

Mycobacterium tuberculosis İzolatlarının Amoksisilin-Klavulanik Aside Karşı Duyarlılıklarının E-Test Yöntemiyle Araştırılması

Tamer Şanlıdağ, Sinem Akçalı, Nuri Özkütük, Beril Özbakkaloğlu

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klin. Mik. AD, Manisa

ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 33'ü birinci sıra ilaçlara duyarlı, 7'si birden fazla antimikobakteriyel ilaca dirençli toplam 40 *Mycobacterium tuberculosis* izolatının amoksisilin-klavulanik aside karşı *in vitro* duyarlılığı E-test yöntemiyle araştırıldı. Amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonunun duyarlı kökenlere karşı MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 8 mg/ml ve 96 mg/ml olarak saptandı. Çoğul ilaç dirençli tüberküloz (ÇİD-tb) izolatlarında ise bu değerler sırasıyla 48 mg/ml ve 256 mg/ml bulundu. Çalışmamız sonuçlarına göre amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonunun özellikle duyarlı kökenlere karşı etkin bir bakterisid aktivite gösterdiği saptandı.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, amoksisilin-klavulanik asit, E-test

Toraks Dergisi, 2000;2:28-31

ABSTRACT

Investigation of Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates to Amoxicillin-Clavulanate by Using E-Test

In vitro susceptibility of 40 *Mycobacterium tuberculosis* isolates to amoxicillin-clavulanate, which were isolated from various clinical specimens and 33 of which were susceptible to first line-drugs and 7 of resistant to more than one antimycobacterial agents were investigated by using E-test. It was determined that MIC₅₀ and MIC₉₀ values of amoxicillin-clavulanate for susceptible strains were 8 mg/ml and 96 mg/ml, respectively. These values in multiple-drug resistant *M. tuberculosis* isolates were found as 48 mg/ml and 256 mg/ml, respectively. According to the results of our study, amoxicillin-clavulanate combination has effective antimycobacterial activity especially against the susceptible strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, amoxicillin-clavulanate, E-test

GİRİŞ

Tüberküloz, ülkemizde ve gelişmekte olan birçok ülkede önemi her geçen gün artan bir sağlık sorunudur. Gelişmiş birçok ülkede özellikle de Human Immunodeficiency Virus (HIV)/Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)

olgularındaki artışla birlikte tüberkülozda da hızlı bir çıkış saptanmıştır [1]. Tüberkülozun yeniden artışında HIV/AIDS enfeksiyonunun yanı sıra, ÇİD-tb (çoklu ilaç dirençli) olgular da önemli rol oynamıştır [2].

Tüberküloz tedavisinde kullanılabilen ilaç sayısının azlığı, bu ilaçların kombinasyonlar şeklinde uygulanma zorunluluğu ve yan etkilerinin fazla olması hastaların tedaviye uyumsuzluğuna neden olmaktadır [3]. ÇİD-tb ile enfekte hastalardaki tedavi sorunları, kullanımı kolay, yan etkileri ve toksisitesi az olan yeni ilaçlara gereksinim doğurmuştur.

Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Tamer Şanlıdağ
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
Tel: 0-236-234 90 70
Faks: 0-236-234 89 31

Tüm bunlar değerlendirildiği zaman, kullanımını ve ulaşılabilirlikleri kolay, yan etkileri ve toksisitesi az olan beta-laktam grubu antibiyotiklerin bu sorunun çözümünde seçeneğe olabileceği bildirilmiştir [4].

Ancak, diğer birçok bakteri türünde olduğu gibi, *Mycobacterium tuberculosis* kökenleri de beta-laktamaz enzimi üretmekte ve bu enzimler sayesinde beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç göstermektedirler [5]. Bu nedenle, beta-laktam grubu antibiyotiklerin bir beta-laktamaz inhibitörü ile kombine edilmesine gereksinim vardır [4]. Yapılan çalışmalarda, amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonunun *M. tuberculosis* kökenlerine bakterisidal etki gösterdiği ve tedavide seçeneğe olabileceği bildirilmiştir [4,6].

