



doi • 10.5578/tt.7323

Tuberk Toraks 2014;62(2):122-130

Geliş Tarihi/Received: 25.10.2013 • Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 09.03.2014

KLİNİK ÇALIŞMA
RESEARCH ARTICLE

Van yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört farklı yöntemle antimikobakteriyel ajanlara duyarlılık tespiti

Elif Sanem BAYKAL¹
Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU²
Görkem YAMAN³
Mustafa BERKTAŞ⁴

¹ Sağlık Müdürlüğü, Halk Sağlığı, Manisa, Türkiye

¹ Health Department, Public Health, Manisa, Turkey

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Yuzuncu Yil, Van, Turkey

³ İstanbul Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Istanbul Maltepe University, Istanbul, Turkey

⁴ Lokman Hekim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Van, Türkiye

⁴ Department of Medical Microbiology, Lokman Physician Hospital, Van, Turkey

* 24. Ankem Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur (Poster No: 89, 29 Nisan-3 Mayıs, Ölüdeniz/Fethiye, 2009).

ÖZET

Van yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının dört farklı yöntemle antimikobakteriyel ajanlara duyarlılık tespiti

Giriş: Bu çalışmada; hastanemiz mikobakteriyoloji laboratuvarına gönderilen hasta örneklerinden soyutlanan, 58 *Mycobacterium tuberculosis* complex suşunun üç farklı sistem ve agar proporsiyon yöntemiyle majör antitüberküloz ilaçlar olan streptomisin, izoni-azid (INH), rifampisin (RIF) ve etambutol (ETM) duyarlılıklarını tespit etmek ve bu üç sistemin uygulanabilirliğini, hızlarını, özgüllük ve duyarlılıklarını karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu amaçla; mikobakteriyoloji laboratuvarına başvuran hastalardan izole edilen 60 suştan, 58 (%96.6)'i klasik yöntemlerle *M. tuberculosis* complex olarak adlandırılmıştır. Bu suşlara Manuel MGIT AST SIRE sistemi, BacT/ALERT 3D sistemi MB/BacT SIRE kiti, TK anti-TB kiti ve Middlebrook 7H10 besiyerinde agar proporsiyon yöntemleri kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışma sonucunda; agar proporsiyon yöntemi ile Van ilindeki direnç profili değerlendirildiğinde, INH direnç oranının %12 olduğu, bunu %1.7 oranıyla INH + RIF ve %1.7 oranıyla INH + SM dirençlerinin izlediği tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan sistemler direnç ve duyarlılık saptamada tüm ilaçlar için %100 duyarlılığa sahip bulunmuşlardır. INH için özgüllükleri TK anti-TB sisteminde %98, MGIT sisteminde %96 ve MB/BacT sisteminde ise %95 olarak tespit edilmiştir. Üç sistem de, çoklu ilaç direncinde %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. MB/BacT sistemi 1 suşta tek başına yanlış RIF direnci tespit etmiştir. Direnç tespit sürelerine bakıldığında ise en hızlı sistem MGIT sistemidir.

Yazışma Adresi (Address for Correspondence)

Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, VAN - TURKEY
e-mail: hguducu@hotmail.com

Sonuç: *Sonuçlar lke genelinde yapılan çalışmalara göre değerlendirildiğinde ortalama bir değerdedir. Fakat tüberküloz tedavisinde en tehlikeli direnç kalıbı olarak bilinen INH + RIF direncinin varlığı yöremizde yetersiz tedavi programlarının uygulandığına işaret etmektedir. Sonuçta, üç sistem de rutin mikobakteriyoloji laboratuvarları için, duyarlılık tespitinde kullanılabilecek hızlı ve güvenilir yöntemlerdir.*

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis, agar proporsiyon, TK, MGIT, MB/BacT*

SUMMARY

Mycobacterium tuberculosis strains isolated from Van region four different sensitivity detection method antimycobacterial agents

Introduction: *The purpose of this study is detecting the susceptibility rates of 58 Mycobacterium tuberculosis complex strains which were isolated from patient specimens sent to our mycobacteriology laboratory, for major anti-tuberculosis drugs like streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol with three different systems and agar proportion method and compare the accessibility, speed, specificity and sensitivity of these three systems.*

Materials and Methods: *With this purpose, 58 (96.6%) strains out of 60 which were isolated from the patients attended to the mycobacteriology laboratory were identified as M. tuberculosis complex with conventional methods. These strains susceptibilities to four major anti-tuberculosis drugs were detected with Manuel MGIT AST SIRE system, BacT/ALERT 3D system MB/BacT SIRE, TK anti-TB system and compared with reference method in Middlebrook 7H10 media.*

Results: *As a result, INH resistance in Van province with agar proportion method was detected as 12%, followed by INH + RIF resistance of 1.7% and INH + SM resistance of 1.7%. These result compared with other studies conducted country wide are in median range. The systems included in our study were determined to have 100% sensitivity for all of the drugs for detecting resistance and sensitivity rates. Specificities for INH for TK anti-TB, MGIT and MB/BacT were detected as 98%, 96% and 95% respectively. Multidrug resistance rates were detected in 100% sensitivity and specificity with all of the three systems. Only MB/BacT system gave a false negative RIF resistance for 1 strain. Fastest system according to resistance determination times is found to be the MGIT system.*

Conclusion: *However, presence of INH + RIF resistance pattern, indicates inadequate treatment programs in our region. As a result these three systems are fast and reliable systems for antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium spp. to be used in routine mycobacteriology laboratories.*

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, agar proportion, TK, MGIT, MB/BacT*

GİRİş

Dünya Sağlık rgt (DSÖ)'nün verilerine göre 2011 yılında tüm dünyada 8.7 milyon yeni tanı almış olgu bulunmaktadır ve 1.4 milyon insan bu nedenle hayatını kaybetmiştir (1). Ülkemizde ise 15.183' yeni olgu olmak üzere, 2010 yılında toplam 16.551 kayıtlı tüberküloz olgusu bulunmaktadır (2).

