

Mycobacterium tuberculosis Suşlarının Antitüberküloz İlaçlara Direnç Paternleri ve İsoniazid Direnci ile Katalaz Aktivitesi Arasındaki İlişki

Ayşe Yücel¹, Mine Yücesoy², Hale Ercan², Emel Çeliktepe³, Nuran Yuluğ²

Özet: Tüberküloz sağaltımına ışık tutabilmek amacıyla ülkemizdeki suşların antitüberküloz ajanlara direnç paternleri ve isoniazid direnci ile katalaz aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir. 58 *Mycobacterium tuberculosis* suşunun antitüberküloz ilaçlara *in vitro* duyarlılıkları % 1 proporsiyon metodu ile araştırılmış ve suşların 24 (% 41.4)'ünde rifampisine, 22 (% 37.9)'sinde etambutole, yine 22 (% 37.9)'sinde streptomisine, 19 (% 32.8)'unda ise isoniazide % 1'in üzerinde direnç saptanmıştır. Genel olarak bakıldığında suşların 41 (% 70.7)'inin en az bir ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Suşların 53'ünde semikantitatif katalaz yöntemi ile katalaz aktivitesi incelenmiş ve 36 (% 68)'sında olumlu bulunmuştur. Katalaz aktivitesi ile isoniazid direnci arasındaki ilişki incelendiğinde ise 34 isoniazide duyarlı suşun 25 (% 73.5)'inde (% 38.2'sinde kuvvetli, % 26.3'ünde zayıf) katalaz aktivitesi saptanmıştır; ancak aradaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Anahtar Sözcükler: Çoklu ilaç direnci, *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid direnci, katalaz aktivitesi.

Summary: Resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains against antituberculosis drugs and the correlation between the isoniazid resistance and catalase activity. The resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* of our country against antituberculosis drugs and the correlation between the isoniazid resistance and catalase activity were examined in order to improve the therapy of tuberculosis. The *in vitro* susceptibility of 58 *M. tuberculosis* strains to antituberculosis drugs were investigated by 1% proportion method and it was found that 24 (41.4%), 22 (37.9%), 22 (37.9%) and 19 (32.8%) of the strains were resistant more than 1% to rifampicin, ethambutol, streptomycin and isoniazid, respectively. Totally 41 (70.7%) of the strains were resistant to at least one drug. The catalase activity of 53 strains were investigated by semiquantitative catalase method and it was found to be positive in 36 (68%) of the strains. When the relation between the catalase activity and isoniazid resistance were examined, it had been detected that catalase activity was expressed in 25 (73.5%) of 34 isoniazid-sensitive (38.2% strongly and 35.3% weakly positive) and in 11 (57.9%) of 19 isoniazid-resistant (31.6% strongly and 26.3% weakly positive) however the difference between the two groups were not statistically significant ($p>0.05$).

Key Words: Multi-drug resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid resistance, catalase activity.

Giriş

Bu yüzyılın ikinci yarısında azalmış olan tüberküloz insidansı AIDS'in ortaya çıkışı, sosyoekonomik düzeyin düşmesi ve yoksulluğun yayılımı ile artış göstermiştir (1). Tüm dünyadaki insanların 1/3'ünü infekte etmiş olan *Mycobacterium tuberculosis* her yıl üç milyon kişinin ölümüne yol açmaktadır (2).

1990'lı yıllarda tüberküloz olgularının hızla artmasına paralel olarak çoklu ilaç dirençli suşlara bağlı salgınlara da sıklıkla rastlanmaktadır (3,4). İlaç direnci ile ilgili en büyük korku ilaçlara dirençli mikroorganizmaların yayılması ve infekte hastalara uygulanan kemoterapinin etkisiz hale gelmesidir (5). Salgınlar esnasındaki tüberküloz olgularının mortalitesi % 72-89 arasında olup, 4-16 hafta gibi kısa bir sürede hastalığın ilerleyerek ölüme yol açması söz konusu olmaktadır (6).

İyi uygulanmayan sağaltım programları sonucu tüberkülozlu olgular iyileşmemekte ve dirençli tüberküloz basilleri ile oluşan enfeksiyonlar hızla yayılmaya devam etmektedir (7,8).

Bu çalışmada tüberküloz sağaltımına ışık tutabilmek amacıyla ülkemizdeki suşların antitüberküloz ajanlara direnç patern-

leri ve isoniazid direnci ile katalaz aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir.

Yöntemler

Bakteri Suşları: 1994 Ocak-1995 Şubat tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Göğüs Hastalıkları Hastanesinde çeşitli örneklerden (balgam, bronkoalveoler lavaj, beyin-omurilik sıvısı) soyutlanan 58 *M. tuberculosis* suşu çalışmaya alındı.