Mycobacterium türlerinin çeşitli ilaçlara karşı *in vitro* duyarlılıklarının araştırılmasında, mutlak konsantrasyon, direnç-oran ve proporsiyon yöntemi gibi birçok yöntem kullanılmaktadır [7]. Son yıllarda bu amaç için E-testinin (Epsilometer) de güvenle kullanılabilmesi birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir [8,9,10].

Bu çalışmada, bir beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile amoksisilin kombinasyonunun *M. tuberculosis* izolatlarına karşı etkinliğinin *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na Ocak 1999-Nisan 2000 yıllarında başvuran hastaların çeşitli klinik örneklerinden, çoğunlukla solunum sisteminden izole edilen ve birinci sıra ilaçlara dirençliliği standart agar proporsiyon yöntemiyle belirlenmiş 40 *M. tuberculosis* izolatı, rastgele yöntemle seçilerek çalışmada kullanılmıştır.

Kökenlerin İzolasyon ve İdentifikasyonu: *M. tuberculosis* kökenleri, Löwenstein Jensen besiyerindeki ilk izolasyon-

larından sonra, standart biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlandı. Kalite kontrol kökeni (standart köken) olarak tüm ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* ATCC 27294 kullanıldı.

Duyarlılık Testi: Amoksisilin-klavulanik asidin E-test şeritleri (0.016-256 µg/ml) AB BIODISK'ten sağlanıp, kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. Löwenstein-Jensen besiyerinden alınan koloniler steril distile suda McFarland No: 3 olacak şekilde homojenize edildikten sonra, %10 OADC içeren Middlebrook 7H10 besiyerine inokülasyon yapıldı. 37°C'de 24 saat bekletildikten sonra, oda ısısına getirilen E-test şeritleri plaklara yerleştirildi. Plaklar, 37°C'de inhibisyon zonu oluşuncaya kadar (5-10 gün) inkübe edildi. İnhibisyon zonunun antibiyotik şeridini kestiği noktadaki konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan *M. tuberculosis* kökenlerinin 33 tanesi birinci sıra ilaçlara duyarlı iken, 1 tanesi streptomisine, 1 tanesi izoniazid ve rifampisine, 5 tanesi ise izoniazid, streptomisin, rifampisin ve etambutole dirençliydi. Kökenlerin 6 tanesi çoklu ilaç direnci göstermekteydi. E-test duyarlılık yönteminin uygulandığı *M. tuberculosis* kökenlerinde, 5 gün sonra rahatlıkla değerlendirilebilecek inhibisyon zonları gözlemlendi. Amoksisilin-klavulanik asidin birinci sıra ilaçlara duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* kökenlerinde MİK dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Kökenlerin %90'ını inhibe eden amoksisilin-klavulanik asit konsantrasyonu MİK₉₀, %50'sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu ise MİK₅₀ olarak değerlendirildi. Buna göre, birinci sıra antimikobakteriyel ilaçlara duyarlı 33 kökenin 32'sinde amoksisilin-klavulanik asidin MİK değeri (MİK₉₀) ≤ 96 mg/ml, 18'inde ise (MİK₅₀) 8 mg/ml olarak saptandı (Tablo 2). ÇİD-tb kökenlerin 3'ü (%50)

Tablo 1. *M. tuberculosis* kökenlerine karşı amoksisilin-klavulanik asidin MİK'lerinin dağılımı

Kökenler	MİK değerleri														
	<math><0.06</math>	0.12	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16	32	48	64	96	128	≥ 256
Duyarlı kökenler (n=33)	4	7	1		2	1	3	2	2	3	2	5			1
Dirençli kökenler (n=7)	1	1								1	1				3

