

İLAÇ DİRENCİNİN TESPİTİ

Dr.Meltem Uzun
İstanbul Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
uzun.meltem@yahoo.com

DSÖ'nün 2013 verilerine göre,

- 9.0 milyon kişide tb gelişti (2012'de 8.6 milyon)
- 9.0 milyon olgunun 1.1 milyonu (% 13) HIV +
- 1.5 milyon kişi hayatını kaybetti (HIV pozitif 360.000 ölüm dahil)
- HIV koinfeksiyonu en yüksek Afrika'da (%34)
- Güney Afrika'da HIV koinfeksiyonu >%50

- 2000-2013 arasında etkili tedavi ve uygulanan tanı stratejileri sayesinde 37 milyon kişinin hayatı kurtuldu
- Global TB Report 2014 . WHO/HTM/TB/2014.08

ÇİD

480.000 kişi ÇİD-tb
210.000 ÖLÜM

- ▶ Yeni tanı koyulan olguların %3.5'i ve bunlar arasında önceden tedavi görenlerin %20.5'i ÇİD-tb

PT tanısı alan hastaların tahmini 300.000 'i ÇİD-tb

ÇİD-tb en yüksek → **Yarıdan fazlası üç ülkede:**
Hindistan-Çin-Rusya Federasyonu

(Buradaki bazı ülkelerde yeni olguların %20'den fazlası ve bunlar arasında önceden tedavi görmüşlerin %50'si ÇİD-tb)

Tahmini **2.9 milyon kayıp olgu** var *(12 ülkede)*

(Tanı almamış ya da tanı almış ama ulusal tb programına bildirilmemiş)

Hindistan (tüm olguların %31'i)

Güney Afrika

Bangladeş

Pakistan

Endonezya

Çin

Kongo Demokratik Cum.

Mozambik

Nijerya

Etiyopya

Filipinler

Myanmar

Yaygın İlaç Dirençli TB

(extensively drug resistant=XDR = Yaygın ilaç direnci=YİD)

ÇİD + herhangi bir kinolon + üç enjektebl ilaçtan birine
(kapreomisin, kanamisin, amikasin) dirençli

2013 sonunda en az 1 YİD-tb olgusu bildiren ülke



100

ÇİD-tb hastalarının ► **%9.0' u** (2008'de %5.4'ü)



YİD-tb

Global Plan to Stop TB 2011-2015 Hedefler

2015 yılı sonuna kadar, önceden tedavi almış hastalar arasında,

ÇİD-tb'u %20 azaltmak

2015 yılı sonuna kadar, tahmin edilen tüm ÇİD-tb

hastalarının en az %85'ine tanı koymak

ve,

ÇİD-tb olduğu bildirilen tüm hastaların en az

%75'ini başarılı bir şekilde tedavi etmek

Plan başarılı bir şekilde uygulanırsa

- ❖ 250.000 yeni ÇİD-tb ve 13.000 YİD-tb hastasının oluşumu engellenecek,
- ❖ Tahminen 225.000 ÇİD-tb hastasına tanı koyulacak,
- ❖ Bunların en az 127.000'i başarılı bir şekilde tedavi edilecek ,
- ❖ Böylece, ÇİD-tb'un yayılması engellenecek ve yaklaşık 120.000 kişi hayatta kalacak..

ÇİD-tb tanısında kullanılan duyarlılık yöntemleri

Fenotipik yöntemler:

Konvansiyonel

- Direnç oranı yöntemi
- Mutlak konsantrasyon yöntemi
- **Agar proporsiyon (orantı) yöntemi**
- **MGIT 960 (sıvı besiyeri)**
- **Versa TREK (sıvı besiyeri)**

Konvansiyonel olmayan

- İlaç duyarlılığının mikroskopta gözlemi (MODS)
- İnce tabaka agar (TLA)
- Faj temelli yöntemler