Hastalık Kontrol ve nleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) ve DSÖ tarafından tüberkülozun başlangıç tedavisinde primer ilaçların kombine kullanımı önerilmektedir. Bununla birlikte antitüberküloz ilaç direnci önemli bir sorun oluşturmaktadır. Primer antitüberküloz ilaçlardan en azından isoniazid (INH) ve rifampisin (RIF) direnci gösteren izolatlar çok ilaca dirençli (İD) olarak tanımlanmakta ve 2010 yılı için dünyanın çoğu bölgesinde %5'ten daha az oranda saptandığı bildirilmektedir. Ülkemizde de farklı zaman ve bölgelerde yapılan yayınlarda İD tüberküloz izolatlarının oranı (İD-MTC) %4-6 arasında değişmektedir (3).

Yeterli tüberküloz kontrol programı uygulanmayan, tüberküloz oranı ve tedavi uyumsuzluğu yüksek oranda bulunan az gelişmiş yoksul toplumlarda yüksek oranda ilaç direnci bulunduğu bilinmektedir.

Ancak bu toplumlarda eksik ya da hatalı bildirimler, düzensiz kayıtlar ve standardize olmayan laboratuvar sonuçları gibi nedenlerle direnç prevalansları gerçeği yansıtılmamaktadır. Aslında ilaç direnci verilerine en çok gereksinim duyulan, direnç verilerinin en az olduğu bu topluluklardır (4). Uzun süreli ve çoklu antibiyotik tedavisi gerektiren tüberkülozun tanı konduktan sonra en kısa zamanda ve doğru antibiyotik kombinasyonuyla tedaviye başlanması, günümüzde çoklu antibiyotik dirençli suşlarıyla büyük bir problem olan bu hastalığın etkili tedavisinde önemlidir. Bundan dolayı duyarlılık ve tanı testlerinin hızlı ve doğru bir şekilde sonuçlandırılması gerekmektedir. Agar ve yumurta bazlı ve ilerine antibiyotik diskleri veya belirli oranlarda antibiyotik konsantreleri eklenerek yapılan tüberküloz antibiyotik duyarlılık testleri sürelerinin uzun olması yeni arayışları da beraberrinde getirmiştir (5).

Biz de bu çalışmada Van yöresinde tespit edilen *Mycobacterium tuberculosis* complex kökenlerinin, tedavide ilk seçilecek ilaçlar olan dört majör antitüberküloz ilaca karşı direnç profillerini ortaya koymak ve rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında uygulanan hızlı ve güvenilir ticari yöntemleri agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Laboratuvarımıza tüberküloz ön tanılı hastalardan, kültür istemiyle gönderilmiş klinik örneklerden (balgam, mide açlık suyu, idrar, beyin omurilik sıvısı, trakeal aspirat vb.) soyutlanan 60 suş çalışmaya alındı. Bu suşlardan Niasin testi pozitif, nitrat redüksiyonu pozitif, ısıya stabil katalaz test negatif, pigment üretimi negatif, 37°C'de üreme hızı yavaş olan ve TK PNB (Salubris AŞ.; Türkiye) besiyerinde üreyen 58 izolat *M. tuberculosis* complex olarak tanımlandı ve çalışmaya alındı. Çalışmada kontrol kökeni olarak *M. tuberculosis* ATCC H37Rv suşu kullanıldı.

Çalışmaya alınan 58 suş ve kontrol suşunun streptomisin (SM), INH, RIF, etambutol (EMB)'e karşı duyarlılıkları Manuel MGIT AST SIRE sistemi (Becton Dickonson and Company-USA), BacT/ALERT 3D sistemi MB/BacT ve SIRE kiti (bioMérieux SA-Fransa), TK anti-TB & PNB KIT (Salubris A.Ş.; Türkiye) ve altın standart olarak kabul edilen agar proporsiyon (orantı) yöntemleri kullanılarak test edildi. Sistemlerde kullanılan antibiyotiklerin dozları Tablo 1'de verilmiştir.

BacT/ALERT® 3D Sistemi

Bu çalışmada; antibiyotik bulunan şişe pozitif bulunmaz veya direkt kontrolden daha büyük ve proporsiyonel kontrolden daha büyük saptama zamanına sahipse, mikobakteri duyarlı olarak raporlandı. Antibiyotik bulunan şişe, direkt kontrole eşit veya daha büyük ancak proporsiyonel kontrole eşit veya daha az pozitif saptama zamanına sahipse mikobakteri o antimikobakteriyele dirençli olarak raporlandı. On beş gün içinde direkt kontrol ve/veya proporsiyonel kontrol şişesi pozitif sonuç vermezse test iptal edilerek tekrarlandı.

BBL MGIT AST SIRE Sistemi

Bu çalışmada; ekimi takiben üçüncü günden itibaren tüpler günlük olarak 365 nm uzun dalga boyunda uv translüminatörlü MGIT okuyucuda okutuldu. Kontrol MGIT tüpü pozitif olduğunda, ilaçlı MGIT tüplerinin sonuçları değerlendirildi. Kontrol MGIT tüpü negatif ise tekrar inkübe edilmeye devam edildi. Kontrol MGIT tüpü 12 gün boyunca takip edildi. Eğer 12. gün

sonunda hala negatife test tekrar edildi. İlaçlı MGIT tüpü, kontrol tüpünün floresan vermesinden itibaren iki gün geçtiği halde hala floresan vermiyorsa negatif (duyarlı) olarak raporlandı. Bunun tersine ilaç içeren MGIT tüpü, kontrol tüpünün floresan vermesi esnasında veya floresandan itibaren iki gün içinde floresan veriyorsa pozitif (dirençli) olarak rapor edildi.

