Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2024;58(3):259-269*/doi: 10.5578/mb.20249764

Geliş Tarihi (Received): 15.04.2024 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.05.2024

Mycobacterium tuberculosis Kompleks İzolatlarında Rifampisin ve İzoniyazid Direncinin Belirlenmesi için Yeni Bir Yöntem: Kapiller Tüp Yöntemi

A New Method for Determination of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex Isolates: Capillary Tube Method

Nazlı ARSLAN[1](ID), Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ[2](ID), Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK[2](ID), Nuran ESEN[2](ID)

[1] Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
[1] *Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology, İzmir, Türkiye.*

[2] Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
[2] *Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Türkiye.*

**Bu çalışmadan elde edilen verilerin bir bölümü, XL. Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2022, Antalya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.*

***Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 2017.KB.SAG.047 numaralı proje ile desteklenmiştir.*

Makale Atıfı: *Arslan N, Demiray Gürbüz E, Özkütük AA, Esen N. Mycobacterium tuberculosis kompleks izolatlarında rifampisin ve izoniyazid direncinin belirlenmesi için yeni bir yöntem: kapiller tüp yöntemi. Mikrobiyol Bul 2024;58(3):259-269.*

ÖZ

Tüberküloz tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Tüberkülozun tanısında ve ilaç direncinin belirlenmesinde kültür yöntemleri halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemlerin en önemli kısıtlılığı sonuçlanma sürelerinin uzun olmasıdır. Süreyi kısaltmaya yönelik olarak geliştirilen ticari kültür sistemleri, özellikle gelişmekte olan ülkeler için ekonomik bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle ucuz, hızlı, kolay uygulanan ve objektif değerlendirilebilen testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada; *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarında rifampisin (RIF) ve izoniazid (INH) direncinin belirlenmesi için kültüre dayalı yöntemlere ek olarak, değerlendirme sürecini hızlandırabilmek için kapiller tüp yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya mikobakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan, daha önce BACTEC MGIT 960 (BD, ABD) sistemiyle birinci seçenek ilaçlara duyarlılık testleri gerçekleştirilmiş ve stoklanmış olan izolatlardan 27 RIF dirençli, 36 RIF duyarlı ve 30 INH dirençli, 33 INH duyarlı bakteri dahil edilmiştir. Çalışmada kalite kontrol suşu olarak H37Rv standart suşu ile RIF ve INH dirençli olduğu bilinen bir dış kalite kontrol (IDT3) suşu kullanılmıştır. Yeni bir test yöntemi olarak RIF ve INH direncinin saptanmasında kapiller tüp yöntemi standart bir test olan BACTEC MGIT 960 sistemiyle karşılaştırılarak çalışılmıştır. RIF ve INH dirençlerinin belirlenmesinde kapiller tüp yöntemiyle referans yönteme göre duyarlılık sırasıyla, %85 ve %80 olarak belirlenmiş ancak çalışmaların özgüllük değerleri (sırasıyla %25 ve %45.5) iki ilaç için de düşük olmuştur. Kapiller tüp yöntemiyle direncin saptanma süreleri 4-9 gün arasında değişmiştir. Özellikle çok ilaca dirençli izolatların hızlı tanımlanarak tedaviye alınabilmeleri için geliştirilen bu yöntem her ne kadar özgüllüğü çok düşük olsa da kısa sürede

İletişim (Correspondence): *Dr. Nazlı Arslan, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (538) 642 1132,* ***E-posta (E-mail):*** *nzlarslan88@gmail.com*

dirençli suşları görece yüksek bir duyarlılık ile göstermesi yönüyle umut vadedicidir. Çalışmanın daha geniş sayıda örneklem ile sürdürülmesi hatta doğrudan klinik örnekten yapılacak çalışmalarla yöntemin geliştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis; rifampisin direnci; izoniazid direnci; kapiller tüp yöntemi.*

