

# ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TEST YÖNTEMLERİ

**Dr Nuri ÖZKÜTÜK**

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD  
MANİSA

Tüberküloz ile savaşta en etkili yol;

- Hastalarının erken saptanması
- Etkili tedavisi

İle bulaş zincirinin kırılmasıdır.

Sorun;

- Artan ilaç direncinin etkin tedaviyi zorlaştırması

## DSÖ'nün

ÇİD TB prevelansının yüksek olduğu bölgelerde önerisi;

## DOTS-plus

- Standart ilaç tedavisi verilmemesi,
- **Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre özgün tedaviler düzenlenmesi**
- Gerektiğinde sekonder ilaçların kullanılması

**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 olmadığı olan her hastada testin tekrarı

# Mikobakteriyel Duyarlılık Test Yöntemleri

## ■ Konvansiyonel yöntemler

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

## ■ Kolorimetrik yöntemler

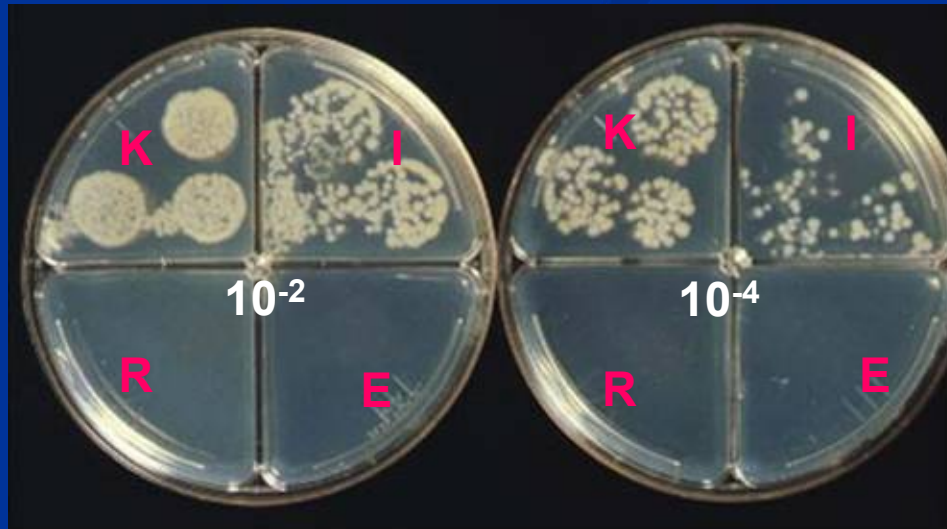
- Mycolor-TK
- Resazurin (Alamar mavisi)
- MTT

