

İlaç Direncinin Saptanmasında Güncel Moleküler Yöntemler

O. Kaya Köksalan

Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)

İstanbul Üniversitesi



**TB solunum yoluyla bulaşan önlenabilir
bir hastalıktır**



Bulaşları önleme yolları

- **Neftsal Hijyen ve Alet Higryenleri**



DOTS **1994**

DOTS*plus* **2001**

Stop TB Partnership **2006**



DOTS

Standard tedavi

Mikroskop ile tanı

Hasta bildirimlerinin, yayma ve tedavi sonuçlarının sürekli izlenmesi ve değerlendirilmesi

Primer ilaçların yeterli miktarda temini

Hükümetlerin istekli katılım ve desteği

DOTSplus

İDT sonucuna göre tedavi

Kültür ve İDT ile tanı,
Sekonder ilaçlara karşı İDT

Daha detaylı klinik ve lab. data değerlendirmesi (üç ayda bir kültür, İDT ve RFLP sonuçları vb)

Minor ilaçların da yeterli miktarda temini ve kontrolsüz kullanımının önlenmesi, lab. sarf malzeme temini

İlave olarak yabancı hükümet ve uluslararası kuruluşların desteği

İDT : İlaç Duyarlılık Testi



1995-2008

Tedavi edilen
hasta sayısı

36 milyon

Engellenen ölüm

6 milyon

Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report
www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html



Latest global TB estimates - 2007

(Updated Feb 2009)



**Estimated
number of
cases**

**Estimated
number of
deaths**

All forms of TB

Greatest number of cases in Asia;
greatest rates per capita in Africa

9.27 million
(139 per 100,000)

1.77 million
(27 per 100,000)

Multidrug-resistant TB (MDR-TB)

511,000

150,000

Extensively drug- resistant TB (XDR-TB)