ABSTRACT

Tuberculosis continues to be an important public health problem worldwide. Culture methods are still considered the gold standard in the diagnosis of tuberculosis and the determination of drug resistance. The most important limitation of these methods is their long turnaround time. Commercial culture systems developed to shorten the duration are emerging as an economic problem, especially for developing countries. Therefore, cheap, fast, easy to apply and objectively evaluable tests are needed. In this study, in addition to culture-based methods for determining RIF and INH resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates, it was aimed to develop the capillary tube method to accelerate the evaluation process. The study included 27 RIF-resistant, 36 RIF -sensitive, 30 INH-resistant, and 33 INH-sensitive isolates obtained from the mycobacteriology laboratory culture collection, for which susceptibility testing to first-line drugs were previously performed using the BACTEC MGIT 960 system (BD, USA) and were stored. H37Rv standard strain and an external quality control strain (IDT3) with known RIF and INH resistance were used as quality control isolates in the study. As a new testing method, the capillary tube method for detecting rifampicin and isoniazid resistance was compared to the standard BACTEC MGIT 960 system. In the determination of RIF and INH resistance, the sensitivity of the capillary tube method compared to the reference method was determined as 85% and 80%, respectively; however, the specificity values (25% and 45.5%, respectively) for both drugs were found to be low in the studies. The time to detect resistance with the capillary tube method varied between 4-9 days. Capillary tube method, which was developed especially for the rapid identification and treatment of multidrug-resistant isolates, is promising in that it detects resistant strains in a short time with a relatively high sensitivity, although its specificity is very low. It is thought that it would be beneficial to continue the study with a larger number of samples and even improve the method with studies conducted directly from clinical samples.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis; rifampicin resistance; isoniazid resistance; capillary tube method.*

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), son 25 yıldır küresel halk sağlığı için acil durum olarak kabul edilmektedir[1]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2023 yılı raporunda, 2022 yılında 10.6 milyon insanın tüberküloza yakalandığı ve 1.3 milyon insanın tüberküloz nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Aynı raporda, tüberkülozun dünya çapında önde gelen ölüm nedenleri arasında 13. sırada olduğu ve koronavirüs hastalığı 2019 [coronavirus disease 2019 (COVID-19)]'dan sonra [insan immünyetmezlik virüsü (human immundeficiency virus (HIV)/kazanılmış immün yetmezlik sendromu (acquired immunedeficiency syndrome) (AIDS)'in üst sırasında] ikinci önde gelen bulaşıcı bir hastalık olduğu da belirtilmektedir[2].

Hastalığın laboratuvar tanısında kültüre dayalı testler halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak klasik kültür yöntemlerinin sonuçlanması uzun zaman almakta, ticari otomatize yöntemler ise görece yüksek maliyet gerektirmektedir[1,3,4]. Mikobakteriler için ilaç duyarlılık testlerinde altın standart olarak kullanılan kültüre dayalı agar proporsiyon yöntemi zaman alıcı ve zahmetlidir. BACTEC MGIT 960 sistemi (Becton Dickinson, ABD)'yle duyarlılık testlerinin çalışılabilmesi süreci kolaylaştırmış ve sonuçlanma süresi kısalmıştır. Bununla birlikte BACTEC MGIT 960 sistemiyle de ilaç direncinin saptanması

12 güne kadar uzayabilmektedir. Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde maliyet de önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır[5-7]. Bu nedenle halen mikobakterilerin ilaç direncinin saptanmasında; hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir kültüre dayalı yöntemlere gereksinim devam etmektedir.

Çok ilaca dirençli (ÇİD) TB'nin dünya çapında artan oranları göz önüne alındığında direncin belirlenmesinde hızlı yöntemler hayati önem taşımaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere koşulları kısıtlı olan laboratuvarlar için altyapı gerektirmeyen ve teknik olarak karmaşık olmayan testlerin kullanımı DSÖ tarafından da araştırılmaktadır. Bu kapsamda ticari olmayan kültür ve duyarlılık test yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır[8]. Bunlardan, mikroskobik olarak gözlenen ilaç duyarlılığı [microscopically observed drug susceptibility (MODS)], kolorimetrik redoks gösterge yöntemleri [colorimetric redox indicator methods (CRI)], ince tabaka agar yöntemleri [thin-layer agar methods (TLA)], nitrat redüktaz testi [nitrate reductase assay (NRA)] ve mikobakteriyofaj tabanlı testler hızlı ve ucuz olmaları bakımından umut vadetmektedir[8,9]. Bu testlerin DSÖ tarafından yapılan değerlendirmesinde CRI, MODS ve NRA'nın belirli koşullar altında kullanımı için yeterli kanıt olduğu kabul edilmektedir[8]. Bununla birlikte özellikle koşulları kısıtlı olan laboratuvarlar için ÇİD-TB'nin saptanmasında hızlı ve ekonomik yöntemlere gereksinim devam etmektedir.