Kolorimetrik redoks indikatör yöntemleri

- Nitrat Redüktaz Deneyi(NRA)
- Rezasurin (Alamar mavisi)
- MTT
- XTT

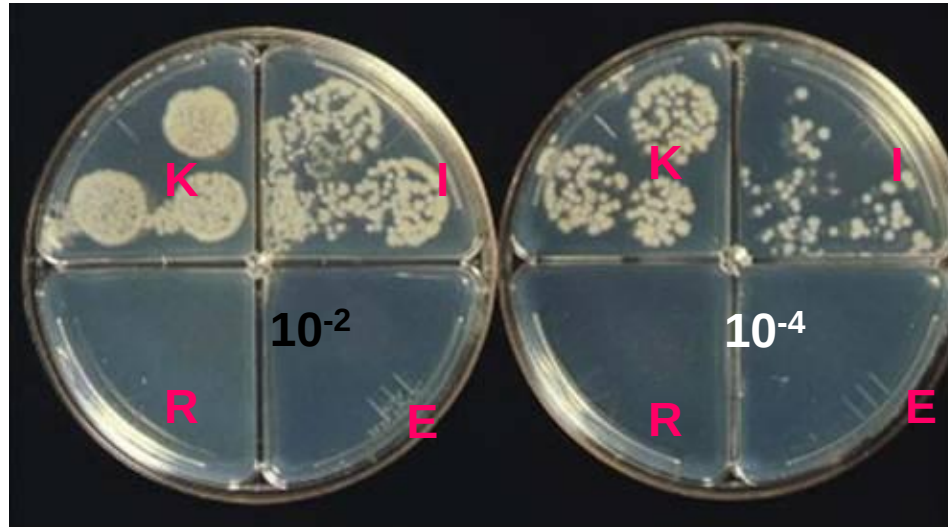
Genotipik yöntemler

- ❖ Real-time PCR (GeneXpert MTB/Rif)
- ❖ Line-prob yöntemleri
 - * Inno-Lipa Rif TB
 - * Genotype MTBDR*plus*

Konvansiyonel Yöntemler

Proporsiyon (orantı) yöntemi

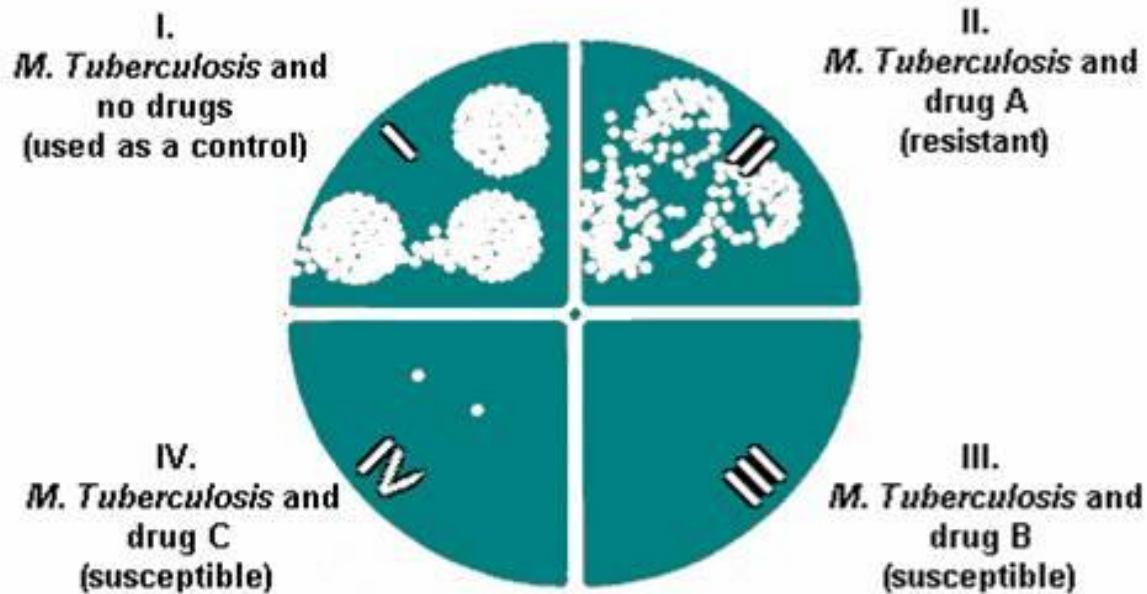
- Sık kullanılan güvenilir bir yöntemdir.
- Yüksek ve düşük dilüsyonlu inokulümler hazırlanarak, denenecek suş ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilir.



