



ANTİ-TÜBERKÜLOZ İLAÇ DUYARLILIK TESTLERİ ve TÜRKİYE VERİLERİ

Dr. Ali ALBAY

**Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Tıbbi Mikrobiyoloji. AD. Öğretim Üyesi**



Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Başkanlığı



Tüberküloz tüm dünyada özellikle Asya ve Afrika'da önemli bir hastalık ve ölüm sebebi

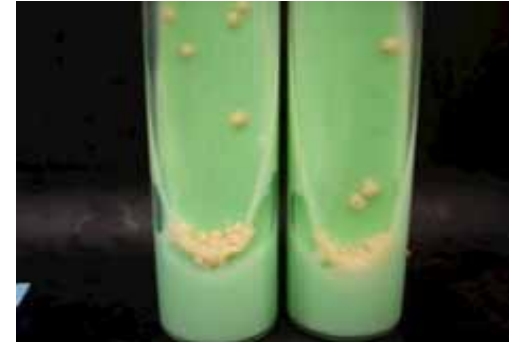
***Mycobacterium tuberculosis*, tek bir infeksiyöz ajana bağlı ölümlerin sebebi olarak ilk sıralarda**

➤ **DSÖ'ne göre 2008 yılında;**

- * 9.4 milyon yeni vaka**
- * 4.1 milyon kişi yeni yayma pozitif (toplam vakaların ~ %44'ü)**
- * Global insidans 139/100000**
- * 1.3 milyon HIV (-) ölüm**
- * 0.52 milyon kişi HIV (+) ölüm**
- * Toplam ~ 1.8 milyon kişi**

Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yaklaşımlar;

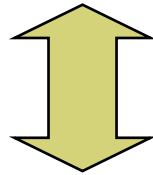
- ☐ Aside dirençli boyama ve mikroskopi
- ☐ Katı veya sıvı besiyerine ekim
- ☐ Basilin tanımlanması
- ☐ Antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması



****Moleküler tanı yöntemleri**



CDC (Centers for Disease Control and Prevention)



☐ Her hasta için kültürde izole edilen ilk *M. tuberculosis* izolatına duyarlılık testi

☐ Üç aylık tedaviden sonra,

* kültür pozitifliği devam eden
veya

* klinik yanıtı zayıf olan her
hasta da testin tekrarı

CLSI'a göre

□ Primer İlaçlar

- İzoniazid
- Rifampisin
- Etambutol
- Pirazinamid

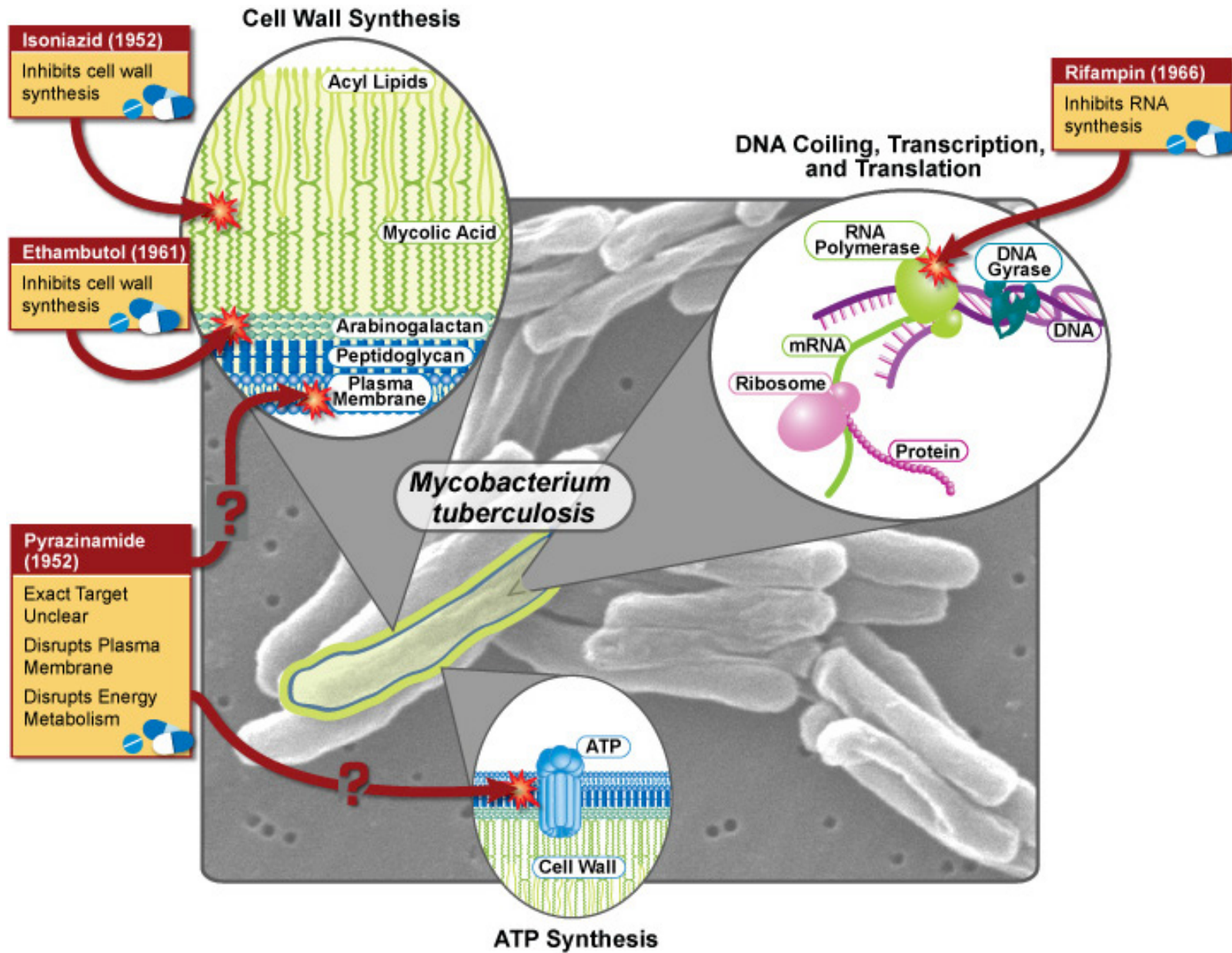
□ Sekonder ilaçlar

- Streptomisin
- Kapreomisin
- Etionamid
- Kanamisin
- Kinolonlar
- Rifabutin
- PAS