Bu çalışmada, tüberküloz ilaçlarına direncin saptanması için farklı bir yöntem olarak kapiller tüp yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan ön çalışmalarda sıvı besiyeri içeren kapiller tüplerde *Mycobacterium tuberculosis* kompleksin oluşturduğu kord yapısının mikroskobik olarak görülebilmesiyle kısa sürede saptanabildiği belirlenmiştir. Konvansiyonel kültür yöntemiyle karşılaştırıldığında kapiller tüp yöntemiyle kısa sürede sonuç alınabilmesi bu yöntemin ilaç direncinin hızlı belirlenmesinde de kullanılabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca ilk defa geliştirilecek olan bu yöntemin çok az miktarda besiyeri gerektirmesi ve klasik agar proporsiyon yöntemine göre daha kolay uygulanabilir olması da ilaç direncinin belirlenmesinde avantaj sağlayabilecektir. Bu çalışmada, ilk kez kapiller tüp yöntemiyle ÇİD-TB belirteçleri olan rifampisin (RIF) ve izoniazide (INH) direncin belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarında Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 08.03.2021 ve Karar No: 2021/08-37).

Örneklem

Mikobakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan, daha önce BACTEC MGIT 960 sistemi ile birinci seçenek ilaçlara duyarlılık testleri gerçekleştirildi ve stoklanmış olan izolatlardan RIF ve INH dirençli ve duyarlı olan bakteriler araştırma için seçildi. Seçilen izolatlar tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı araştırma laboratuvarında biyogüvenlik sınıf 2 kabininde BACTEC MGIT besiyerlerine pasajlandı. Cihazda üreme sinyali alınan tüpler-

den ARB boyama yapıldı. ARB pozitif olan örneklerin BD MGIT TBc-tanımlama testiyle *M.tuberculosis* kompleks izolatları olduğu doğrulandı. Doğrulanan izolatların RIF ve INH duyarlılıkları BACTEC MGIT 960 sistemiyle tekrar araştırıldı. Çalışmaya 27 RIF dirençli, 36 RIF duyarlı ve 30 INH dirençli, 33 INH duyarlı izolat dahil edildi. Çalışmada kalite kontrol olarak H37Rv standart suşu ile RIF ve INH dirençli olduğu bilinen bir dış kalite kontrol (IDT3) suşu kullanıldı.

Kapiller Tüp Yöntemi

İlaç solüsyonlarının hazırlanması

RIF; 0.32 gr RIF (AFG Bioscience) 10 ml DMSO (Sigma Aldrich, ABD) içerisinde çözdürülerek 32 µg/mL stok konsantrasyonu hazırlandı. Stok konsantrasyonun 10 ml'si, 10 ml distile suyla karıştırılarak 16 µg/mL olarak 1. dilüsyon elde edildi. Mikrokuyucuklara 300 µl sıvı besiyeri + 300 µl inokülum + 300 µl ilaç çalışma konsantrasyonu olmak üzere finalde toplam 900 µl hacim bulunmaktaydı. The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre Middlebrook 7H10 için belirlenmiş RIF ve INH kritik konsantrasyonu ve yüksek konsantrasyonu olan final ilaç konsantrasyonlarına (RIF 1 µg/mL ve 4 µg/mL, INH 0.1 µg/mL ve 0.4 µg/mL) ulaşmak için eklenecek 300 µl ilaç çalışma konsantrasyonu hesaplanarak stok konsantrasyondan uygun dilüsyonlar hazırlandı[9]. Bu çalışma konsantrasyonları RIF 1 µg/mL için 3.2 µg/mL, RIF 4 µg/mL için 12.8 µg/mL, INH 0.1 µg/mL için 0.32 µg/mL ve INH 0.4 µg/mL için 1.28 µg/mL olarak hesaplandı.

1 µg/mL RIF final konsantrasyon hazırlığı: 1. dilüsyondan 4 ml alınarak 16 ml distile suyla karıştırılıp 3.2 µg/mL çalışma konsantrasyonu hazırlandı. Mikroplak kuyucuğunda çalışma konsantrasyonundan 300 µl + sıvı besiyeri 300 µl + inokülum 300 µl eklendiğinde final konsantrasyon 1.07 µg/mL olarak elde edildi.

4 µg/mL RIF final konsantrasyon hazırlığı: 1. dilüsyondan 16 ml alınarak 4 ml distile suyla karıştırılıp 12.8 µg/mL çalışma konsantrasyonu hazırlandı. Mikroplak kuyucuğunda çalışma konsantrasyonundan 300 µl + sıvı besiyeri 300 µl + inokülum 300 µl eklendiğinde final konsantrasyon 4.3 µg/mL olarak elde edildi. INH; 0.032 gr INH (Tokyo Chemical Industry Co.Ltd) 20 ml distile su içerisinde çözülerek 1.6 µg/mL stok konsantrasyon hazırlandı.

