

İlaç direnci saptanmasında yeni yöntemler

Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Bornova, İZMİR

2050 TB Eliminasyon Hedefi

(WHO; Global Tuberculosis Report 2012)

||

•İlaca duyarlı ve ilaca dirençli TB tanısında ilerleme (FIND)

+

•BCG'den daha etkili bir aşı ile kitle aşılması (Aeras; TBVI)

+

•Tüm TB formları için daha etkili ve kısa süreli tedavi rejimleri (TB Alliance)

+

•Latent TB enfeksiyonu olan kişilerin geniş ölçekli tedavisi

Partnerships

Who we work with

Our donors

Donate to FIND

Country: Program: Profile:

Name	Country
Alere Inc. (previously Inverness Medical Innovations Inc.)	USA
Antigen Discovery, Inc. (previously ImmPORT Therapeutics Inc.)	USA
Becton, Dickinson and Company	USA
Cepheid	USA
Chembio Diagnostic Systems, Inc.	USA
Chemogen Inc.	USA
Global Implementation Solutions	USA
HX Diagnostics	USA
Infectious Disease Research Institute	USA
Nanogen Inc.	USA
PriTest	USA
Salubris Inc.	USA
T2 Biosystems	USA
13 partners found	

Partnerships

Who we work with

Our donors

Donate to FIND

Country: Program: Profile:

Name	Country
Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Germany
Chimera Biotec GmbH	Germany
Cibitest GmbH	Germany
Genovac GmbH	Germany
Hain Lifescience GmbH	Germany
LIONEX Diagnostics	Germany
Thymed GmbH	Germany
7 partners found	

Partnerships

Who we work with

Our donors

Donate to FIND

Country: Program: Profile:

Name	Country
Turkish National TB Reference Laboratory (NTRL), Department of Refik Saydam Heigiene Center (RSHC)	Turkey
1 partner found	

Tuberculosis

TB projects

TB projects

- Antibody detection
- Antigen detection
- Automated NAAT
- β -lactamase detection
- LAMP TB
- LED fluorescence microscopy
- LFI sensitivity increase
- Line probe assay (1st line drugs)
- Line probe assay (2nd line drugs)
- Liquid culture & DST
- Rapid colorimetric DST
- Rapid speciation
- Xpert MTB/RIF clinical studies
- Reports & brochures

Approved by
WHO/STAG

	Concept >	Feasibility >	Development >	Evaluation >	Demonstration >	Implementation >
Reference laboratory level					 	Liquid Culture & DST Rapid Speciation Line Probe Assay (1st line drugs)
District / peripheral level		Rapid Colorimetric DST		Line Probe Assay (2nd line drugs)	LAMP TB	LED fluorescence microscopy  Xpert MTB/RIF
Community Level (POC)	LFI sensitivity increase	Antibody detection Antigen detection	β-lactamase detection			

Direncin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Fenotipik yöntemler

- Otomatize sıvı sistemler (MGIT 960; BD)
- Ticari mikrodilüsyon testi (Sensititre MYCOTB; Trek Diagnostic)
- Rapid colorimetric drug susceptibility test [RCDST] (<http://www.finddiagnostics.org>)
- Nitrate-reductase assay [NRA] (Plos ONE; 6(5); e19565, 2011)
- Microscopic Observation Drug Susceptibility [MODS] (Plos ONE; 6(5); e19565, 2011)

Moleküler yöntemler

- | | |
|---|--------------------|
| – PCR-ters hibridizasyon (Hain-LifeScience) | – DNA dizi analizi |
| – Xpert MTB/RIF (Cepheid) | |

MGIT 960 (Becton Dickenson)

<u>Primer ilaçlar</u>	MGIT960 (NCCLS;2003)	MGIT960 (CLSI; 2011)
<u>Izoniyazid</u>	0.1 0.4	0.1 0.4
<u>Rifampisin</u>	1.0	1.0
<u>Etambutol</u>	5.0	5.0
<u>Pirazinamid</u>	100	100
<u>Sekonder İlaçlar</u>		
<u>Streptomisin</u>	1.0 4.0	1.0 4.0
<u>Amikasin</u>		1.0
<u>Kapreomisin</u>		2.5
<u>Etionamid</u>		5.0
<u>Etambutol</u>		7.5
<u>Levofloksasin</u>		1.5
<u>Moksifloksasin</u>		0.25
<u>Ofloksasin</u>		2.0
<u>Rifabutin</u>		0.5
<u>Linezolid</u>		1.0

Sensititre MYCOTBI (TREK Diagnostics)