50,000

30,000

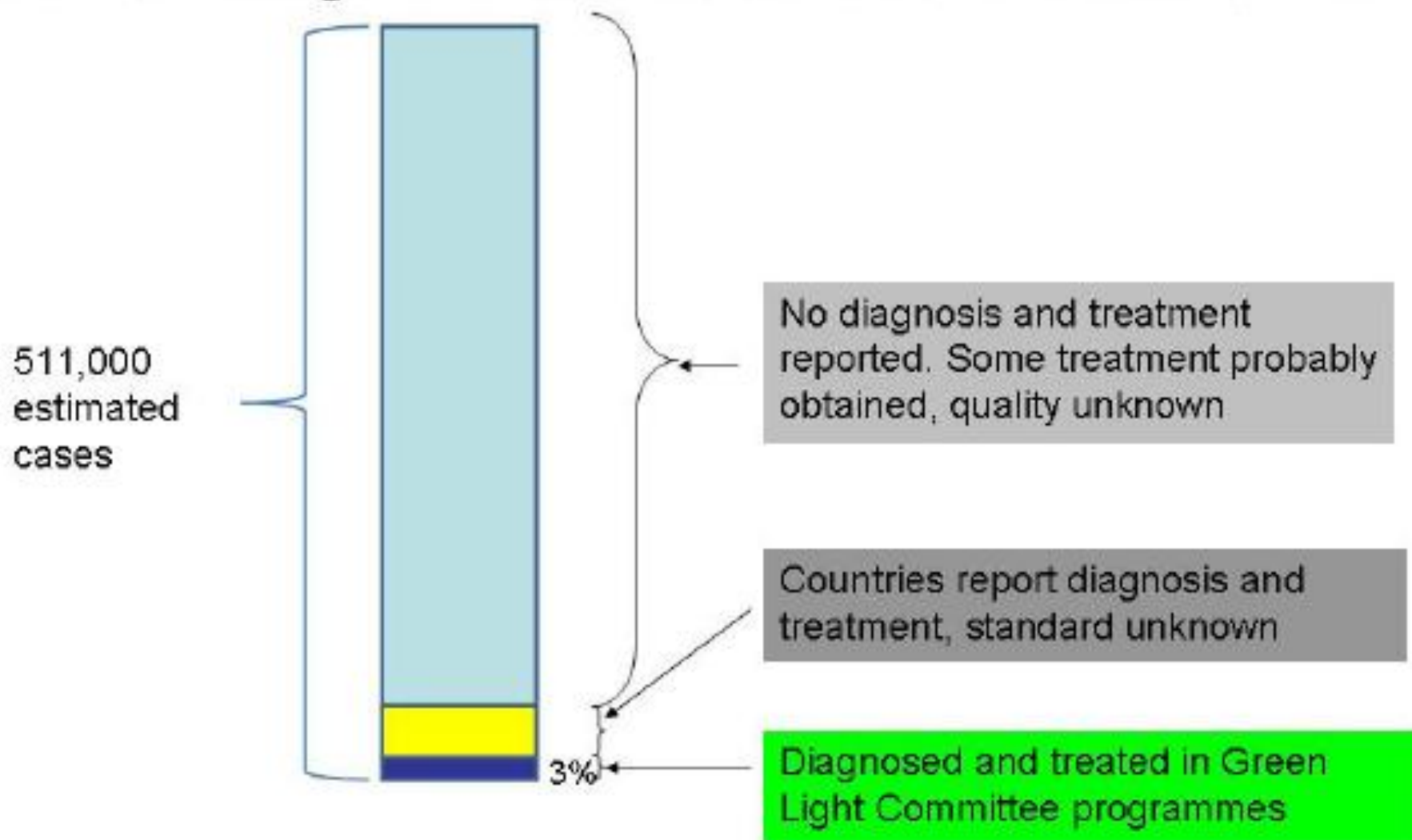
HIV-associated TB

1.4 million

456,000

Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) :
2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE

Overall problem: MDR-TB diagnostic and treatment levels far too low



MDR olgularının en yaygın olduğu 27 ÷lkede

Yeni olgular

Ted. Görmüş Olanlar

İDT Oranı:

%1

%3

İDT: İlaç Duyarlılık Testi

Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) : WHO 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE



Salgın Bileşkeleri

- Enfekte kişinin bulaştırıcılık süresi
- Bulaştırıcı kişinin temas ettiği yatkın kişi sayısı
- Enfekte kişinin bulaştırıcı hale dönüşmesi olasılığı



Kontrol Programlarına Eleştiri

- **Enfekte kişinin bulaştırıcılık süresi**
- **Bulaştırıcı kişinin temas ettiği yatkın kişi sayısı:20**

Styblo K. 1980. Adv Tub Res 20:1-63

Gelişmekte olan ülkelerde >20?

- **Enfekte kişinin bulaştırıcı hale dönüşmesi olasılığı**
%10
> %10

Genetik olarak yatkın kişiler,
Açlık / yoksulluk, sigara, alkol
HIV, DM



**Bulaşların yayılmasını önleyici aktif bir
bileřke kontrol programlarına
eklenmelidir.**

Temaslı taraması ve aktif olgu yakalama

Boettger EC . 2008. Eur J Pediatr 167:141–148



Stop TB Ortaklığı

1. DOTS'un yayılması ve kuvvetlendirilmesi çabası
2. MDR-TB, HIV/TB yoksul ve riskli grupların sorunlarına yoğunlaşma
3. Sağlık sisteminin güçlendirilmesi
4. Tüm sağlık hizmeti vericilerini meseleye çekmek
5. Hastaların/toplumların hassaslaştırılması, bilgilendirilmesi ve yetkilendirilmesi
6. Ar-Ge'ye mümkün kılınması



Stop TB Hedefler: 2011-2015

2015 yılında

- *TB prevalans ve ölümlerini 1990 düzeyinin yarısına indirmek*
- *Tüm hastalara yüksek kaliteli tanı & tedavi olanağı*
- *7milyon İDT, 1milyon uygun MDR tedavisi*
- *2 adet yeni hızlı tanı testi, 3 adet ilaç, 4 ad. aşı*