## ■ Canlı bakteri varlığına dayalı yöntemler

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

# Proporsiyon (orantı) Yöntemi:

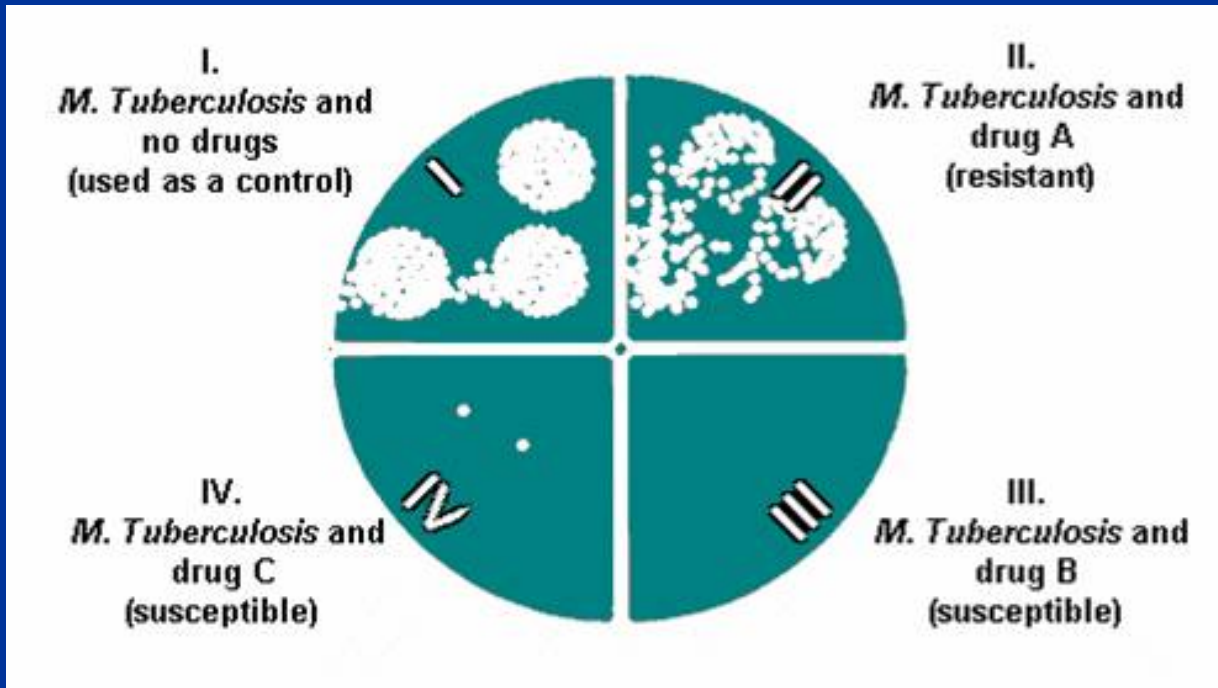
- Sık kullanılan güvenilir bir yöntemdir.
- Bakteri suşu ilaçlı ve ilaçsız b.y.lerine ekilir
- Yüksek ve düşük dilüsyonlu inokulumlar kullanılarak sayılabilir koloniler elde edilir



İlaçlı b.y. de üreyen koloni sayısı

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

İlaçsız b.y. de üreyen koloni sayısı



# Besiyeri

## ■ Lowenstein-Jensen (LJ)

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



## ■ Middlebrook 7H10-7H11

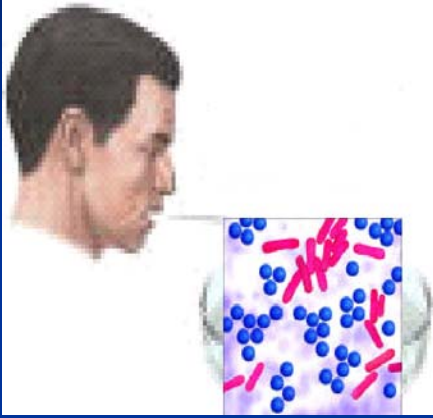
- Raf ömrü kısa
  - Pahalı
  - Daha kısa sürede (21 gün)
  - Daha güvenilir
- } sonuç verir



CLSI, MD7H10 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.

# Direkt test

## ■ Avantajları;

- Daha kısa sürede sonuç verir (3 hf)
- Hastanın bakteriyel popülasyonundaki dirençli bakteri oranını daha iyi gösterir

## ■ Dezavantajları

- İnokulumu doğru ayarlamak zor
- Kontaminasyon
- Non-tüberküloz mikobakteriler

## ■ Önerildiği durumlar

- İlaç direncinin yüksek olduğu bölgelerde,
- Dirençli TB'den şüphelenildiği durumlarda.
- Sonuçlar indirekt testle doğrulanmalıdır.

# İndirekt test

## ■ Avantajları;

- Primer kültürde üremiş ve tanımlanmış saf bakteri kolonisi kullanılır.
- İnokulum standardizasyonu kolaydır.
- Standart yöntem olarak kabul edilmektedir

## ■ Dezavantajları;

- Daha geç sonuç verir
- Primer kültürde yetersiz üreme varsa hastadaki dirençli basil oranını tam yansıtmayabilir.