Ülkemizde

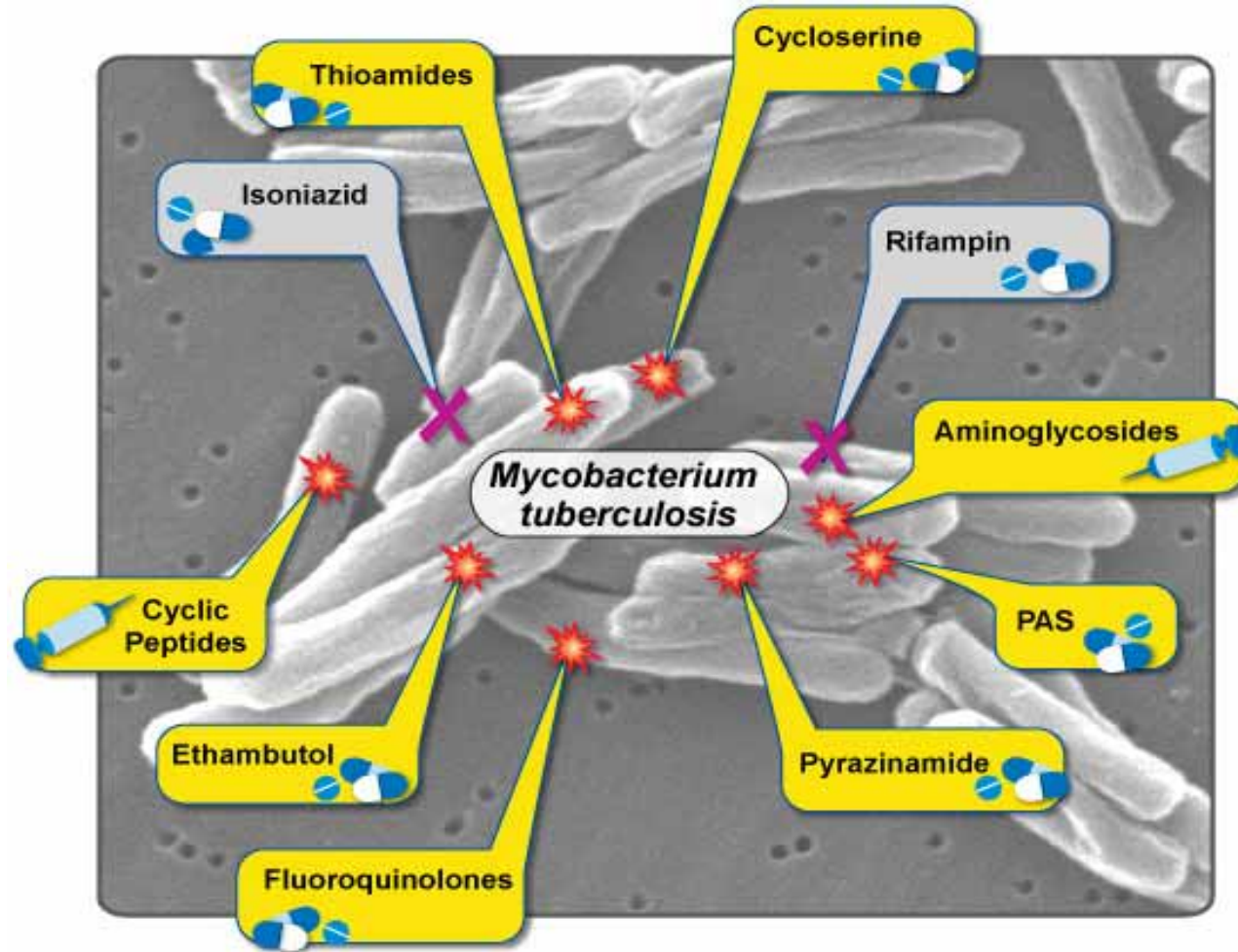
□ Primer İlaçlar

- İzoniazid
- Rifampisin
- Etambutol
- Streptomisin

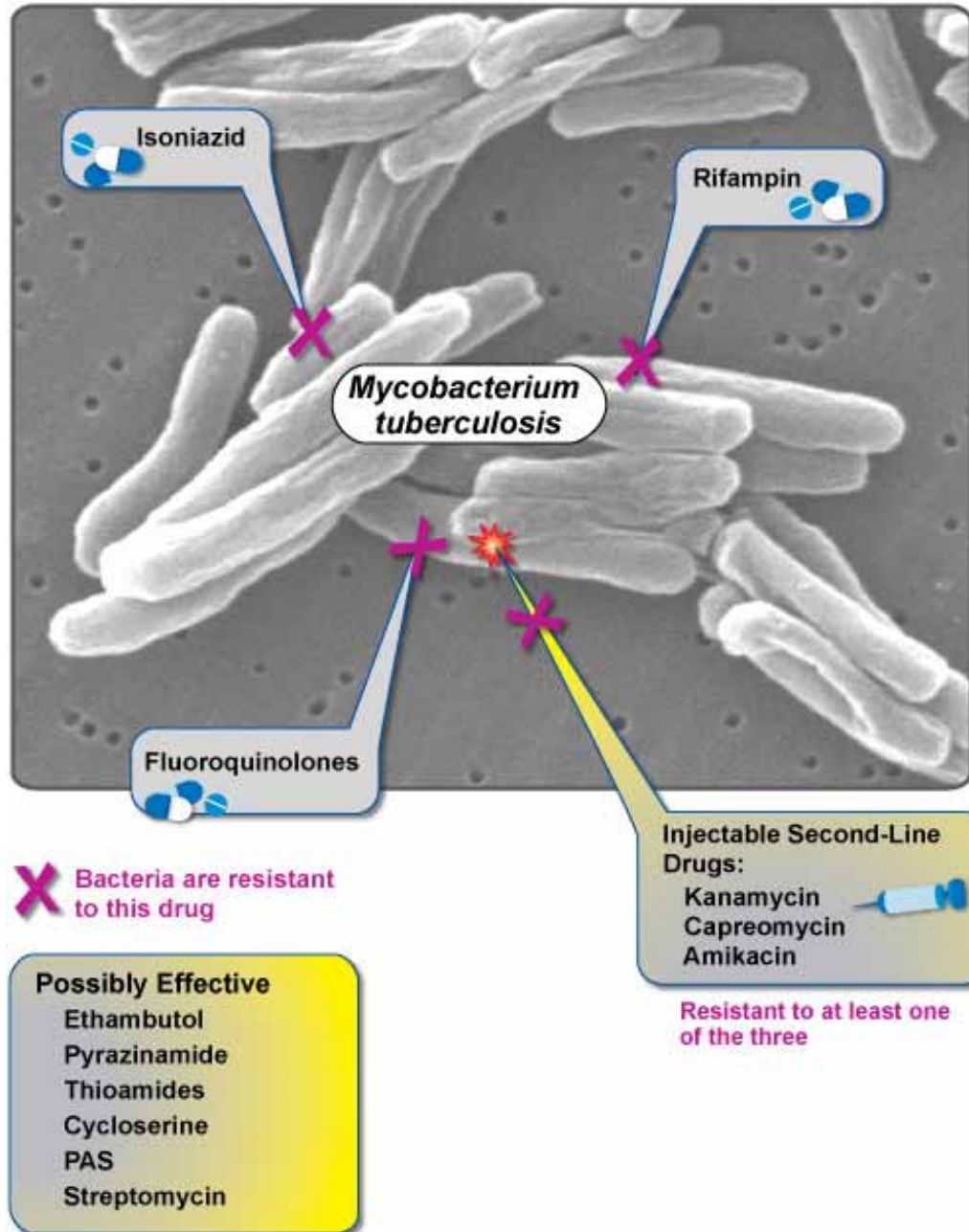


Multidrug Resistant - Tuberculosis (MDR-TB)

Çok İlaç Dirençli-Tüberküloz (ÇİD-TB)



Duyarlı TB tedavisi 6040 £
MDR TB tedavisi 54 000 £



**Extensively Drug
Resistant - Tuberculosis
(XDR - TB)**

**Yaygın İlaç
Dirençli - Tüberküloz
(YİD - TB)**

**Extremely
Drug - Resistant
TB (XXDR - TB) !!??**

İdeal Duyarlılık Test Yöntemi

- **Hızlı**
- **Güvenilir**
- **Basit**
- **Ekonomik**

Anti-Mikobakteriyel Duyarlılık Test Yöntemleri

❖ Konvansiyonel yöntemler

- Proporsiyon (orantı) yöntemi
- Direnç oranı yöntemi
- Mutlak konsantrasyon yöntemi

❖ Genotipik (Moleküler) yöntemler

- DNA dizi analizi
- Reverse hibridizasyon testi (Line probe Assay)
- RNA/RNA mismatch analiz
- Heterodubleks analiz
- SSCP (*Single strand conformation polymorphism*)
- Real-time PCR
- DNA microarray
- PCR-ELISA