0.1 µg/mL INH final konsantrasyon hazırlığı: Stok konsantrasyondan 4 ml alınarak 16 ml distile suyla karıştırılıp 0.32 µg/mL çalışma konsantrasyonu hazırlandı. Mikroplak kuyucuğunda çalışma konsantrasyonundan 300 µl + sıvı besiyeri 300 µl + inokülum 300 µl eklendiğinde final konsantrasyon 0.107 µg/mL olarak elde edildi.

0.4 µg/mL INH final konsantrasyon hazırlığı: Stok konsantrasyondan 16 ml alınarak 4 ml distile suyla karıştırılıp 1.28 µg/mL çalışma konsantrasyonu hazırlandı. Mikroplak kuyucuğunda çalışma konsantrasyonundan 300 µl + sıvı besiyeri 300 µl + inokülum 300 µl eklendiğinde final konsantrasyon 0.43 µg/mL olarak elde edildi.

Besiyeri

Çalışmada %10 OADC (Sigma Aldrich, ABD) içeren Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri (DIFCO) kullanıldı. Her izolat için mikroplağın kuyucuklarına 300'er µl dağıtıldı.

İnokülum hazırlanması

BACTEC MGIT 960 sisteminde üreme sinyali alınmasından sonra üç gün daha 37 °C'de inkübe edilerek MGIT tüpteki basil yoğunluğu inokülum hazırlanması için standart kabul edildi. Üreme sinyali veren MGIT tüplerinden 3-5. günde 3 ml sıvı, cam boncuk içeren steril falkon tüpe alınarak vortekslendi. Vortekslenen tüpler 15 dakika beklendi ve tüplerin üst kısmından alınan 1 ml inokülum, 4 ml Middlebrook 7H9 sıvı besiyeriyle karıştırılarak 1/5 oranında seyreltilerek çalışmada inokülum olarak kullanıldı.

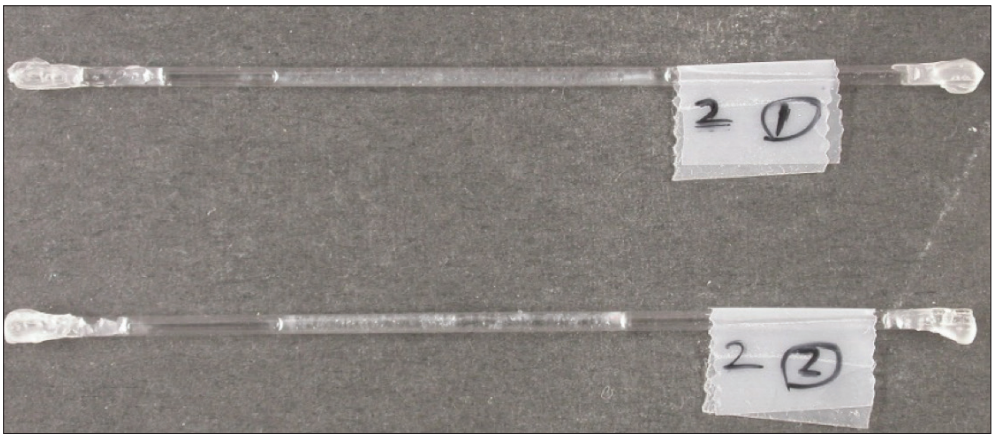
Test yöntemi

Çalışmada 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplaklar kullanıldı. Her izolat için bir ilaçsız üreme kontrol kuyucuğu, 1 ve 4 µg/mL RIF içeren iki kuyucuk ve 0.1 ve 0.4 µg/mL INH içeren iki kuyucuk olmak üzere toplam beş kuyucuk kullanıldı. İlaç içerecek kuyucuklara daha önce hazırlanan ilaç çalışma konsantrasyonlarından 300 µl eklendikten sonra üzerine 300 µl sıvı besiyeri ve inokülum süspansiyonundan 300 µl eklendi. Üreme kontrolü olarak kullanılacak ilaçsız kuyucuklara inokülum 1/100 oranında seyreltilerek eklendi, ilaç çalışma konsantrasyonu yerine ise bu kuyucuğa 300 µl steril distile su konuldu.

Bu hazırlanan mikroplak kuyucukları kapiller tüpler için kaynak olarak kullanıldı.

Her izolatın her bir ilaç direnç testi için bir kontrol ve iki farklı ilaç konsantrasyonu olmak üzere üç kapiller tüp, toplamda her izolat için altı kapiller tüp (Isotherm Media Diagnostics, I.D-1.4-1.5 mm, O.D.-1.8-1.9 mm, length 75 mm) kullanıldı (Şekil 1).

