

# Dirençli *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarında Siprofloksasin Direncinin Saptanmasında Tetrazolyum Moru ve Resazurin Testlerinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi\*

## Evaluation of Tetrazolium Violet and Resazurin Assays for Ciprofloxacin Susceptibility Testing of Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates

Emrah RUH, Hamdiye Yeşim ÖCAL, Pınar YURDAKUL, Zeynep SARIBAŞ, Alpaslan ALP

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.  
Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

\* Bu çalışma, 20. ECCMID Kongresi (10-13 Nisan 2010, Viyana)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.05.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.08.2012

### ÖZET

*Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu tüberküloz günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Bu hastalığın dünyada hala bu kadar önemli bir sağlık sorunu olmasının en önemli nedeni, antimikobakteriyel ilaç direncidir. *M.tuberculosis* izolatlarına karşı in vitro ve in vivo etkinlikleri nedeniyle florokinolonlar özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz tedavisinde Dünya Sağlık Örgütü tarafından alternatif olarak önerilmektedir. Antimikobakteriyel ajanlara karşı direncin hızlı saptanması tüberküloz hastalarının tedavisi açısından çok önemlidir. Bu çalışmada tetrazolyum moru (TM) ve resazurin (RES) testlerinin *M.tuberculosis* klinik izolatlarının hızlı tanımlanması ve siprofloksasin duyarlılıklarının belirlenmesindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmaya, birinci seçenek ilaçlardan en az birine dirençli olduğu belirlenmiş 30 *M.tuberculosis* klinik izolatına ek olarak *M.tuberculosis* H37Ra standart suşu dahil edilmiştir. Bu suşların siprofloksasin duyarlılığının test edilmesi amacıyla TM ve RES testleri ile birlikte altın standart oranıtı (proporsiyon) yöntemi uygulanmıştır. İnkübe edilmekte olan test tüplerine TM ve RES 5, 7, 10 ve 12. günlerde eklenmiş ve testler dört set olacak şekilde yapılmıştır. TM testinde sarıdan koyu mora her türlü renk değişikliği mikobakteriyel üreme olarak değerlendirilmiştir. RES testi için ise maviden pembeye herhangi bir renk değişikliği bakteriyel üreme olarak kaydedilmiştir. Mikobakteriyel üreme ve direncin saptanması için gerekli süre, 30 *M.tuberculosis* klinik izolatının 25 tanesi için 7 gün olarak tespit edilmiştir. Ancak başlangıç inokulum miktarı düşük olan beş izolat için mikobakteriyel üreme değeri 10

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Alpaslan Alp, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye, 06100 Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 305 1562, **E-posta (E-mail):** aalp@hacettepe.edu.tr

ve 12. günlerde saptanmıştır. Siprofloksasin içeren tüplerde gözlenen herhangi bir renk değişikliği siprofloksasine direnç olarak yorumlanmıştır. Çalışma sonucunda, TM ve RES testleriyle uygulanan siprofloksasin duyarlılık testi sonuçları orantı yöntemi sonuçlarıyla tamamen uyumlu olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, RES ve TM testlerinden elde edilen bulgular, bu yöntemlerin diğer ikinci seçenek antimikobakteriyel ilaçlara karşı duyarlılığın belirlenmesinde de pratik ve hızlı testler olarak kullanım alanı bulabileceğine işaret etmektedir. Bu kolorimetrik testlerin özellikle düşük gelir düzeyine sahip ülkelerde yaygınlaştırılması pahalı tanısal sistemlere duyulan ihtiyacı da azaltacaktır.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis*; ilaç direnci; tetrazolyum moru; resazurin.

## ABSTRACT

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is still a serious public health concern. Antimycobacterial drug resistance which is in an increasing trend worldwide adds to the importance of tuberculosis problem. Fluoroquinolones which exhibit in vitro and in vivo anti-mycobacterial activity, are being recommended by World Health Organization as alternative drugs particularly for the treatment of multidrug resistant tuberculosis. Rapid detection of antimycobacterial resistance is of great importance for the effective treatment of patients with tuberculosis. In this study, we evaluated the efficiency of tetrazolium violet (TV) and resazurin (RES) assays in terms of rapid detection of bacterial growth and ciprofloxacin resistance in *M.tuberculosis* clinical isolates. Thirty *M.tuberculosis* isolates which were resistant to at least one of the first-line anti-tuberculosis drugs were tested using TV and RES assays in addition to gold standard agar proportion test. Standard strain *M.tuberculosis* H37Ra was also included in each run. The tests were performed in four sets as TV and RES were added on day 5, 7, 10 and 12. For the TV assay, any change in colour from yellow to dark purple was recorded as bacterial growth. For the RES assay, any change in colour from blue to pink was recorded as bacterial growth. The optimal incubation period for detection of growth and resistance was 7 days for 25 of 30 bacteria. However, results for five isolates with low inoculum rates were detected on 10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days. Any change in colour in drug containing media was recorded as resistance to ciprofloxacin. All the susceptibility results were consistent with those obtained from agar proportion method. As indicated by our results, TV and RES assays are rapid and simple tests which could be used for detection of bacterial growth and ciprofloxacin resistance in *M.tuberculosis* clinical isolates. Widespread use of such colorimetric tests will help to minimize the need of sophisticated expensive susceptibility test systems particularly in low income countries.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance; tetrazolium violet; resazurin.

## GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2010 yılında dünya genelinde ortalama 650.000 çok ilaca dirençli yeni tüberküloz (ÇİD-TB) olgusu ve 50.000 yaygın ilaç dirençli yeni tüberküloz (YİD-TB) olgusunun ortaya çıktığını belirtmektedir<sup>1,2</sup>. Mart 2011 itibarıyla 58 farklı ülke DSÖ'ye en az bir adet YİD-TB olgusu bildirmiştir<sup>2,3</sup>. Ülkemizde de farklı merkezlerden çeşitli YİD-TB olgu bildirimleri olmuştur. İzmir ve İstanbul'da farklı merkezlerde yapılan araştırmalarda bu bölgelerdeki YİD-TB olgu sayısı 22-26 arasında belirtilmektedir<sup>4</sup>. Her ne kadar ülkemizden bildirilen YİD-TB olguları henüz sınırlı sayıda olsa da, ülkesel ÇİD-TB ve YİD-TB kontrolü için güvenilir direnç belirleme yöntemlerine ihtiyaç vardır.

DSÖ'nün "Stop TB" projesi de benzer şekilde global ölçekte tüberküloz yükünü ve olgu sayısını azaltmayı amaçlamaktadır. Bu nedenle bilimsel gelişmelerin ışığında yeni ilaç-

lar ve yeni tanısal yaklaşımlar geliştirilmektedir<sup>1,2</sup>. *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarına karşı in vitro ve in vivo etkinlikleri nedeniyle florokinolonlar, özellikle ÇİD-TB tedavisinde DSÖ tarafından alternatif olarak önerilmektedir. Bu nedenle son yıllarda tüberküloz tedavisinde florokinolon etkinliğinin ve direncinin saptanması çalışmalarına odaklanılmıştır<sup>2,5</sup>. *M.tuberculosis* suşlarının üretilmesi ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemler 3-6 hafta içinde sonuç verebilmekte; hızlı moleküler testler ise düşük gelir düzeyine sahip ülkelerde rutin kullanıma girememektedir<sup>6</sup>. Bu nedenle *M.tuberculosis* ilaç direncinin saptanmasında tetrazolyum tuzları<sup>7,8</sup>, rezazurin<sup>9,10</sup>, malaşit yeşili<sup>11</sup>, alamar mavisi<sup>12</sup> ve nitrat redüksiyon<sup>13</sup> testleri gibi ucuz, kolorimetrik saptamaya dayalı testler önerilmektedir. Bu testler tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci ve ikinci sıra ilaçlara karşı direncin saptanmasında umut vaat edicidir<sup>6</sup>. Özellikle ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci sıra ilaçlara karşı duyarlılığın saptanması için düşük maliyetli ve kolay testlerin kullanıma girmesi, YİD-TB bulaşının önüne geçilmesi ve ülkesel tüberküloz kontrol politikası açısından çok önemlidir.

Bu çalışmada ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci sıra ilaçlardan siprofloksasine karşı duyarlılığın belirlenmesinde, oksidasyon ve redüksiyon prensibine dayanan iki kolorimetrik yöntem olan tetrazolyum moru (TM) ve rezazurin (RES) testlerinin etkinliği araştırılmıştır. Bu iki yöntemden birincisi olan TM testinde kullanılan tetrazolyum tuzları canlı hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimleriyle formazana dönüştürülmektedir. Klinik bir örnekteki canlı mikobakteri aktivitesi sonucu, oksitlenmiş tetrazolyum tuzunun formazana dönüşümünü takiben sarıdan koyu mora renk değişimi gözlenir<sup>6,14</sup>. *M.tuberculosis* ilaç direncinin saptanmasında yaygın olarak 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolyum bromür (MTT) kullanılmaktadır<sup>7,8,14-17</sup>. Bu çalışmada daha önce birçok başka bakterinin canlılığının gösterilmesinde de kullanılmış olan farklı bir tetrazolyum tuzu [2,5-diphenyl-3-(1-naphthyl): tetrazolyum klorür (TM)] kullanılmıştır<sup>18</sup>. İkinci yöntemde ise boya olarak alamar mavisinin bir yapıtaşı olarak tanımlanmış RES bileşiği kullanılmıştır<sup>6</sup>. *M.tuberculosis* ilaç direncinin saptanmasında uzun zamandır kullanılan bu bileşik, oksitlenmiş haldeyken mavi olup, klinik örnekteki canlı mikobakteriler tarafından redüksiyona uğratıldığında renk değiştirmekte ve pembeye dönmektedir<sup>9,10,15,19,20</sup>. Bu çalışmada *M.tuberculosis* klinik izolatlarında siprofloksasin direncinin hızlı saptanmasında TM ve RES kolorimetrik testlerinin etkinliği değerlendirilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### TM ve RES Testleri