Stop TB Bütçe: 2011-2015

Global planın uygulanması için gerekli miktar

- *37 milyar USD*
- *Açık 14 milyar USD*

Ar-Ge yatırımları için gerekli miktar

- *10 milyar USD*
- *Açık 7 milyar USD*

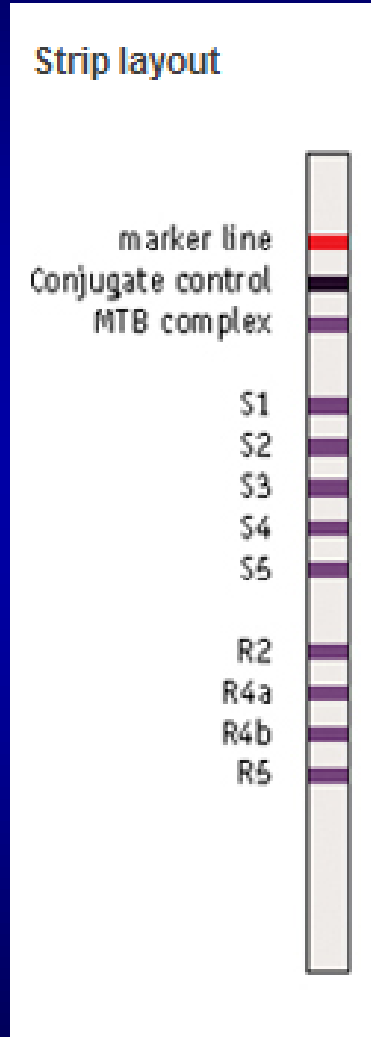


Moleküler Yöntemler

- 1-2 gün
- İyi standardize edilmiş ticari kitler
 - Inno-Lipa Rif.TB
 - Hain MDRTBplus
 - Cepheid Xpert MTB / RIF



INNO-LiPA Rif.TB

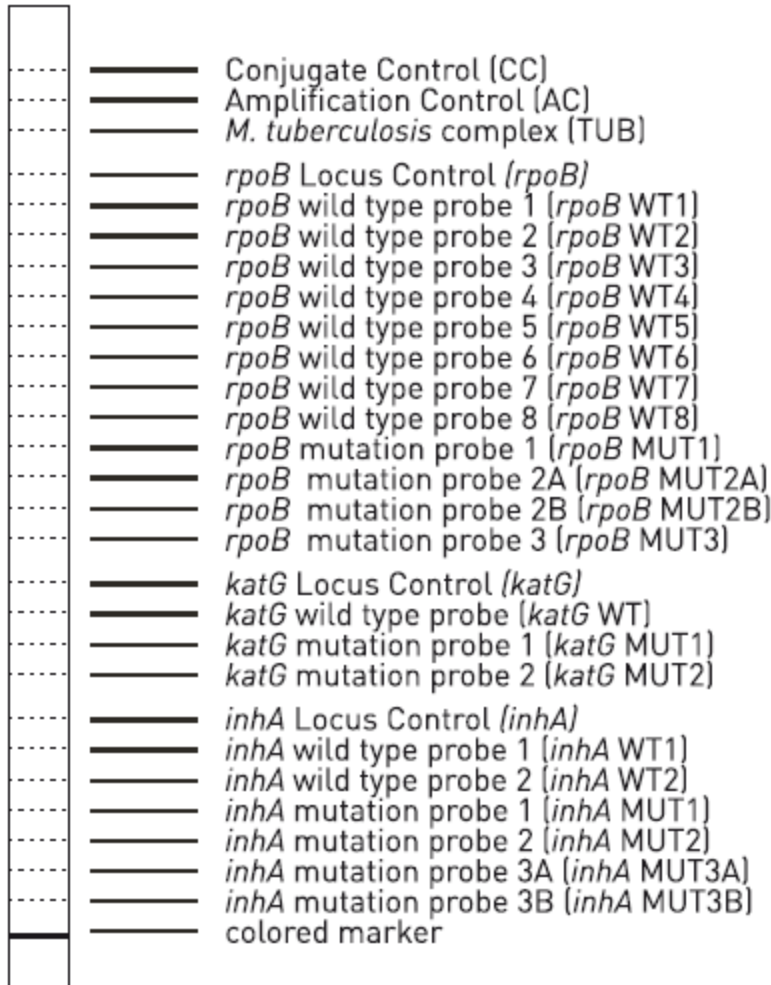


Duyarlık ve özgünlük: %97-100

Sadece rifampisin direnci (*rpoB* geni)

Direkt balgam örneğinde düşük duyarlık

Hain MDRTBplus



■ RMP Direnci (*rpoB* geni)