Her bir kapiller tüpe ilgili kuyucuklardan 30 µl pipetlendi. Tüplerin her iki ucu önce sıvı daha sonra katı parafinle kapatıldı.

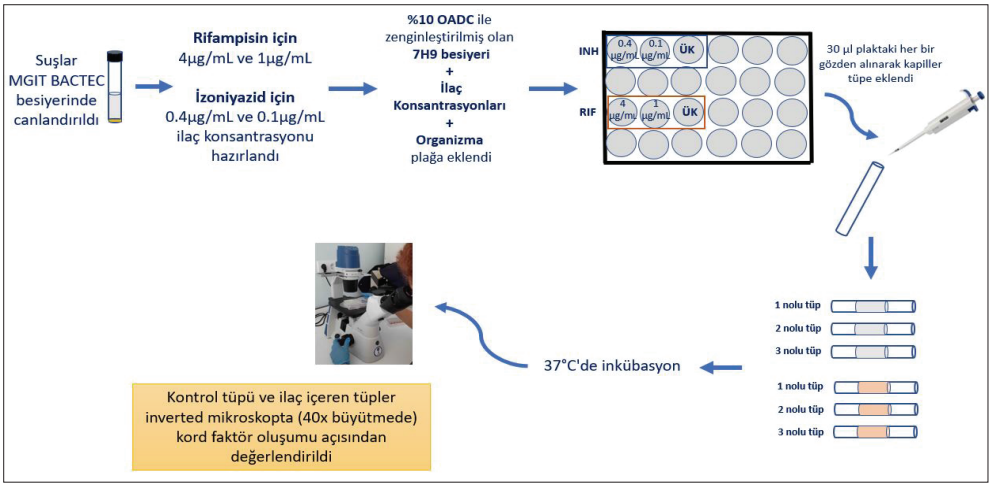


Şekil 1. *Kapiller tüpler.*

Her izolata ait INH direncinin saptanması için; kontrol kuyucuğundan 1 numaralı kapiller tüp; 0.4 µg/mL INH içeren kuyucuktan 2 numaralı kapiller tüp ve 0.1 µg/mL INH içeren kuyucuktan 3 numaralı kapiller tüp hazırlandı. RIF için de kontrol kuyucuğundan 1 numaralı kapiller tüp; 4 µg/mL RIF içeren kuyucuktan 2 numaralı kapiller tüp ve 1 µg/mL RIF içeren kuyucuktan 3 numaralı kapiller tüp hazırlandı. Hazırlanan kapiller tüpler 37 °C'de inkübasyona kaldırıldı (Şekil 2).

Değerlendirme

İnkübasyonun birinci gününden itibaren kontrol ve ilaç içeren tüpler her gün inverted mikroskopta (40x büyütme) incelenerek kord faktör varlığı araştırıldı. Kontrol kapiller tüpünde üremenin saptanıp ilaç içeren kapiller tüplerde kontrolden daha az üreme saptanması ilaca duyarlı, kontrolden daha fazla üremenin saptanması ise dirençli olarak değerlendirildi. İki haftalık sürede kontrol tüpünde üreme saptanmaması durumunda veya kapiller tüpte kontaminasyon lehine bulanıklık tespit edilmesi durumunda test tekrar edildi (Şekil 3).



Şekil 2. *Kapiller tüp yöntemi.*
INH: İzoniyazid, RIF: Rifampisin, ÜK: Üreme kontrol.



Şekil 3. *Kapiller tüp yöntemiyle ilaç direncinin belirlenmesi.*

Her gün yapılan değerlendirmelerin sonucunda gözle seçilebilen üremenin tüpler arasında 4-9 gün arasında değiştiği belirlendi. Bunun üzerine çalışmayı standardize edebilmek için tüm tüpler dokuzuncu günde değerlendirildi. Her izolat için tüm testler üç set halinde çalışıldı ve üç farklı araştırmacı tarafından kör olarak değerlendirildi. Aynı izolat için iki uyumlu sonuç kesin sonuç olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizinde SPSS version 22.0 programları kullanıldı. Kapiller tüp yöntemiyle RIF ve INH direncinin belirlenmesinde BACTEC MGIT 960 sistemi sonuçları referans alınarak duyarlılık ve özgüllük hesaplandı. Değerlendirme yöntemi mikroskobik gözleme dayalı olduğu için çalışmacılar arasındaki uyum Cohen'in kappa katsayısı yöntemiyle hesaplandı[10].