TM testi, Abate ve arkadaşları<sup>21</sup> ile Foongladda ve arkadaşları<sup>16</sup> tarafından tanımlanan yöntemlerden; RES testi ise Palomino ve arkadaşlarınınca<sup>10</sup> tanımlanan yöntemden modifiye edildi. Deneylerde orantı yöntemiyle tüberküloz tedavisinde ilk seçenek olan ilaçlardan en az birine dirençli olduğu gösterilmiş olan 30 *M.tuberculosis* izolatı ve *M.tuberculosis* H37Ra suşu kullanıldı. En uygun inkübasyon süresinin belirlenebilmesi için deneyler dört düzenek olarak hazırlandı ve 5, 7, 10 ve 12. günlerde kontrol edildi. Her bir izolat için Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinde 3-4 hafta süresince inkübe edilen kültürlerden toplanan bakteri kolonileri McFarland 2 bulanıklığa ayarlanarak, %10 oleik asit-albumin-

dekstroz-katalaz (OADC) ile zenginleştirilen Middlebrook 7H9 besiyerine inoküle edildi. Her bir süspansiyondan alınan 1 ml hacmindeki örnekler steril tüplere aktarıldı. Tüplerdeki son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde, 4 µg/ml siprofloksasin stok solüsyonundan 1'er ml eklendi ve böylece son inokulum miktarı da McFarland 1 bulanıklık olarak ayarlandı. TM testi için hem kontrol hem de ilaç içeren tüplere 100'er µl TM (Sigma-Aldrich; 30 mg/ml distile suda çözünmüş) eklendi. Tüm tüpler 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin bitiminde 0.1N hidroklorik asit (HCL)/izopropanol içeren 50 µl formazan çözücü solüsyon tüplere eklendi; tüpler vortekslenildi ve tekrar 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda tüplerin rengindeki sarıdan koyu mora dönüşüm mikobakteri üremesi olarak değerlendirildi. RES testi ise TM testine benzer şekilde 100'er µl RES'in (Sigma-Aldrich; 0.2 mg/ml distile suda çözünmüş) tüm tüplere damlatılarak 37°C'de bir gece inkübasyonu gerçekleştirildi. Inkübasyon süresinin sonunda tüplerde maviden pembeye renk değişimi mikobakteriyel üreme olarak yorumlandı. Tüm sonuçlar orantı yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

### Antimikobakteriyel Duyarlılık Testi

Antimikobakteriyel duyarlılık testleri, daha önce önerilen şekilde orantı yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi<sup>22</sup>. Bu amaçla %10 OADC ile zenginleştirilmiş Middlebrook 7H10 agar (Difco, ABD) kullanıldı. Otuz *M.tuberculosis* suşu ve *M.tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 standart suşu birlikte test edildi. *M.tuberculosis* izolatları siprofloksasin direnci için sınır değeri kabul edilen 2 µg/ml ilaç içeren 7H10 Middlebrook besiyerine ve ilaç içermeyen kontrol besiyerine inoküle edildi<sup>23</sup>. Siprofloksasinli besiyerinde; siprofloksasin içermeyen besiyerlerindeki üremeye kıyasla %1'in üstünde üreme gösteren *M.tuberculosis* suşları dirençli olarak kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışmamızda, iki test düzeneğinde de beş gün içinde herhangi bir renk değişikliği gözlemlenmemiştir. Mikobakteriyel üremeye bağlı olarak hem kontrol tüplerinde hem de dirençli *M.tuberculosis* suşlarını içeren siprofloksasinli tüplerde renk değişikliği 7. günde saptanmıştır. Başlangıç inokulum miktarının az olduğu beş izolatta 7. günde az miktarda renk değişikliği gözlenmiştir. Dirençli olan bu suşlarda renk değişikliği, enzimatik ve metabolik aktivitelerin artması sonucu 10. günde tam olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca 12. gün sonuçlarıyla 10. gün sonuçları arasında fark tespit edilmemiştir.