❖ Kültüre dayalı hızlı yöntemler

- BACTEC 460 TB
- MGIT 960
- Versa TREK (ESP II)
- BacT/Alert 3D (MB/BACT)

❖ Kültüre dayalı diğer yöntemler

- Disk elüsyon
- E test
- MODS

❖ Kolorimetrik yöntemler

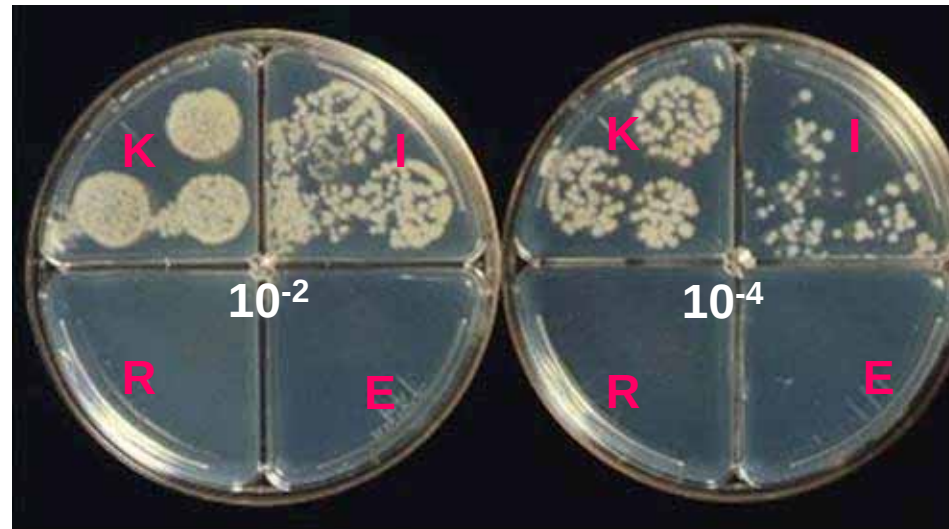
- Mycolor-TK
- Resazurin (Alamar mavisi)

❖ Canlı bakteri varlığına dayalı yöntemler

- Flow sitometri
- Lusiferaz taşıyıcı faj yöntemi
- Faj çoğaltma yöntemi

Agar Proporsiyon (orantı) Yöntemi

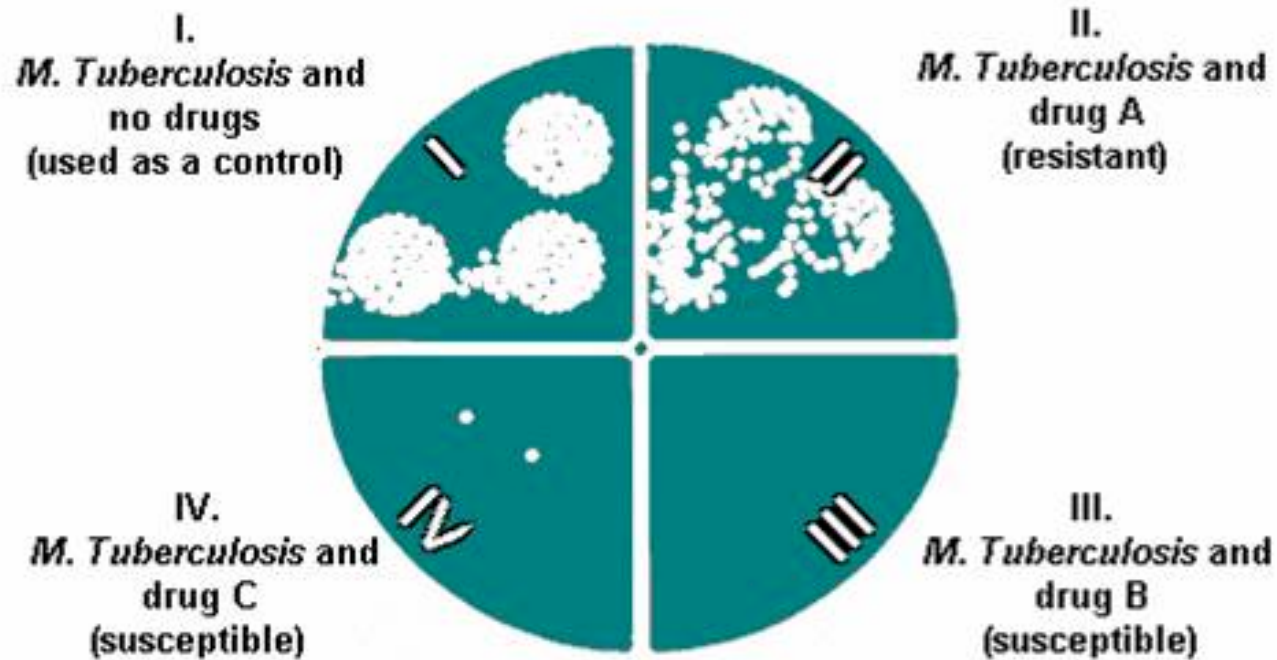
- ❖ Canettii, Rist ve Grosset tarafından 1960'ların başında
- ❖ Pirazinamid dışındaki tüm antimikobakteriyel ilaçlar için güvenilir bir yöntemdir
- ❖ Test edilecek bakteri suşu değişik dilüsyonlarda (10^{-2} - 10^{-4}) standardize edilerek sayılabilir koloniler elde edilir
- ❖ Test suşu ilaçlı ve ilaçsız besiyerlerine ekilir