BULGULAR

Çalışmaya alınan 126 izolat ve kalite kontrol suşlarının dokuzuncu günde değerlendirmeleri yapılmıştır. Kalite kontrol olarak kullanılan iki suş değerlendirilmiştir, H37Rv standart suşu her iki ilaca duyarlı ve IDT3 suşu da her iki ilaca dirençli saptanmıştır. Çalışma izolatlarının sonuçları Tablo I ve Tablo II'de gösterilmiştir.

BACTEC MGIT 960 yönteminde RIF dirençli olan 27 izolatın kapiller tüp yöntemiyle 23 (%85)'ü dirençli, RIF duyarlı 36 izolatın ise ancak 9 (%25)'u duyarlı olarak saptanmıştır. Araştırmacıların yapmış oldukları değerlendirme sonuçları arasında yapılan kappa uyum testi RIF için 0.794 olarak hesaplanmıştır. RIF direncini saptamada kapiller tüp yönteminin duyarlılığı %85.2, özgüllüğü ise %25 olarak elde edilmiştir. RIF için iki yöntemin uyumluluğu %50.8 olarak hesaplanmıştır.

Tablo I. *Kapiller Tüp Yöntemiyle Belirlenen Rifampisin Direnç Sonuçları*

	BACTEC MGIT 960		
Kapiller Tüp	**RIF Dirençli**	**RIF Duyarlı**	**Toplam**
RIF Dirençli	23	27	50
RIF Duyarlı	4	9	13
Toplam	27	36	63

RIF: Rifampisin.

Tablo II. *Kapiller Tüp Yöntemiyle Belirlenen İzoniyazid Direnç Sonuçları*

	BACTEC MGIT 960		
Kapiller Tüp	**INH Dirençli**	**INH Duyarlı**	**Toplam**
INH Dirençli	24	18	42
INH Duyarlı	6	15	21
Toplam	30	33	63

INH: İzoniyazid.

BACTEC MGIT 960 yönteminde INH dirençli saptanan 30 izolatın 24 (%80)'ü kapiller tüp yöntemiyle dirençli olarak bulunmuştur. INH duyarlı olan 33 izolatın ise 15 (%45.5)'i kapiller tüp yöntemiyle duyarlı olarak saptanmıştır. INH için yapılan değerlendirme sonuçları arasındaki Cohen'in kappa uyum testi 0.634 olarak belirlenmiştir. Kapiller tüp yönteminin INH direncini saptama duyarlılığı %80, özgüllüğü ise %45.5 olarak elde edilmiştir. INH için iki yöntemin uyumluluğu %61.9 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

DSÖ tarafından "End TB Stratejik Planı"na göre 2025 yılında tüberkülozdan ölümlerin 2015 yılına göre %75 azaltılmış olması planlanmaktadır. Tüberküloz 2022 yılında dünya çapında tahmini 1.3 milyon kişinin ölümüne neden olmuş, küresel olarak, 2022'de yaklaşık 410000 kişi (%95 UI= 370000-450000) ÇİD-TB veya RIF-dirençli tüberküloza yakalanmıştır. Tanı konulan ve tedaviye başlanan kişi sayısı çok daha düşük olup ne yazık ki tüm olguların ancak %43'ü tanı alıp tedaviye ulaşabilmiştir[2]. Bu nedenle özellikle ÇİD-TB olguları başta olmak üzere tüberküloz olgularında ilaç direncinin hızlı ve doğru tanımlanması gerekliliği önemini korumaktadır.

Tüberküloz tanısında ve ilaç direncinin belirlenmesinde konvansiyonel yöntemler halen altın standarttır. Kültür yöntemi için katı ve sıvı besiyerlerinin birlikte kullanımı önerilmektedir. Özellikle sıvı otomatize ticari sistemlerin kullanıma girmesiyle laboratuvar tanısı hızlanmış, ilaç duyarlılık testleri de katı besiyerinde yapılan agar proporsiyon yöntemine göre hızlı ve daha kolay uygulanabilir olmuştur. İlaç direncinin saptanmasında birçok ticari otomatize kültür sistemi fenotipik olarak ve moleküler yöntemler de genotipik olarak kullanımdadır[11]. Hızlı ilaç duyarlılık test (İDT) yöntemleri ÇİD-TB riskli hastaları belirlemek için temel tarama stratejilerinde birinci öncelikle yer almaktadır. RIF direnci, ÇİD-TB için güvenilir bir gösterge olarak kullanılmakta, saptandığında mevcut laboratuvar kapasitesine göre ek birinci ve ikinci seçenek ilaçlar için İDT yapılmaktadır[12]. Tanı ve İDT amacıyla kullanılan ticari olmayan yöntemler daha ucuz seçenekler olarak karşımıza çıkmakta olup, ülkemizde çok merkezli bir çalışmada bu amaçla kristal viyole dekolarizasyon testi (CVDA) *M.tuberculosis* suşlarında INH ve RIF direncini saptamak için kullanılmıştır[13]. Bu testler umut vadedici olmakla birlikte, DSÖ'de ticari olmayan yöntemlerde standardizasyon eksikliğine dikkat çekmektedir[8]. Günümüzde tüberküloz insidansının yüksek olduğu düşük ve orta gelirli ülkelerde ticari yöntemlerin kullanımı sınırlı olabilmekte, ucuz alternatif yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmada; hızlı ilaç direncinin tespit edilebilmesi için ekonomik bir seçenek olabileceği düşüncesiyle kapiller tüp yöntemi kullanılmıştır.

