

# Tüberküloz Kültür, İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

**Işın Akyar**

**Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.**

**Acıbadem Labmed Tıbbi Laboratuvarı**

ACIBADEM  
LABMED

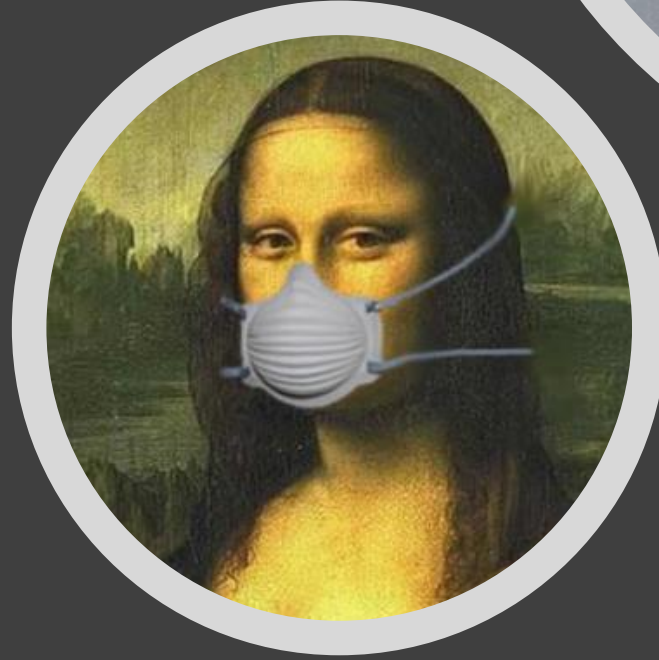


# Kültür- rnek



- Steril/steril olmayan örnekler
- 2 rnek yeterli-DSÖ
- Örneklerin işlenmesi :Kubica yöntemi, NALC-NAOH

- Kültür ekimleri, tanımlama, ve ilaç duyarlılık testleri BSL3'de yapılmalıdır.
- Bir n oda bulunmalıdır.
- Saatte 6-12 hava değişimi olmalıdır.



güvenlik Düzeyi; BSL3



1st Edition WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11



|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | ing (Decontamination-Digestion)                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|    | NALC (N-acetyl L-cysteine)-NaOH (soa)                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxalic Acid</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                      |
|    | Directly on specimens from non-sterile sites                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|    | Decontamination (NaOH):                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• To eliminate contaminants as much as possible w affecting the viability of mycobacteria</li> </ul>                                                                                                                                                                          |
|    | Digestion (NALC):                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• To release mycobacteria trapped in specimen muc</li> <li>• To improve the decontamination process</li> <li>• To facilitate concentration of the specimen</li> </ul>                                                                                                         |
| ns | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Delicate procedure: if it is too harsh, the yield is af mycobacteria are also killed; if too mild, specimen overgrown by other bacteria. Many manual steps</li> <li>• Optimal method for specimens other than sput</li> <li>• Risk of <i>cross-contamination</i></li> </ul> |
|    | N/A. Sediment or pellet obtained: used for sm amplification test (NAAT) or culture                                                                                                                                                                                                                                   |
|    | amination rate: cultures overgrow                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|    | and 8-10% (liquid)                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

## Homojenizasyon, dekontaminasyon ve nötralizasyon

- **Homojenizasyon:** Kültürün duyarlılığını artırır
- **Dekontaminasyon ve nötralizasyon:** Kontaminasyonu ortadan kaldırır ve pH'yı dengeler.
- 1 N NaOH ile dekontaminasyon –modifiye Petroff yöntemi
- NALC-NaOH ile dekontaminasyon
- Zephiran trisodium phosphate
- Oxalic acid yöntemi
- Cetylpyridinium chloride sodium yöntemi
- Sülfirik asit yöntemi