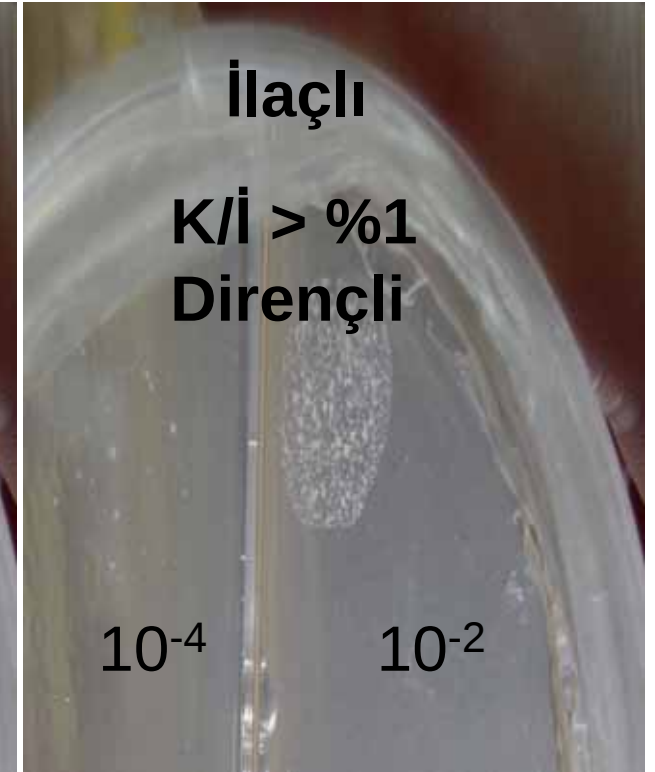
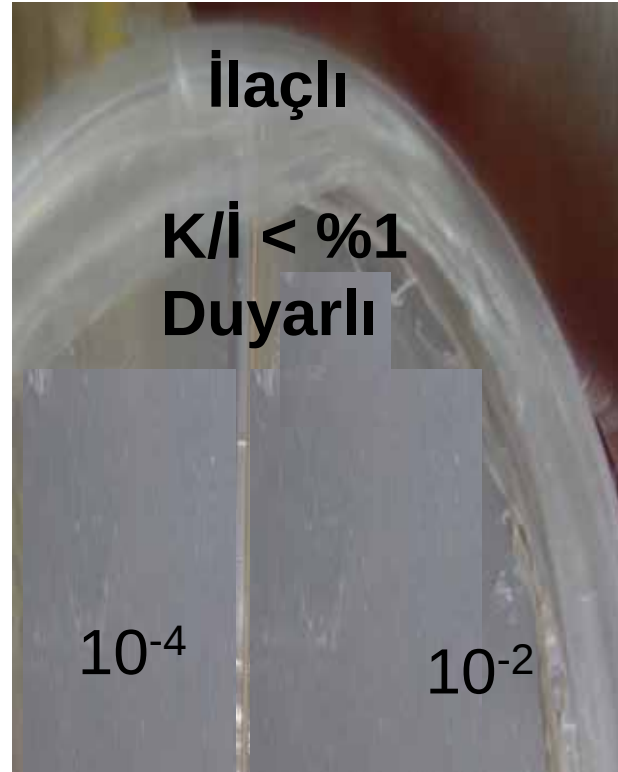
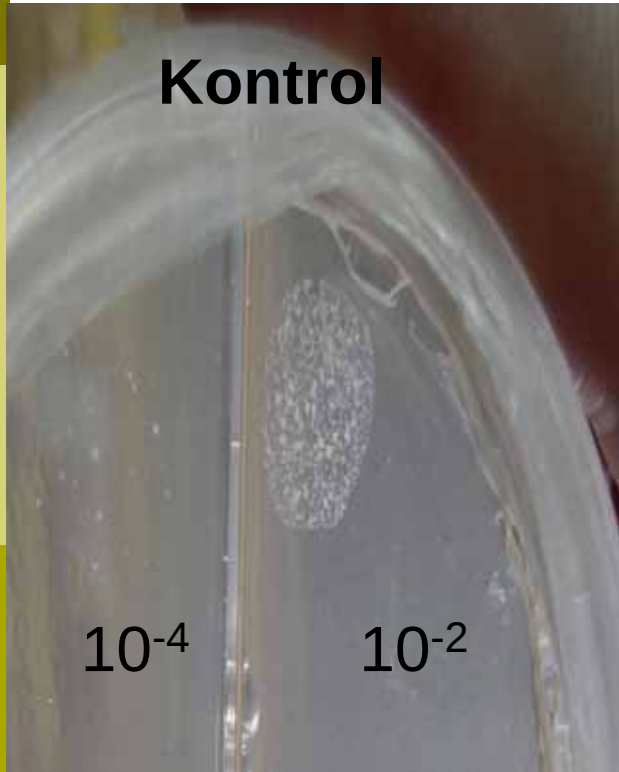
İlaçlı b.y. de üreyen
koloni sayısı

İlaçsız b.y. de üreyen
koloni sayısı

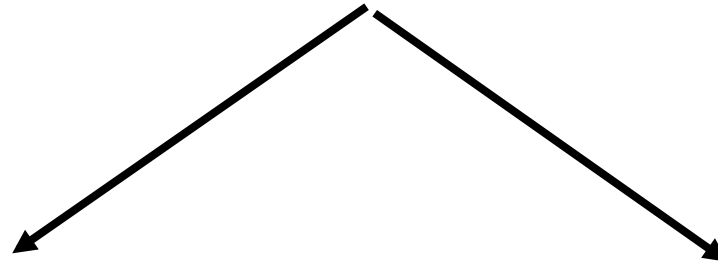
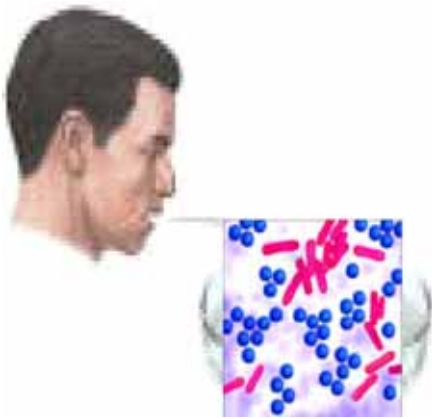
$\geq \%1$ (KP) $\rightarrow$ R



Agar Proporsiyon Yöntemi



Agar Proporsiyon Yöntemi



Direkt

Homojenize ve dekontamine edilmiş, AARB pozitif örnekler kullanılır

İndirekt

Primer kültürde üremiş, saf mikobakteri kolonileri kullanılır

Besiyeri

❖ Lowenstein - Jensen (LJ)

- Uzun süre saklanabilir
- Ekonomiktir
- Koagülasyon işlemi sırasında ilaç büyük oranda inaktive olur
- CLSI tarafından önerilmemektedir.



❖ Middlebrook 7H10 - 7H11

- Raf ömrü kısa
- Pahalı
- Daha kısa sürede (21 gün) } sonuç verir
- Daha güvenilir



CLSI, MD7H10 besiyerinde yapılan proporsiyon test yöntemini referans yöntem olarak kabul etmektedir. ([Agar Proporsiyon Yöntemi](#))

Kritik Konsantrasyon(KK):

Belli bir oranda veya miktarda bakteri üremesine izin verilen (belli oran veya miktarda üremesi direnç testi açısından önemli olmayan) besiyeri içerisindeki antibiyotik konsantrasyonudur.

Kritik Proporsiyon(KP):

Kritik konsantrasyonda üremesine izin verilen basil popülasyonu oranıdır.

- ❖ Proporsiyon yönteminde amaç;
KK'da dirençli olan bakterilerin KP'un üzerinde olup olmadığını saptamaktır.
- ❖ Kritik Proporsiyon genelde %1
- ❖ LJ de bazı ilaçların KP'u %10 (SM, ETH vs.)

Kritik Konsantrasyon (KK)

- ❖ İlaç-yöntem-besiyeri etkileşimleri sonucu ulaşılmış ve standardize edilmiş değerdir.
- ❖ Bu konsantrasyonlarda bakterinin üremesi engelleniyor ise ilacın o bakteriye etkili olduğu söylenebilir.

Yönteme ve besiyerine göre KK farklılığı

- ❖ İlacın, bazı besiyeri komponentlerine farklı oranlarda bağlanması ve absorpsiyonu
- ❖ Besiyerinin hazırlanması sırasında değişik oranlarda inaktivasyonu,
- ❖ Yeterli üreme için gerekli olan sürede değişik oranlarda inaktivasyonu

Önerilen kritik konsantrasyon ve kritik proporsiyonlar

Antitüberküloz ilaç	7H10		LJ	
	KK (µg/ml)	KP (%)	KK (µg/ml)	KP (%)
İsoniazid (INH)	0.2	1	0.2	1
Rifampisin (RİF)	1.0	1	40.0	1
Streptomisin (SM)	2.0	1	4.0	10
Ethambutol (EMB)	5.0	1	2.0	1
Pirazinamid (PZA)*	50.0?	1	100.0	10
Amikasin (AMK)	4.0	1		
Kapreomisin (KAP)	10.0	1	40	1
Kanamisin (KAN)	5.0	1	20	10
Etyonamid (ETH)	5.0	1	20	10
Klofazimin (CLF)	1.0	1		
Sikloserin (CYC)	30.0	1	30	10
Ofloksasin (OFL)	2.0	1	2	1
PAS	2.0	1	0.5	1

- ❖ Test edilen suşun dirençli yada duyarlı olduğuna KK'da karar verilir.
- ❖ Bazı ilaçların yüksek konsantrasyonunun da test edilmesi önerilir.