- Daha kısa sürede sonuç (10-14 gün)
- MİK değerleri
- Hem birinci hem ikinci seçenek ilaçlar
- APY ile %99.3 uyum (Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31: 835-9)
- APY ile %94-100 kategorik uyum (J Clin Microbiol. 2012; 50: 3732-4)



SENSITITRE® CUSTOM PLATE FORMAT

Plate Code: MYCOTBI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	OFL 32	MXF 8	RIF 16	AMI 16	STR 32	RFB 16	PAS 64	ETH 40	CYC 256	INH 4	KAN 40	EMB 32
B	OFL 16	MXF 4	RIF 8	AMI 8	STR 16	RFB 8	PAS 32	ETH 20	CYC 128	INH 2	KAN 20	EMB 16
C	OFL 8	MXF 2	RIF 4	AMI 4	STR 8	RFB 4	PAS 16	ETH 10	CYC 64	INH 1	KAN 10	EMB 8
D	OFL 4	MXF 1	RIF 2	AMI 2	STR 4	RFB 2	PAS 8	ETH 5	CYC 32	INH 0.5	KAN 5	EMB 4
E	OFL 2	MXF 0.5	RIF 1	AMI 1	STR 2	RFB 1	PAS 4	ETH 2.5	CYC 16	INH 0.25	KAN 2.5	EMB 2
F	OFL 1	MXF 0.25	RIF 0.5	AMI 0.5	STR 1	RFB 0.5	PAS 2	ETH 1.2	CYC 8	INH 0.12	KAN 1.2	EMB 1
G	OFL 0.5	MXF 0.12	RIF 0.25	AMI 0.25	STR 0.5	RFB 0.25	PAS 1	ETH 0.8	CYC 4	INH 0.06	KAN 0.6	EMB 0.5
H	OFL 0.25	MXF 0.06	RIF 0.12	AMI 0.12	STR 0.25	RFB 0.12	PAS 0.5	ETH 0.3	CYC 2	INH 0.03	POS	POS

ANTIMICROBICS

OFL	Ofloxacin
MXF	Moxifloxacin
RIF	Rifampin
AMI	Amikacin
STR	Streptomycin
RFB	Rifabutin
PAS	Para-aminosalicylic acid
ETH	Ethionamide
CYC	Cycloserine
INH	Isoniazid
KAN	Kanamycin
POS	Positive Control
EMB	Ethambutol

- Inoculum: 5×10^5 cfu/ml
- Shelf Life: 6 mo.
- Plates per Box: 10

Rapid colorimetric drug susceptibility test (DST)

Product name: *MDR-XDRTB Colour Test*

Partner: London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM)

Stage of Development: Feasibility phase

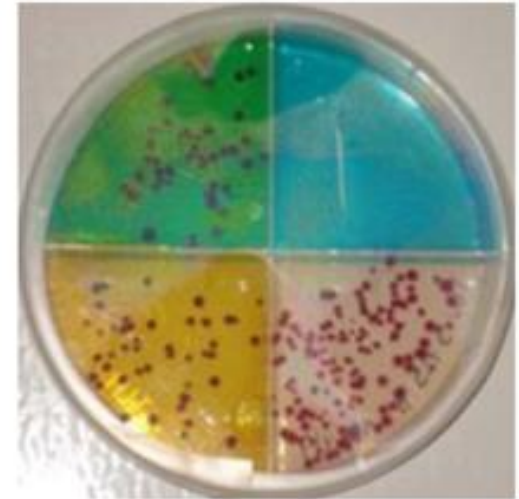
Level of the Health system: Peripheral laboratory (microscopy centres)



A complete MDR-XDRTB colour test: sputum is collected into disinfectant transport medium that is applied directly to the culture plate as soon as it reaches the laboratory, without any processing.



An MDR-XDRTB colour test for drug-susceptible TB that only grew in the clear detection quadrant (red dots), not the coloured antibiotic-containing quadrants.



MDR TB grew in detection, isoniazid and rifampicin containing quadrants, but the quinolone (blue) prevented TB growth, ruling out XDRTB.

