

Türkiye’de Bir Referans Hastanede Akciğer Örneklerinden Sıklıkla İzole Edilen Yavaş Üreyen Tüberküloz Dışı Mikobakteriler ve İlaç Duyarlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Frequently Isolated Slow Growing Nontuberculous Mycobacteria from Pulmonary Samples and Evaluation of Drug Susceptibility Testing Results in a Referral Hospital in Turkey

İsmail CEYHAN¹, Şeref ÖZKARA², Müjgan Zuhul GÜLER², Güngör DULKAR², Resul ALTINSOY², Sedat VEZİR²

¹ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

¹ Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Turkey.

² Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara.

² Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Training and Research Hospital, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Ceyhan İ, Özkara Ş, Güler MZ, Dulkar G, Altınoy R, Vezir S. Türkiye’de bir referans hastanede akciğer örneklerinden sıklıkla izole edilen yavaş üreyen tüberküloz dışı mikobakteriler ve ilaç duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2019;53(3):330-335.

ÖZ

Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM)’lerin çoğu doğada serbest yaşayan ve fırsatçı patojen mikroorganizmalardır. TDM’ler çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilirler. Ancak bunlar arasında en sık görülen klinik tablo pulmoner TDM hastalığıdır. Bu çalışmada, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2014 ve 2018 tarihleri arasında tüberküloz (TB) ön tanısı alan kişilere ait hasta örneklerinden izole edilen yavaş üreyen TDM izolatlarının tanımlanması ve ticari mikrodilüsyon plak yöntemiyle ilaç duyarlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya akciğer TB şüpheli hastalardan elde edilen toplam 435 adet TDM izolatu dahil edilmiştir. Örnekler homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi uygulandıktan sonra aside dirençli boyamanın ardından otomatize MGIT-BACTEC960 sistemi ve iki farklı katı besiyerinde (Löwenstein Jensen ve Ogawa) kültürü yapılarak aside dirençli bakteri (ARB) araştırılmıştır. Kültürden izole edilen ARB pozitif bakteriler kart testi (MPB64, Capilla TB-Neo) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli ters hibridizasyon “line probe assay (LPA)” (GenoType MycobacteriumCM/AS Hain Lifescience, Almanya) yöntemiyle tanımlanmıştır. Kültürlerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, mikobakteri 23S rRNA “spacer” bölgesine özgü primerler kullanılarak PCR yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen biyotinlenmiş PCR ürünü, nitroselülöz şeritler üzerinde mikobakteri türlerine özgü problemlerle üretici firmanın önerilerine göre hibridize edilerek değerlendirilmiştir. Bu çalışmada akciğer hastalarından sırasıyla *Mycobacterium avium* (n= 77, %17.7), *Mycobacterium intracellulare* (n= 70, %16.1), *Mycobacterium szulgai* (n= 19, %4.4), *Mycobacterium kansasii* (n= 10, %2.3) ve *Mycobacterium smiae* (n= 9, %2.1) yavaş üreyen mikobakteri

türleri saptanmıştır. İlaç duyarlılık testinde CLSI tarafından CLSI/M24-A2 rehberi ile önerilen “oleic asit, albumin dextrose catalase” ile zenginleştirilmiş, katyon-ayarlı Mueller-Hinton (CAMH) sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Test, kullanıma hazır ticari ilaçlı plaklarda (SLOMYCO-Sensititre, TREK Diagnostic Systems Ltd, Birleşik Krallık) yapılmıştır. *M.intracellulare*, *M.avium*, *M.kansasii* ve *M.smiae*'nin klaritromisine duyarlılıkları sırasıyla %100, %99, %100 ve %100 oranlarında saptanmıştır. *M.intracellulare* ve *M.avium* için moksifloksasine duyarlılık sırasıyla %91, %64 ve linezolidde ise %80, %74 olarak bulunmuştur. *M.kansasii*, *M.simiae*'den daha fazla oranda birçok ilaca duyarlı bulunmuştur. *M.kansasii*'nin rifabutın, rifampisin, moksifoksasin, amikasin, linezolid, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ), siprofloksasin ve etambutole duyarlılığı sırasıyla %100, %90, %100, %100, %100, %80, %70 ve %50 oranlarında bulunmuştur. Bu çalışma, akciğer örneklerinden sık izole edilen yavaş üreyen TDM'lerin tür ayrımı ve ilaç duyarlılık testleri ile tedaviye rehberlik edebileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz dışı mikobakteri (TDM); ilaç duyarlılık testi; akciğer hastalığı.