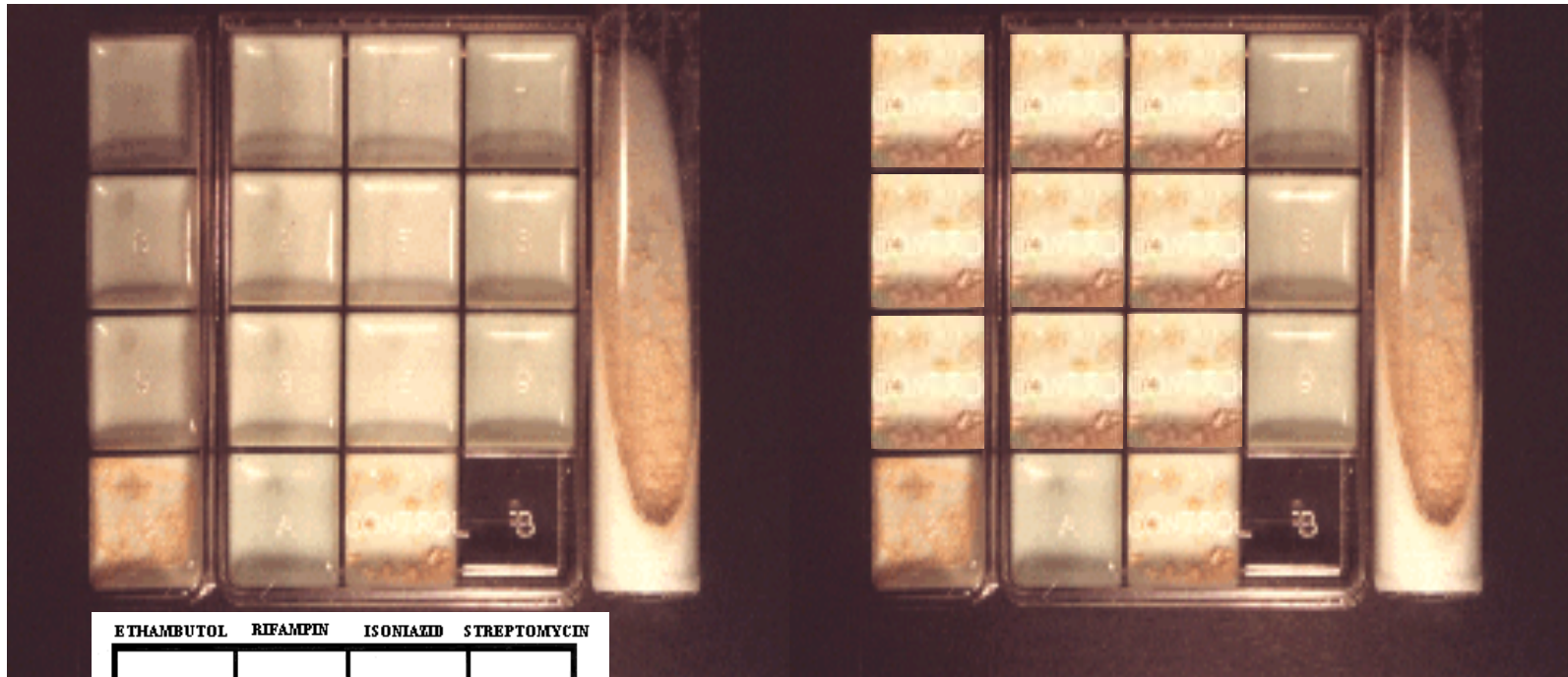
INH 0.2 μ g/ml (KK) $\rightarrow$ R	}	düşük düzeyde direnç
INH 1.0 μ g/ml $\rightarrow$ S		

Bu durumda INH'ın tedavi rejiminde yer alması yararlı olabilir.

Direnç Oranı Yöntemi

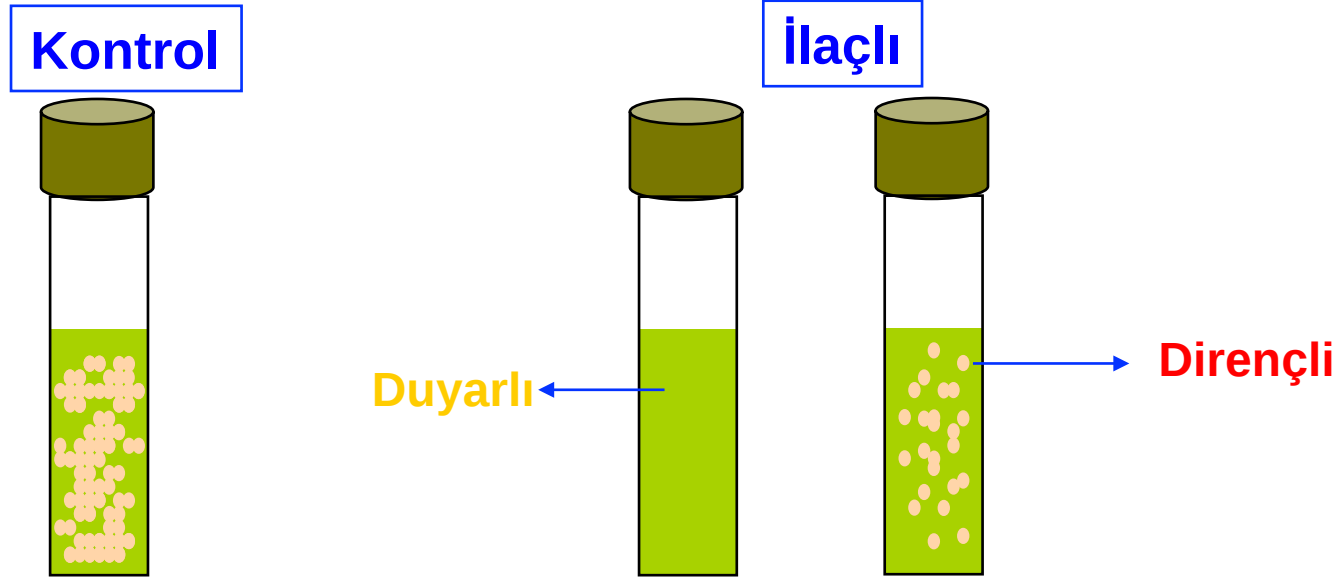
Standart suş
M. tuberculosis H37Rv

Test suşu
TS/SS $MIK \leq 2$ → duyarlı
TS/SS $MIK \geq 8$ → dirençli



**Değerlendirmesi zordur,
yeterli çalışma yoktur,
hata oranı yüksek**

Mutlak Konsantrasyon Yöntemi



**2×10^3 veya 1×10^4 cfu/ml mikobakteri, dört hafta sonra
İlaçlı besiyerinde 20 cfu'dan fazla koloni dirençli
Hata oranı yüksek**

Testlerin sonuçlanma süreleri

- Genotipik testler (2 - 8 h)
- Canlı bakteri varlığına dayalı testler (2 - 10 gün)
- Sıvı besiyerinde kültüre dayalı testler (1 - 2 hf)
- Katı besiyerinde kültüre dayalı testler (3 - 4 hf)
 - Middlebrook 7H10 (3 hf)
 - LJ (4 hf)

