) ekim yapılır (8, 4). Yağ asiti kullanılıncaya 14 CO₂ ortaya çıkar ve şişeler periyodik olarak BACTEC 460 cihazına yerleştirilerek 14 CO₂ saptanmaya çalışılır. Oluşan 14CO₂ miktarı üreme indeksi (GI) olarak cihaz tarafından saptanır. GI: 500 olunca duyarlılık testi yapılır (4). Bir antitüberküloz ilaç besiyerine eklendiğinde organizma duyarlı ise üreme baskı altına alınır. Bu kontrole kıyasla günlük üreme indeksinde azalma veya çok küçük artış şeklinde saptanabilir. Organizma dirençliyse çok az veya hiç baskılanma görülmez. Direncin % 1 oranını tayin etmek için kontrol şişesinde

kullanılan bakteri miktarı ilaçlı şişedekinden 100 defa daha azdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün standart olarak önerdiği bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçların yanı sıra bazı sekonder antitüberküloz ilaçların duyarlılık testleri de yapılabilmektedir (10) (Tablo 2). Günlük iş yükü fazlalığı ve radyoaktivite içeren atıklarının olması dezavantajdır. Geleneksel yöntemlerle ortalama 21 günde sonuç alınırken, bu sistemde sonuçlar 5-7 günde çıkmaktadır.

2-Floresan Kültür Sistemi (BACTEC-MGIT 960- Becton Dickinson):

Middlebrook 7H9 içeren dip kısmı ruthenium kompleksi bulunan silikon bir tabaka ile kaplı tüpler kullanılmaktadır. Tüp içinde bulunan oksijen yoğunluğunun fazla olması nedeniyle tüp dibine gönderilen UV ışınına karşı floresan ışımazken, oksijenin mikobakteri veya kontaminan mikroorganizmalar tarafından kullanılarak tüketilmesi ve CO₂ birikmesi sonrası tüp dibine gönderilen UV ışını ruthenium kompleksindeki değişiklik nedeniyle floresan vermektedir. Saptanan floresan miktarı üreme indeksi olarak ele alınmakta ve kültür pozitifliği açısından değerlendirilmektedir (9).

Duyarlılık testi için ilaçsız ve ilaçlı tüplere eşit miktarda bakteri ekimi yapıp bu tüplerdeki üreme karşılaştırılır. İlaçsız tüpte üreme saptandıktan sonra 48 saat içerisinde ilaçlı bir tüpte üreme olursa, bakterinin o ilaca dirençli olduğu kabul edilir. Üreme oranı ve saptama zamanı BACTEC 460 ile aynıdır. Rayoizotop kullanılmaması avantajıdır. Sürekli monitörizasyon ile 960 tüpün aynı anda

takibini sağlaması ve bilgisayar verileri vermesi nedeniyle iş yükü daha azdır. Kontaminasyon oranları yüksektir (9). Bazı çalışmalarda etambutol için duyarlılığının düşük olduğu bildirilmiştir (15, 6).

Pirazinamid ve kanamisin için bu yöntem denenmiş ve iyi sonuçlar alınmıştır (11, 1).

3-Kolorimetrik Kültür Sistemi :

A) MB /BacT /ALERT MB (Organon, Teknika)

Kolorimetrik olarak besiyerinde oluşan CO₂ düzeyini ölçerek mikobakteri üremesini değerlendirir. Radyoizotop içermez. Tam otomatiktir, bilgisayar desteği mevcuttur. Duyarlılık testi yapılabilmektedir. Testlerin sonuçlanma süresi BACTEC 460'dan daha uzundur. Etambutol için duyarlılığı düşüktür (2).

B) Alamar Blue Oxidation-Reduction Indicator (Accumed)

Bakteri ilaçlı ve ilaçsız Middlebrook besiyerlerine ekilerek 10-14 gün inkübe edilir. Kontrol tüpüne alamar mavisi eklenip, 50 °C'de 2 saat bekletilir. Rengin maviden pembeye dönmesi üreme olduğunu gösterir. Üreme saptanmışsa aynı işlem ilaçlı tüplere uygulanır. Pembeye dönmenin görüldüğü tüplerde üreme olduğu, o tüplerdeki ilaçlara karşı bakterinin dirençli olduğu saptanır. Üremenin ne zaman olacağı tam olarak tahmin edilemediğinden birden fazla kontrol tüpü hazırlanması ve belli aralıklarla bu tüplerde üreme araştırılması gerekmektedir.