ABSTRACT

Most of the nontuberculous mycobacteria (NTM) are opportunistic pathogenic microorganisms and free-living in nature. NTM can cause a wide range of infections. However, pulmonary NTM disease is the most frequent clinical picture. The aim of this study was to identify and evaluate drug susceptibility of slow growing NTM isolated from pulmonary samples of patients prediagnosed as tuberculosis between 2014 and 2018 in Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Training and Research Hospital Microbiology Laboratory by a commercial microtube dilution plaque method. A total of 435 NTM strains obtained from suspected TB patients were included in the study. After the samples were processed by homogenization and decontamination and acid-fast staining, culture in two solid media (Löwenstein-Jensen, Ogawa) and in MGIT-BACTEC960 automated system were performed. Acid-fast bacilli isolated from culture media were identified by using cart test (MPB64, Capilla TB-Neo) and polymerase chain reaction (PCR) based reverse hybridization “line probe assay (LPA)” method (GenoType MycobacteriumCM/AS, Hain Lifescience, GmbH, Germany). After DNA isolation from the culture, PCR was performed by using the primers specific for mycobacterial 23S rRNA spacer region. PCR products were then hybridized with the probes specific for *Mycobacterium* species on nitrocellulose strips according to the recommendations of the manufacturer and the results were evaluated. In this study, *Mycobacterium avium* (n= 77, 17.7%), *Mycobacterium intracellulare* (n= 70, 16.1%), *Mycobacterium szulgai* (n= 19, 4.4%), *Mycobacterium kansasii* (n= 10, 2.3%) ve *Mycobacterium smiae* (n= 9, 2.1%) were isolated as slowly growing mycobacteria from the pulmonary patients. Susceptibility testing was performed in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMH), supplemented with “oleic acid, albumin dextrose catalase” according to CLSI/ M24-A2 guideline recommendations. For the antibiotic susceptibility test, ready-to-use plaque drugs for slow-growing mycobacteria (SLOMYCO-Sensititre, TREK Diagnostic Systems Ltd, UK), were used. *M.intracellulare*, *M.avium*, *M.kansasii* and *M.smiae* isolates were found to be sensitive to clarithromycin %100, %99, %100 and %100, respectively. For *M.intracellulare* and *M.avium* isolates, moxifloxacin and linezolid sensitivity values were found to be 91%, 64% and 80%, 74% respectively. *M.kansasii* isolates were more sensitive than *M.simiae* isolates to the most of the drugs. *M.kansasii* isolates, were susceptible to rifabutin, rifampin, moxifloxacin, amikacin, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX), ciprofloxacin and etambutol, with the frequencies of 100%, 90%, 100%, 100%, 80%, 70% and 50%, respectively. The study showed that the species identification and drug susceptibility testing of frequently isolated slow-growing NTM's from pulmonary specimens could guide for the treatment.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria (NTM); drug susceptibility testing; pulmonary disease.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) dışındaki mikobakteriler tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM) olarak adlandırılırlar. TDM'lerin çoğu doğada yaygın olarak bulunur ve fırsatçı patojenler olarak bilinirler¹. TDM'ler son yıllarda klinik olgulardan daha

sık izole edilmeye başlanmıştır. TDM’ler çoğunlukla akciğerlerde hastalık oluşturlar^{2,4}. Tedaviye başlayabilmek için izole edilen etkenlerin tür ayrımı yanında klinik ve radyolojik bulguların birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir^{3,4}.