Direncinin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler

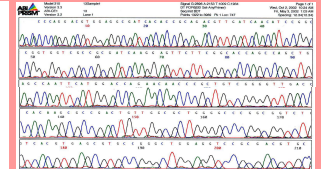
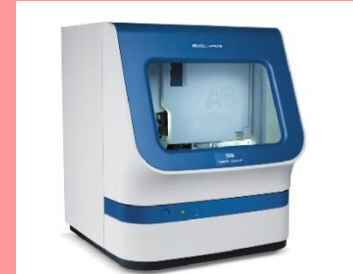
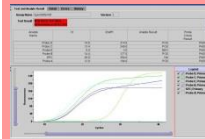
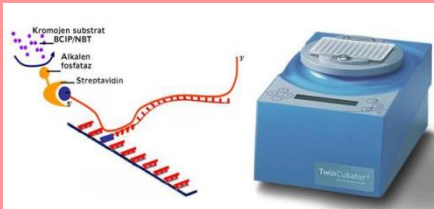
- Kültürden veya klinik örnekten DNA eldesi



- Direnç genlerinin (hedef DNA) PCR ile amplifikasyonu



- Mutasyonların saptanması



PCR-Ters Hibridizasyon Testleri

•MTBDR_{plus} (Hain LifeScience)

- RİF direnci → *rpoB*
- INH direnci → *katG* ve *inhA*

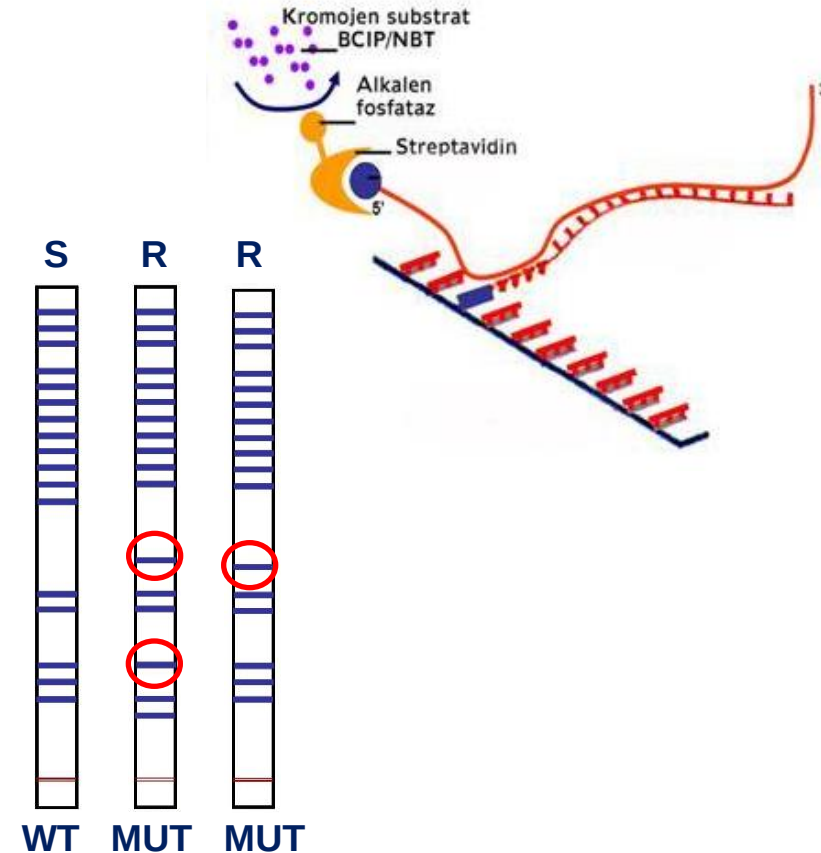
•INNOLIPA RIF TB (Innogenetics)

- RİF direnci → *rpoB*

•MTBDRs/ (Hain LifeScience)

- ETB direnci → *embB*
- AK, KAN, VIO, CAP direnci → *rrs*
- Kinolon direnci → *gyrA*

- Kullanım kolaylığı nedeniyle günümüzde rutin uygulamada en çok kullanılan yöntemlerden biridir



MTBDR*plus* (Hain LifeScience)

- RIF ve INH direncini saptamaktadır
 - Yayma pozitif ve negatif solunum örneklerinden
 - Kültürden
- **Turk J Med Sci 2011; 41 (3): 419-25**
 - MTBDR*plus* (V1) DB (+) 82 örnek
 - 3 TUB (%96) negatif, toplam 8 geçersiz sonuç (%90)
 - RIF uyumu (%97.5), INH uyumu (%98.8)
- **J Clin Microbiol 2012; 50 (11): 3712-16**
 - MTBDR*plus* (V2) toplam 282 örnek Özgüllük %100
 - Duyarlılık 21 DB (+) örnekte %100
 - Duyarlılık 31 DB (-) örnekte %56.6
 - RIF ve INH duyarlılık sonucu uyumu (%100)

MTBDRs/ (Hain LifeScience)