Siprofloksasin içeren tüplerde gözlenen herhangi bir renk değişikliği, siprofloksasine direnç olarak yorumlanmış ve tüm sonuçlar orantı yöntemiyle elde edilen direnç sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bu uyum, TM ve RES testlerinin mikobakteriyel üremenin saptanması ve siprofloksasine direncin gösterilmesinde başarılı testler olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Çalışmamızda, formazan çözücü solüsyon olarak kullanılan HCl etkisi de değerlendirilmiştir. Siprofloksasin içermeyen kontrol tüplerinde ve dirençli *M.tuberculosis* izolatlarının ürettiği ilaçlı tüplerde, inkübasyonun 4. saatinde HCl eklenmeksizin koyu mor renk oluştuğu gözlenmiştir. %0.1N HCl eklenmesini takiben *M.tuberculosis* izolatlarının bir sa-

at yeniden inkübasyonları sonrasında da herhangi bir renk değişikliği oluşmamıştır. Bu sonuç, TM testinde oluşan formazanın çözünmesinde ve renk değişiminde HCl'nin net bir etkisi olmadığına işaret etmektedir.

## TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2010 yılında dünyada ortalama 1.4 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle hayatını kaybettiği düşünülmektedir<sup>1</sup>. DSÖ, hem genel tüberküloz yükünü hem de dirençli olgu sayısını azaltmayı hedeflemektedir. Dolayısıyla, tüberküloz hastalarının etkin tedavisi için enfeksiyon ajanını ve ilaç direncini saptayabilecek hızlı tanı yöntemlerinin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Dirençli *M.tuberculosis* suşlarının hızlı tespiti, bulaşın önünü kesmek açısından kritiktir.

Ülkemizde gerçekleştirilen farklı çalışmalarda ÇİD-TB oranı araştırılmıştır. Sürücüoğlu ve arkadaşlarının<sup>24</sup> çalışmasında, tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlardan herhangi birine direnç oranı %21.1 olarak belirtilmiştir. ÇİD-TB oranı Kocaeli'de yapılan bir çalışmada %5 ve Trabzon'da yapılan bir başka çalışmada da %4.8 olarak bildirilmiştir<sup>25,26</sup>. Durmaz ve arkadaşlarının<sup>27</sup> Malatya'da yaptıkları bir araştırmada ise, antimikobakteriyel ilaçlardan herhangi birine karşı direnç oranı %29 ve ÇİD-TB oranı %4.5 olarak saptanmıştır. Perinçek ve arkadaşları<sup>28</sup> ÇİD-TB oranını %2.2 olarak bulmuştur. Sağlık Bakanlığının 2011 Verem Savaş Raporunda yeni tüberküloz olgularındaki ÇİD-TB oranı %5.1 olarak belirtilmektedir<sup>29</sup>. Türkiye'deki ilk YİD-TB olgusu ise Özkütük ve arkadaşları<sup>30</sup> tarafından Manisa'dan bildirilmiştir. YİD-TB olgularının kontrolü, ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci sıra ilaçlara karşı hızlı, güvenilir ve kesin sonuç veren tanı ve duyarlılık testlerinin kullanımına bağlıdır. Tüberküloz tanısında kullanılmak üzere BACTEC, MGIT ve diğer hızlı moleküler yöntemler önerilmektedir; ancak tüberküloz insidansının ve dirençli olgu sayısının çok yüksek olduğu düşük gelir düzeyine sahip ülkelerde bu pahalı sistemlerin rutin uygulamaya sokulması mümkün olamamaktadır<sup>1,6</sup>. Öte yandan, *M.tuberculosis* tanısı ve dirençli suşların belirlenmesi için hücre sel çoğalmaya bağlı metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı, daha ucuz kolorimetrik yöntemler de önerilmektedir. Bunlar arasında tetrazolyum tuzları<sup>7,8</sup>, RES<sup>9,10</sup>, malaşit yeşili<sup>11</sup>, alamar mavisini<sup>12</sup> ve nitrat redüksiyon testleri sayılabilir<sup>13</sup>.

Bizim bu çalışmamızda, *M.tuberculosis* klinik izolatlarında ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olan siprofloksasine karşı gelişen direncin saptanmasında TM ve RES testlerinin etkinliği araştırılmıştır. Çalışmamızda, inkübasyonun 7. gününde mikobakteriyel üreme, siprofloksasin duyarlılık ve direnç varlığı başarıyla tespit edilmiştir. Başlangıç inokulum miktarı düşük olan suşlarda ise, inkübasyonun 10. güne kadar uzatılması gerekliliği ortaya konmuştur. Çalışmamızda, *M.tuberculosis* ilaç direncinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan MTT yerine TM bileşiğinin kullanılması tercih edilmiştir. MTT testi, ekstra formazan çözücü tampon eklenmesini takiben bir saat daha inkübasyon periyodu gerektirmekte olup<sup>7,16,21</sup>, bizim kullandığımız TM testinin sonuçları dört saat kadar kısa sürede okunabilmekte ve ortamın koyu mor renge dönüşmesiyle formazan oluşumu gösterilebilmektedir. Bu test sistemi, formazanın görünür hale gelmesini sağlayan tampon eklenmesi gerekliliğini ortadan kaldırmakta ve testi kolay, tek basamaklı bir yöntem

haline getirmektedir. Bu çalışmada hem TM hem de RES testi *M.tuberculosis* varlığının gösterilmesi ve siprofloksasin direncinin saptanması açısından hızlı ve etkin testler olarak bulunmuştur. Bwanga ve arkadaşlarının<sup>31</sup> ÇİD *M.tuberculosis* oranını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada da, RES testinin ÇİD-TB saptamadaki duyarlılığı %86, özgüllüğü %92 ve testin referans yöntemle uyumu %67 olarak bildirilmiştir.