TDM akciğer enfeksiyonlarının tedavisi zaman alıcı, zor ve maliyetlidir. Sıklıkla MAC (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* ve *Mycobacterium xenopi* gibi yavaş üreyen TDM’ler enfeksiyonlarda etken olarak bildirilmektedir². Tedavileri, türe özgü çoklu ilaç kullanımına dayanmaktadır. MAC, *M.kansasii*, *M.malmoense* ve *M.xenopi* için sıklıkla makrolidler, etambutol, rifampisin, rifabutin, *Mycobacterium simiae*’nın ise amikasin, linezolid, moksifloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) kombinasyonları önerilmektedir^{2,3}. TDM’lere duyarlılık testi yapılmasının önemi gittikçe artmaktadır^{2,3,5}. Özellikle önceden anti-mikobakteriyel ilaçlarla tedavi görmüş hastalarda hedef ilaçlara yönelik duyarlılık testleri daha kritik değer taşımaktadır^{2,3}. Bu çalışmada, hastanemizin merkezi tanı laboratuvarında akciğer örneklerinden izole edilen TDM’lerin tür ayrımının yapılması ve standardize duyarlılık sonuçlarının elde edilmesi ile tedaviye rehberlik etmedeki rolünü göstermek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Haziran 2014-Haziran 2018 tarihleri arasında hastanemize akciğer TB şüphesiye başvuran hastalara ait örnekler dahil edildi. Akciğer kaynaklı bu örnekler NaOH-NALC yöntemi sonrasında kültürde saptanan üremeler aside dirençli boyama ve TB yönünden kart testine (MPB64, Capilla TB-Neo) alındı. Kültür için iki katı (Ogawa, Löwenstein-Jensen) ve bir sıvı otomatize kültür sistemi (BACTEC-MGIT 960, Becton-Dicenton, ABD) kullanıldı. Kart testi negatif örneklere tür belirleme amacıyla “line probe assay” (GenoType/Mycobacterium-CM/AS, Hain-Lifescience, GmbH, Almanya) testi uygulandı. Bu işlem için kültür örneklerinden önce DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işleminden sonra elde edilen biyotinlenmiş ürün nitroselülöz şeritler üzerinde özgül problemlerle hibridize edildi ve kolorimetrik olarak görüntülenerek değerlendirildi.

Duyarlılık testi, içinde katlanarak artan ilaç konsantrasyonları [klaritromisin (CLA; 0.06-64.0 µg/ml), rifabutin (RFB; 0.25-8.0 µg/ml), etambutol (EMB; 0.5-16.0 µg/ml), moksifloksasin (MXF; 0.12-8.0 µg/ml), rifampin (RIF; 0.12-8.0 µg/ml), trimetoprim/sulfametoksazol (TMP-SMZ; 0.12/2.38-8.0-152.0 µg/ml), amikasin (AMI; 1.0-64.0 µg/ml), linezolid (LZD; 1.0-64.0 µg/ml) ve siprofloksasin (CIP; 0.12-16.0 µg/ml)] bulunan U-tabanlı “SLOMYCO-Sensititre” (TREK Diagnostic Systems Ltd, Birleşik Krallık) hazır plakları kullanılarak yapıldı. Test için önce 0.5 McFarland ayarına uygun bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan 50 µl alınarak OADC ile zenginleştirilmiş katyon-ayarlı Mueller Hinton besiyerine (10 ml) ilave edildi. Çoklu kanallı pipet kullanılarak her bir kuyucuğa 100 µl ekim yapıldı. Plaklar şeffaf özel plastik ile kapatıldı. 35°C’de 7-14 gün inkübe edildi. Yöntemin uygulanması ve değerlendirilmesinde CLSI/M24-A2 rehberinde belirtilen öneriler esas alındı⁵.