*The number of AFB indicates how infectious the patient is. It is important to record exactly what you see.*

| What you see                                | What to report                 |
|---------------------------------------------|--------------------------------|
| No AFB in 100 fields                        | No AFB observed                |
| 1 – 9 AFB in 100 fields                     | Record exact number of bacilli |
| 10 – 99 AFB in 100 fields                   | 1+                             |
| 1 – 10 AFB per field, check 50 fields       | 2+                             |
| More than 10 AFB per field, check 20 fields | 3+                             |



| What you see (200x)     | What you see (400x)    | What to report         |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| No AFB in one length    | No AFB in one length   | No AFB observed        |
| 1-4 AFB in one length   | 1-2 AFB in one length  | Confirmation required* |
| 5-49 AFB in one length  | 3-24 AFB in one length | Scanty                 |
| 3-24 AFB in one field   | 1-6 AFB in one field   | 1+                     |
| 25-250 AFB in one field | 7-60 AFB in one field  | 2+                     |
| >250 AFB in one field   | >60 AFB in one field   | 3+                     |

*\* Confirmation required by another technician or prepare another smear, stain and read*



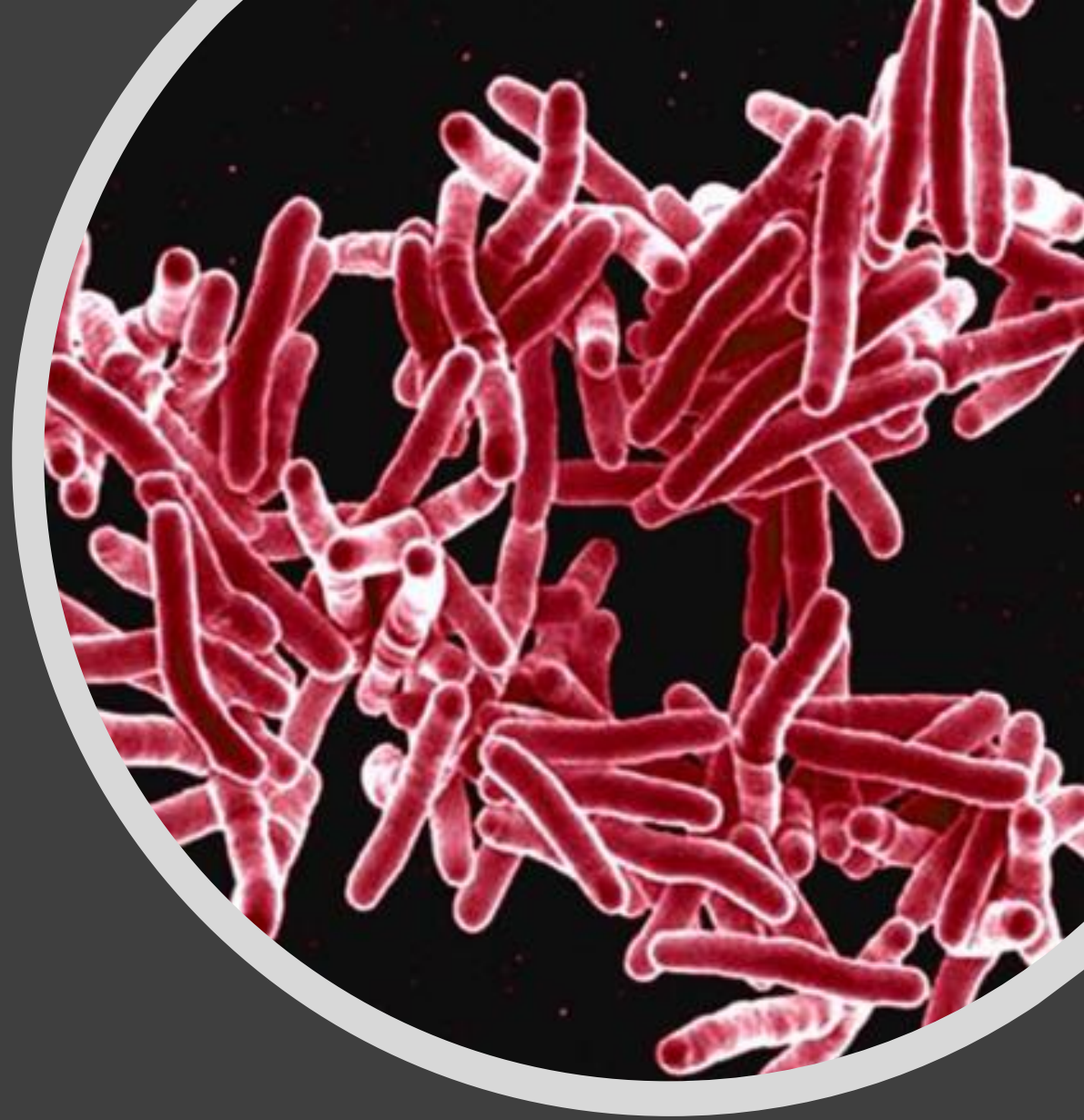
# TB Tanı akış diyagramı



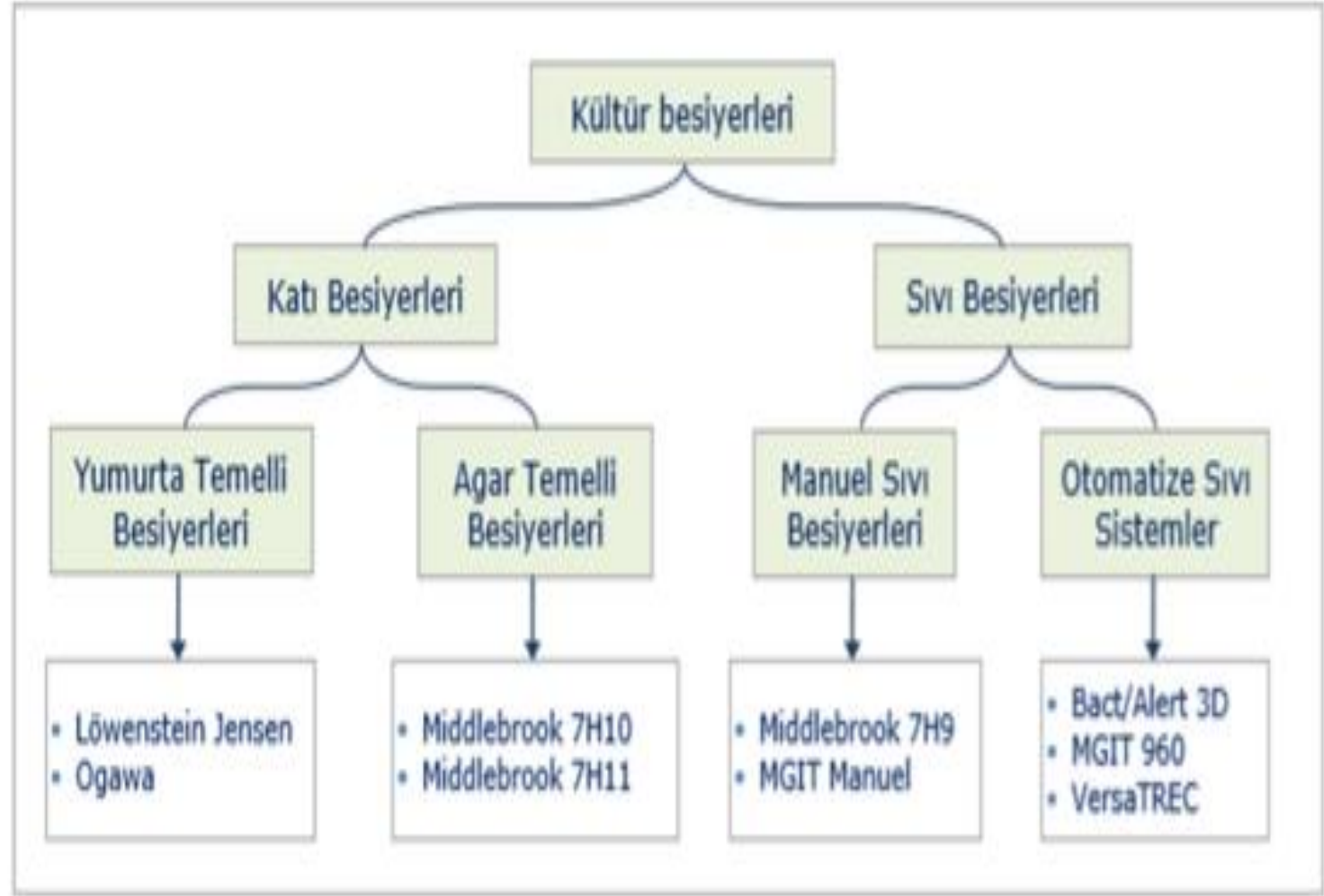
ULUSAL MİKROBİYOLOJİ  
STANDARTLARI (UMS)