TK ANTI-TB & PNB KİT

Bu çalışmada; Test, TK Medium® tüpü sarıya döndüğü zaman değerlendirilmeye alındı. Bir suşa ait TK Medium tüpü sarıya döndüğü zaman, içerilerinde antimikobakteriyel ilaç bulunan tüplerden rengi sarıya dönen yani üremenin pozitif olduğu tüp hangi antimikobakteriyele aitse o suş, o antimikobakteriyele dirençli olarak, rengi kırmızı kalmış tüplerdeki antimikobakteriyellere ise duyarlı olarak raporlandı.

AGAR PROPORSİYON (ORANTI) YÖNTEMİ

Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyerleri her biri 200 mL'lik olacak şekilde 8 balon joje içinde hazırlandı. Her bir 200 mL'lik 7H10 agar besiyerinin hazırlanması için; bir cam balon joje içine, 180 mL distile su, 3.8 g 7H10 agar besiyeri ve 1 mL gliserol eklenerek ısı kaynağı üzerinde eritildi (üretici firmanın önerdiği şekilde). Otoklavda 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edildi.

Daha sonra 50-55°C'lik su banyosunda soğumaya bırakıldı. Besiyerlerinin sıcaklığı 50-55°C'ye indiğinde içlerine zenginleştirici olarak 20 mL OADC (oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz) karışımı eklendi.

İlaç Dilüsyonlarının Hazırlanması

Antibiyotiklerin steril distile su ile veya uygun çözücüler ile (streptomisin, izoniazid ve etambutol için distile su, rifampisin için metanol) 10.000 µg/mL'lik (en az 1000 µg/mL olmalı) stok solüsyonları hazırlandı. Stok solüsyonlar hazırlanırken gerekli miktar antibiyotikler üzerinde belirtilen potens (% veya µg/mg) dikkate alınarak şu formüle göre hesaplandı:

Ağırlık (mg) = Hacim (mL) x istenilen konsantrasyon (µg/mL) / Potens (µg/mg)

Tablo 1. Sistemler ve kullanılan antibiyotik dozları

	İzoniazid	Streptomisin	Etambutol	Rifampisin
Agar proporsiyon	0.2 µg/mL 2.0 µg/mL	2.0 µg/mL	5 µg/mL	1 µg/mL
MGIT AST SIRE	0.1 µg/mL	0.8 µg/mL	3.5 µg/mL	1 µg/mL
BACT-ALERT	0.1 µg/mL	1.0 µg/mL	5 µg/mL	1 µg/mL
TK-TB	0.2 µg/mL	2.0 µg/mL	30 µg/mL	1 µg/mL

Streptomisin Solüsyonunun Hazırlanması

Potensi= 800 mg/g

125 mg streptomisin sülfat 10 mL distile su içinde eritildi. Böylece 10.000 µg/mL olan solüsyon elde edildi. Solüsyon 0.22 µm por çaplı membran filtrelerinden geçirilerek sterilize edildi. Steril edilen 10.000 µg/mL'lik stok solüsyondan, 1 mL alınarak 9 mL steril distile su üzerine eklendi. Böylece 1000 µg/mL'lik bir solüsyon elde edilmiş oldu. Bu solüsyondan 0.4 mL alınarak 55°C'ye soğutulmuş üzeri antibiyotik ismiyle etiketlenmiş 200 mL besiyerine eklendi. Böylece son konsantrasyonu 2 µg/mL olan streptomisinli besiyeri elde edilmiş oldu.

1000 µg/mL'lik stok solüsyondan 2 mL alınarak, 55°C'ye soğutulmuş üzeri antibiyotik ismiyle etiketlenmiş 200 mL besiyerine eklendi ve son konsantrasyonu 10 µg/mL olan streptomisinli besiyeri elde edilmiş oldu.

İzoniazid (INH) Solüsyonunun Hazırlanması

Potensi= 1000 mg/g

100 mg (100.000 µg) izoniazid 10 mL distile su içinde çözdürüldü. Böylece 10.000 µg/mL INH solüsyonu elde edildi. Solüsyon 0.22 µm'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Steril 10.000 µg/mL'lik stok solüsyondan 1 mL alınarak 9 mL distile su ile karıştırıldı ve 1000 µg/mL'lik bir solüsyondan da 1 mL alınıp 9 mL distile su ile karıştırıldığında, 100 µg/mL'lik stok solüsyon elde edildi. 100 µg/mL'lik stok solüsyondan 0.4 mL alınarak 55°C'ye soğutulmuş 200 mL Middlebrook 7H10 agar besiyerine eklenerek, mililitresinde 0.2 µg INH olacak şekilde besiyeri elde edilmiş oldu.

100 µg/mL'lik stok solüsyondan 2 mL alınarak, 55°C'ye soğutulmuş 200 mL Middlebrook 7H10 agar besiyerine eklenerek, mililitresinde 1 µg INH olan besiyeri elde edilmiş oldu.

Rifampisin Solüsyonunun hazırlanması

Potensi= 1000 mg/g

100 mg rifampisin 10 mL metanol içinde eritildi. Böylece 10.000 µg/ml rifampisin solüsyonu elde edildi. Solüsyon 0.22 µm'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi. Steril 10.000 µg/mL'lik stok solüsyondan 1 mL alınarak, 9 mL distile su ile karıştırıldı ve böylece mililitresinde 1000 µg rifampisin bulunan bir solüsyon oluşturuldu.

Bu solüsyondan 0.2 mL alınarak, 55°C'ye soğutulmuş 200 mL Middlebrook 7H10 agar besiyerine eklenerek, mililitresinde 1 µg rifampisin bulunan bir besiyeri elde edilmiş oldu.