Tablo 1. *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii* ve *Mycobacterium simiae* için Belirlenen MİK Değerleri (µg/ml) ve Duyarlılık Durumları

İlaçlar	MİK aralığı	<i>M.avium</i> (n= 77)			<i>M.intracellulare</i> (n= 70)			<i>M.kansasii</i> (n= 10)			<i>M.simiae</i> (n= 9)		
		MİK ₅₀	MİK ₉₀	%	MİK ₅₀	MİK ₉₀	%	MİK ₅₀	MİK ₉₀	%	MİK ₅₀	MİK ₉₀	%
CLA	0.06-64.0	2.0	8.0	99	1.0	2.0	100	0.25	0.25	100	1.0	4.0	100
MXF	0.12-8.0	2.0	4.0	64	1.0	2.0	91	0.25	0.5	100	2.0	4.0	56
LNZ	1.0-64.0	32.0	64.0	74	16.0	32.0	80	1.0	4.0	100	8.0	16.0	100
RFB	0.25-8.0							0.25	0.5	100	8.0	8.0	22
EMB	0.5-16							4.0	16.0	50	8.0	16.0	0
RIF	0.12-8.0							0.25	0.5	90	8.0	8.0	0
TMP-SMZ	0.12/2.38- 8.0/152							0.25/4.75	0.5/9.5	80	8/152	8/152	33
AMI	1.0-64.0							2.0	8.0	100	8.0	16.0	100
CIP	0.12-16.0							1.0	4.0	70	8.0	8.0	0

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, CLA: Klaritromisin, MXF: Moksifloksasin, LNZ: Linezolid, RFB: Rifabutın, EMB: Etambutol, RIF: Rifampin, TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol, AMI: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, D: Duyarlılık.

BULGULAR

Çalışmanın gerçekleştirildiği dönemde kontaminasyon olduğu düşünülen izolatlar çalışma dışı bırakılarak toplam 435 adet TDM ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada üç ve daha az sayıda izole edilen TDM'ler değerlendirmeye alınmamıştır.

Çalışmada klinikle uyumlu, patojen kabul edilen izolatların tür ayrımı sonucunda *M. avium* (n= 77, %17.7), *M.intracellulare* (n= 70, %16.1), *Mycobacterium szulgai* (n= 19, %4.4), *M.kansasii* (n= 10, %2.3) ve *M.smiae* (n= 9, %2.1) türleri tanımlanmıştır.

MAC, *M.kansasii* ve *M.smiae*'nin klaritromisin için duyarlılık oranları sırasıyla \geq %99, %100, %100 olarak bulunmuştur. MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla \leq 8 µg/ml, 0.25 µg/ml ve \leq 4 µg/ml olarak saptanmıştır. *M.intracellulare* ve *M.avium*'un ise moksifloksasine ve linezolide olan duyarlılıkları sırasıyla %91, %64 ve %80, %74 olarak bulunmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 1' de yer almaktadır.

TARTIŞMA

Akciğer enfeksiyonu yapan yavaş üreyen TDM'lerin epidemiyolojik dağılımı dünyada bölgesel olarak değişkenlik göstermekte ancak sıklıkla MAC ve *M.kansasii* olguları bildirilmektedir⁶. Ülkemizde yapılan bir çalışmada klinik örneklerden MAC, *M.kansasii*, *M.szulgai* ve *M.smiae*'nin sırasıyla %26.6, %10, %6.7 ve %3.3 oranında izole edildiği bildirilmiştir⁷. Çalışmamızda aynı bakteri türleri sırasıyla %33.8, %4.4, %2.3 ve %2.1 oranlarında saptanmıştır.

Yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmalarında TDM'lerin MİK değerlerinin değişkenlik gösterebildiği görülmektedir. Litvinov ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada⁸ *M.avium*'un klaritromisin, moksifloksasin ve linezolid için MİK₅₀-MİK₉₀ değerleri sırasıyla 4.0-16.0 µg/ml,