■ İsoniazid Direnci

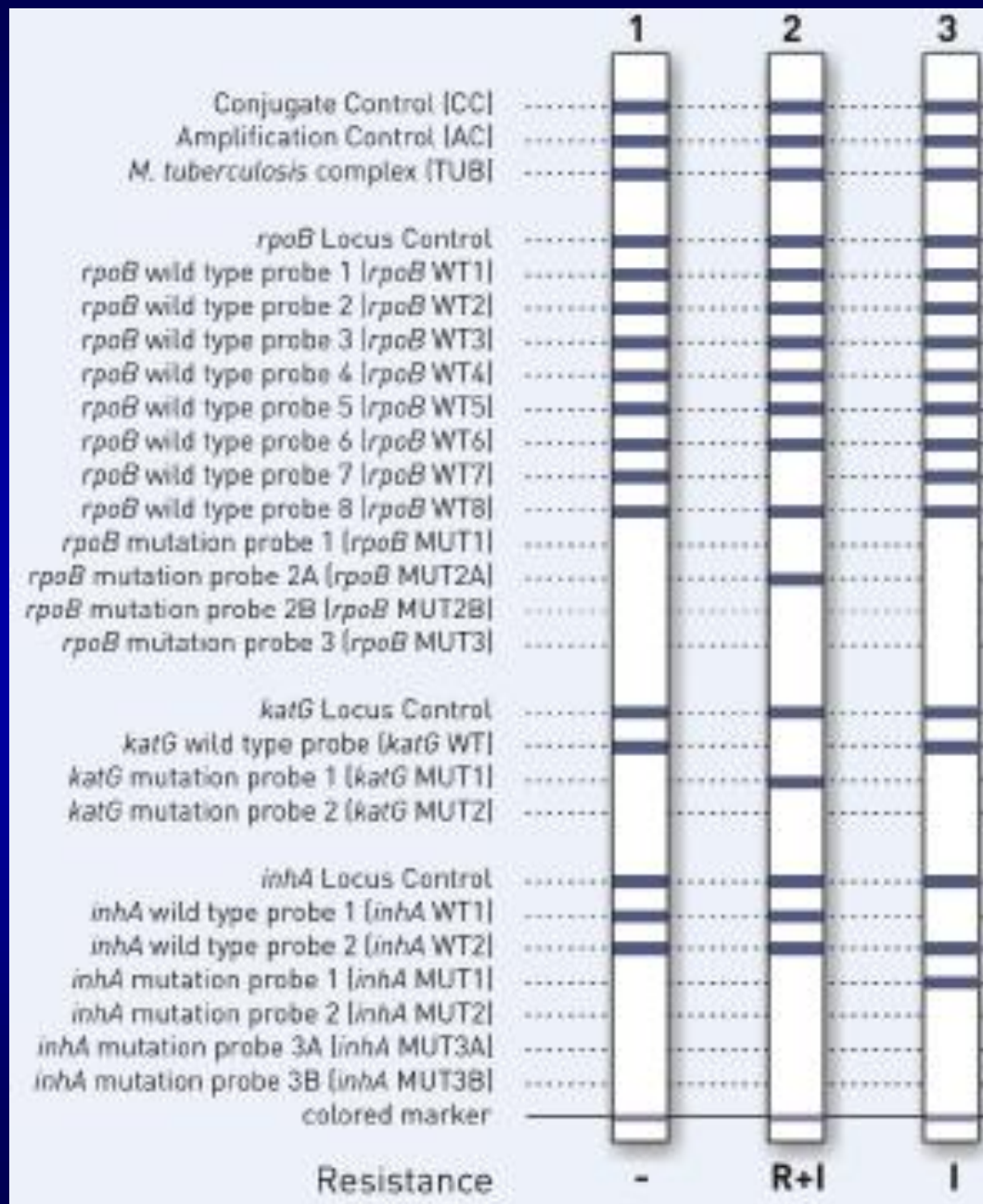
Yüksek düzey (*katG*)

Düşük düzey (*inhA*)

Yayma(+) balgam ✓



Hain MTBDRplus



MTBDR_{plus} G. Afrika Çalışması

***n*=536**

	Duyarlık	Özgünlük	PPD	NPD
RMP	98.9	99.4	97.9	99.7
Isoniazid	94.2	99.7	99.1	97.9
MDR	98.8	100	100	99.7

Barnard M et al. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177:787-92



MTB / Rif-resistance test

Workflow

- sputum
- simple 1-step external sample prep. procedure
- time-to-result < 2 h
- throughput: ≥ 16 tests / day / module
- no need for biosafety cabinet
- integrated controls
- true random access

Performance

- specific for MTB
- sensitivity better than smear, similar to culture
- detection of rif-resistance via *rpoB* gene