Tablo 2. Duyarlı kökenlere karşı amoksisilin-klavulanik asidin MİK değerleri		
Antibiyotik	MİK (µg/ml)	
	Duyarlı kökenler(n=33)	
	MİK ₅₀ ^a	MİK ₉₀ ^b
Amoksisilin-klavulanik asit	8	96
^a MİK ₅₀ , kökenlerin %50'sini inhibe eden MİK değeri ^b MİK ₉₀ , kökenlerin %90'ını inhibe eden MİK değeri		

amoksisilin-klavulanik asidin 48 mg/ml'lik konsantras-

Tablo 3. Çoklu ilaca dirençli <i>M. tuberculosis</i> kökenlerinde amoksisilin-klavulanik asidin MİK değerleri		
Antibiyotik	MİK (µg/ml)	
	ÇİD ^c kökenler (n=6)	
	MİK ₅₀ ^a	MİK ₉₀ ^b
Amoksisilin-klavulanik asit	48	□256
^a MİK ₅₀ , kökenlerin %50'sini inhibe eden MİK değeri ^b MİK ₉₀ , kökenlerin %90'ını inhibe eden MİK değeri ^c Çoklu ilaca dirençli		

yonlarına duyarlı iken, diğer 3 köken antibiyotiğin □256 mg/ml konsantrasyonlarına dirençli bulundu (Tablo 3).

TARTIŞMA

Tüberküloz için kullanıma ilk giren ilaç olan streptomisin, önceleri monoterapi olarak kullanılmış; ancak, kısa sürede bu ilaca dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmıştır. Daha sonra streptomisin (SM), izoniazid (INH) ve paraminosalisilik asit (PAS) kombinasyonu ile hemen hemen tüm hastalar iyileşmiştir. İlaçların bu başarısı üzerine tüberküloz hastaları, hastane dışında da tedavi edilmeye başlanmıştır. Hastane dışı tedavilerle birlikte hastaların tedavi uyumsuzluk sorunu ortaya çıkmış ve bunun sonucunda dirençli basillerle karşılaşmaya başlanmıştır [10,11]. Bu nedenle Mycobacterium izolatlarının hızlı identifikasyonu ve hızlı duyarlılık yöntemlerinin kullanılması ÇİD-tb kökenlerinin yayılmasının önlenmesi ve tedavi seçenekleri açısından kritik hale gelmiştir [12,13].

Tüberküloz insidansının ve antimikobakteriyel ilaçlara direncin artması nedeniyle, bu sorunu çözebilecek yeni ilaçlara gereksinim duyulmaktadır [4]. Araştırmacılar tarafından, beta-laktam grubu antibiyotiklerin, tüberküloz tedavisinde alternatif olarak kullanılabilirliği konusunda

birçok çalışma yapılmıştır [4,14]. Ancak, *M. tuberculosis* kökenlerinin beta-laktamaz enzimi üretmeleri ve bu enzimleri aracılığıyla beta-laktam grubu antibiyotikleri inaktive etmeleri yeni bir sorunu da beraberinde getirmiştir [15]. *M. tuberculosis*'in beta-laktamaz enzimleri incelendiğinde, Bush sınıflamasına göre Sınıf 2b grubunda yer aldığı ve klavulanik asitle inhibe olduğu belirlenmiştir [5,16].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, *M. tuberculosis* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanmasında E-testinin alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir [8,17].

Çalışmamızda, *M. tuberculosis* izolatlarının amoksisilin-klavulanik aside karşı direnç durumlarının belirlenmesinde E-testinin tercih edilmesi, bu yöntemin diğerlerine göre daha hızlı sonuç vermesi ve basit ve kolay uygulanabilir olmasından kaynaklanmaktadır [9,10,17].

M. tuberculosis kökenleri üzerinde beta-laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğinin incelendiği araştırmalarda, amoksisilin, karbenisilin, seforanid, sefamandol, sefapirin, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam gibi antibiyotiklerin etkin olmadığı; ancak, bu antibiyotiklerin sulbaktam veya klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine edildiğinde etkinliklerinin arttığı gözlenmiştir [4,14,18].