Düşük maliyetli bir yöntem olarak rutin kullanıma girebileceği öne sürülen RES testi, değerlendirme aşamasında ek sistemlere ihtiyaç duyulmadığı için<sup>32</sup>, özellikle antimikobakteriyel etkinliğini in vitro koşullarda koruyamayan ve pH değişikliklerinden etkilendiği için duyarlılık belirlenmesinde sorun yaşanan pirazinamid (PZA)'e karşı direncin saptanmasında da umut vaat edici olabilir. Campenerut ve arkadaşları<sup>33</sup> yaptıkları çalışmada, RES, mikrodilüsyon, mutlak konsantrasyon ve pirazinamidaz testlerinin etkinliğini, PZA duyarlılığını saptamak açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirmişler; sekizi PZA dirençli 34 *M.tuberculosis* suşu ile yaptıkları çalışmada testlerin PZA direncini saptama sürelerini sırasıyla 8, 20, 28 ve 7 gün olarak belirtmişler; RES testinin duyarlılık ve özgüllüğünü absölu mikrodilüsyon yöntemiyle %100 uyumlu olarak bildirmişlerdir. Ferrari ve arkadaşlarının<sup>34</sup> çalışmasında da, BACTEC-MGIT 960 ile TM yöntemi izoniyazid (INH), rifampin (RIF), etambutol (EMB) ve streptomisin (STR) duyarlılıklarını saptamak amacıyla karşılaştırılmış; TM yönteminin antimikobakteriyel ilaç duyarlılığını saptamada BACTEC-MGIT 960 ile uyum oranlarının INH ve EMB için %100, RIF için %99 ve STR için %95.8 olduğu ifade edilmiştir.

Literatürde ikinci sıra antimikobakteriyel ilaçlara duyarlılık saptanmasında RES ve TM testinin kullanıldığı çalışmalara daha nadir rastlanmaktadır. Bunlardan geniş ölçekli bir çalışma olan Singh ve arkadaşlarının<sup>35</sup> TM yöntemini geliştirmek üzere yaptıkları çalışmada, *M.tuberculosis* H37Ra, *M.smegmatis* ve *M.bovis* BCG suşunun birinci ve ikinci sıra toplam 10 farklı antimikobakteriyel ajana karşı duyarlılık profili araştırılmıştır. Araştırmacılar, mikrodilüsyon, RES ve TM yöntemleri arasında uyumlu sonuçlar bulmuşlar; menadion ile yaptıkları modifikasyon sonrası TM yöntemiyle en az 12 saat süren test prosedürünün *M.smegmatis* için 20 dakikaya, *M.tuberculosis*/*M.bovis* BCG için ise 40 dakikaya kadar indiğini rapor etmişlerdir<sup>35</sup>. Morcillo ve arkadaşları<sup>14</sup> 101 ÇİD-TB hastasından izole edilen birer *M.tuberculosis* suşunun ÇİD-TB tedavisinde kullanılan ikinci sıra ilaçlara karşı duyarlılığını test etmede orantı yöntemiyle TM yöntemini karşılaştırmış ve yöntemler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Ülkemizde kolorimetrik yöntemle birinci sıra antimikobakteriyel ilaç duyarlılığının test edildiği çalışma sayısı kısıtlıdır. Çoban ve arkadaşları<sup>36</sup>, RES testiyle INH ve RIF direnç saptama etkinliğini, radyometrik BACTEC sistemiyle karşılaştırdıklarında RES testini %96 ve %100 uyumlu olarak belirtmişlerdir.