İlaçlı b.y. de üreyen
koloni sayısı

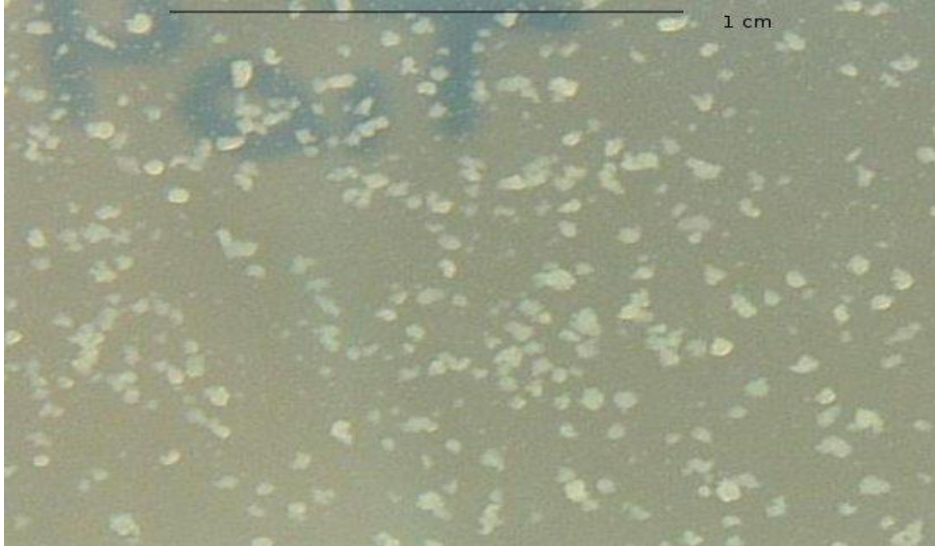
$\geq \%1$ (KP) ► R

İlaçsız b.y. de üreyen
koloni sayısı



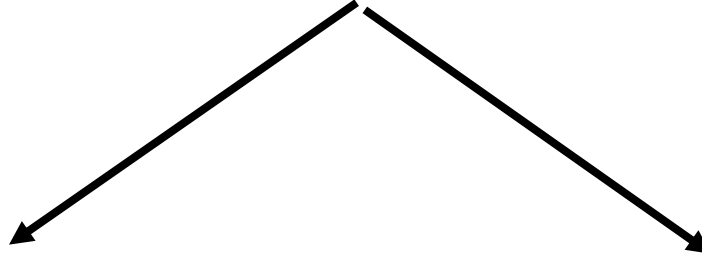
Besiyeri

- Löwenstein-Jensen (LJ)
- Middlebrook 7H10-7H11



CLSI, MB7H10 besiyerinde yapılan proporsiyon test yöntemini referans yöntem olarak kabul etmektedir (**Agar Proporsiyon Yöntemi**)

Proporsiyon yöntemi



Direkt test

Dekontamine ve konsantre edilmiş, ARB pozitif örnek kullanılır.



İndirekt test

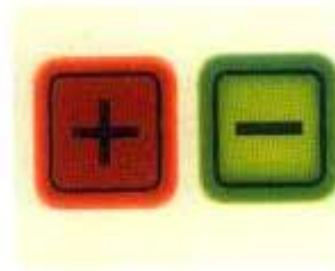
Primer kültürde üremiş, saf bakteri kolonileri kullanılır.

MGIT 960 sistemi

- ❖ Tam otomatize, radyometrik olmayan
- ❖ Besiyerinin dibindeki silikon içine floresan gömülüdür.
- ❖ Floresan madde sıvı besiyerindeki oksijen varlığına duyarlıdır.
- ❖ Üreyen mikobakterilerin oksijeni kullanması sonucu floresans oluşur.



- **MGIT 960 cihazı;**
floresansı sürekli izler,
sonuçları otomatik olarak
yorumlar, 1/100 kontrol ve
ilaçlı besiyerlerinde floresan
oluşup oluşmamasına göre
suşun denenen ilaca dirençli
ya da duyarlı olduğunu bildirir.



- Versa TREK sisteminde duyarlılık testi(sıvı besiyeri)
- Tam otomatize ve sürekli moniterize durumda olan bir kültür sistemidir.Sistemde, kullanılan besiyerlerinin üzerindeki boşlukta biriken gaz basıncı değişiklikleri otomatik olarak her 24 saatte bir ölçülerek değerlendirme yapılır ve bu değerlendirme grafiksel olarak bir monitöre yansıtılır. Beklenen, üreme varlığında oksijen basıncında azalma, karbondioksit basıncında artış olmasıdır.Sistemde uygulanan duyarlılık deneyinde de, ilaçlı ve ilaçsız (kontrol) besiyerlerindeki gaz basıncı değişiklikleri karşılaştırılarak değerlendirme yapılır ve sonuçlar kaydedilir.