Segura ve arkadaşları amoksisilin-klavulanik asidin etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, birinci sıra anti-tüberküloz ilaçlara duyarlı 24 kökene karşı bu antibiyotiğin MİK₅₀ değerini 16 mg/ml, ÇİD-tb 9 kökende ise MİK₉₀ değerini 32 mg/ml olarak saptamışlardır [4].

Otuz ÇİD-tb kökeninin amoksisilin-klavulanik asit kombinasyonuna karşı duyarlılığının incelendiği benzer bir çalışmada ise amoksisilin-klavulanik asidin MİK₉₀ değeri 2 mg/ml olarak bildirilmiştir [18].

Antimikrobik kombinasyonlarının duyarlı ve ÇİD-tb kökenlerine karşı in vitro etkinliklerini araştıran Bergmann ve arkadaşları, rifabutin ile amoksisilin-klavulanat kombinasyonunun bu kökenlere karşı sinerjik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır [19].

Çalışmamızda, amoksisilin-klavulanik asidin, birinci sıra ilaçlara duyarlı *M. tuberculosis* izolatlarının %55'ine karşı etkili olduğu saptanmıştır. Duyarlı kökenlerde amoksisilin-klavulanik asidin etkinliği literatürle uyumluluk göstermektedir. Ancak, ÇİD-tb kökenlerinde amoksisilin-klavulanik asidin yüksek konsantrasyonlarda (MİK₅₀=48 mg/ml, MİK₉₀ □256 mg/ml) etkin olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın temelinde ülkemizdeki ÇİD-tb kökenlerinin amoksisilin-klavulanik aside direnç göstermesinin rol oynadığını ve bunun yanı sıra çalışmada kullanılan izolat sayısının artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

M. tuberculosis kökenlerinin *in vitro* antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde, kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesinden dolayı E-test yönteminin uygun olacağı ve amoksisilin-klavulanik asidin özellikle birinci sıra ilaçlara duyarlı kökenlere karşı etkin olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cohn DL, Bustreo F, Raviglioni MC. Drug-resistant tuberculosis: Review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (suppl 1): 121-30.
2. Mendez AP, Raviglione MC, Laszlo A, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N Eng J Med* 1998; 338: 1641-9.
3. Çımrın AH. Tüberküloz tedavisinde gelişmeler. *ANKEM Derg* 1994; 8: 217-23.
4. Segura C, Salvado M, Collado I, et al. Contribution of b-lactamases to b-lactam susceptibilities of susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1524-6.
5. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
6. Chambers HF, Kocagöz T, Sipit T, et al. Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 874-7.
7. Akçalı S. Manisa bölgesinden soyutlanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının birinci kuşak anti-tüberküloz ilaçlara *in vitro* duyarlılıkları. Uzmanlık Tezi. S.41, 2000, Manisa.
8. Wanger A, Mills K. E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 1994; 19: 179-81.
9. Hoffner SE, Klintz L, Olsson-Liljequist B, Bolmström A. Evaluation of Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium chelonae* and *M. fortuitum*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1846-9.
10. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1760-4.
11. Akcan Y, Tuncer S, Ünal S. Çoklu ilaca dirençli tüberküloz. *İlaç ve Tedavi Dergisi* 1997; 10: 25-29.
12. Pfaller MA. Applications of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteria*. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:329-37.
13. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 961-79.
14. Chen CH, Yang MH, Lin JS, et al. The *in vitro* activity of beta-lactamase inhibitors in combination with cephalosporins against *M.tuberculosis*. *Proc Natl Sci Coun Repub China B* 1995; 19: 80-4.
15. Neu HC. Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanism to inhibit beta-lactamases. *Am J Med* 1985 (suppl 5B): 2.
16. Hackbarth CJ, Unsal I, Chamber HF. Cloning and sequence analysis of a class A beta-lactamase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1182-5.
17. Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using Etest. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1672-6.
18. Abate G, Miorner H. Susceptibility of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to amoxicillin in combination with clavulanic acid and ethambutol. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 735-40.
19. Bergmann JS, Woods GL. *In vitro* activity of antimicrobial combinations against clinical isolates of susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 621-6.