# Kritik Proporsiyon (KP)

- Hastada doğal dirençli mutantlar bulunur
- Dirençli olanların oranı KP sınırının üzerinde ise;
  - ilacın tedavide etkili olamayacağı,
  - İlaç ile dirençli bakterilerin seçileceği düşünülür
- 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 ( $\mu\text{g/ml}$ )	KP (%)	KK ( $\mu\text{g/ml}$ )	KP (%)
İzoniazid (INH)	0.2	1	0.2	1
Rifampisin (RIF)	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  $0.2\mu\text{g/ml}$  (KK)  $\rightarrow$  R

INH  $1.0\mu\text{g/ml}$   $\rightarrow$  S

} düşük düzeyde direnç

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

# Test edilecek ilacın seçimi

- Önce primer ilaçlar test edilmeli.
- Primer ilaçlara karşı test edilen izolat;
  - RİF'e dirençli veya
  - Diğer primer ilaçlardan en az ikisine dirençli ise



- Sekonder ilaçlara karşı +
- EMB'nin yüksek konsantrasyonuna karşı test edilmeli



- Çalışılacak paneli her toplum kendi belirlemeli.
- Kararda etkili faktörler;
  - hizmet verilen hasta popülasyonu,
  - toplumdaki ilaç direncinin prevalansı,
  - ilaç direnci görüldüğünde ek testlerin gerektirdiği süre
  - toplumda uygulanan ilaç rejimleri

- **Örnek;**

Toplumda tek başına PZA direnci nadir ise



Test edilecek primer ilaçlar paneline PZA dahil edilmeyebilir.

# CLSI'a göre

## ■ Primer İlaçlar

- İsoniazid
- Rifampisin
- Etambutol
- Pirazinamid

## ■ Sekonder ilaçlar

- Streptomisin
- Kapreomisin
- Etionamid
- Kanamisin
- Ofloksasin
- Rifabutin

# Ülkemizde

## ■ Primer İlaçlar

- İsoniazid
- Rifampisin
- Etambutol
- Streptomisin

# Kültüre dayalı hızlı yöntemler

- CDC;

örnek kabul edildikten sonra 30 gün içinde primer ilaçlara karşı duyarlılık sonuçları rapor edilmeli.

- Bu amaçla CLSI;

FDA'in de onayladığı bazı hızlı, sıvı besiyerinde kültüre dayalı ticari sistemlerin kullanılabilceğini kabul etmiştir.

- BACTEC 460 TB,
- MGIT 960,
- Versa TREK (ESP II)

## Fakat;

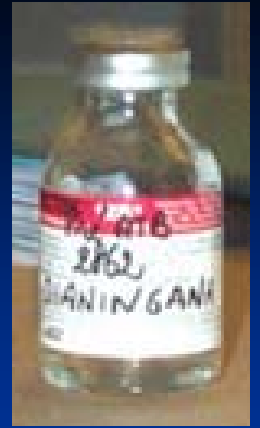
- Hızlı ticari sistemlerde elde edilen sonuç,
  - Test edilen izolatın herhangi bir ilaca karşı dirençli olduğunu gösteriyorsa,
  - Kararsız kalınmışsa



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

# BACTEC 460 TB

(BectonDickinson)



- Yarı otomatize, radyometrik
- BACTEC 12B besiyeri  $^{14}\text{C}$  işaretli palmitik asit içerir
- $^{14}\text{C}$  işaretli palmitik asit kullanımı



$^{14}\text{CO}_2$



Üreme İndeksi (GI)



## Duyarlılık testi,

- izolat ilaçlı ve ilaçsız şişelere ekilir.
- ilaçsız şişeye 100 kat dilüe inokulum ekilir.
- ilaçsız ve ilaçlı şişelerdeki günlük GI artışı ( $\Delta GI$ ) karşılaştırılır.