Konvansiyonel olmayan yöntemler

İlaç duyarlılığının mikroskopta gözlemi (MODS)

- 7H9 sıvı besiyeri
- Doku kültürü plakları
- Direkt veya indirekt uygulanabilir
- Direkt uygulamada 8-12 günde sonuç almak mümkün.
- Dekontamine ve homojenize edilmiş balgam örnekleri ilaçsız kontrol ve INH ve RIF içeren kuyucuklara ekildikten sonra, plakların üzeri kapatılır → $CO_2+37\text{ }^{\circ}C$
- *Plaklar hergün invert mikroskopta incelenerek M. tuberculosis'in oluşturduğu kord formasyonu araştırılır.*
- *Kontrol ve ilaçlı kuyucuklarda üreme olması suşun o ilaca dirençli olduğunu gösterir.*



TB MODS TEST KIT*

- Detects the presence of viable *Mycobacterium tuberculosis* and...
- Performs susceptibility testing simultaneously and within the same procedure.
- Detects resistance to **both** isoniazid and rifampicin; the two most commonly used drugs for therapy.
- Uses liquid culture for accelerated growth.
- Detects susceptible, mono-resistant, and multi-drug resistant (MDR) TB usually within a 5 to 10 day incubation period.
- Utilizes the TB cording phenomenon for identification, which is easily viewed with an inverted microscope.
- Can be used to monitor patients on therapy. Detects only living organisms.
- Cost effective and labor saving at the price of approximately \$5.00 per test.
- Ready-to-use antibiotics available in an easy-to-dissolve tablet. No measuring, weighing, or mixing needed.
- All vials and reagents are color coded to simplify and error-proof the procedure.
- Unique protective flexible silicone sealing lid for increased safety. Tray remains permanently sealed throughout the entire incubation and examination procedure. Safety lid can be easily pierced with a needle/syringe if sub-culturing or rapid speciation is necessary.
- Formulated in a standardized, ready-to-use kit format complete with 24-well trays and color coded vials.
- Kit contains all necessary components. No need to source from multiple vendors.
- No expensive capital equipment required. Utilizes an inverted microscope (approximately \$2,500 USD). See below.



TB MODS Kit - a complete, simplified, and standardized system.



Color coded ready-to-use reagents



MODS Antibiotic Tablets



MODS Sealing Lid for safety



Inverted Microscope

For use with the TB MODS KIT™

The VanGuard inverted microscope is recommended for use with the MODS procedure. This trinocular brightfield microscope uses a 30W light source and features Infinity Corrected Optics. It comes with 4x and 10x fluorite objectives for 40x and 100x total magnification. Five year warranty.

110 volts, each..... 1491INIMODS
220 volts, each..... 1491INIMODS220



Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay
A standardized and accelerated liquid culture and direct susceptibility testing method for *Mycobacterium tuberculosis*.



HARDY
DIAGNOSTICS
A Culture of Service™

phone: (800) 266-2222
fax: (805) 614-9274
website: www.HardyDiagnostics.com
email: Sales@HardyDiagnostics.com

1430 West McCoy Lane
Santa Maria, 93455 CA
USA

*Not currently for sale within the United States.

080410H

MODS / MGIT 960

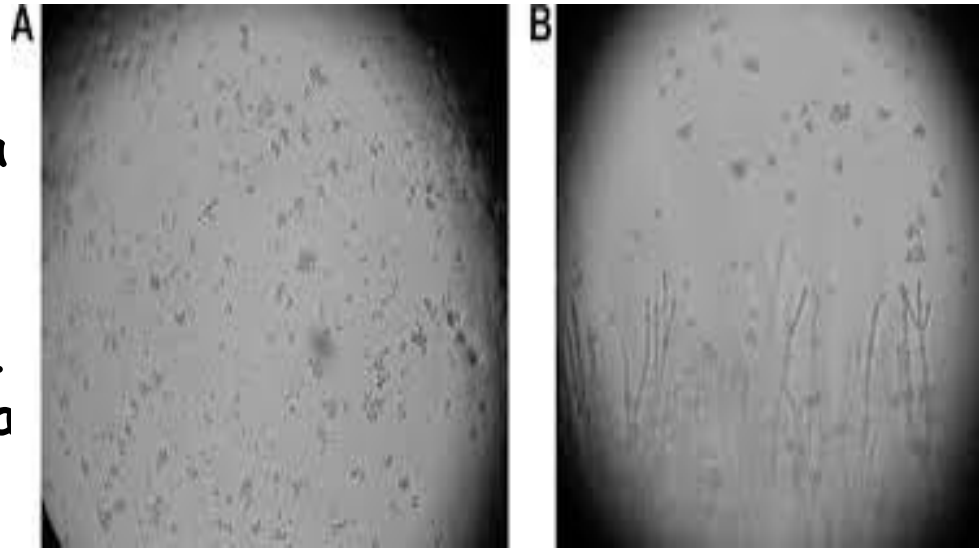
- Preparat (+) balgam örneklerinde
- INH %92.9 Rif %95.5 ÇİD %97.3 uyum
- ÇİD-tb saptamada
- Duyarlılık %95.3 PPV %97.6
- Özgüllük %98.6 NPV %97.1
- Sonuç alma süresi ortalama 8 gün (5-21) *
- 18 yayın → direkt yöntem → meta-analiz
- 6 yayın MODS → Rif için toplam (pooled)
 - duyarlılık %96
 - özgüllük %96
- INH için toplam (pooled)
 - duyarlılık %92
 - özgüllük %96 **

* Int J Tuberc Lung Dis 2012; 16(7):941-46.