Etambutol Solüsyonunun Hazırlanması

Potensi= 1000 mg/g

100 mg (100.000 µg) etambutol, 10 mL steril distile su içinde çözdürüldü. Böylece 10.000 µg/mL etambutol solüsyonu elde edildi. Solüsyon 0.22 µm'lik membran filtresinden geçirilerek sterilize edildi. 10.000 µg/mL'lik solüsyonundan 1 mL alınarak 9 mL distile su ile karıştırılarak mililitresinde 1000 µg etambutol olan solüsyon elde edildi.

Bu solüsyondan 1.2 mL alınarak soğutulmuş 200 mL besiyerine eklendi. Böylece 6 µg/mL'lik etambutollu besiyeri elde edildi.

Bu şekilde hazırlanan ilaç stok solüsyonları ağzı kapalı ependorf tüplerinde 2 mL'lik hacimlere bölünerek -80°C'de altı ay boyunca saklanabilmektedir. Çalışmadan önce oda ısısında zdrlmeleri gerekir.

Hazırlanan ilaçlı ve ilaçsız besiyerleri, daha önceden hazırlanmış ve etiketlenmiş dört bölmeli steril plastik petri plaklarına (Felsen plakları) her bölmeye 5 mL olacak şekilde Tablo 2'de belirtilen düzende döküldü. Dökülen besiyerleri direkt ışıktan korunarak, kapakları yarı acık şekilde biyogüvenlik sınıf 2 kabin içinde kurumaya bırakıldı. Daha sonra deliksiz plastik torbalara konularak +4°C'de saklandı.

Mikobakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Çalışmaya alınan Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilmiş *M. tuberculosis* complex olarak isimlendirilmiş kökenler steril tek kullanımlık plastik zeler yardımıyla bol miktarda (besiyerinden almamaya dikkat edilerek) toplandı. İçinde 8-10 adet cam boncuk ve 5-6 mL Middlebrook 7H9 broth bulunan hasta isimleri ile etiketlenmiş steril cam tüplerdeki

Tablo 2. Middlebrook 7H10 agar ile agar proporsiyon yönteminde ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerinin dört bölmeli petri plaklarına (Felsen plakları) dökülme düzeni ve ilaçların konsantrasyonları

Plaklar	Bölme	Antibiyotik içerikleri
1	1	İlaçsız (kontrol)
	2	İzoniazid 0.2 µg/mL
	3	Streptomisin 2 µg/mL
	4	Rifampisin 1 µg/mL
2	1	İlaçsız (kontrol)
	2	İzoniazid 1 µg/mL
	3	Streptomisin 10 µg/mL
	4	Etambutol 5 µg/mL

sıvı besiyerine emulsifiye edildi. 1-2 dakika süreyle tüpler vorteksleildi. Büyük partiküllerin çökmesi ve oluşan aerosollerin azalması için 20 dakika süreyle tüp bekletildi. Süpernatant, steril pastör pipeti yardımıyla etiketlenmiş boş bir steril cam tüpe alındı. Gerektiğinde sıvı besiyeri ekleyerek süspansiyonun bulanıklığı McFarland No: 1'e ayarlandı (yaklaşık 10^7 CFU/mL).

Daha sonra steril distile suyla etiketlenmiş boş steril cam tüplerde bu süspansiyonun 10-2 (1/100) ve 10-4 (1/10.000) dilüsyonları hazırlandı.

İnokülasyon ve İnkübasyon

Çalışmaya alınan her bir *M. tuberculosis* complex için; iki set test besiyeri (1 ve 2 nolu plakların her birinden ikişer tane) oda ısısına getirildi. Plak yüzeylerinin kuru olmasına dikkat edildi. Petri plakları hasta kültür numarası ve dilüsyon oranlarını gösterecek şekilde (setlerden biri 10-2, diğeri 10-4) işaretlendi. Önce 1 nolu setin her bir bölmesine önceden hazırlanmış olan 10-2 basil dilüsyonundan steril ölçekli pastör pipeti kullanılarak, 0.1'er mL inoküle edildi. Sonra 2 nolu set için aynı işlem 10-4 dilüsyon ile tekrarlandı. İnokülumun saf olup olmadığını kontrol etmek amacıyla dilüe edilmemiş süspansiyondan 1-2 damla, bir adet kanlı agar besiyerine ekildi. İnokülumun besiyerlerine absorbe olması için, inoküle edilen plaklar agarlı tarafı aşağıda olacak şekilde oda ısısında kabin içinde yaklaşık 1 saat süreyle bekletildi. Daha sonra her bir petri plağı CO_2 geçirgen torbalara konularak $36^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı.

Bu çalışmada; inkübasyonun ilk yedi gününde kontaminant bakteri varlığı açısından kanlı agarlar incelendi. Kontaminasyon saptanılan testler iptal edilerek, tekrarlandı. Test besiyerlerinde ise antibiyotiksiz kontrol bölmeleri üç hafta boyunca her hafta incelendi. Üçüncü hafta sonunda üreme yetersizse, test tekrar edildi. Üç haftadan önce kontrol kadranında sayılabilir düzeyde 50'den fazla koloni (+1 veya daha fazla) saptanması halinde plaklar değerlendirilmeye alındı. İnkübasyon sonunda tüm kadranlardaki koloniler sayılarak Tablo 2'ye göre kantite edildi. "Direnc oranı (%)= ilaçlı bölmedeki koloni sayısı x 100 / kontrol bölmesindeki koloni sayısı" formülü uygulanarak direnc oranı %1 olan sonuçlar dirençli; < %1 tespit edilenler ise duyarlı olarak raporlandı. Karşılaştırma yapılırken aynı dilüsyonlardaki üremeler kullanıldı ve değerlendirilmede, kontrol bölmelerindeki koloni sayısı 4+ olan dilüsyonlar değerlendirmeye alındı. Bu durumda tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlılık tespit edildiyse sonuç raporlandı. Fakat tek bir antitüberküloz ilaca direnc görülmesi durumunda test yoğun inokülum şüphesiyle iptal edilerek tekrarlandı.