2.0-4.0 µg/ml ve 32.0-64.0 µg/ml, *M.intracellulare* için ise sırasıyla 1.0-4.0 µg/ml, 2.0-4.0 µg/ml ve 16.0-32.0 µg/ml olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada *M.kansasii*'nin klaritromisin, moksifloksasin, linezolid, rifabutin, etambutol, rifampisin, TMP-SMZ, amikasin ve sip-rofloksasin için Mik₅₀-Mik₉₀ değerleri sırasıyla 0.5-4.0 µg/ml, 0.5-4.0 µg/ml, 4.0-32.0 µg/ml, 0.25-2.0 µg/ml, 4.0-16.0 µg/ml, 0.25-2.0 µg/ml, 8.0/152.0-8.0/152.0 µg/ml, 8.0-32.0 µg/ml ve 4.0-16.0 µg/ml olarak saptanmıştır. Heidarieh ve arkadaşları⁹ *M.kansasii*'nin Mik değerlerini rifabutin (2.0-8.0 µg/ml), rifampisin (2.0-8.0 µg/ml) ve TMP-SMZ (8.0-16.0 µg/ml) için yüksek, diğerlerinde ise düşük tespit etmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar ayrıca *M.simiae*'nin *M.kansasii*'ye göre rifabutin (0.125-1.0 µg/ml) gibi birkaç ilaç hariç daha yüksek Mik değerlerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda *M.simiae*'nin, test edilen tüm ilaçlarda daha yüksek Mik değerlerine sahip olduğunu saptadık. Guna ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada¹⁰ *M.kansasii*'nin Mik₅₀-Mik₉₀ değerlerini klaritromisin, moksifloksasin, linezolid, etambutol ve rifampisin için sırasıyla <0.06-0.125 µg/ml, <0.06-0.125 µg/ml, 0.5-1.0 µg/ml, 4.0-4.0 µg/ml, 0.125-0.25 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Heidarieh ve arkadaşlarının⁹ verilerinin aksine, çalışmamız ve diğer birçok araştırmacıların sonuçları^{8,10} MAC ve *M.kansasii*'nin klaritromisine duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir. *M.simiae*'nin kinolon, etambutol, TMP-SMZ, rifabutin ve rifampisine karşı saptadığımız farklı duyarlılık/direnç sonuçları ise Heidarieh ve arkadaşlarının⁹ verilerine yakın bulunmuştur. Diğer araştırmacılar ile çalışmamızdaki duyarlılık sonuçları arasındaki farklılıklar büyük olasılıkla kullanılan yöntem, izolat sayısı ve/veya izolatların özellikleri gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır⁸⁻¹⁰.

Sonuç olarak, çalışmamız akciğer enfeksiyonlarından izole edilen TDM'lerin tür ayrımlarının ve duyarlılık testlerinin yapılmasının önemini ortaya koymuştur. Bu çalışmada, "SLOMYCO-Sensititre"nin bazı hedef ilaçlar için uygulanmasının ve değerlendirmesinin kolay, standardize bir yöntem olduğu ve maliyet dikkate alınarak klinisyene yol gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Pfyffer GE, Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures, pp:536-69. In: Jorgensen JH, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2015, 11th ed. American Society for Microbiology Press Washington DC.
2. Wassilew N, Hoffmann H, Andrejak C, Lange C. Pulmonary disease caused by non-tuberculous mycobacteria. Respiration 2016;91(5):386-402.
3. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007;175(4):367-416.
4. Somoskovi A, Salfinger M. Nontuberculous mycobacteria in respiratory infections advances in diagnosis and identification. Clin Lab Med 2014;34(2):271-95.

5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae and Other Aerobic Actinomycetes, Approved Standard CLSI Documents M24-A2. 2011, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania.
6. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med* 2015;36(1):13-34.
7. Biçmen C, Coşkun M, Gündüz AT, Senol G, Cirak AK, Tibet G. Identification of atypical mycobacteria isolated from clinical specimens by line probe assay (LIPA). *Mikrobiyol Bul* 2007;41(4):503-10.
8. Litvinov V, Makarova M, Galkina K, Khachatourians E, Krasnova M, Guntupova L, et al. Drug susceptibility testing of slowly growing non-tuberculous mycobacteria using SlomycoTest-System. *PLoS One* 2018;13(9):e0203108.
9. Heidarieh P, Mirsaiedi M, Hashemzadeh M, Feizabadi MM, Bostanabad SZ, Nobar MG, et al. In-vitro antimicrobial susceptibility of nontuberculous mycobacteria in Iran. *Microb Drug Resist* 2016;22(2):172-8.
10. Guna R, Munoz C, Dominguez V, Garcia-Garcia A, Galvez J, de Julian-Ortiz JV, et al. In-vitro activity of linezolid, clarithromycin and moxifloxacin against clinical isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(6):950-3.