** BMC Infect Dis 2009; 9:67.

İnce tabaka agar (TLA)

- Besiyeri Middlebrook 7H10-11 agar
- Katı besiyerinde ilaçlı ve ilaçsız (kontrol) kadranlarda süşun **kord ve mikrokoloni oluşturmaları** ve bu oluşumların **mikroskopta incelenmesi** esasına dayanır.
- Preparat (+) örneklerde kısa sürede ÇİD-tb tanısı koymak mümkün, preparat (-) lerde süre çok daha uzun.
- Standart yöntemle %100 uyumlu sonuçlar alınıyor ancak daha çok çalışmaya gerek var.
- Clin Lab Med 2012;111-127



Kolorimetrik redoks indikatör yöntemleri

Nitrat Redüktaz Deneyi (NRA)

- Canlı bakterilerin nitroredüktaz enzimini kullanarak nitratı→ nitrite indirgemesi ve bu reaksiyonun, besiyerinde bulunan Griess ayıracı sayesinde belirlenmesi esasına dayanır.İndirgeme reaksiyonu sonucu besiyerinin rengi **pembeden mora** dönüşür.
- Rezasurin gibi farklı indikatörler kullanılabilir (maviden pembeye)
- **Renk değişiminin olması süşun ürediğini ve o ilaca dirençli olduğunu gösterir.**
- Konvansiyonel L-J besiyerinde direkt ve indirekt yöntem kullanılabilir.
- Sonuç alma süresi ortalama 10-14 gün,
- Örnek başına maliyet 3.58 Dolar.
- Düşük ve orta gelirli ülkelerde tavsiye ediliyor.



NRA/Proporsiyon (7H11 agar)

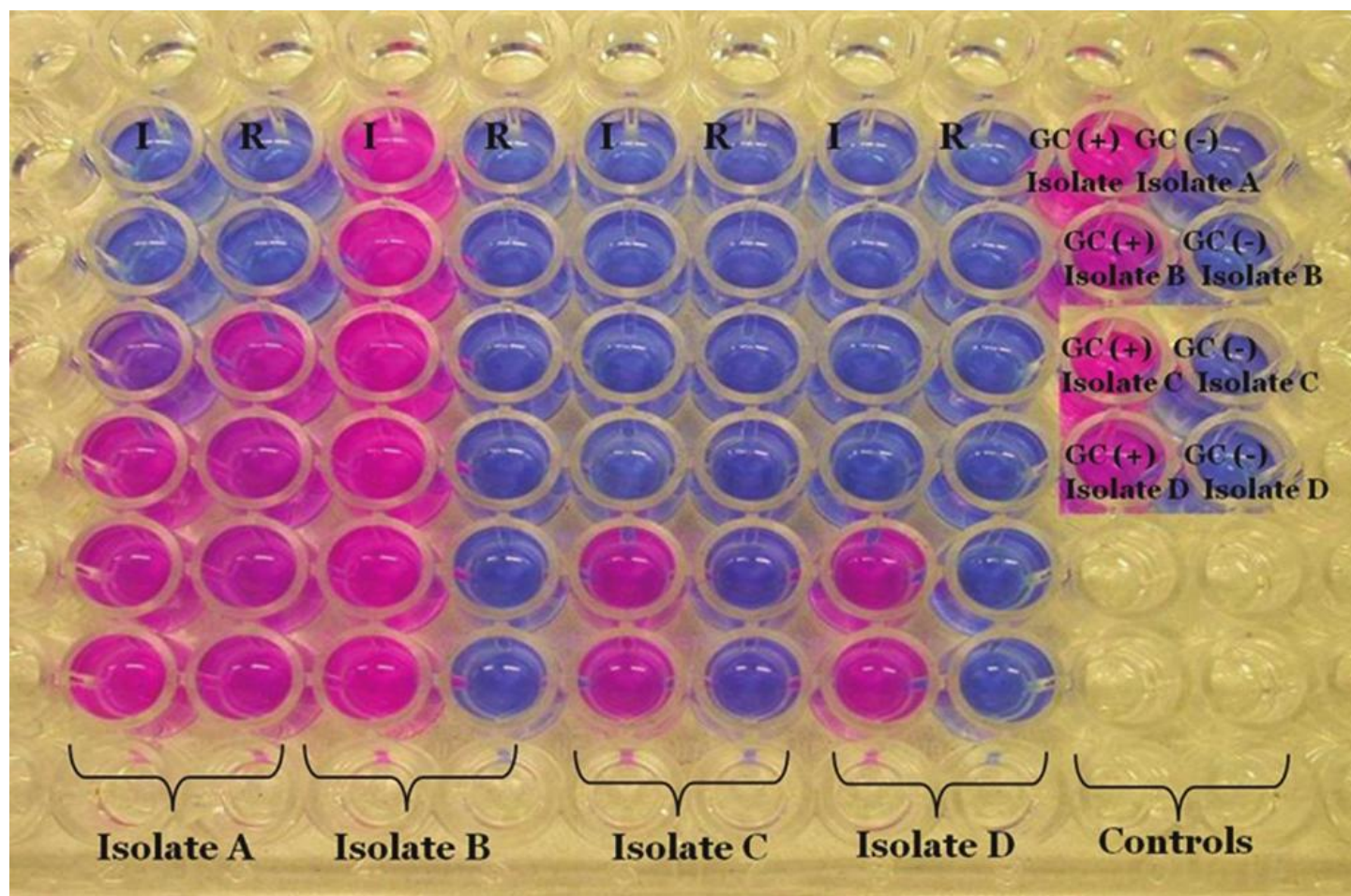
- 37 tamamen duyarlı, 88 ÇİD, 12 YİD, 11 poliresistan → farklı bölgelerden toplanmış 148 M.tb
- Duyarlılık RIF %97 - %100 özgüllük
INH %99 - %95
OFX %100 - %95.7
KM %94.6 - %99 *
- 6 farklı ülke çok merkezli ► Samsun ► MGIT 960 - LJ
Prep (+) balgam örneklerinden ekim ► Direkt yöntem
RIF için doğruluk %93.7-%100 3 merkez ► 21 gün
INH %88.2-%100 1 merkez ► 13.9 gün
OFX %94.6-%100 1 merkez ► 18.4 gün
KM %100 1 merkez ► 16.2gün **