- AK, KAN, VIO, CAP, ETB ve FLQ direncini saptamaktadır

- Yayma pozitif solunum örneklerinden

- Kültürden

- PLoS ONE 2013; 8(2): e55292 Meta-Analiz**

- Direnci saptamada duyarlılık**

- FLQ %87.4 ·AK %82.6 ·CAP %82

- KAN %44.4 ·ETB %67.9

- Duyarlılığı saptamada özgüllük**

- FLQ % 97.1 ·AK %99.5 ·CAP %97.3

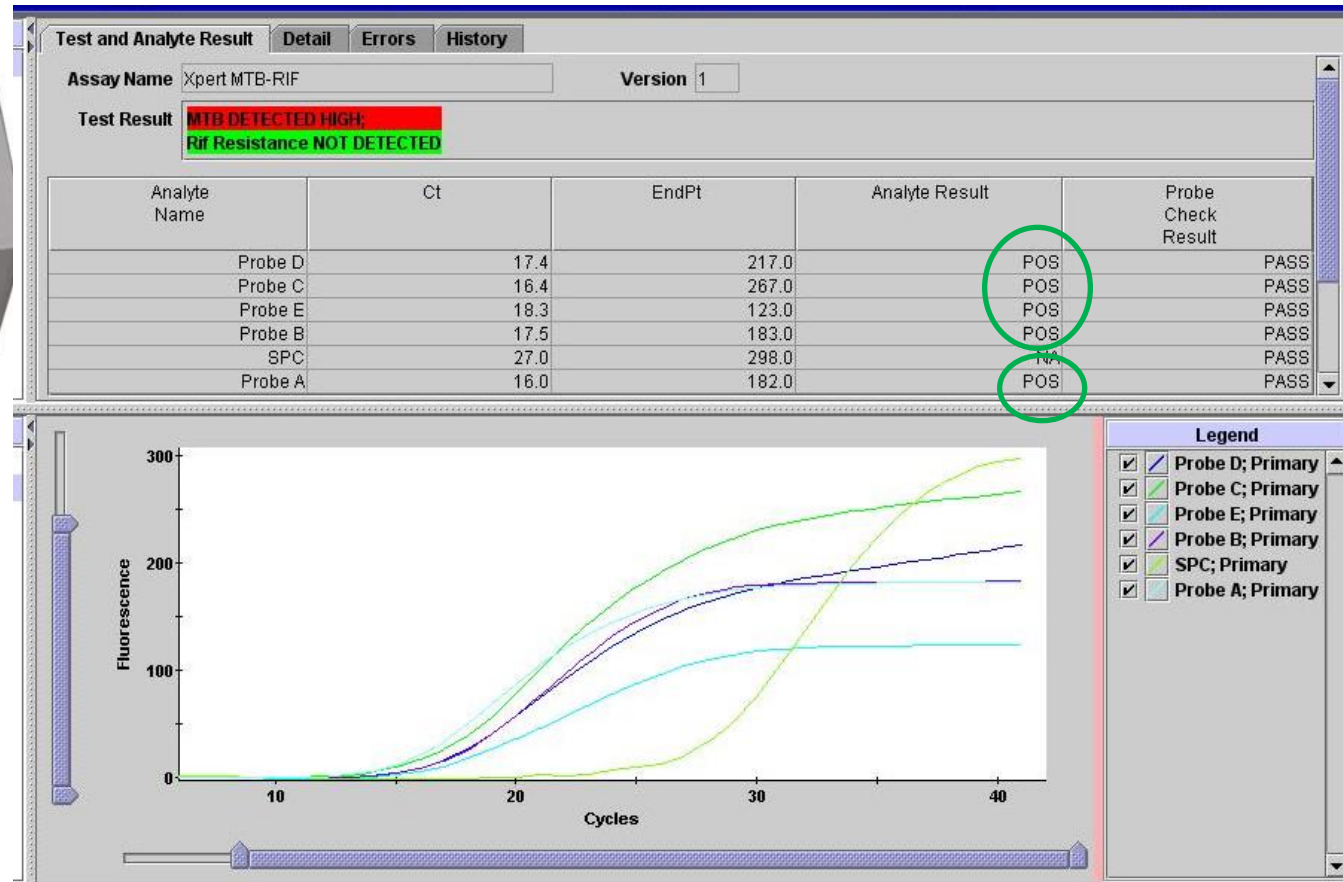
- KAN %99.3 ·ETB %79.9

- Klinik örneklerdeki performansını değerlendirmek için veriler yeterli değil

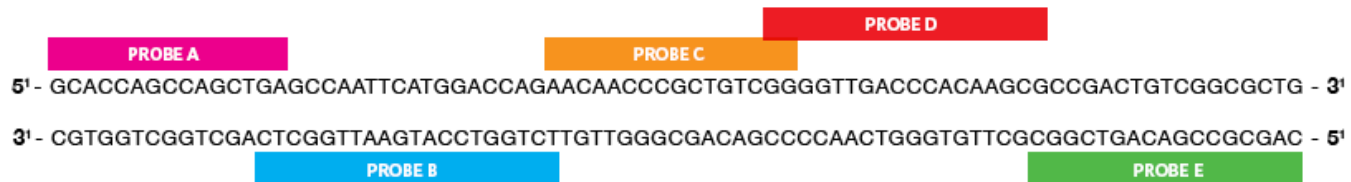
Sorunlar

- Sessiz mutasyonlar direnç paterni oluşmasına yol açabilir