Hızlı Ticari Sistemler

- ❖ Standart AP yöntemi bir hızlı duyarlılık testi yöntemi değildir
- ❖ Dirençli organizmaların saptanmasında hızlı, standart, pratik duyarlılık yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir
- ❖ **CDC'ye göre;**
 - Örnek kabul edildikten sonra 30 gün içinde primer ilaçlara karşı duyarlılık sonuçları rapor edilmeli.**
- ❖ Bu amaçla CLSI;
 - FDA'in de onayladığı, sıvı besiyerinde kültüre dayalı bazı hızlı ticari sistemlerin kullanılabileceğini kabul etmiştir.
 - BACTEC 460 TB,
 - MGIT 960,
 - Versa TREK (ESP II)

Hızlı Ticari Sistemler

- ❖ Hızlı ticari sistemlerde elde edilen sonuç,
 - Test edilen izolatın herhangi bir ilaca karşı dirençli olduğunu gösteriyorsa,
 - Kararsız kalınmışsa

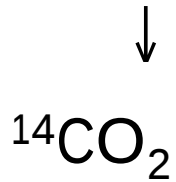


- ❖ Standart agar proporsiyon yöntemi ile testin tekrarı,
- ❖ Tekrar sırasında İNH'nin yüksek konsantrasyonunun da test edilmesi önerilmiştir

BACTEC 460 TB

(Becton Dickinson)

- B460 radyoaktif atık üreten yarı otomatize bir sistemdir
- BACTEC 12B şişesi, Middlebrook 7H9, karbon kaynağı ^{14}C işaretli palmitik asit içerir
- ^{14}C işaretli palmitik asit kullanımı



↓ Üreme İndeksi (GI)

DSÖ ve CLSI standart yöntem

5-7 günde sonuç



- ❖ İlaçlı kontrol ve ilaçsız şişelere ekim yapılır.
- ❖ İlaçsız şişeye 1/100 dilüsyonda inokulum ekilir.
- ❖ Kontrol şişesinin üreme indeksi (GI) değeri ≥ 30 'a ulaştığında günlük GI farkı (ΔGI) hesaplanır

İlaçlı şişe GI $\geq$ Kontrol şişesi $\Delta GI \rightarrow$ **DİRENÇLİ**

İlaçlı şişe GI $<$ Kontrol şişesi $\Delta GI \rightarrow$ **DUYARLI**

Günlük GI					
Gün	Kontrol	SM	INH	RIF	EMB
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	92
4	65	14	500	12	91
ΔGI	+41	+2	+250	+2	-1

MGIT 960 Sistemi

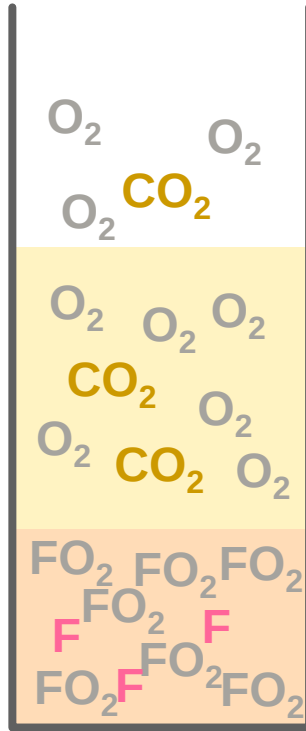
(Mycobacterium Growth Indicator Tube) (BD)

- ❖ Modifiye Middlebrook 7H9 tüpleri
- ❖ Tüpün dibinde silikona gömülü O_2 ile bileşik halde bulunan fenatrolin rutenyum klorid pentahidrat adında floresans veren bir indikatör bulunmakta
- ❖ Mikobakteriler tüpteki O_2 'ni tüketmekte
- ❖ İndikatör serbest kalarak floresans açığa çıkmakta
- ❖ Floresans miktarı, üreme indeksi olarak değerlendirilmekte



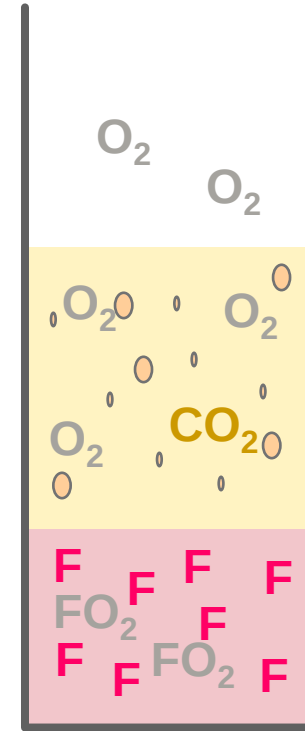
MGIT 960 Sistemi (BD)

Negatif Kültür



Floresan çok az veya yok

Pozitif Kültür



Kuvvetli Floresan

MGIT 960 Sistemi (BD)

Duyarlılık testi,

- ❖ İlaçsız tüpteki floresans (1/100) ile ilaç içeren tüplerdeki floresansın karşılaştırması esasına dayanır
- ❖ MGIT 960 cihazı floresansı sürekli izler, sonuçları otomatik olarak yorumlar, dirençli ya da duyarlı olarak verir
- ❖ İlaç tüpündeki relatif üreme $\geq$ kontrol tüpündeki üreme ise dirençli
- ❖ BACTEC 460TB ve proporsiyon ile uyumlu
- ❖ Saptama süresi B460 TB ile aynı

BacT/ALERT 3D (BioMérieux)

**Modifiye Middlebrook 7H9
sıvı besiyeri içeren şişeler**

- Kolorimetrik, bilgisayar destekli kapalı sistem
- BACTEC 460TB ve proporsiyon ile, özellikle INH ve RIF sonuçları uyumlu
- Saptama süresi B460 TB'ye yakın

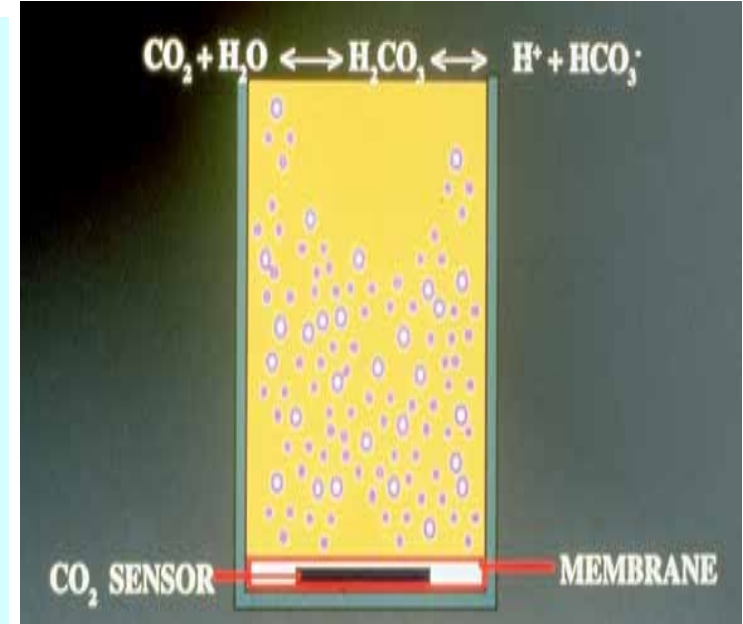


BacT/ALERT 3D - (240'lık)



BacT/ALERT 3D (BioMérieux)

- Her şişenin tabanında silikona gömülü kolorimetrik sensör bulunmakta,
- Sensör, mikobakterilerin oluşturduğu çözünmüş CO_2 değişimine ve bunun sonucunda değişen pH'ya duyarlı → renk değişikliği
- Pozitiflik durumunda sensörün rengi koyu yeşilden sarıya dönmekte



VersaTREK (Extra Sensing Power II kültür sistemi, Trek Diagnostics)