* Int J Tuberc Lung Dis 2012;16:110-113

** JAC 2014 ;69 :441-4.

Rezasurin (Alamar mavisi)- MTT-XTT (Tetrazolyum tuzları)

- Middlebrook 7H9 besiyeri + OADC
- *M. tuberculosis*'in üremesine bağlı olarak antitüberküloz ilaç içeren besiyerlerinin indirgeme reaksiyonu sonucu renginin değişmesi esasına dayanır.
- *Besiyerinin renginde değişiklik meydana gelmesi bakterinin o ilaca dirençli olduğunu gösterir.*
- Mikroplaklarda ilaçların MIC değerlerini saptamak mümkün, aynı anda birden çok suş denenebilir.
- Ortalama sonuç süresi 4-14 gün.
- MGIT 960 ile aynı sürede sonuç vermesi açısından düşük ve orta gelirli ülkelerde tavsiye ediliyor.

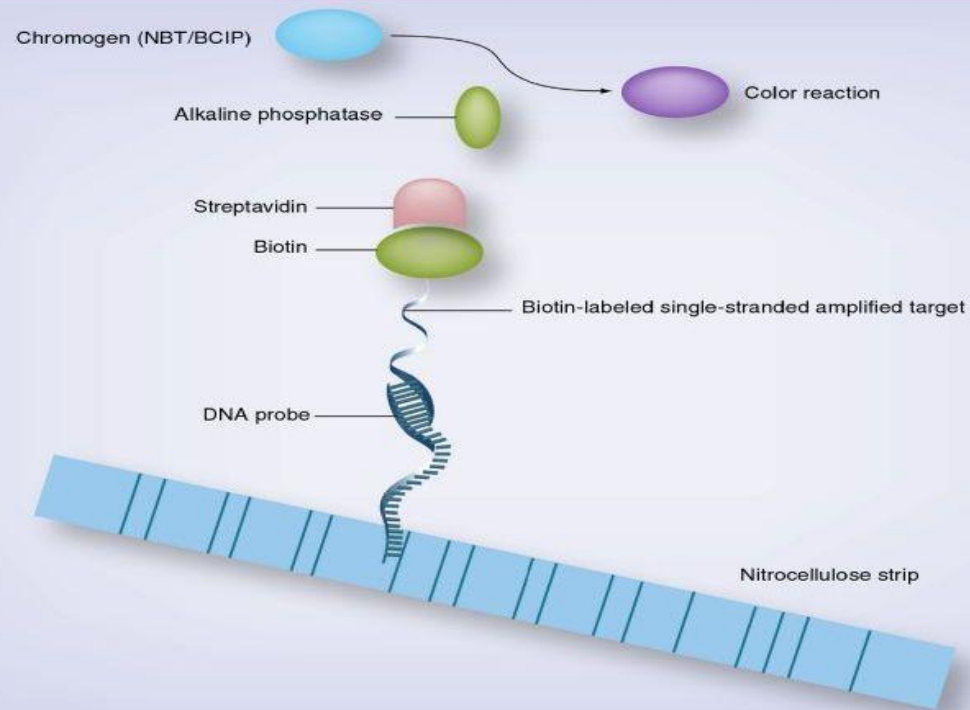


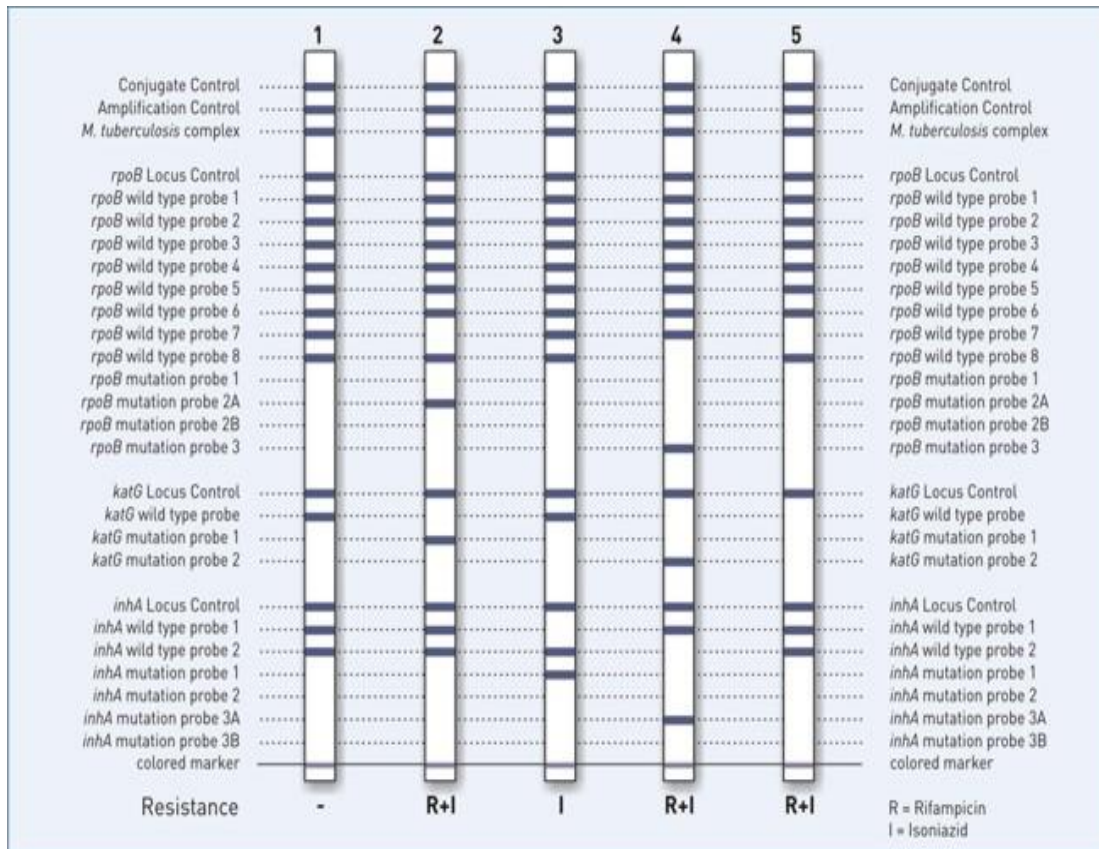
Genotipik yöntemler

- ❖ Real-time PCR (GeneXpert MTB/Rif)
- ❖ Line-prob yöntemleri
 - * Inno-Lipa Rif TB (Innogenetics NV, Ghent, Belgium)
 - * Genotype MTBDR*plus* (Hain Lifesciences, Nehren, Germany)

Belli genlerin spesifik bölgelerindeki belirli mutasyonları saptamaya yönelik testler. İşaretle PCR ürünlerinin bir strip üzerindeki oligonükleotid problemleri ile hibridize olduğu yerde kolorimetrik olarak saptanan bir çizgi meydana gelir.

- Rifampine dirençli suşların %90-95'i *rpoB* geninde mutasyona sahip
- Isoniazide dirençli suşların %70-80'i *katG-inhA* geninde mutasyona sahip.