# Kültür

- Altın standart- Kesin tanı
- Üreme, tanımlanma, İDT, epidemiyolojik çalışmalar
- **Kültürde mikobakterilerin üremesi için hasta örneklerinin ml .de 10-100 canlı basilin olması yeterlidir.**
- **Duyarlılığı %80-85, özgüllüğü %98**
- Mikroskopide- 5000-10 000 basil/ml
- MTB bölünme süresi 18-24 saat- üreme uzun
- **Kültür değerlendirme süresi 6-8 hft-uzun**
- Özel besiyeri gerektirir .



En sık  
kullanılan  
besiyerleri





## Löwenstein - Jensen besiyeri hazırlanması

Bileşim (g/1,6 L; hazırlanmış besiyeri için)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0,24; tri-Magnesium  
dicitrate 14-hydrate 0,6; L-Asparagine 3,6;  
Potato meal 30,0; Malachite green 0,4

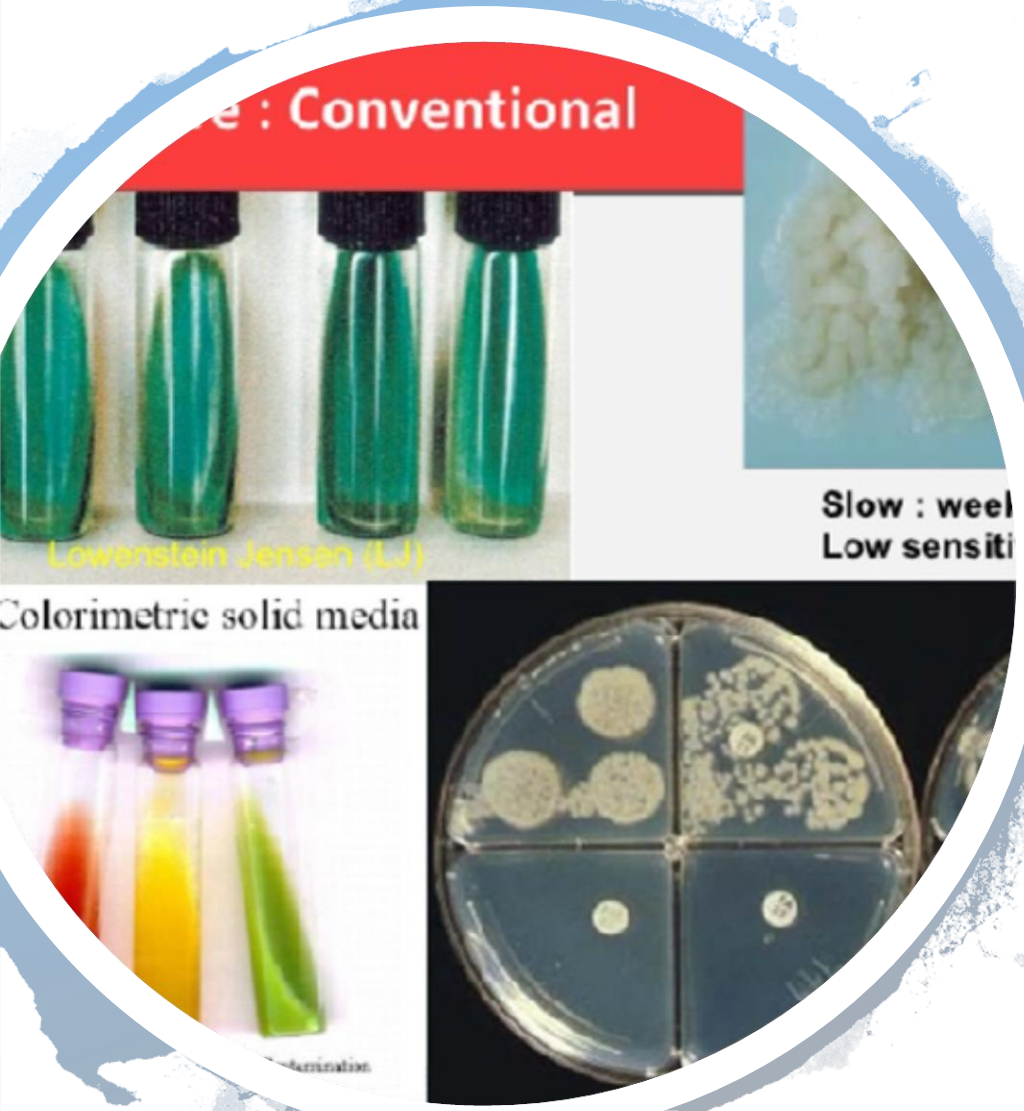
### Hazırlanması

Bu besiyerinin hazırlanması diğer pek çok besiyerinden oldukça farklıdır. Dehidre besiyeri 37,5 g/600 mL olacak şekilde damıtık su içine çözülür, gerekirse 600 mL bazal besiyeri için 1 mL gliserol (Merck 1.04094) ilave edilip, otoklavda 121 oC'da 15 dakika sterilize edilir. 50 oC'a soğutulup üzerine 1 litre taze yumurtadan hazırlanmış tam yumurta (sarı ve beyaz karışık) homejenizatı ilave edilir. Bu homejenizatın hazırlanmasında gereken asept kurallarına uyulmalıdır. Homejenizat ilave edilmeden önce 25 °C'da pH'sı 4,8±0,2 olmalıdır. Yumurta ilavesinden sonra hava kabarcıkları oluşmayacak şekilde iyice karıştırılır ve steril tüplere 7'şer mL olacak şekilde dağıtılır. Tüpler yatık olarak 85 oC'da 4 dakika doymuş su buharında (inspissator'de) tutularak koagülasyon sağlanır. Steriliteden emin olmak için bu işlem 24 saat sonra bir kez daha tekrarlanır. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve yeşildir.