4- Karbondioksit Oluşumunu Saptayan Sistem; ESP Culture System II (Accumed):

Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri içeren şişelerde mikobakterilerin oluşturduğu gaz ve oluşan basıncı ölçerek üreme değerlendirmesi yapan, tam otomatik, radyoaktif olmayan, bilgisayar destekli bir sistemdir. Primer antitüberküloz ilaçlar test edilebilmektedir (12).

5- E Test (AB BIODISK):

Primer antitüberküloz ilaçlara karşı MIK değerlerini belirlemek için kolay bir yöntemdir. Açık sistem olduğundan uygulama ve okunması sırasında dikkatli

olunması gerekmektedir. Ülkemizden yapılan bir çalışmada E test ile 7H11 agar proporsiyon metodu arasında uyum isoniazid, rifampisin, streptomisin, etambutol için sırasıyla %83.1, % 78.8, % 84.7, % 80.5 olarak saptanmış olup sonuçlandırma süresi

E test için 7 gün, agar proporsiyon için 21 gün olarak bulunmuştur (13).

Tablo 1. Primer antitüberküloz ilaçların farklı besiyerlerindeki eşdeğer son ilaç konsantrasyonları (µg / ml)

Antibiyotik	BACTEC 12B	LJ	M7H10
Streptomisin	2.0 6.0	4.0 -	2.0 10.0
Rifampisin	2.0	40.0	1.0
İsoniazid	0.1 0.4	0.2 1.0	0.2 1.0
Etambutol	2.5 7.5	2.0 6.0	5.0 10.0
Pirazinamid	100	100	25.0 50.0

Tablo 2. Sekonder antitüberküloz ilaçların farklı iki besiyerindeki ilaç konsantrasyonları (µg / ml)

İlaç	BACTEC 12B	M7H10
Kapreomisin	1.25	10.0
Sikloserin	-	-
Ethionamid	1.25	5.0
Kanamisin	5.0	5.0
Amikasin	1.0	4.0
Klofazimin	0.5	1.0
Ofloksasin	2.0	2.0
Rifabutin	0.5	1.0

KAYNAKLAR:

- 1- Bastian I, Rigouts L, Palomino JC, Potaels F. Kanamycin susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using Mycobacterium Growth Indicator Tube and a colorimetric method. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1934-1936.
- 2- Brunello F and Fontana R. Reliability of the MB/BacT system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex isolates to antituberculous drugs. J Clin Microbiol. 2000;38:872-873.
- 3- Gümüřlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi. 1.Baskı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı. 1998.
- 4- Hindler J. Antimicrobial susceptibility testing In: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook, Washington DC: ASM. 1993: 5.14.
- 5-Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu In: Topçu Willke A, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları, 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1996: 396-443.
- 6- Koskela-Adjers K and Katila ML. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. J Clin Microbiol 2003; 41:1235-1239.
- 7- MMWR: Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis of the Centers for Disease Control and Prevention. MMWR 1993;42:1-8
- 8- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antimycobacterial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis; Tentative Standard. 1995: M24-T
- 9- Özakin C. Tüberküloz kültüründe kullanılan yeni yöntemler. In: Uzun M, Erturan Z (eds). 4. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2002:49-56
- 10- Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, Gross W et al. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. J Clin Microbiol. 1999; 37:3179-3186.
- 11- Pfyffer GE, Palicova F, Rusch-Gerdes S. Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. J Clin Microbiol 2002; 40:1670-1674.
- 12- Ruiz P, Zero FJ, Casal MJ. Comparison of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis using the ESP culture system II with that using the BACTEC method. J Clin Microbiol. 2000; 38: 4663-4664.
- 13- Saniç A, Günaydın M, Çoban AY, Tokaç MS, Çetin M. A comparison of the E-test and proportion methods for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. J Chemother 2000; 12 :491-494.
- 14- Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR Jr, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready ? J Clin Microbiol 1993; 31:767-770.
- 15- Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. J Clin Microbiol 2002; 40:607-610.