***Mycobacterium*'ların Duyarlılık Testi:** Suşların rifampisin, etambutol, streptomisin ve isoniazid (INH) duyarlılıkları proporsiyon metodu ile Löwenstein-Jensen (L-J) besiyeri (Difco) kullanılarak araştırıldı (9). Bakteriler steril distile suda cam boncuklar ile homojenize edildi, bulanıklıkları 1 no.'lu McFarland standardına göre ayarlandıktan sonra belirtilen miktarlarda ilaç içeren ve içermeyen (kontrol) L-J besiyerine ekildi. Altı haftalık 37°C'deki inkübasyondan sonra ilaçlı besiyerindeki koloniler sayılarak, kontrol besiyerindekiler ile karşılaştırıldı. Buradan dirençli basillerin oranı saptanarak, yüzde olarak belirtildi.

Besiyerine konulan ilaç konsantrasyonları dolayısı ile ilaçların dirençli veya duyarlı olduğuna karar verdiren konsantrasyonlar, rifampisin, etambutol, streptomisin ve isoniazid için sırasıyla 40.0, 2.0, 4.0, 0.2 mg/lt şeklindeydi.

Katalaz Aktivitesinin Araştırılması: Suşların 53'ünde katalaz aktivitesi semikantitatif katalaz yöntemi ile incelendi (10). Bir kısım % 10'luk Tween 80, bir kısım % 30'luk H₂O₂ ile ka-

(1) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

(2) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

(3) Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve Göğüs Cerrahisi Merkezi, İzmir

5. Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (4-6 Eylül 1995, İstanbul)'nde bildirilmiştir.

Tablo 1. Antitüberkülob Dirençliliğinin İlaçlara Göre Dağılımı

İlaç	Tek İlaç Direnci Sayı (%)	İkili Direnç Sayı (%)	Üçlü Direnç Sayı (%)	Dörtlü Direnç Sayı (%)
Izoniazid	4 (6.9)	2 (3.4) I,R	1 (1.7) I,R,E	9 (15.5)
Etambutol	3 (5.2)	1 (1.7) I,E	1 (1.7) E,S,I	
Rifampisin	6 (10.3)	2 (3.4) R,E	4 (6.9) R,E,S	
Streptomisin	6 (10.3)	1 (1.7) S,E 1 (1.7) S,I		
Toplam	19 (32.8)	7 (12.1)	6 (10.3)	9 (15.5)

I: izoniazid, E: etambutol, R: rifampisin, S: streptomisin

riştirildi. Bu süspansiyondan L-J besiyerindeki *M. tuberculosis* kültürleri yüzeyine 1 ml damlatılıp, oda ısısında 5 dakika beklendi. Daha sonra hava kabarcıklarının yüksekliği ölçüldü. 0-25 mm arasındakiler negatif, 25-45 mm arasındakiler zayıf olumlu, 45 mm ve üzerindekiiler kuvvetli olumlu olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz: INH'ye duyarlı ve dirençli suşlarda saptanan katalaz aktivitesi oranları iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi ile karşılaştırıldı (11).

Sonuçlar

Çalışılan 58 *M. tuberculosis* suşunun 24 (% 41.4)'ünde rifampisine 22 (% 37.9)'ünde etambutole, 22 (% 37.9)'ünde streptomisine 19 (% 32.8)'ünde ise INH'ye % 1'in üzerinde direnç saptanmıştır. Genel olarak bakıldığında suşların 41 (% 70.7)'inin en az bir ilaca dirençli olduğu saptanmıştır. Direnç oranlarının ilaçlara göre oranları Tablo 1'de görülmektedir.

Katalaz aktivitesi yönünden 53 suş incelenmeye alınmış olup, 36 (% 68)'sında semikantitatif katalaz yöntemi ile katalaz aktivitesi saptanmıştır. Katalaz aktivitesi ile INH direnci arasındaki ilişki incelendiğinde ise 34 INH'ye duyarlı suşun 25 (% 73.5)'inde, 19 INH dirençli suşun ise 11 (% 57.9)'ünde katalaz varlığı saptanmıştır. INH'ye duyarlı suşların % 38.2'inde kuvvetli, % 35.3'ünde zayıf; INH'ye dirençli suşların % 31.6'ında kuvvetli, % 26.3'ünde zayıf katalaz olumluluğu elde edilmiştir (Tablo 2). Her iki grubun oranları arasında belirgin bir fark olmasına karşın aralarında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır ($t=1.17$; $p>0.05$).

İrdeleme

Progresif ilaç direncinin ortaya çıkması ve özellikle majör antitüberkülob ilaçlara karşı direnç gelişmesi oldukça endişe vericidir.