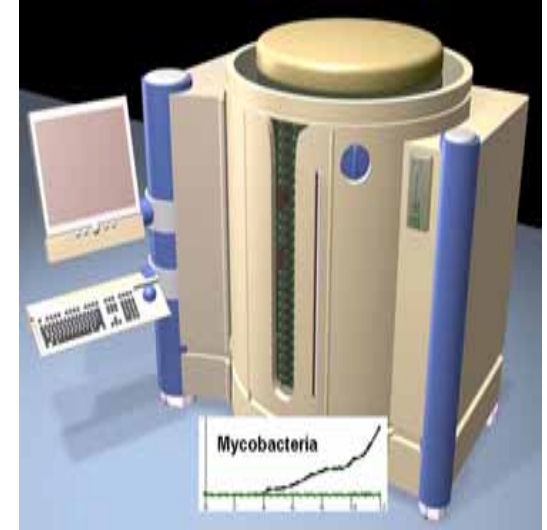
- Devamlı moniterize, tam otomatize, radyoaktif olmayan bir sistem
- Zenginleřtirilmiř Middlebrook 7H9 besiyeri ve selüloz sünger
- Mikobakterilerin O₂ tüketimine bağlı oluşan gaz basıncı değişikliklerinin devamlı takip edilmesi ve bilgisayarda grafiksel olarak görüntülenmesi
- **Duyarlılık testi**, antibiyotiksiz ve antibiyotikli şişelerdeki üremenin karşılaştırılması esasına dayanır.



BACTEC 460TB ve proporsiyon ile uyumlu
Saptama süresi B460 TB'ye yakın

TK Kültür Sistemi (Salubris)

- ❖ **İzolasyon:** TK Medium, TK SLC (selektif, PolyPANT: polimiksin B, piperasilin, amfoterisin B, nalidiksik asit, trimetoprim)
- ❖ **Tür ayrımı:** TK PNB (*p*-nitro-benzoik asit)
- ❖ **Anti-TB ilaçlara duyarlılık:** TK INH, TK RIF, TK STR ve TK EMB katı besiyerleri ve **TKPZA**
- ❖ **MYCOLOR TK** otomatik okuyucu inkübatör



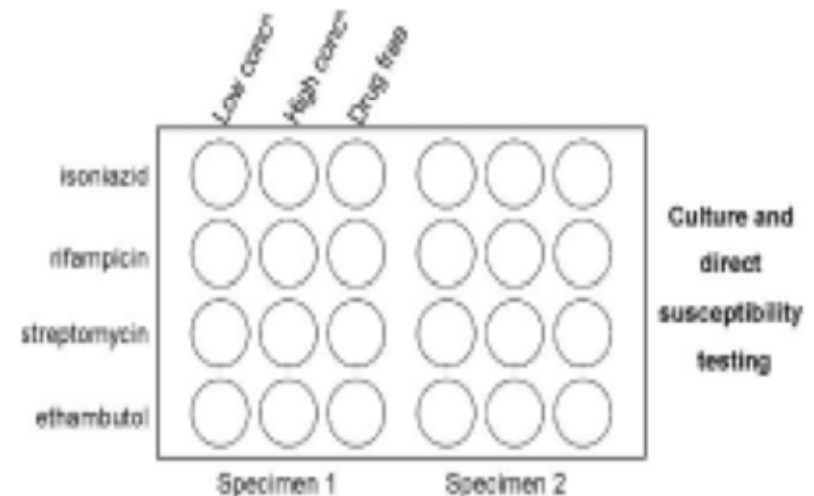
TK Kùltür Sistemi (Salubris)

- ❖ TK Medium, çoklu renk indikatörleri kimyasından yararlanılarak hazırlanmış
- ❖ Mikobakterilerin ürettiği metabolitlere ve enzimlere bağılı olarak TK Medium besiyerinin orijinal **KIRMIZI** renkten **SARI**ya
- ❖ Diğer bakteri veya fungal türlerin varlığında ise **KIRMIZI** renk **YEŞİLE** dönmekte



MODS (Microscopic-Observation Drug-Susceptibility assay)

- Manuel, ticari olmayan, ucuz (~2\$)
- 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarında
- MB7H9+OADC+PANTA+(NaOH/NALC)-işlenmiş balgam
- İnvert ışık mikroskobu x40 → *M. tuberculosis* kord
- Direkt antimikobakteriyel duyarlılık



MODS

	duyarlılık	ort. belirleme süresi
MODS	%92	9 gün
L/J	% 76	24 gün

Caviedes L, et al. JCM 2000; 38: 1203.

	duyarlılık	ort. belirleme süresi: smear(+) smear(-)		
MODS	%94	8 gün	7gün	10 gün
L/J	%87	16 gün	16 gün	28 gün

Moore DA, et al. JCM 2004; 42: 4432.

Etest (AB-Biodisk)

- Primer antitüberküloz ilaçların MİK değerleri
- Test süresi ortalama 5 gün (5-10 gün)
- Yüksek konsantrasyonda inokulum, pahalı
- Gelişmekte olan ülkeler için çok uygun değil

Etest / BACTEC460

(J Clin Microbiol 2002; 40: 6, 2282-4)

- RIF'de %97, INH'da %96 ve STR'de %80



Genotipik Yöntemler

M. tuberculosis'de direnç genleri

İlaç	Direnç geni	Mutasyonun sıklığı (%)
RİF	<i>rpoB</i>	96 - 100
INH	<i>katG</i>	42 - 58
	<i>inhA</i>	21 - 34
	<i>kasA</i>	-
	<i>ahpC</i>	10 - 15
	<i>pncA</i>	72 - 97
PZA	<i>embCAB</i>	47 - 65
STR	<i>rpsL</i>	52 - 59
	<i>rrs</i>	8 - 21
FQ	<i>gyrA</i>	75 - 94
	<i>gyrB</i>	-

Genotipik Yöntemler

- DNA eldesi



- Hedef bölgenin amplifikasyonu



- Mutasyonun saptanması
 - DNA dizi analizi
 - Reverse hibridizasyon testi
 - RNA/RNA *mismatch* analiz
 - Heterodubleks analiz
 - SSCP
 - *Real-time* PCR
 - DNA *microarray*

Dünya Sağlık Örgütü 2009 Global Raporu

- ❖ Bütün TB vakalarının %5'i ÇİD-TB
- ❖ 2007 yılında 500 000 civarında yeni ÇİD-TB
- ❖ En fazla görülen beş ülke;
Hindistan
Çin
Rusya Federasyonu
Güney Afrika
Bangladeş