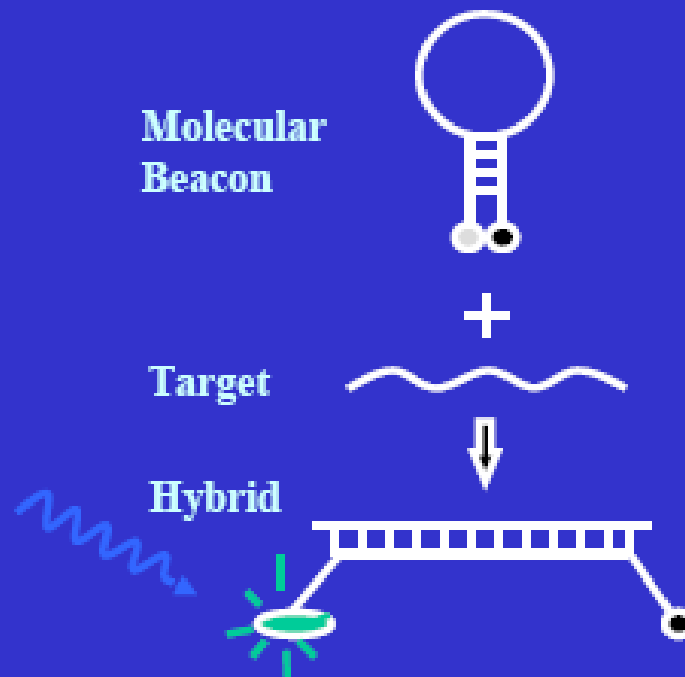
Product and system design

- test cartridges for GeneXpert System
- several GeneXpert modules can be combined in 1 workstation
- swap replacement of detection unit
- ~1 day technician training for non-mycobacteriologists