Çalışmamızda suşlarınızın % 70.7'si en az bir antitüberkülob ilaca dirençli olarak bulunmuştur. Direnç oranları rifampisine % 41.4, etambutole % 37.9, streptomisine % 37.9, INH'ye % 32.8'dir. İsveç'te yapılan bir çalışmada 59 *M. tuberculosis* suşunun % 3.4'ünde sadece INH'ye olmak üzere direnç saptanmıştır (12). Senegal'deki bir çalışmada ise streptomisine en yüksek

Tablo 2. Katalaz Aktivitesi ile INH Direnci Arasındaki İlişki

INH	Katalaz Aktivitesi	
	n	(%)
Duyarlı suş (n=34)	25	(73.5)
Dirençli suş (n=19)	11	(57.9)

oranda direnç (% 17.9) elde edilirken, INH'ye % 14.9, etambutole %10.4 ve pirazinamid ile rifampisine % 7.4 oranında direnç izlenmiştir (13). Kore'de 1965'ten 1990 yılına dek direnç oranlarının incelendiği bir çalışmada 1965 yılında *M. tuberculosis* suşlarının % 38'inde, 1980'de % 48.0'ünde, 1990'da ise % 25.3'ünde ilaç direnci saptanmıştır. Aynı yıllarda saptanan INH direnci sırasıyla % 25.4, % 43.5 ve % 22.2 olarak bildirilmiştir (5). Görüldüğü gibi 1980'de hızlı bir artış gösteren ilaç direnci antitüberkülob ilaçların yaygın ve uygun kullanımı ile 1990'da azaltılabilmektedir. Avustralya'da ise en az bir ilaca direnç saptanan *M. tuberculosis* olgularına % 10.5 oranında rastlanırken, INH'ye dirençli *M. tuberculosis* suşları % 5.8 dolayındadır (14). Dünyadaki direnç oranları ile karşılaştırıldığında çalışmamızda saptanan oranların çok yüksek olduğu görülmektedir. Bu da antitüberkülob sağaltımının düzenli olarak uygulanmamasına, hastaların ilaç sağaltımına gerekli önemi vermemesine, ülkemizdeki sosyoekonomik düzeyin düşük olmasına bağlanabilir.

1989-1992 yılları arasında yaptığımız benzeri bir çalışmada, suşların % 41'inde ilaç direnci saptanmıştır. Suşların % 9'u INH'ye, % 3'ü etambutole, % 32'si streptomisine, % 27'si rifampisine dirençli olarak bulunmuştur (15). Aynı şekilde ülkemizde daha önceki yıllarda saptanan direnç oranlarına da bakılacak olursa, tüm antitüberkülob ajanlara karşı direncin hızla yayıldığı izlenmektedir (16,17). Özellikle kısa süreli sağaltımda tercih edilen rifampisin ve antitüberkülob sağaltımının önemli bir parçası olan INH'ye direnç gelişmesi tüberkülozda sağaltımın başarısını azaltacaktır.

INH, tüberkülozun profilaksisi ve sağaltımı için yıllardan beri kullanılan bir ilaçtır. Son yıllarda INH'ye dirençli ve çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* suşlarına ait salgınların görülmesi dikkati bu konuya çekmiştir (18). 1992'de Zhang ve arkadaşları (19), hem katalaz hem de peroksidaz aktivitesini kodlayan bir *M. tuberculosis* geni bulmuşlar ve bu genin INH'ye dirençli bir *M. smegmatis* mutantına INH'ye duyarlılık özelliğini geçirdiğini göstermişlerdir. Daha sonra *M. tuberculosis* suşlarında INH direnci ile katalaz-peroksidaz aktivitesinin yokluğu arasında bir ilişki kurulmuştur (20).

Çalışmamızda 34 INH'ye duyarlı suşun % 73.5'inde, 19 INH'ye dirençli suşun % 57.9'unda katalaz aktivitesi saptanmıştır. Ferrozil ve arkadaşları (21) 'nin inceledikleri INH'ye duyarlı suşların tümünün, INH'ye dirençli suşların ise % 81'inin katalaz aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Aynı araştırmacılar, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile INH'ye duyarlı suşların tümünde kat G gen sekansları izlerken; 53 INH 'ye dirençli suşun dördünde (% 7) kat G sekanslarının bulunmadığını saptamışlardır. Stoeckle ve arkadaşları (20) ise 41 INH'ye dirençli suşun % 78'inde, 39 INH'ye duyarlı suşun % 77'sinde katalaz aktivitesi saptamışlar ve *M. tuberculosis* suşlarındaki INH direncinde kat G'nin delesyonundan bu suşlardan majör bir mekanizma olmadığı sonucuna varmışlardır. Aynı çalışmada, PZR ile INH'ye duyarlı *M. tuberculosis* suşlarının % 90'ının, INH'ye dirençli suşların ise % 76'sının kat G geni içerdiği saptanmıştır.