Kalite Kontrol

Çalışmada kullanılan tüm sistemler tüm ilaçlara duyarlı olduğu bilinen *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) kalite kontrol suşu ile kontrol edildi.

İstatistiksel Yorum

Sistemlerin direnc ve duyarlılık tespitlerindeki özgüllük, duyarlılık ve genel uyumları agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırılarak kappanın istatistiği ile değerlendirilmiştir. Kappa değerlerine göre uyum:

0.81-1.00 değer aralığında mükemmel

0.61-0.80 değer aralığında güçlü

0.41-0.60 değer aralığında belirgin

0.10-0.40 değer aralığında zayıf

< 0.10 değer aralığında ise uyum yok olarak yorumlanmıştır (6).

İlaçların duyarlılık zamanı (gün) olarak sistemler arasında fark olup olmadığı ise tek yönlü varyant analizi (One-ONAVA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Tüberküloz ön tanılı, farklı hastalardan kültür istemiyle mikobakteriyoloji laboratuvarımıza gönderilmiş ve LJ besiyerlerinde üretilmiş 60 suştan 58 tanesi (%96.6) *M. tuberculosis* complex olarak tanımlandı ve çalışmaya alındı. Elli sekiz suşun 47 (%81)'si balgam, 11 (%19)'i ise akciğer dışı tüberküloz örneklerinden (3 lenf drenajı, 2 beyin omurilik sıvısı, 2 plevral mayi, 2 idrar, 2 mide açlık sıvısı) izole edildi. Hastaların 48'i yeni olgu olup 10'u daha önce tedavi almış hastalardı.

Çalışmaya alınan 58 suşun 49 (%84.5)'u agar proporsiyon yöntemiyle tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlı olarak bulunurken, diğer sistemlerde bu sayı sırasıyla Manuel MGIT'da 47 (%81), MB/BacT'da 45 (%77.6), TK anti-TB'de 48 (%82.8) olarak tespit edildi. Agar proporsiyon yöntemiyle INH'nin 0.2 g/mL'lik konsantrasyonuna 7 (%12) suşta direnc saptanmış ve bu 7 suş INH'ye düşük düzey dirençli olarak kabul edilmiştir. Yüksek düzey INH direnci ise tespit edilmemiştir. Diğer sistemlerde de aynı 7 suş INH dirençli bulunmuştur. Manuel MGIT AST SIRE sistemi, bu 7 suşun dışında 2 (%15.5) suşta, MB/BacT 3 (%17.3) suşta, TK anti-TB ise 1 (%13.8) suşta daha tek başına INH direnci saptamıştır. Agar proporsiyon yöntemiyle streptomisine ve izoniazide dirençli 1 (%1.7) suş saptanmış ve bu suş tüm sistemler tarafından tespit edilmiştir. Manuel MGIT, MB/BacT, TK anti-TB ve agar proporsiyon yöntemiyle RIF'a, 1 (%1.7) suşta direnc saptanırken bu suş aynı zamanda INH direnci

de taşımaktadır. Bu direnç dışında MB/BacT sistemi tek başına 1 suşta RIF direnci tespit etmiştir (Tablo 3).

Daha önce tedavi almış 10 hastadan birinde INH direnci tespit edilirken, diğer 9 hastanın izolatu tüm antitüberküloz ilaçlara duyarlı bulunmuştur.

Sistemlerin direnç ve duyarlılık tespit etmedeki özgüllük, duyarlılık ve genel uyumları agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Tablo 4'te sistemlerin agar proporsiyon yöntemine göre direnç tespit etmede özgüllük, duyarlılık genel uyumları ve kappa değerleri görülmektedir.

Bu doğrultuda; MGIT AST SIRE sistemiyle 58 suşun 47'sinde tüm majör antitüberküloz ilaçlara duyarlılık tespit edilmiştir. Agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırıldıklarında özgüllük, duyarlılık ve genel uyumu sırasıyla %96, %100 ve %97 olarak hesaplanmıştır. Kappa değerleri 0.87 olarak bulunmuş ve duyarlılık saptamada sistem mkemmell uyumlu olarak yorumlanmıştır. MGIT AST SIRE sistemi agar proporsiyonla tespit edilen tek başına INH dirençli 7 suşu doğru olarak tespit etmiş fakat 2 INH duyarlı suşu dirençli olarak raporlamıştır. Buna göre özgüllük, duyarlılık ve genel uyumu sırayla %96, %100, %96 bulunmuştur. Kappa değerleri 0.81'dir. Tek başına SM, RIF ve EMB'ye direnç tespit edilmemiş ve sistem duyarlılık tespiti açısından agar proporsiyonla tam olarak (%100) uyumlu bulunmuştur. Çoklu direnç için de durum aynıdır. Bir suşta INH + RIF ve bir suşta da INH + streptomisin (SM) direnci tespit edilmiş ve agar proporsiyonla tam uyum göstermiştir (%100).

BacT/ALERT 3D sistemi MB/BacT SIRE kiti ile 58 suşun 45'inde tüm majör antitüberküloz ilaçlara duyarlılık tespit edilmiş ve özgüllük, duyarlılık ve genel uyumları referans yöntem olan agar proporsiyonla karşılaştırılarak sırasıyla %92, %100 ve %93 olarak bulunmuştur. Hesaplanan kappa değerleri 0.78 dir ve güçlü bir uyumdan bahsedilir.