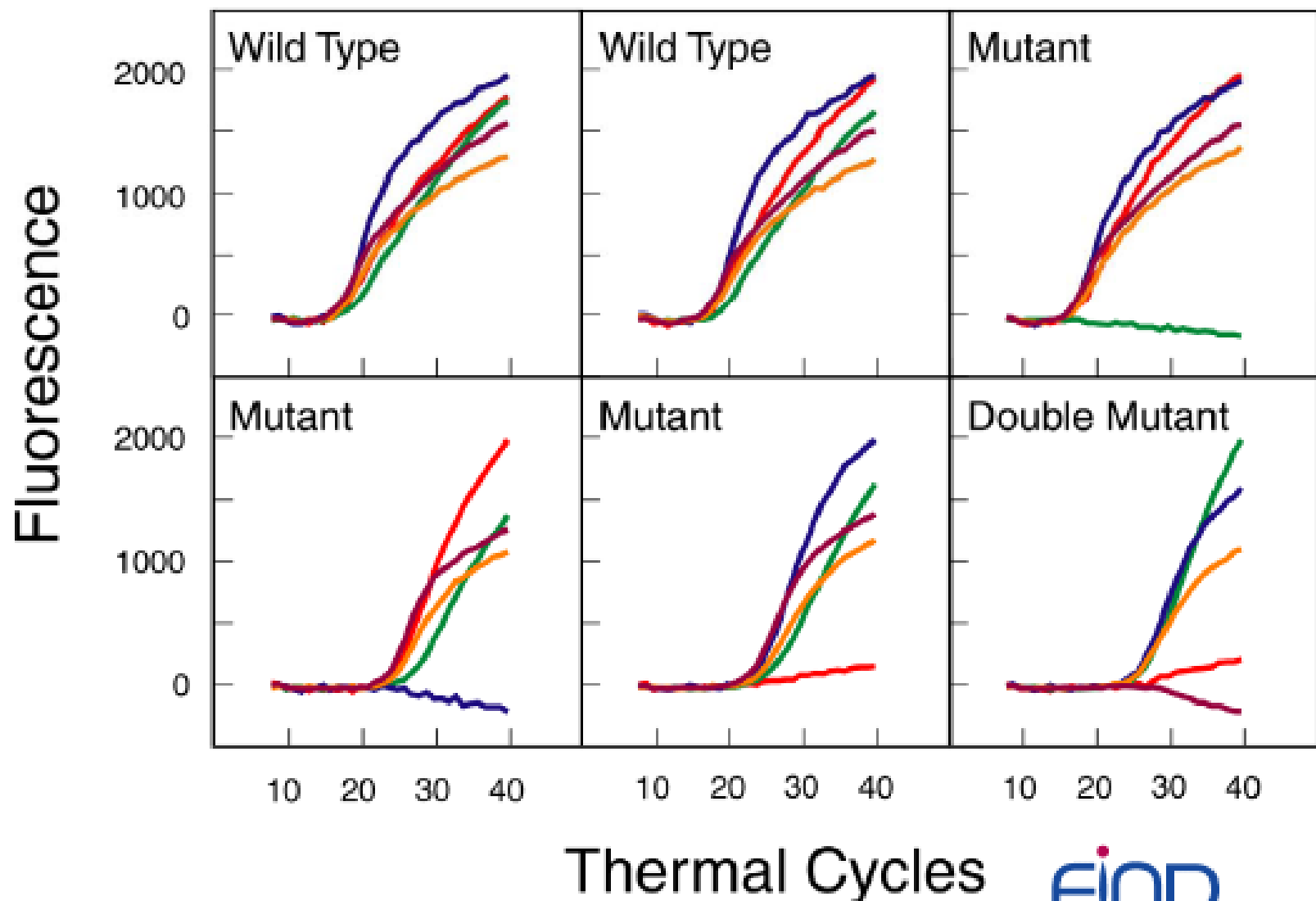
cartridge

rpoB Molecular Beacon Assay



Rifampin-resistant TB contains at least 1 *rpoB* mutations

Five-color PCR performed in a single well



Xpert TB development studies in Peru and Latvia

<i>TB CASE DETECTION</i>	Xpert sensitivity in smear+, cul+	Xpert sensitivity in smear-, cul+	Xpert specificity in smear-, cul-*
LATVIA	93.3% (14/15)	80% (12/15)	95.9% (71/74)
PERU	100% (99/99)	81.8% (9/11)	95.6% (151/158)
TOTAL 95% CI	99.1% (113/114) [95.2, 99.8]	80.8% (21/26) [62.1, 91.5]	95.7% (222/232) [93.2, 98.4]

*Follow-up of patients
limited

<i>RIF RESISTANCE DETECTION</i>	Xpert sensitivity in Rif resistant	Xpert specificity in Rif sensitive
LATVIA	100% (8/8)	100% (18/18)
PERU	100% (14/14)	100% (94/94)
TOTAL 95% CI	100% (22/22) [85.1, 100]	100% (112/112) [96.7, 100]

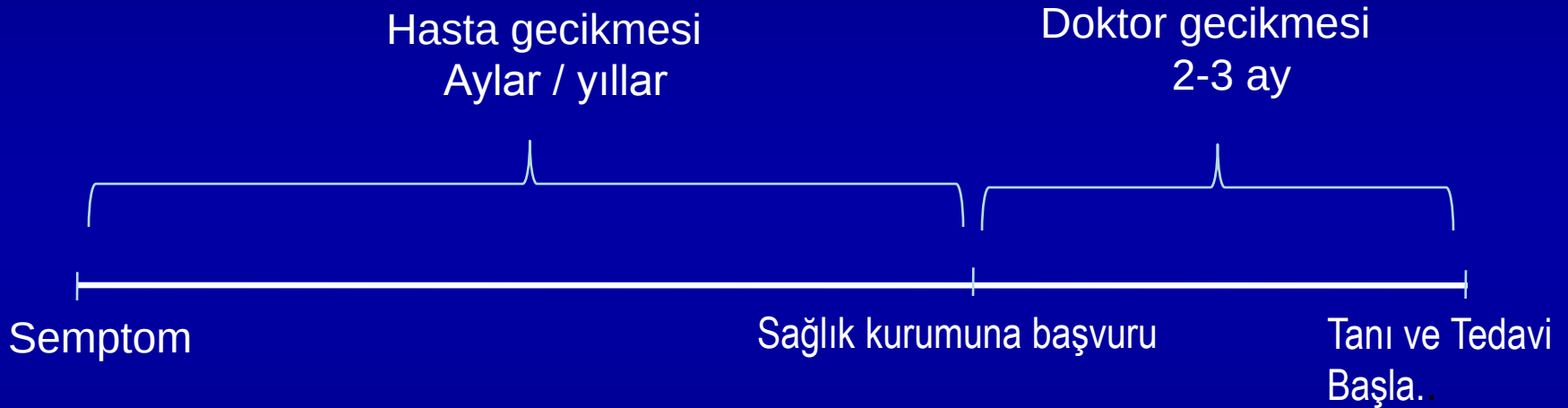
Ticari Moleküler Direnç Testi Kitleri

- Yayma sonucundan 1-2 gün sonra ilaç direnç sonucu
 - Hızla uygun tedaviye geçebilme olanağı
 - Daha kısa süre bulaştırıcılık dönemi
- Ticari
- Türkiye öncelikli 27 ülkeden biri değil
- Yüksek test maliyetleri



Tanı gecikmesi

Tanı gecikmesi = Hasta gecikmesi + doktor gecikmesi



Moleküler testler doktor gecikmesini 2-3 ay kısaltır.