# Kültür Yöntemlerinin Karşılaştırılması



|                       | Yumurta temelli besiyerleri | Agar temelli besiyerleri | Sıvı besiyerleri                |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Hazırlık              | Zahmetli                    | Kolay                    | Kolay                           |
| Raf ömrü              | 6 ay                        | 4 hafta                  | Kullanılan sisteme göre değişir |
| Besiyeri görünümü     | Opak                        | Şeffaf                   | Şeffaf                          |
| Koloni morfolojisi    | Ayirt edilebilir            | Ayirt edilebilir         | Ayirt edilemez                  |
| Ortalama üreme süresi | 21-42 gün                   | 18-28 gün                | 7-14 gün                        |
| Sonuçlandırma süresi  | 8 hafta                     | 6 hafta                  | 6 hafta                         |
| İzolasyon şansı       | Yüksek                      | Yüksek                   | Çok yüksek                      |
| Maliyet               | Düşük                       | Orta                     | Orta-Yüksek                     |



## • Kültür Yöntem  e itleri

- Genellikle gliserol, asparajin içeren yumurta temelli by, agar bazlı by, serum ve sığır albümini içeren sıvı by kull.
- Mala it ye ili-kont. Önleyici
- İnhibitör,antibiyotik eklenebilir.
- Katı by kont./üreme takibi için 2/hft, sonra 8. hft'a dek en az hft'da 1 üreme açısından kontrol edilir.
- Sıvı by'nin hft'da 2 kez kontrolu yapılır.