Buna göre agar proporsiyon yöntemiyle INH'ye direnç saptanan 7 suş sistem tarafından tespit edilmiş fakat INH duyarlı 3 suş sistem tarafından yanlış dirençli olarak raporlanmıştır. INH duyarlılık tespitinde sistemin özgüllük, duyarlılık, genel uyum ve kappa değerleri sırasıyla %94, %100, %95, 0.84 olarak hesaplanmıştır. Agar proporsiyon yöntemiyle tek başına RIF direnci saptanmamışken BacT/ALERT 3D sistemi, MB/BacT SIRE kitiyle 1 suşta yanlış direnç tespit edilmiştir. RIF için sırasıyla özgüllük %98, duyarlılık %100, genel uyum %98 hesaplanmış kappa değerleri 0.91 olarak bulunmuştur. EMB, SM ve çoklu ilaç direnci için tüm değerler %100'dr.

TK anti-TB sistemiyle duyarlılık saptamada özgüllük, duyarlılık ve genel uyum sırasıyla %98, %100, %98 ve kapa değerleri 0.93 hesaplanmış ve mkemmell uyuma sahip bulunmuştur.

Ayrıca IHN için %98 özgüllük, %100 duyarlılık ve %98 genel uyuma sahip olup kappa değerleri 0.91'dir. Diğer ilaçlar için değerler %100'dr.

İlaçların duyarlılığını tespit etme zamanı (gün) olarak sistemler arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla; tek yönlü varyans analizi (One-ANOVA) yapılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda; ilaçların duyarlılığını tespit etme zamanı bakımından her üç sistem arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 5).

Buna göre MGIT sistemiyle ortalama 5 günde (min 3; maks 7), TK anti-TB sistemiyle ortalama 11.7 günde (min 7; maks 20), MB/BacT sistemiyle ortalama 13.6 günde (min 8; maks 22) duyarlılıklar tespit edilmiştir.

TARTIşMA

Günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılan primer antitüberküloz ilaçlar, INH, RIF, SM, ETM ve pirazinamidir. Tüberkülozda etkenin kısa sürede tanınması, ilaç direncinin saptanması ve ilaçların uygun dozlarda uygulanması son derece önemlidir. Bu nedenle klasik laboratuvar tanı yöntemleri yanında hızlı sonuç veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir yeni kültür yöntemleri ile moleküler biyoloji teknikleri geliştirilmektedir. Antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimini saptamak için *M. tuberculosis* kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesinde, DSÖ tarafından sıvı (7H12 besiyeri kullanılan ticari sistemler) ve katı [proporsiyon yöntemi (Middlebrook 7H10/7H11 agar veya Löwenstein-Jensen: LJ)] bazlı yöntemler önerilmektedir (7).

Çalışmaya toplam 58 *M. tuberculosis* complex suşu alınmış olup, bu suşlardan 48'i yeni olgulardan, 10'u ise daha önce tedavi almış olgulardan izole edilmiştir ve bu 10'u sadece birinde INH direncine rastlanmıştır. Bu sayıların bölgemizdeki primer ve sekonder direnç oranlarını doğru yansıtmayacağı düşünülerek primer ve sekonder direnç şeklinde bir değerlendirmeye gidilmemiştir.

Aslan ve arkadaşları, Baylan ve arkadaşları, Durmaz ve arkadaşları, Yaylı ve arkadaşları, Karadağ ve arkadaşları, Orhan ve arkadaşları ile Tansel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda INH dirençleri sırasıyla %14.3, %7.9, %10.22, %9.3, %8, %13.93, %9 şeklinde olup, bizim çalışmamızda olduğu gibi tekli INH

Tablo 3. Agar proporsiyon yöntemi ve diğer sistemlerin saptadıkları dirençli suş sayıları ve yüzdeleri

Antibiyotik duyarlılıkları	Sistemler			
	Agar proporsiyon n (%)	Manuel MGIT n (%)	MB/BacT n (%)	TK anti-TB n (%)
Tümüne duyarlı	49 (84.5)	47 (81)	45 (77.6)	48 (82.8)
Tek başına INH direnci	7 (12)	9 (15.5)	10 (17.3)	8 (13.8)
Tek başına RIF direnci	-	-	1 (1.7)	-
INH + RIF	1 (1.7)	1 (1.7)	1 (1.7)	1 (1.7)
INH + SM	1 (1.7)	1 (1.7)	1 (1.7)	1 (1.7)
Toplam çoklu ilaç direnci	2 (3.4)	2 (3.4)	2 (3.4)	2 (3.4)

INH: İsoniazid, RIF: Rifampisin, SM: Streptomisin

Tablo 4. Sistemler ve agar proporsiyon yöntemiyle karşılaştırılmalı ilaç duyarlılıklarının özgüllük, duyarlılık, genel uyum ve kappa değerleri

İlaçlar	MB/BacT				MGIT				TK anti-TB			
	Özgüllük	Duyarlılık	Genel uyum	Kappa değeri	Özgüllük	Duyarlılık	Genel uyum	Kappa değeri	Özgüllük	Duyarlılık	Genel uyum	Kappa değeri
Tümüne duyarlı	%92	%100	%93	0.78 güçlü	%96	%100	%97	0.87 güçlü	%98	%100	%98	0.93 mükemmel
Tek başına INH	%94	%100	%95	0.81 güçlü	%96	%100	%96	0.81 güçlü	%98	%100	%98	0.91 mükemmel
Tek başına RIF	%98	%100	%98	0.60 belirgin	%100	%100	%100	1 mükemmel	%100	%100	%100	1 mükemmel
INH + RIF	%100	%100	%100	1 mükemmel	%100	%100	%100	1 mükemmel	%100	%100	%100	1 mükemmel
INH + SM	%100	%100	%100	1 mükemmel	%100	%100	%100	1 mükemmel	%98	%100	%98	1 mükemmel