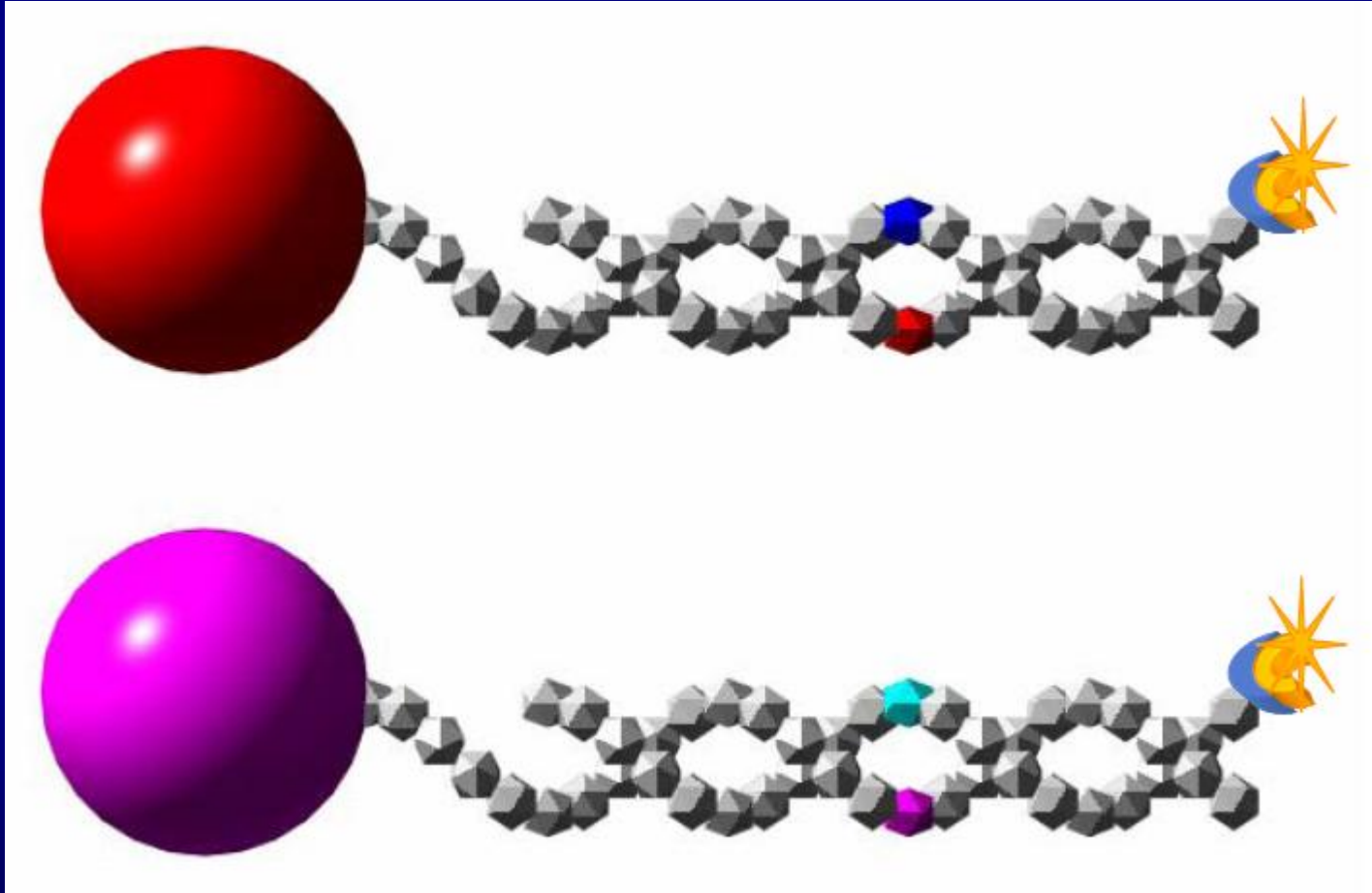
Ne moleküler testler ne de DOTS aylar/yıllar süren hasta gecikmesine etki etmez.

Hasta gecikmesi aktif olgu yakalama ve temaslı taraması ile kısaltılabilir.