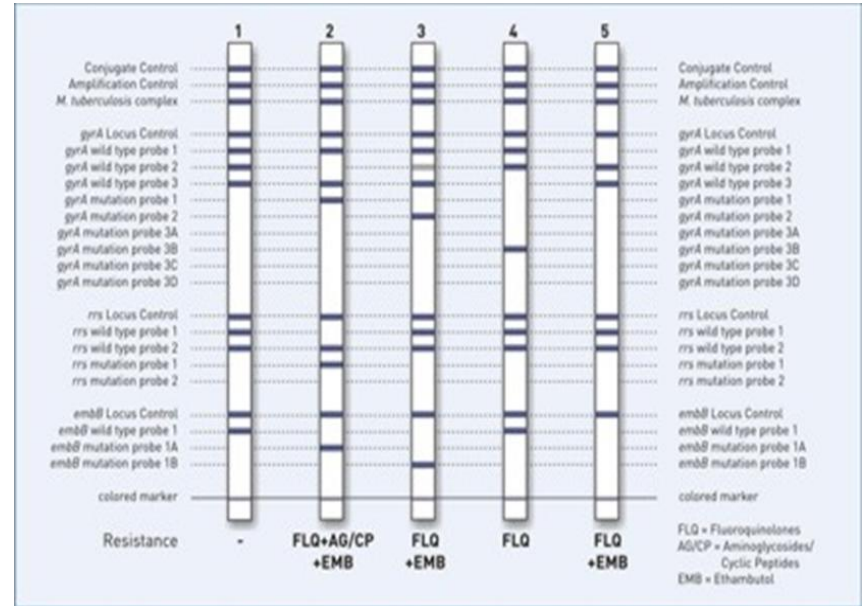




Genotype MTBDRplus

İkinci kuşak ilaçlara direnç (YİD)

- Agar proporsiyon yöntemi
- MGIT 960 sistemi
- Kolorimetrik redoks indikatör yöntemleri (Rezaurin-MTT-NRA)
- İkinci jenerasyon line-prob (DSÖ bazı bölgelerde duyarlılığını yeterli bulmadı)
- **Genotype MTBDRs/** (Hain Lifesciences, Nehren, Germany)
- Prep(+)**pulmoner örnekler veya suş**
- **Fluorokinolon direnci**
(*gyrA* geninde mutasyon)
- **Enjektabl ilaçlara direnç**
(*rrs* geninde mutasyon)
- **Etambutol direnci**
(*emb* geninde mutasyon)



- ❖ OFX için duyarlılık %91 Özgüllük %98.4 PPV %99
Enjektabl ilaçlar için uyum %100
ETM için duyarlılık %56.2 özgüllük %81*
 - ❖ 342 ÇİD suş (Genotype MTBDRs//Agar proporsiyon-G.Afrika))
OFX için Duyarlılık %70.3 Özgüllük %97.7
KM %25 %98.7
CPM %21.2 %98.7
ETM %56.3 %56 **
 - ❖ 200 suş → 170 ÇİD → Doğu Avrupa'daki 4 ülkeden
Fluorokinolon duyarlılığı %92.3 özgüllük%100 PPV%100 NPV%93.9
Enjektabl ilaçlar için %41.7 özgüllük%100 PPV%100 NPV %62.3
YİD tanısı %22.6 özgüllük %100 PPV%100 ***
 - ❖ Vietnam'da mutasyonların çoğu *eis* geninde (*rrs*'ye ek olarak) bu nedenle kitin enjektabl ilaçları saptamadaki duyarlılığı düşük. ****
- Bu gendeki mutasyonların saptanmasına yönelik problr eklenmeli→ kanamisin Orta Asya ve Doğu Avrupa'da tedavide yaygın olarak kullanılıyor.

* Med Clin N Am 97 (2013);553-579

*** J Clin Microbiol 2012;50:1593-7

** Int J Tuberc Lung Dis 2012; 16:104-9.

**** J. Clin. Microbiol 2011;49:2502-8

Real-time PCR

- GeneXpert MTB/RIF (Cepheid Inc., ABD), direkt örnekten *M. tuberculosis* ve RIF'e direnci birlikte saptayan tek tam otomatize real-time PCR (izlenebilir/gerçek zamanlı) temelli kartuş testtir.
- Nükleik asit amplifikasyonu ve real time PCR kapalı sistem içinde uygulanır. Nükleik asit amplifikasyonu cihazda gerçekleştiğinden insan gücü gerekmez ve kaynakları kısıtlı ülkeler için bu durum avantaj olarak görülmektedir..
- Sistemde kullanılan primerler *rpoB* geninin 81 baz çiftinden oluşan merkez bölgesini çoğaltır. Bazı suşlarda mutasyon farklı bir bölgedeyse, bu yöntemle RIF'e direnç saptanamayabilir