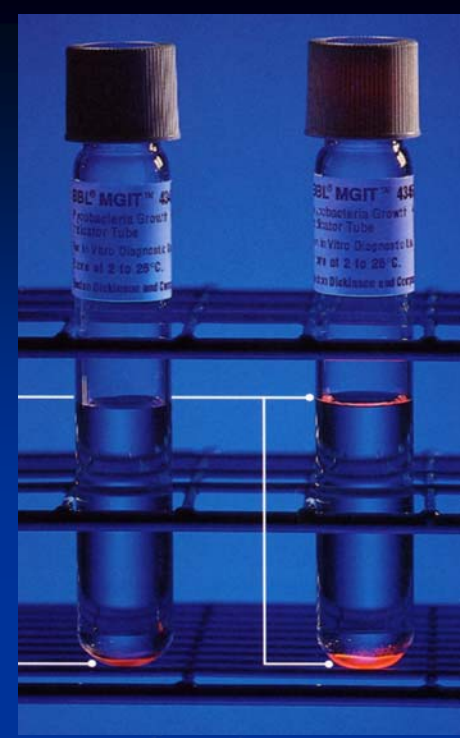
İlaçlı şişe  $\Delta GI \geq$  Kontrol şişesi  $\Delta GI \rightarrow$  **DİRENÇLİ**

İlaçlı şişe  $\Delta GI <$  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
$\Delta GI$	+41	+2	+250	+2	-1

# MGIT 960

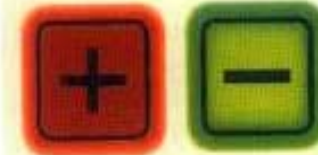
(Becton Dickinson)



- Tam otomatize, radyometrik olmayan
- MGIT tüpün dibindeki silikon içine floresan madde gömülüdür.
- Floresan madde sıvı besiyerindeki oksijen varlığına duyarlıdır.
- Üreyen mikobakterilerce oksijenin kullanılması ile floresans verir

## Duyarlılık testi,

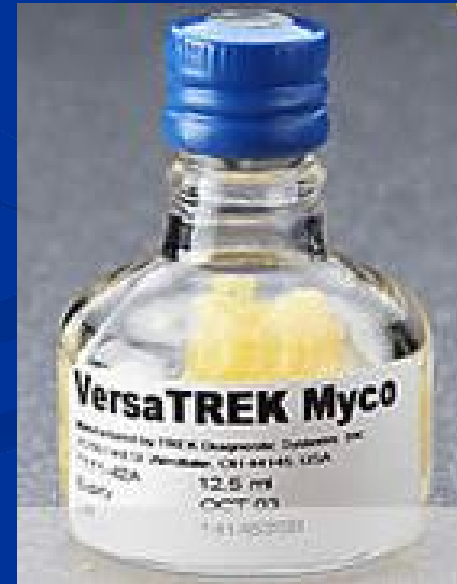
- İlaçsız tüpteki üreme (1/100) ile ilaç içeren tüplerdeki üremenin karşılaştırması esasına dayanır.
- MGIT 960 cihazı; floresansı sürekli izler, sonuçları otomatik olarak yorumlar, dirençli ya da duyarlı olarak verir.





# VersaTREK (ESP Culture System II) (Trek Diagnostic Systems)

- Tam otomatize, sürekli monitorize sistem
- Sıvı besiyeri üzerindeki boşlukta oluşan gaz basıncı değışiklikleri ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır
- **Duyarlılık testi**, antibiyotiksiz ve antibiyotikli şişelerdeki üremenin karşılaştırılması esasına dayanır.



# Duyarlılık Test Sonuçları

- Geciktirilmeden bildirilmelidir.
- Her bir ilacın adı ve sonucun yorumu mutlaka belirtilmelidir. (R-S)
- CLSI alt komitesi;
  - kullanılan yöntem ve besiyeri;
  - kullanılan konsantrasyonlar ve referans yönteme eşdeğer karşılıkları,
  - direnç oranının belirtilmesini önermektedir.



## Teşekkürler

Tulipa orphanidea  
(Manisa lalesi)