- Test sadece problemlerin seçildiği genomik bölgelerin sınırları içinde çalışır
 - Bu genlerin diğer bölgelerinden kaynaklanan
 - Bilinmeyen direnç mekanizmaları saptanamaz
- *Wild*-tip propla birlikte mutasyon proplarından biri pozitif boyanabilir
 - Heterorezistans durumunda
 - Test edilen örnekte birden fazla sayıda suş bulunması durumunda
- Direncin fenotipik olarak ortaya çıkıp çıkmaması araştırılan mutant ve mutant olmayan dizilerin oranına bağlıdır
- Sonuçlar mutlaka fenotipik duyarlılık testleriyle doğrulanmalıdır

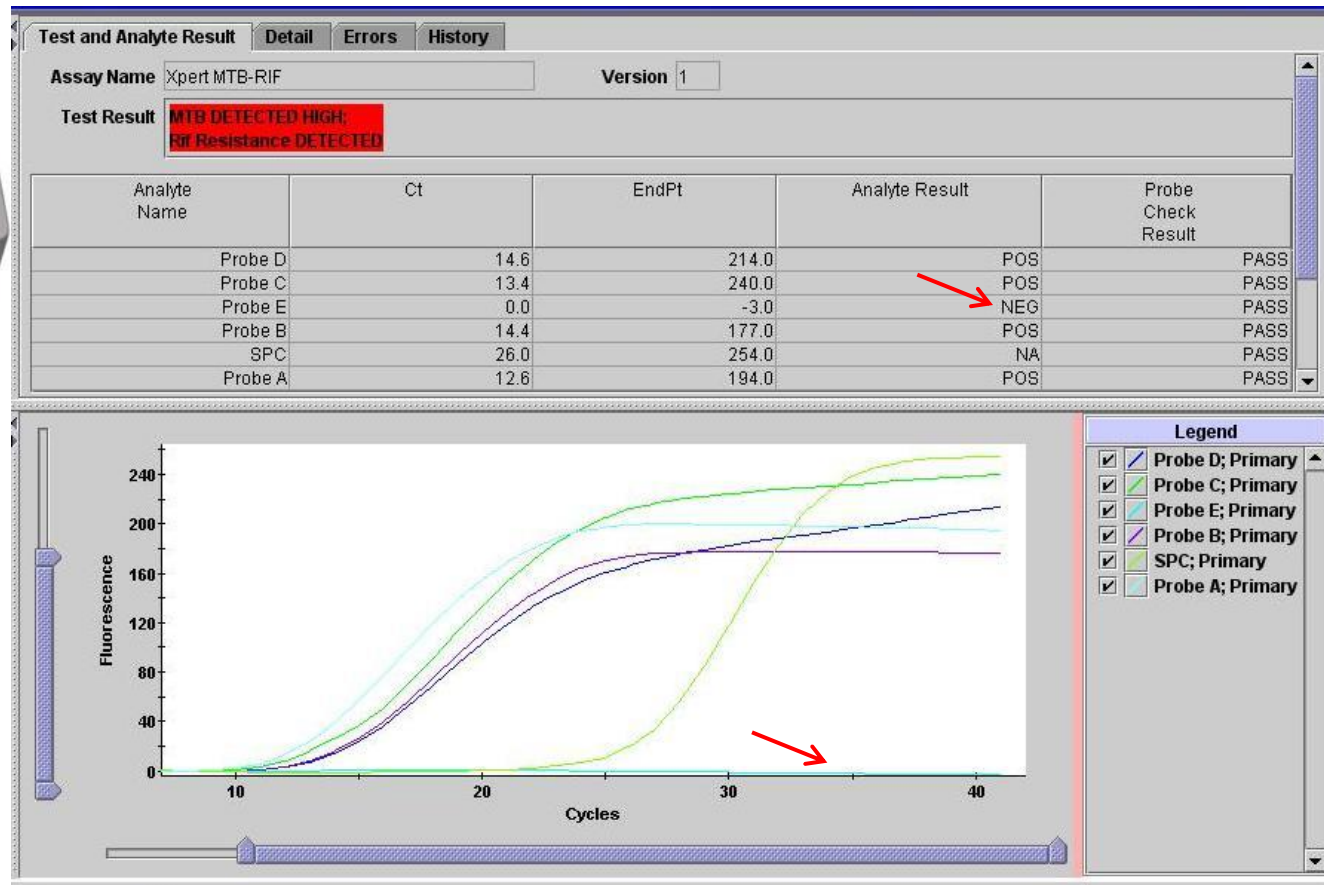
Real-time PCR [GeneXpert MTB/RIF]