Global ve bölgesel tüberküloz kontrolü için, süreklilik arz eden direnç surveyanı oluşturulması, ÇİD ve YİD *M.tuberculosis* suşlarının hızlı tanısı ve duyarlılıklarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Özellikle ulusal tüberküloz kontrol programlarının uygulanabilmesi, uygun ilacın etkin sağlık politikası doğrultusunda hızlı bir şekilde temin edilmesiy-le mümkündür. Uygun ilacın temini ise hızlı, maliyeti düşük ve konvansiyonel yöntem-

lerle yüksek uyum gösteren testlerin geliştirilip yaygınlaşması sayesinde olasıdır. TM testi özellikle ikinci sıra antimikobakteriyel ilaçlara karşı direncin belirlenmesinde kullanılmaktadır ve ÇİD *M.tuberculosis* suşlarının artışta olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanımını önerilmektedir<sup>34</sup>. Birçok farklı çalışmada tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci sıra ilaçlara karşı duyarlılığın belirlenmesinde RES ve TM testi, kullanılan referans yöntemlerle yüksek derecede uyumlu ve dolayısıyla direncin saptanmasında yeterli olarak belirlenmiştir<sup>34,37</sup>. Ancak RES testi, RES'in canlı mikobakteriyel hücreler tarafından indirgenmesi ve renginin pembeye dönüşmesi için ekstra bir gece inkübasyon sürecine ihtiyaç duymaktadır<sup>10</sup>. Bu nedenle TM testi RES testine kıyasla dört saatte sonuçlanması bakımından daha hızlı bir testtir.

Bugüne kadar birçok araştırma grubu tüberküloz hızlı tanısının ve tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direncin hızlı belirlenmesi için farklı kolorimetrik yöntemler öne sürmüştü ve bu sistemleri mikobakteriyel üreme açısından standart yöntemler ile karşılaştırmıştır. Örneğin, Kocagöz ve arkadaşlarının<sup>38</sup> geliştirdikleri, renk değişikliğine bağlı olarak üremenin gözlemlendiği TK SLC besiyerinde, pozitif tüplerde mikobakteriyel üreme saptanması için gereken süre 15.5 gün olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, mikobakteriyel üremenin birçok tüpte 10 ile 15. günler arasında, ortalama olarak da inkübasyonun 12. gününde gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Çalışmada, TK hızlı besiyeri kullanılarak tüberküloz tedavisinde kullanılan birinci sıra ilaçlara karşı duyarlılık saptanma süresi ise ortalama 10.35 gün olarak verilmiştir<sup>38</sup>. Araştırmacılar TK besiyerlerinin kullanıma hazır, klinik örneklerin inokülasyonu için kullanılan TK SLC besiyerlerininse bazı antimikrobialleri içerdiğini belirtmişlerdir. Besiyerlerinin kullanımından önce herhangi bir hazırlık aşamasına gerek duyulmamasının kontaminasyon riskini azalttığını belirten araştırmacılar, kontaminasyon oranını LJ besiyerinde %5.33, TK SLC besiyerinde ise %0.55 olarak kaydetmişlerdir<sup>38</sup>. Bizim çalışmamızda kullanılan tetrazolyum ve resazurin maddeleri tüberküloz sisteminden farklı olarak inkübasyonun belirli günlerinde sisteme eklenmekte ve renk değişimi sonrası inkübasyon sonlandırılmaktadır. Testte kullanılan her iki indikatör madde de mikobakteriler için toksiktir. Toksikite nedeniyle, indikatörlerin eklenmesini takiben kültürler devam ettirilememiş ve bu nedenle farklı günlerde sonlandırılan birkaç tüp hazırlanmıştır. Inkübasyon sırasında kapaklı tüplerin açılıp bu maddelerin bakteri süspansiyonu üzerine eklenmesi kontaminasyon riskini artıran bir unsurdur. Tüm çalışma boyunca biyogüvenlik kabininin kullanılması sayesinde kontaminasyon riski en aza indirilmiştir.

Sorlozano ve arkadaşları<sup>39</sup>, BACTEC MGIT, MB/BacT Alert 3D ve klasik LJ kültür yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında, *M.tuberculosis* üremesini sırasıyla 15.1, 20.2 ve 32.4 gün olarak saptamışlardır. Lopez ve arkadaşları<sup>40</sup> nitrat redüktaz testi kullanarak araştırdıkları 325 *M.tuberculosis* izolatının üreme ve birinci sıra tüberküloz ilaç direnci sonuçlarının saptanma süresini sırasıyla 10 ve 14 gün olarak belirtmişlerdir. Renk değişikliğine dayalı bir başka *M.tuberculosis* hızlı tanı yöntemi olan nitrat redüktaz testiyle tüm sonuçların ortalama 10 günde elde edilebildiğini vurgulamışlardır. Nitrat redüktaz yöntemini kullanarak doğrudan balgam örneklerinde mikobakteriyel üremeyi ve birinci sıra ilaç direncini değerlendirdikleri çalışmada Visalakshi ve arkadaşları<sup>41</sup>, örneklerin büyük bir kısmında sonuç