Kapiller test yöntemi RIF direncini %85 ve INH direncini %80 duyarlılık ile saptamış ve saptama süresinin 4-9 gün olduğu gözlenmiştir. Ticari olmayan duyarlılık testlerinden kolorimetrik redoks indikatör yöntemlerinin değerlendirildiği bir metaanalizde iki ilaç için de direnç oranlarının %89-100 duyarlılıkla saptanabildiği bildirilmektedir. Test süresi mikobakterilerin üremesi sonrası 7-14 gün olarak rapor edilmektedir[14]. Test protokolü standardize edilebilmiştir. Ancak yoğun bakteri süspansiyonu kullanımı nedeniyle

biyogüvenlik düzeyi 3 koşullarında uygulama gerektirmesi ve sürece de ek bir avantaj sağlamaması bu yöntemin ancak referans laboratuvar seviyesinde kullanılabileceğini göstermektedir[8].

Ticari olmayan yöntemler içerisinde bu çalışmada kullanılan teste belki de en çok benzerlik gösteren yöntem MODS'dur. Bu yöntem sıvı besiyeri içeren kapalı mikroplaklarda *M.tuberculosis* mikrokolonilerinin ve tipik kord oluşumunun ters mikroskop kullanılarak gözlemlenmesiyle gerçekleştirilen bir testtir. DSÖ raporunda MODS ile RIF direncinin tespiti için oldukça duyarlı %98 ve INH için de %91 duyarlılık ile sonuç verdiği, biyogüvenlik düzeyi 2 laboratuvarda çalışılabileceği bildirilmektedir. Gana'da yapılan bir çalışmada testin sonuçlanma süresi 7-32 gün arasında olup ortalama 13 gün olarak saptanmıştır[14]. Peru'da direkt örnekten yapılan bir çalışmada ise bu süre 7-10 gün olarak bildirilmiştir[15]. MODS için de DSÖ referans laboratuvar seviyesinde kullanım için uygunluk belirtmiştir[8,16].

Nitrat redüktaz (NRA) testi de ticari olmayan yöntemler içerisinde RIF ve INH direncini yüksek bir duyarlılık (%97) ile saptayan testler arasında yer almaktadır. Brezilya'da yapılan bir çalışmada testin sonuç verme süresinin ortalama 15 gün olduğu bildirilmektedir[17]. Ancak süre olarak konvansiyonel proporsiyon yöntemine göre bir avantaj sağlamadığı belirtilmektedir. Çalışma ortamı olarak biyogüvenlik seviye 2 laboratuvarda biyogüvenlik kabininde işlemlerin yapılması önerilmektedir. DSÖ bu yöntem için de referans laboratuvar seviyesinde kullanım için uygunluk belirtmiştir[8].