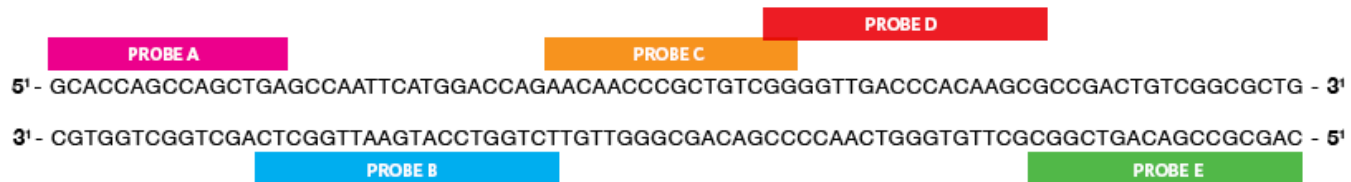
***rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION**



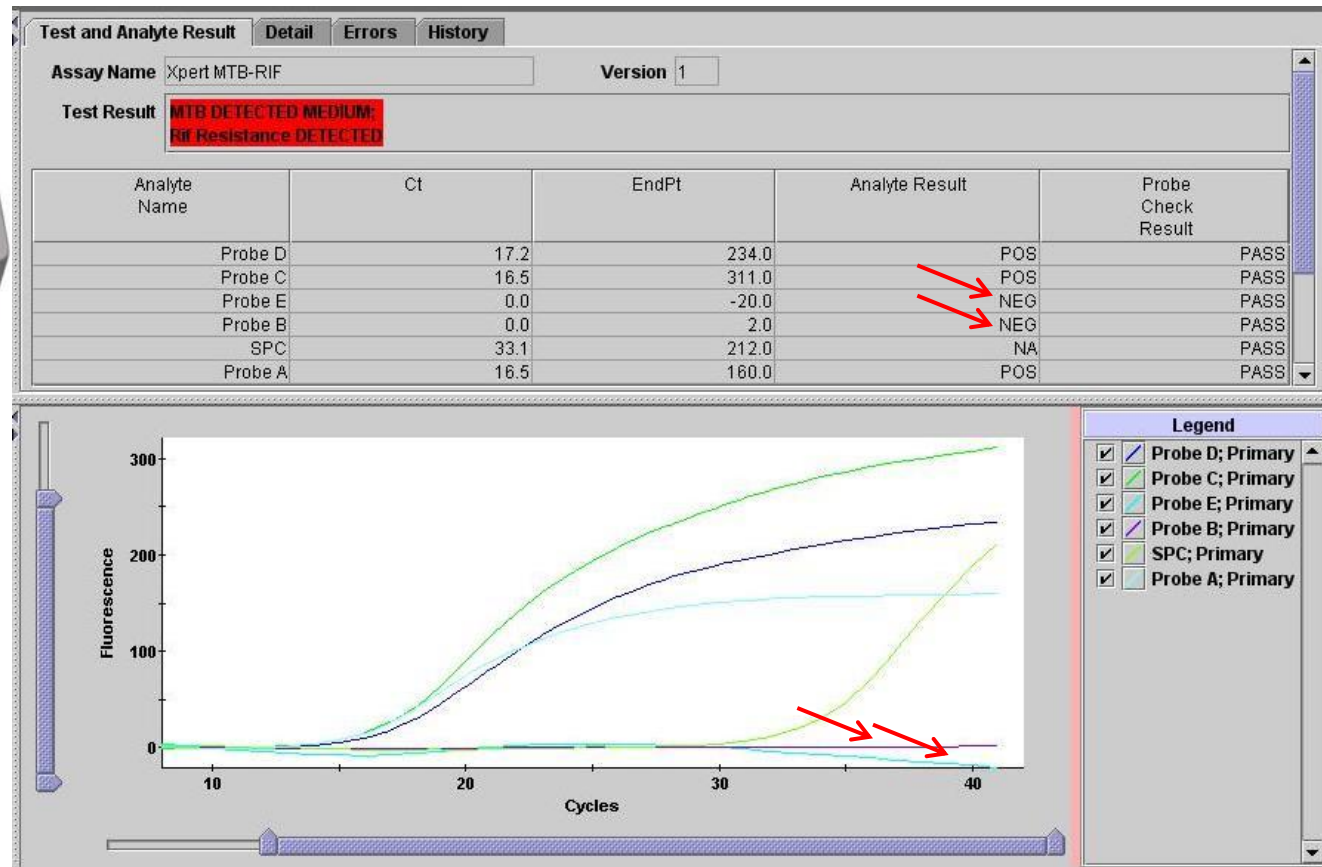
GeneXpert MTB/RIF



***rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION**



GeneXpert MTB/RIF



***rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION**



GeneXpert MTB/RIF

- Yayma (+) ve (-) örneklerden (**kültürden**) RIF direnci saptanabilmektedir