Tablo 5. Sistemler ve duyarlılık saptama süreleri (gün)

Sistemler	Suş sayısı	Ortalama	Hata	St. sapma	Minimum	Maksimum
MB/BacT	58	14.000	0.388	2.953	8	22
TK anti-TB	58	11.000	0.424	3.227	7	20
MGIT	58	5.000	0.164	1.248	3	7

* Ortalamalar arasındaki fark anlamlıdır (p< 0.01).

dirençleri diğer dirençlere göre yüksektir (8-14). Bu çalışmada ikili ilaç direncinde INH ile birlikte RIF'e ve SM'ye direnç tespit edilmiştir. Bu durumda RIF ve SM'ye %1.7'lik bir direnç söz konusudur. İki ilaca direnç oranı ise %3.4'tür. EMB direnci ise yoktur. Durmaz ve arkadaşlarının, Yaylı ve arkadaşlarının, şenol ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda çoklu ilaç direnci sırasıyla %2.26, %2.7, %2 bulunmuştur (10,11,15). Çalışılan suş sayısı, gerçek direnç durumunu göstermek için yetersiz olsa da saptanan ilaç direnç oranları, tedaviye doğru yön vermek adına, ilaç duyarlılık testi çalışmalarının yapılması gerektiğini göstermesi bakımından önemlidir. Çalışmada saptanan %12 oranında bir INH direnci göz ardı edilmemelidir. Yöresel, primer INH direncinin %4'n üstünde olması durumunda en az dört antitüberküloz ilaçla tedaviye başlanması ilkesi nedeniyle, bu değer bölgemizdeki tedavi seçeneğini yönlendirmesi açısından da ayrı bir öneme sahiptir (16).

Yurt dışında ise 1997 yılında MGIT sistemiyle INH ve RIF duyarlılığı üzerine çalışılmış ve BACTEC 460 sistemi ile karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışma sonucunda genel uyum INH için %97.3, RIF için %100 bulunmuştur (17). Bu alışmada MGIT sisteminin genel uyumu INH için %96 bulunmuştur.

1999 yılında Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada ise MGIT sistemi yine BACTEC 460 TB sistemiyle karşılaştırılmış, uyumsuz sonuçlar proporsiyon yöntemiyle tekrar analiz edilmiştir (18). Çalışma sonucunda INH, RIF ve SM için genel uyum %99 bulunmuştur. 3.75 µg/mL'lik konsantrasyonda çalışıldığında EMB için doğruluk seviyesi %98 olarak tespit edilmiştir.

2000-2001 yılında Avrupa ve Amerika'da yapılan çalışmalarda MGIT AST SIRE sistemi agar proporsiyon metoduyla karşılaştırılmış ve dört majör anti-tüberküloza duyarlılık tespitinde genel uyumda %95.3 ile %100 arasında değerler tespit edilmiştir (19-21). Bu çalışmada ise manuel MGIT sisteminin dört majör anti-tüberküloza duyarlılık tespitinde genel uyumu %97, INH'de özgüllük ve duyarlılık sırasıyla %94 ve %100 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada, EMB'ye karşı dirençli suş bulunmadığından MGIT sisteminin EMB direncini saptamadaki başarısı değerlendirilememiştir.

Manuel MGIT sistemiyle yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Tam otomatize bir sistem olan MGIT 960 sistemi bu sistemin yerini almış görünmektedir. Manuel MGIT sistemi, özellikle MDR-TB suşlarının hızlı tespitinde referans sistem BACTEC 460 sistemi kadar güvenilir olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (17,19,21). Bu çalışmada da diğer bir referans yn-

tem olan agar proporsiyonla duyarlılık genel uyumu ve özellikle INH direncinde güçlü bir uyum söz konusudur.

Wing Wai Yew, Steena Ching Wa Tong'un 2001 yılında yaptıkları MB/BacT sistemiyle agar proporsiyon yönteminin karşılaştırılmalı çalışmasında, iki metod arasında genel uyum SM (1 µg/mL) için %99, INH (1 µg/mL) için %95.2, RIF (1 µg/mL) içinse %100 olarak bulunmuştur (22). 2006 yılında BacT/ALERT 3D sistemiyle DSÖ ait 80 suş kullanılarak yapılan bir çalışmada, INH (0.09 mg/L) için duyarlılık %100, zgllk %95, EMB (1.8 mg/L) içinse sırasıyla %100 ve %98 bulunmuştur (21). Yapılan bu iki çalışmada ve bu çalışmada INH için duyarlılık %100 bulunmuştur. Çalışmada antibiyotiklere direnç sayısı az olduğu için karşılaştırma yapmak doğru bulunmamıştır.

Duyarlılık tespit zamanlarına bakıldığında MGIT sistemi en hızlı sistem olarak görülmektedir. MB/BacT sisteminde ortalama süre 13.6 gün olarak tespit edilmiştir. Bu süre uzun gibi görünse de; çalışmada, indirekt inokülum (LJ besiyerinde üretilmiş suşlardan 1.0 McFarland hazırlanarak) kullanıldığından, MB/BacT alışma prosedür gereği olarak hazırlanan 1.0 McFarland'lık inokülum, cihaza yüklenmiş ve üreme tespitinden sonra suşlar duyarlılık testine tabii tutulmuşlardır. Cihazın ortalama üretim zamanı 8.55 gün (min 3-maks 20 gün) olarak bulunmuştur. MB/BacT sisteminin ortalama tespit zamanının yüksek çıkması buna bağlanabilir. Tüm sistemler indirekt inokülum ile çalışıldığından bu süre MB/BacT sisteminde duyarlılık tespit zamanının içinde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak çalışmada; standart ve referans yöntem olan agar proporsiyon yöntemiyle, tekli ilaç direnci olarak sadece INH'ye karşı direnç tespit edilmiş olup, tüm sistemler %100 duyarlılıkla (gerçek direnlileri tespit etme yeteneği) INH direncini tespit etmişlerdir. Agar proporsiyon yöntemiyle bir suşta INH + RIF (MDR) ve bir suşta da INH + SM direnci tespit edilmiş, tüm sistemler tarafından bu suşlar %100 duyarlılık ve %100 özgüllükle bulunmuşlardır. Her üç sistemin de, yapılan diğer çalışmalarda belirtildiği gibi, majör anti-tüberküloz ilaçlar olan INH, SM, EMB ve RIF için duyarlılık tespitinde, rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılabilir; iř gücü az, hızlı ve güvenilir yöntemler olduğu görülmektedir.