***** Eski Sovyetler Birliği ülkelerinde
yeni vakaların %10'u ÇİD-TB,
bunların da 1/10'u YİD-TB**

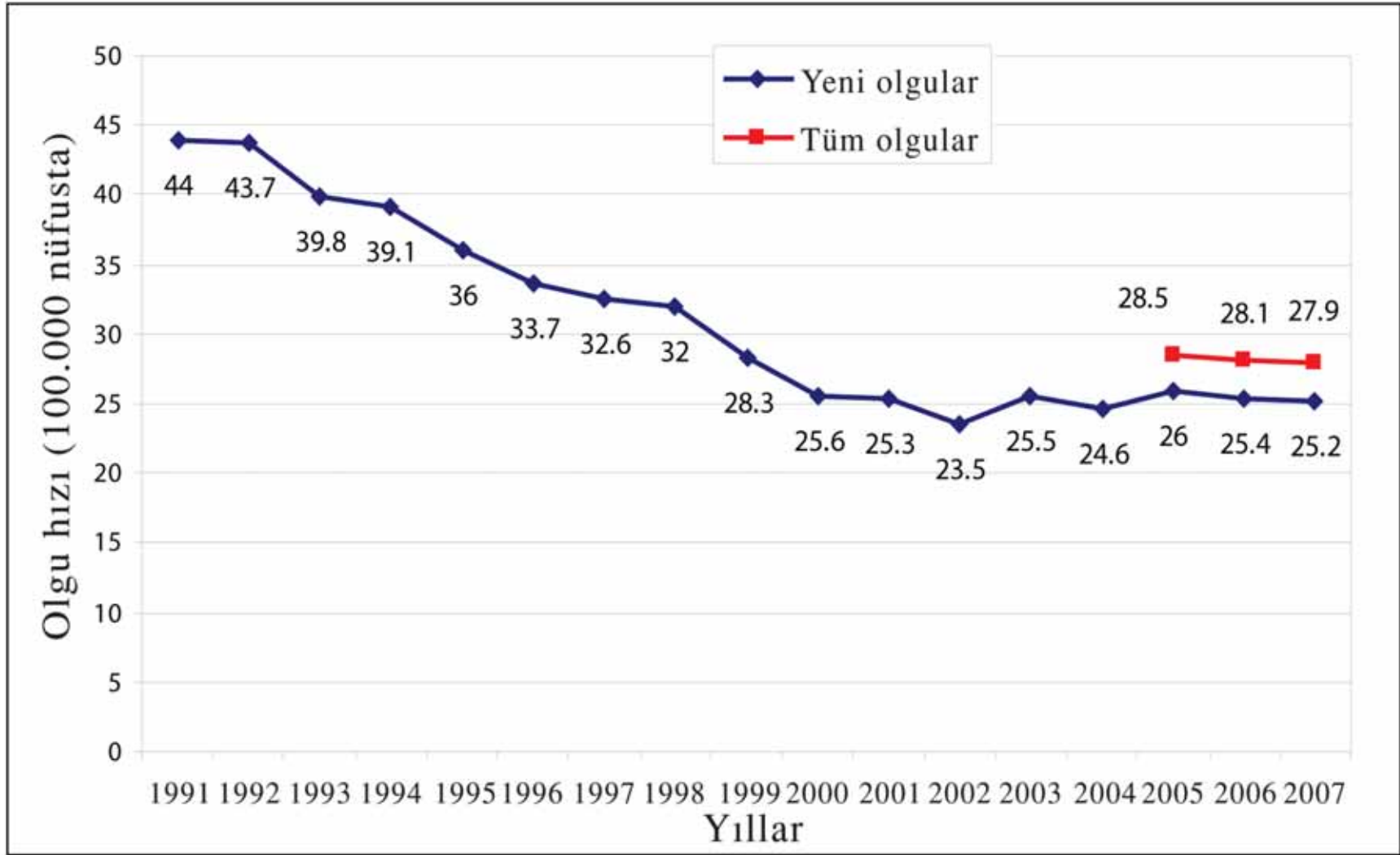
Türkiye'de Tüberküloz İlaç Direnç Verileri

❖ Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda;

- Yöntemlerin farklı olması
- Kullanılan ilaç konsantrasyonlarının belirtilmemesi
- Standart ve ortak miktarda ilaç kullanılmaması

❖ Türkiye Ulusal Tüberküloz Sürveyans araştırması (TUTSA) verileri;

- Dispanserlere kayıtlı tüm hastaların sonuçlarından oluşmaktadır



İlaç duyarlılık testi çalışılan hastalarda her bir TB ilacı için toplam direnç sonuçları,
2005-2007

	2005		2006		2007	
	Dirençli	Oran	Dirençli	Oran	Dirençli	Oran
Yeni hastalar	(n=3.237)		(n=4.135)		(n=4.142)	
İzoniiazid	291	9,0	444	10,7	492	11,9
Rifampisin	144	4,4	185	4,5	202	4,9
Etambutol*	97	3,0	147	3,6	115	2,8
Streptomisin*	227	7,0	348	8,4	296	7,1
ÇİD	101	3,1	131	3,2	120	2,9
Tedavi görmüş hastalar	(n=508)		(n=711)		(n=775)	
İzoniiazid	139	27,4	169	23,8	214	27,6
Rifampisin	107	21,1	141	19,8	145	18,7
Etambutol*	51	10,0	94	13,2	64	8,3
Streptomisin*	77	15,2	121	17,0	107	13,8
ÇİD	90	17,7	118	16,6	120	15,5
Tüm hastalar	(n= 3.745)		(n=4.846)		(n=4.917)	
İzoniiazid	430	11,5	613	12,6	706	14,4
Rifampisin	251	6,7	326	6,7	347	7,1
Etambutol*	148	4,0	241	5,0	179	3,6
Streptomisin*	304	8,1	469	9,7	403	8,2
ÇİD	191	5,1	249	5,1	240	4,9

İlaç duyarlılık testi sonuçlarında ilaç direnci dağılımları, 2007

	Yeni hasta (n=4.142)		Tedavi görmüş (n=775)		Tüm hastalarda (n= 4.917)	
	Sayı	Oran	Sayı	Oran	Sayı	Oran
DUYARLI	3.382	81,7	511	65,9	3.893	79,2
DİRENÇLİ	760*	18,3	264*	34,1	1.024*	20,8
H dirençli	272		66		338	
R dirençli	59		19		78	
S dirençli	140		18		158	
E dirençli	28		4		32	
TOPLAM TEK İLAÇ	499	12,0	107	13,8	606	12,3
HR dirençli	50		44		94	
HS dirençli	68		17		85	
HE dirençli	22		4		26	
RS dirençli	14		5		19	
RE dirençli	3		0		3	
ES dirençli	6		1		7	
TOPLAM İKİ İLAÇ	163	3,9	71	9,2	234	4,8
HRS dirençli	27		24		51	
HRE dirençli	15		15		30	
HSE dirençli	9		6		15	
RSE dirençli	5		1		6	
TOPLAM ÜÇ İLAÇ	56	1,4	46	5,9	102	2,1
HRSE dirençli	26	0,6	33	4,3	59	1,2

Türkiye'de Tüberküloz İlaç Direnci

Türkiye'de birçok merkezde bu amaçla çalışmalar yapılmaktadır. ÇİD-TB oranları % 3 ila % 14 arasında değişmektedir.

*GATA Tıbbi Mikrobiyoloji AD'da (1998-2001, 2002-2003, 2005-2006) total ÇİD-TB oranları;

* % 1.7, % 2.6, % 2.9

* INH direnci; % 9.8, % 15.2, % 17.8

* RIF direnci; % 2.6, % 3.3, % 4.0

❖ Aydın ve ark. 2009-Trabzon-ÇİD-TB %4.36

❖ Ocak ve ark. 2009- Kocaeli- ÇİD-TB %2

❖ Aktaş ve ark. 2009- Erzurum- ÇİD-TB %2.7

❖ Durmaz ve ark. 2004- Malatya-ÇİD-TB % 4.8

Türkiye'de Tüberküloz İlaç Direnci

- * Sekonder anti-tüberküloz ilaçlar ile ilgili sınırlı verilere sahibiz
- * Özkütük ve ark. 2008-Manisa'da 40 MDR-TB suşuna sekonder anti-tb. duy. Testi
- * Bir tanesi YİD-TB olarak saptanmış
- * Türkiye'de ilk YİD-TB vakası

Türkiye'de anti tüberküloz ilaç direnci çok yüksek değilmiş gibi görünse de, bu direnç uzun yıllardan beri devam etmekte olup mutlaka dikkate alınması gerekir. Hedef bu direnç oranlarının gelişmiş ülkelerdeki daha düşük seviyelere indirilmesi olmalıdır.



Ali Albay