- J Clin Microbiol 2012; 50 (11): 3712-16**

- Gene Xpert toplam 282 örnek özgüllük %100**

- 21 DB (+) örnekte duyarlılık %90.5
- 31DB (-) örnekte duyarlılık %58
- RIF duyarlılık sonucu uyumu %100

- J Clin Microbiol 2011; 49(12): 4138-41**

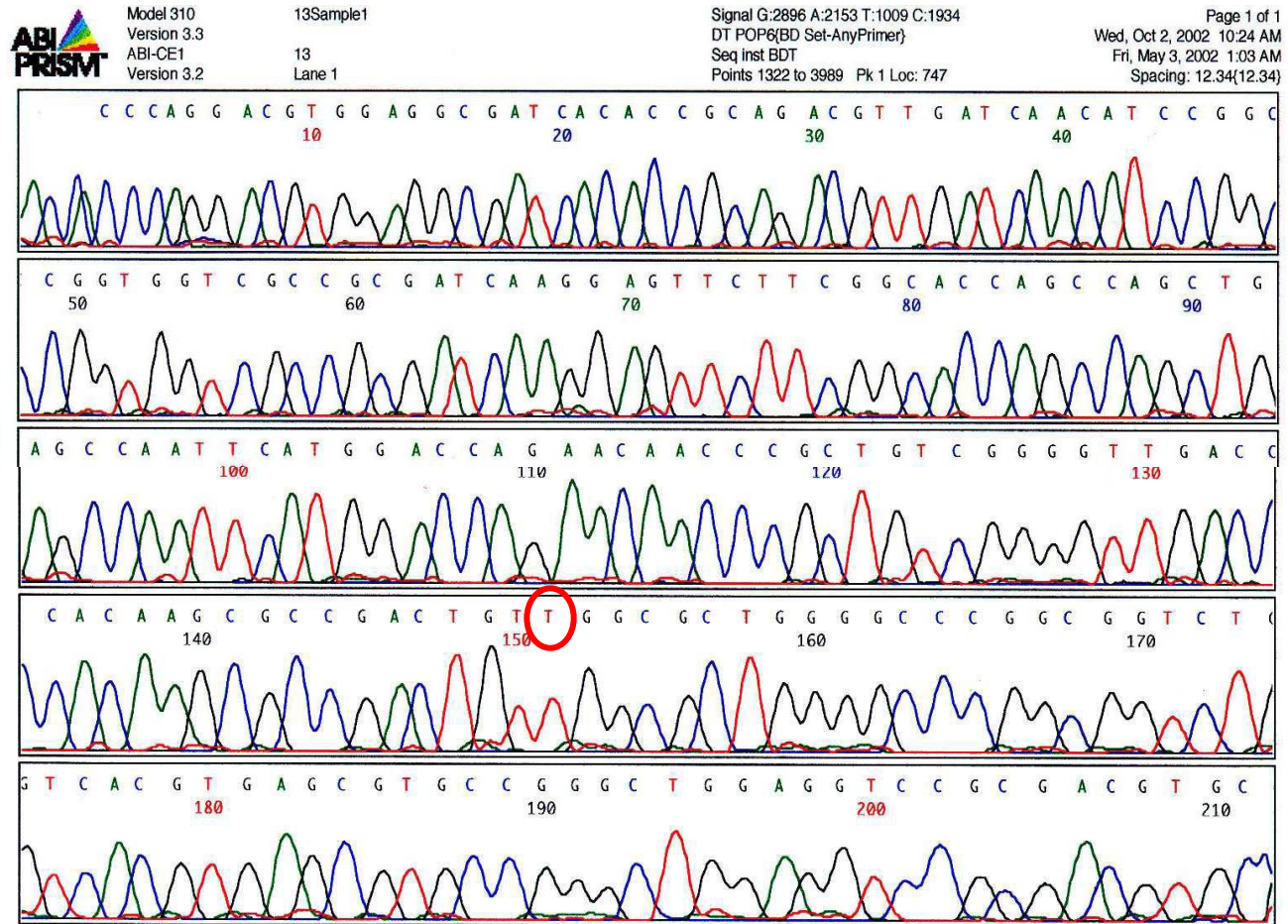
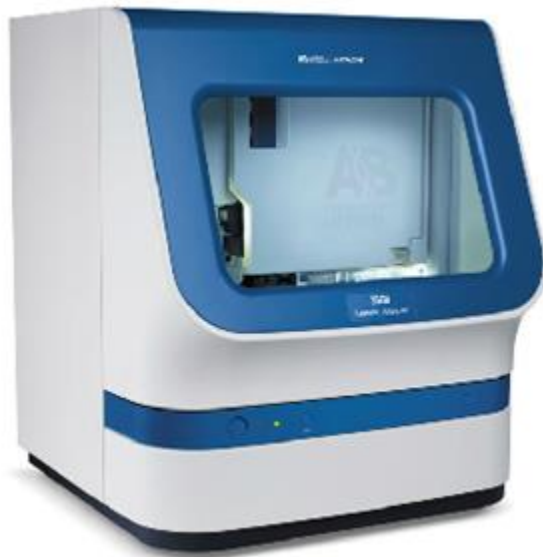
- Gene Xpert toplam 253 pulmoner örnek özgüllük %100**