alınabilmesi için 14 gün gerektiğini belirtmişlerdir. Yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü RIF için sırasıyla %94 ve %98; INH içinse sırasıyla %100 ve %98 olarak bulunmuştur<sup>41</sup>.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ikinci sıra ilaçlara karşı duyarlılığın belirlenmesinde resazurin bazlı hızlı kolorimetrik yöntemin kullanıldığı ender çalışmalardan bir tanesi de Martin ve arkadaşlarının<sup>42</sup> çalışmasıdır. Araştırmacılar, kolorimetrik redoks indikatör yönteminin YİD *M.tuberculosis* hızlı tanısı ile birinci ve ikinci sıra ilaçlara karşı duyarlılığın saptanmasındaki etkinliğini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, birinci sıra ilaçlardan RIF ve INH'ye; ikinci sıra ilaçlardan ofloksasin, kanamisin ve kapreomisine karşı elde ettikleri duyarlılık sonuçlarını referans oranı yöntemi ve hızlı kolorimetrik testlerden BACTEC MGIT 960 ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada resazurin bazlı indikatör yöntemle, 149 *M.tuberculosis* izolatının duyarlılık sonucu sekiz günde saptanabilmiştir. Referans oranı yönteminden daha hızlı olan bu testin, BACTEC MGIT 960 ile aynı zamanda sonuç vermesi ve bu sistemden daha ucuz bir yöntem olması nedeniyle düşük gelirli ülkeler için uygun bir test olabileceği belirtilmiştir<sup>42</sup>. Chauca ve arkadaşları<sup>43</sup> indikatör olarak alamar mavisi kullandıkları çalışmalarında, *M.tuberculosis* suşlarının RIF ve INH'ye olan duyarlılığını araştırmışlardır. Araştırmacılar yedi günde mikobakteriyel ilaç duyarlılıklarını saptamayı hedeflemiş, üreme kontrolünde renk değişimi olmaması durumunda inkübasyon süresini dokuz güne kadar uzatmışlardır. Bu süre içinde sonuç alınamadığı durumlarda testi tekrar etmişlerdir. Çalışmada, yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü RIF için sırasıyla %98 ve %99; INH içinse sırasıyla %97 ve %97 olarak bulunmuştur<sup>43</sup>.

Günümüzde *M.tuberculosis* hızlı tanısında ve duyarlılık saptanmasında manuel ve otomatize birçok farklı tanı ve duyarlılık saptama yöntemi kullanılmaktadır. Farklı avantaj ve dezavantajlara sahip olan bu yöntemlere ek olarak çalışmamızda kullandığımız TM ve RES bazlı yöntemler, geliştirilmeye açık olmalarının yanı sıra, pahalı tanı ve duyarlılık sistemlerinin uygulanmadığı bölgelerde kullanımları önerilen testlerdir. Bu çalışma bizim dahilinde literatürde ÇİD-TB tedavisinde kullanılmakta olan siprofloksasine karşı duyarlılığın RES ve TM testleriyle karşılaştırmalı olarak saptandığı ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonuçları, her iki kolorimetrik testin de *M.tuberculosis* klinik izolatlarının ve siprofloksasin direncinin saptanması açısından hızlı, benzer kolorimetrik yöntemlerle uyumlu, önerilebilecek testler olduğuna işaret etmektedir. Bu ve benzeri kolorimetrik testler diğer kinolon grubu ve ikinci sıra ilaçlar için de farklı çalışmalarla özellikle düşük gelir düzeyine sahip ülkelerde yaygınlaştırılmalıdır. Bu sayede pahalı hızlı tanısal sistemlere duyulan ihtiyaç da azalacaktır.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global tuberculosis control 2011. WHO Report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. 2011, Geneva.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. WHO report 2009. WHO/HTM/TB/2009.42. 2009, Geneva.
3. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. Lancet 2011; 378(9785): 57-72.
4. Serir Ö. Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD = XDR). Türk Toraks Derneği 13.Yıllık Kongresi, 5-9 Mayıs 2010, İstanbul. Available from: <http://www.toraks.org.tr/SunuMerkezi/?s=563B2A3E223D3E2123>