Sonuç olarak, DSÖ'nün referans laboratuvar düzeyinde kullanımına uygunluk belirttiği ticari olmayan yöntemlerden bu üç test RIF direncini belirlemede yüksek duyarlılığa sahip olup, hız açısından bir avantaj sağlamamaktadır. Kapiller tüp yöntemini değerlendirdiğimizde ise RIF direncini belirlemede duyarlılık bu üç teste göre düşüktür ancak süre olarak daha hızlıdır. Dünyada yaygın olarak kullanılan İDT'lerden LJ besiyerinde proporsiyon yöntemi ucuz olmasına rağmen 4-6 hafta gibi uzun bir süreye ihtiyaç göstermesi dezavantajına sahiptir. Otomatize sıvı besiyeri temelli testlerde klasik agar proporsiyon yöntemine göre İDT süresi daha kısalmakta, bu süre 10-12 gün arasında değişmektedir[14,18]. Özellikle koşulları sınırlı laboratuvarlar için hızlı ilaç direnci saptayabilme amacıyla denenen kapiller tüp yönteminin RIF ve INH direnci belirleme süresi 4-9 gün olarak saptanmıştır. Kapiller tüp yönteminin sıvı besiyerinde üreyen mikobakterilerin mikroskobik olarak kısa sürede görülebilmesi ve bu işlem için çok az miktarda besiyeri hacmine ihtiyaç duyulması gibi avantajları mevcuttur. Araştırmacılar tarafından gözle yapılan mikroskobik değerlendirme kolay olarak tanımlanmış olup değerlendirme sonuçları istatistiksel olarak önemli düzeyde uyum göstermiştir (0.794; 0.634). Bununla birlikte mikobakteri üremesinin görülmesi agar besiyerlerine göre daha hızlı olsa da BACTEC MGIT 960 sistemine göre süre açısından ek bir avantaj sunmamıştır.

Sonuç olarak, kapiller tüp yönteminin özgün sıvı besiyerinde üreyen mikobakterilerin kısa sürede saptanabilmesi, çok az miktarda besiyeri hacmine ihtiyaç göstermesi ve ucuz

maliyeti gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak bir tarama testi olarak kullanılabilmesi için yöntemin duyarlılığının geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla daha geniş sayıda örneklem ve daha çok araştırmacıyla yöntemin standardize edilmesi gerekmektedir. Ülkemizde çok yüksek olmasa da özellikle ÇİD-TB oranları yüksek olan ülkelerde RIF direncinin hızlı tespiti için ucuz ve hızlı bir yönteme duyulan gereksinim devam ettikçe yeni yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar artacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 2017.KB.SAG.047 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 08.03.2021 ve Karar No: 2021/08-37).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. Lancet 2019; 393(10181): 1642-56. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3
2. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2023.
3. Natarajan A, Beena PM, Devnikar AV, Mali S. A systemic review on tuberculosis. Indian J Tuberc 2020; 67(3): 295-311. https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.02.005
4. Chopra KK, Singh S. Tuberculosis: Newer diagnostic tests: Applications and limitations. Indian J Tuberc 2020; 67(4S): 86-90. https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.09.025
5. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabaş E, et al. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. Am J Trop Med Hyg 2005; 73(2): 276-80. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.276
6. Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. J Clin Epidemiol 2005; 58(8): 859-62. https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2004.12.009
7. Norbis L, Miotto P, Alagna R, Cirillo DM. Tuberculosis: Lights and shadows in the current diagnostic landscape. New Microbiol 2013; 36(2): 111-20.
8. World Health Organization (WHO). Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis: Policy statement; 2011.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and other aerobic actinomycetes, 3rd ed. CLSI standard M24. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute; 2018.
10. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 1977; 33: 159-74. https://doi.org/10.2307/2529310
11. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2001; 2(3): 164-8. https://doi.org/10.1186/rr54
12. Özkütük N, Sürücüoğlu S, Gazi H, Coşkun M, Özkütük A, Özbakkaloğlu B. Second-line drug susceptibilities of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Aegean Region-Turkey. Turk J Med Sci 2008; 38(3): 245-50.

13. Coban AY, Akbal AU, Bicmen C, Albay A, Sig AK, Uzun M, et al. Multicenter evaluation of crystal violet decolorization assay (CVDA) for rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Rep 2016; 6: 39050. https://doi.org/10.1038/srep39050
14. Owusu E, Newman MJ. Microscopic observation drug susceptibility (MODS) Assay: A convenient method for determining antibiogram of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Ghana. Med Sci (Basel) 2020; 8(1): 5. https://doi.org/10.3390/medsci8010005
15. Rodriguez J, Alcántara R, Rodríguez J, Vargas J, Roncal E, Antiparra R, et al. Evaluation of three alternatives cost-effective culture media for *Mycobacterium tuberculosis* detection and drug susceptibility determination using the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay. Tuberculosis (Edinb) 2022; 137: 102273. https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102273
16. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother 2007; 59(2): 175-83. https://doi.org/10.1093/jac/dkl477
17. Shikama ML, Silva RFE, Villela G, Sato DN, Martins MC, Giampaglia CMS, et al. Multicenter study of nitrate reductase assay for rapid detection of rifampicin-resistant M. tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 3: 377-80.
18. Koh WJ, Ko Y, Kim CK, Park KS, Lee NY. Rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance using a MGIT 960 system. Ann Lab Med 2012; 32(4): 264-9. https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.4.264