- 27 DB (+) örnekte duyarlılık %100 (**%98**)
- 35 DB (-) örnekte duyarlılık %68.5 (**%68**)

- Gene Xpert toplam 176 ekstrapulmoner örnek özgüllük %100**

- 4 DB (+) örnekte duyarlılık %100
- 44 DB (-) örnekte duyarlılık %47.7
- RIF duyarlılık sonucu uyumu %100

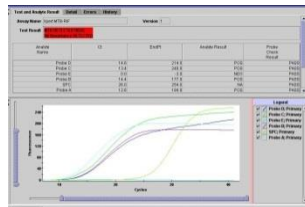
DNA Dizi Analizi: Sanger



Klinik örnek



Gene-Xpert MTB/RIF

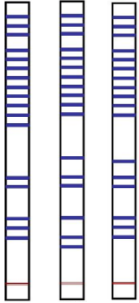


- **Lancet 2011; 377: 1495–1505**
- RIF dirençli olgularda
Duyarlılık 236/250 (%94.4)
- RIF duyarlı olgularda
Özgüllük 796/810 (%98.3)
- **Int J Tuber Lung Dis 2012; 16:206-8**
 - Xpert RIF → dirençli
 - MTBDR_{plus} RIF → duyarlı
 - Fenotipik test RIF → duyarlı
 - Dizi analizi RIF → duyarlı
- Yanlış pozitif
- Heterorezistans
- Multipil suşla enfeksiyon

Kültür



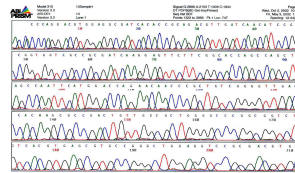
MTBDRplus



Duyarlılık testi



**Gerekirse DNA
dizi analizi**



• Klinisyen için hızlı duyarlılık sonucu ne kadar kritik?

- En hızlı yöntem 1 gün -10 gün
- En yavaş yöntem 21 gün

- Türkiye’de 2009 yılında ÇİD-TB
- Yeni olgularda %2.7
 - Tedavi almış olgularda %20.5

• Klinisyen sonuçları ne kadar dikkate alıyor?

TABLO 4: Çalışmamızdaki direnç oranları.

Direnç şekli	n	%
Yeni olgu (primer) direnci	49	19,1
Hepsi duyarlı	208	80,9
Tek ilaca direnç	34	13,2
H (izoniyazit)	39	15,2
R (rifampisin)	15	5,8
E (etambutol)	17	6,6
S (streptomisin)	7	2,7
En az HR (ÇİD)	12	4,7
HRES	5	1,9
HRE	4	1,6
HE	1	0,4
HS	2	0,8
Toplam hasta	257	100

Diğer üç hasta hem klinik hem de laboratuvar olarak ÇİD TB kabul edildi. Laboratuvar olarak ÇİD olan 12 hastanın 9’unda (%75), sadece R direnci olan üç hastanın hepsinde 2 ay HRZE + 4 ay HR tedavisi ile iyileşme sağlandı. Hastalar asker oldukla-

DSÖ

ÇİD-TB kür %65-85



TEŞEKKÜRLER