Ülkemizde toplumun tümünü yansıtan, güvenilir, standardize edilmiş direnç raporları bulunmamakla birlikte, değişik merkezlerden bildirilen raporlar direnç sorununun küçümsenmeyecek boyutta olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmaların ışığında, etkili tüberküloz tedavisinin sağlanabilmesi için ülke genelinde, ülke gerçekleriyle bağlantılı olarak hızlı, güvenilir, standardize edilmiş hem izolasyon-identifikasyon, hem de duyarlılık testlerinin yapılabildiği sistemlerin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında kullanıma girmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bildirilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Global tuberculosis Report 2012, Erişim tarihi: 10 Eylül 2013. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
2. Öz Y, Aslan M, Akşit F, Durmaz G, Kiraz N. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının değerlendirilmesi. ANKEM 2012;26(Suppl 1):20-4.
3. World Health Organization, Global tuberculosis control: WHO Report, WHO, Geneva 2011.
4. Aslan G, Delialioğlu N, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniazid, rifampisin, streptomisin ve etambutol duyarlılıklarının BACTEC yöntemi ile belirlenmesi. ANKEM 2005;19(1):43-7.
5. Öztürkeri H, Emekdaş G, Kocabeyoğlu Ö, Gözüaçık A. Tüberküloz basillerinin major antitüberküloz ilaçlara duyarlılığının saptanmasında E-test ile BACTEC yönteminin karşılaştırılması. ANKEM 2000;14(1):1-4.
6. Keskin S. İki yönlü (contingency) tablolarda kappa istatistiğinin kullanımı, *Biyoteknoloji (Kükem) Derg* 2001;25(1):53-7.
7. Dibek AM. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin MB/BacT sistemi ile ilaç duyarlılıklarını saptanması ve sistemin standardize edilmesi (Uzmanlık tezi). İzmir: Ege Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 1999.
8. Aslan G, Delialioğlu N, Yıldız Ç, Direkel Ş, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığının belirlenmesinde BACTEC 460 ve agar proporsiyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2007;21(2):75-80.
9. Baylan O, Kısa Ö, Albay A, Doğançlı L. Mikobakteriyoloji laboratuvarımızda 2002 yılında tüberküloz olgularından izole edilen *M.tuberculosis* kompleks (MTC) suşları ve antitüberküloz ilaç duyarlılık sonuçları. *Gülhane Tıp Derg* 2003;45(3):256-62.
10. Durmaz R, Özerol IH, Durmaz B, Günel S, Şenoğlu A, Evliyaoğlu E. Primary drug resistance and molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in a population with high tuberculosis incidence in Turkey. *Microb Drug Resist* 2003;9(4):361-6.
11. Yaylı G, Sözen H, Ağalar C. Isparta yöresinde izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003;33(1):24-30.
12. Karadağ A, Tokaç M, Güvenli A, Sünbül M, Günaydın M, Saniç A. Klinik örneklerden izole edilen tüberküloz basili kompleksinin majör antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. ANKEM 2004;18(4):189-92.
13. Orhan G, Zer Y, Balcı İ, Bayram A, Korkmaz G. Mikobakteriyoloji laboratuvarında incelenen örneklerin retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2002;32(3-4):225-9.
14. Tansel Ö, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaçlara direnci: Trakya üniversitesi hastanesinin iki yıllık sonuçları. *İnfeksiyon Derg* 2003;17(1):23-6.
15. Şenol G, Coşkun M, Biçmen C, Erer OF. Aktif akciğer tüberkülozlu hastalardan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis* kökenlerinin ilaç direnç oranlarının değerlendirilmesi. *Klinik Derg* 2006;19(2):71-4.
16. Oktun M, Akata F, Karabay O, Tabakoğlu E, Tuğrul M, Dündar V. Trakya Üniversitesi Hastanesi'ne 1996 yılı içinde başvuran tüberkülozlu olgularda antitüberküloz ilaçlara direnç sorunu. *İnfeksiyon Derg* 1997;3(11):191-6.
17. Bergman JS, Woods GL. *Mycobacterial Growth indicator tube for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampisin*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28(3):153-6.
18. Rüscher Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the *Mycobacteria Growth Indicator Tube* for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first line drug. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):45-8.
19. Canbau E, Truffot Pernot C, Boulahbal F, Wichlacz C, Grosset J, Jarlier V. *Mycobacterial Growth Indicator Tube* versus the proportion method on Löwenstein Jensen for antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(12):938-42.
20. Macondo EA, Ba F, Gaye-Diallo A, Toure-Kane NC, Kaire O, Gueye-Ndiaye A, et al. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by the *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT AST SIRE). *Clin Microbiol Infect* 2000;6(7):363-7.
21. Bergman JS, Fish G, Woods GL. Evaluation of BBL MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) AST SIRE system for antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to 4 primary antituberculous drugs. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(1):82-6.
22. Wing Wai Y, Steena CWT, Kin SL, Simon Kwok FL, Chi Hung C, Elaine PW. Comparison of MB/BacT system and agar proportion method in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:229-32.