5. O'Brien RJ, Nunn PP. The need for new drugs against tuberculosis. Obstacles, opportunities, and next steps. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5): 1055-8.
6. Martin A, Portaels F. Drug resistance and drug resistance detection, pp:635-60. In: Palamino JC, Leao SC, Ritacco V (eds), *Tuberculosis 2007 / From Basic Science to Patient Care*. 2007, 1<sup>st</sup> ed. Argentina. Available from: [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com)
7. Raut U, Narang P, Mendiratta DK, Narang R, Deotale V. Evaluation of rapid MTT tube method for detection of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(3): 222-7.
8. Abate G, Aseffa A, Selassie A, et al. Direct colorimetric assay for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(2): 871-3.
9. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(11): 3616-9.
10. Palomino JC, Martin A, Camacho M, et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8): 2720-2.
11. Farnia P, Masjedi MR, Mohammadi F, et al. Colorimetric detection of multidrug-resistant or extensively drug-resistant tuberculosis by use of malachite green indicator dye. *J Clin Microbiol* 2008; 46(2): 796-9.
12. Chauca JA, Palomino JC, Guerra H. Evaluation of the accuracy of the microplate Alamar Blue assay for rapid detection of MDR-TB in Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11(7): 820-2.
13. Syre H, Ovreas K, Grewal HM. Determination of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide in liquid and solid media assessed by a colorimetric nitrate reductase assay. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(4): 704-12.
14. Morcillo N, Di Giulio B, Testani B, et al. A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8(2): 253-9.
15. Lemus D, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1): 130-3.
16. Foongladda S, Roengsantha D, Arjattanakool W, et al. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6(12): 1118-22.
17. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1873-4.
18. Hayashi S, Kobayashi T, Honda H. Simple and rapid cell growth assay using tetrazolium violet coloring method for screening of organic solvent tolerant bacteria. *J Biosci Bioeng* 2003; 96(4): 360-3.
19. Umubyeyi AN, Martin A, Zissis G, et al. Evaluation of the resazurin microtiter assay for rapid detection of ofloxacin resistance in *M. tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10(7): 808-11.
20. Martin A, Palomino JC, Portaels F. Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1612-6.
21. Abate G, Mshana RN, Miorner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2(12): 1011-6.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of *Mycobacteriae*, *Nocardiae* and other aerobic *Actinomycetes*. Approved Standard M24-A, 2003. CLSI, Wayne, PA.
23. Wang JY, Lee LN, Lai HC, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(5): 860-5.
24. Surucuoglu S, Ozkutuk N, Celik P, et al. Drug-resistant pulmonary tuberculosis in western Turkey: prevalence, clinical characteristics and treatment outcome *Ann Saudi Med* 2005; 25(4): 313-8.

25. Dündar D, Sonmez Tamer G. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Klimik Derg* 2009; 22(2): 52-4.
26. Aydın F, Kaklıkkaya N, Bayramoğlu G, et al. Resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from clinical specimens. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 36-42.
27. Agarwal M, Gunal S, Durmaz R, Yang Z. Integration of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing and genotyping with epidemiological data analysis to gain insight into the epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol* 2010; 48(9): 3301-5.
28. Perincek G, Tabakoğlu E, Otkun E, Özdemir L, Özdemir B. *Mycobacterium tuberculosis* üremesi saptanan akciğer tüberkülozlu hastaların antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. *Türk Toraks Derg* 2011; 12(3): 111-3.
29. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Türkiye'de Verem Savaşı 2010 Raporu. 2011, Ankara.
30. Ozkutuk N, Surucuoglu S, Gazi H, Coskun M, Ozkutuk A, Ozbakkaloglu B. Second-line drug susceptibilities of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Aegean region-Turkey. *Turk J Med Sci* 2008; 38(3): 245-50.
31. Bwanga F, Joloba ML, Haile M, Hoffner S. Evaluation of seven tests for the rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis in Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14(7): 890-5.
32. Taneja NK, Tyagi JS. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(2): 288-93.
33. Campanerut PA, Ghiraldi LD, Sposito FL, et al. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(5): 1044-6.
34. Ferrari ML, Teles MA, Ferrazoli L, et al. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line antimycobacterial agents in a Brazilian hospital: assessing the utility of the tetrazolium (MTT) microplate assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(5): 661-4.
35. Singh U, Akhtar S, Mishra A, Sarkar D. A novel screening method based on menadione mediated rapid reduction of tetrazolium salt for testing of anti-mycobacterial agents. *J Microbiol Methods* 2011; 84(2): 202-7.
36. Coban AY, Cekic Cihan C, Bilgin K, et al. Rapid susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin with resazurin method in screw-cap tubes. *J Chemother* 2006; 18(2): 140-3.
37. Affolabi D, Sanoussi N, Odoun M, et al. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 8): 1024-7.
38. Kocagöz T, Altın S, Türkyılmaz Ö, et al. Efficiency of the TK culture system in the diagnosis of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72(4): 350-7.
39. Sorlozano A, Soria I, Roman J, et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19(10): 1259-64.
40. Lopez M, Alvarez C, Imaz MS. Utility of nitrate reductase assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low resource setting. *Biomedica* 2011; 31(2): 258-63.
41. Visalakshi P, Meherwal SK, Myneedu VP, et al. Evaluation of direct method of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid by nitrate reductase assay in a national reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(2): 148-52.
42. Martin A, Paasch F, Docx S, et al. Multicentre laboratory validation of the colorimetric redox indicator (CRI) assay for the rapid detection of extensively drug-resistant (XDR) *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(4): 827-33.
43. Chauca JA, Palomino J-C, Guerra H. Evaluation of the accuracy of the microplate alamar blue assay for rapid detection of MDR-TB in Peru. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11(7): 820-2.