Katalaz-peroksidaz aktivitesi ile INH direnci arasındaki ilişkiyi açıklamak amacıyla iki hipotez öne sürülmüştür. Birincisi, katalazın INH 'nin otooksidasyonu esnasında oluşan serbest hidroksil radikalleri ile inaktive olduğu (22); ikincisi ise katalazın INH'yi izonikotinik aside oksidize ettiği ve daha sonra bu ürünün bir nikotinamid analogu ile birleşerek koenzim fonksiyonunun bozulduğu şeklindedir (23). Sonuçlarımızı göre kata-

laz aktivitesinin yokluğu ile INH direnci arasında bir ilişki saptanmış, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, ülkemizde antitüberküloz ajanlara karşı yüksek düzeyde direnç saptanmıştır. Bu nedenle özellikle ülkemiz gibi tüberkülozun ciddi bir tehlike olduğu ülkelerde, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *M. tuberculosis*'e direnç oranlarının ölçülmesinde kullanılacak yöntemlerin standardize edilmesi, periyodik olarak bu oranların bildirilmesi, sağaltımda hasta eğitimi ve belli standartlara uyulması, gerekirse tüm bu aktiviteleri gerçekleştirecek bir tüberküloz üst kurulu oluşturulmasının tüberküloz savaşından büyük başarı sağlayacağına inanıyoruz.

Kaynaklar

- Morris JT, McAllister CK. Homeless individuals and drug-resistant tuberculosis in south Texas. *Chest* 1992; 102: 802-4
- Rastogi N, Ross BC, Dwyer B, et al. Emergence during unsuccessful chemotherapy of multiple drug resistance in a strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11:901-7.
- Edlin BR, Tokars JJ, Grieco MH, et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326:1514-21.
- Bearson ML, Jereb JA, Frieden KR, et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. A risk to patients and healthcare workers. *Ann Intern Med* 1992; 117: 191-6
- Kim SJ, Hong YP. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *Tuberc Lung Dis* 1992; 73: 219-24
- Eliner JJ, Hinman AR, Dooley SW, et al. Tuberculosis symposium: emerging problems and promises. *J Infect Dis* 1993; 168:537-51
- Centers for Disease Control. Tuberculosis - United States. *MMWR* 1986; 35: 699-703
- Frieden TR, Sterling T, Poblis-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Doolery SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York city. *N Engl J Med* 1995; 329:134-5
- Inderlied CB, Salfinger M. Antimicrobial agents and susceptibility tests. In: Murray PC, Baron JE, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1995: 1385-1404
- Cockerill III FR, Uhl JR, Temesgen Z, et al. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (kat G) gene associated with isoniazid resistance. *J Infect Dis* 1995; 171:240-5
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. *Biyoistatistik*. 3. baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 1990:88-94
- Dias F, Michael SG, Hoffner SE, Martins L, Norberg R, Kallenius G. Drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* of a sample of patients in Guinea Bissau. *Tuberc Lung Dis* 1993; 74:129-30
- Cisse M, Gaye A, Boye CS, et al. Sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains to antituberculosis drugs isolated at Dakar University Hospital from 1987 to 1988. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1989;64:26-8
- Hurley JC, Andrew JH. Bacteriology and drug susceptibility of tuberculosis at St Vincent's Hospital, Melbourne, 1962-1991. *Tuberc Lung Dis* 1993; 74: 163-6
- Yüce A, Hatipoğlu O, Uçan ES, Kırdar S, Akkoçlu A. Tüberküloz ilaçlarına karşı primer direnç. *İnfeksi Derg* 1994; 8: 95-8
- Saygun N, Durmaz G, Özdemir İ. 1976-81 yıllarında (6 yıl) laboratuvarımızda üretilen *Mycobacterium* suşlarının rifampicine primer ve skonder direnç durumları. *Tüberk Toraks* 1973; 31: 228-32
- Osmanlıoğlu G, Feyza G. Tüberküloz'da direnç sorunu ve ülkemizdeki durum. In: Kocabaş A, ed. *Tüberküloz Kontrolü ve Tedavisi*. Adana: Çukurova Üniversitesi Matbaası, 1991: 335-42
- Centers for Disease Control. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons-Florida and New York, 1988-1991. *MMWR* 1991;40: 585-91
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; 358:591-3
- Stoeckle MY, Guan L, Riegler N, et al. Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J Infect Dis* 1993;168: 1063-5
- Ferrazoli L, Palaci M, Telles MA, et al. Catalase expression, kat G, and MIC of isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1995; 171:237-40
- Winder F. Catalase and peroxidase in mycobacteria: possible relationship to the mode of action of isoniazid. *Am Rev Respir Dis* 1960; 81: 68-78
- Kruger-Theimer E. Isonicotinic acid hypothesis of the antituberculosis action of isoniazid. *Am Rev Tuberc* 1958; 77:364-7