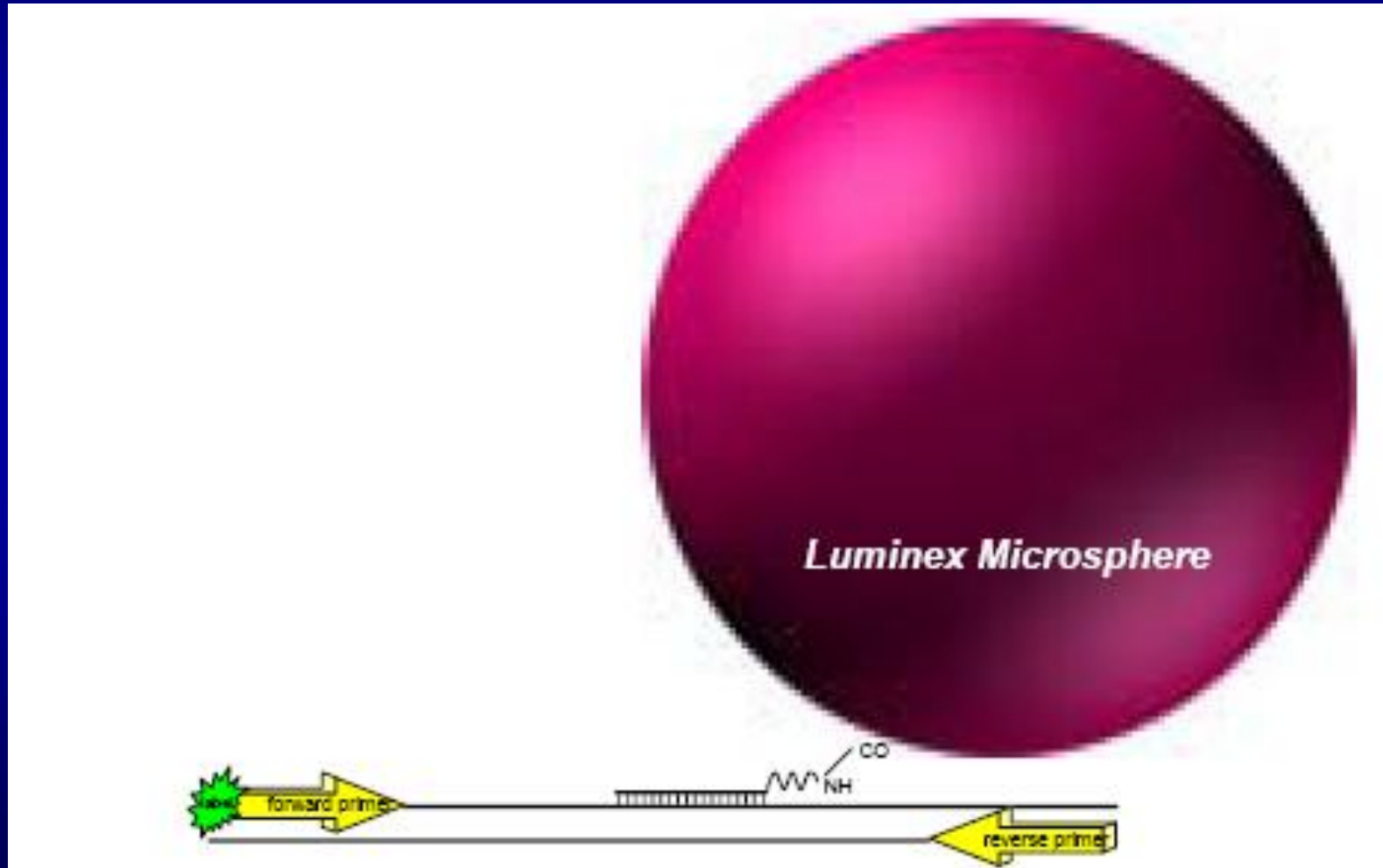
Moleküler tanı testleri ucuz olmalı, kontrol programının sınırlı kaynakları aktif olgu yakalama ve temaslı taramasına kaydırılmalıdır.



Mikrokürecik Bazlı Hibridizasyon Testi



Mikrokürecik Bazlı Hibridizasyon Testi



Mikrokürecik Bazlı Hibridizasyon Testi

Probe Design

- Tüm problemler 18-24nts uzunluğunda
- SNP tam ortada
- Mikroküreciğin -COOH grubuyla birleşmek için 5' ucunda -NH₂ grubu içermeli
- -NH₂ grubu ile prob arasında C12 spacer

Primer Design

PCR ürün uzunluğu 150-300bp

Bir primer 5' biotin işaretli (Bead'e bağlı probun komplementeri olan primer)

Mikrokürecik Bazlı Hibridizasyon Testi

- Ucuz , multipleks PCR'a uygun
- 100 mikrokürecik= 100 SNP/tüp
- Daha az örnek ihtiyacı
- Sıvı ortam  tekrarlanabilir sonuç

rpoB (81bp)

- 153 bp uzunluğunda PCR ürünü
- 5 wild type prob
- 516, 526, 531 pozisyonlarındaki en sık 5 mutasyonu saptayan 5 mut prob
- İhtiyaca göre yeni mut prob eklenebilir
- 2.5 Euro / hasta