## • Kültür ekimleri ve inkübasyon

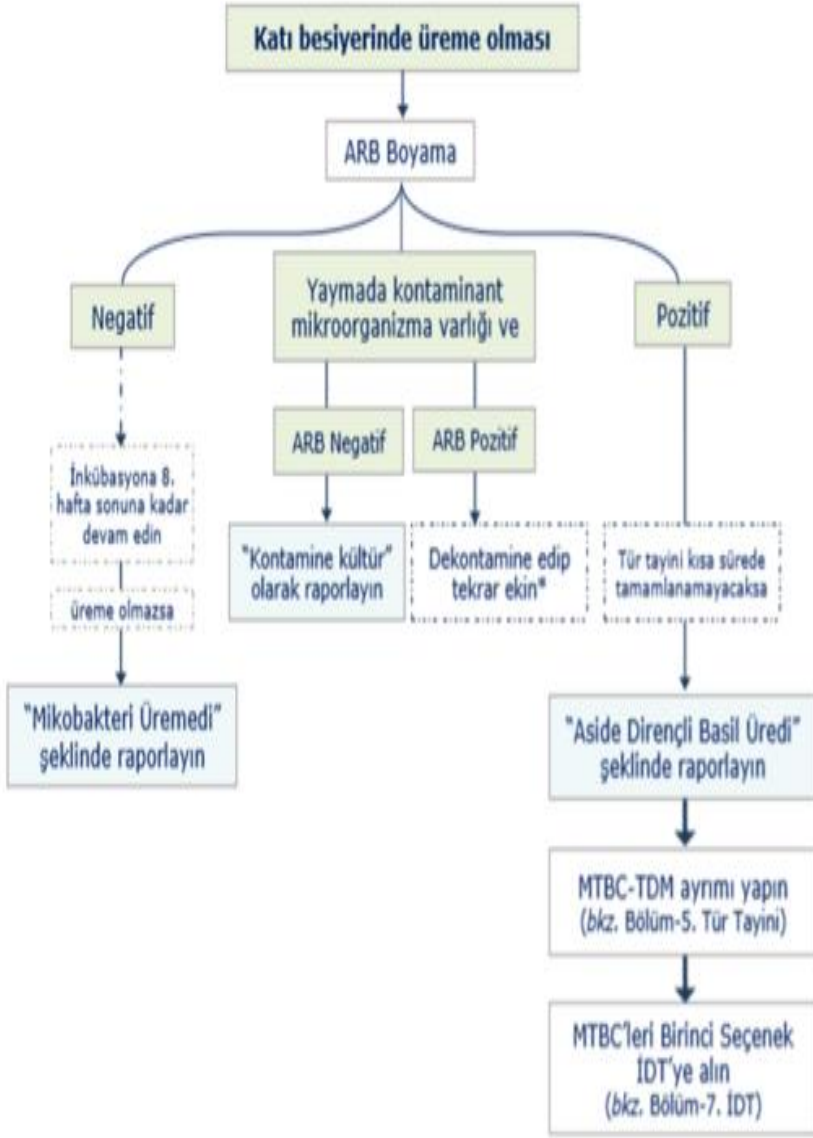
- Klinik örnekten **doğrudan** ekim- Kan ve K 
- MTBC basilinin üreme şansını arttırmak için **en az bir sıvı bir de katı by'nin birlikte kullanımı önerilir. –CDC\*\*\***
- Sıvı by - otomatize sistemler izolasyon süresini kısaltır.

## • Selektif besiyerleri :

- \*L-J Gruft (penisilin, nalidiksik asit)
- \*Mycobactosel L-J ( ikloheksimid, linkomisin, nalidiksik asit)
- \*Mycobactosel Middlebrook 7H10
- \*Mitchison's selektif 7H11(karbenisilin, polimiksin B, trimetoprim laktat, amfoterisin
- \*TK-selektif

# Katı Besiyerinde Üremenin Bildirimi

- MTBC saptanan izolatlar- 'Mycobacterium tuberculosis kompleks'
- TDM olarak saptanan izolatlar 'Tüberküloz Dışı Mikobakteri' olarak bildirilir.
- Kültür izolatları **en az 1 yıl** süre ile (-70 C'de) saklanır.



- |                             |                                                     |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| • ARB pozitif koloni yoksa: | "Üreme olmadı"                                      |
| • 1-19 koloni:              | "1-19 koloni ARB pozitif basil üredi"               |
| • 20-100:                   | "ARB pozitif basil üredi (1+)"                      |
| • 100-200:                  | "ARB pozitif basil üredi (2+)"                      |
| • 200-500:                  | "ARB pozitif basil üredi (3+)"                      |
| • 500 üstü:                 | "ARB pozitif basil üredi (4+)" şeklinde raporlanır. |

# Otomatize Kültür İzleme Sistemleri



## Kültür Sonuçlarının Raporlanması

| Positive controls                   | Result                                                                                                  |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177   | Growth on all media                                                                                     |
| <i>M. kansasii</i> ATCC 12478       | Growth on all media                                                                                     |
| <i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981   | Growth on all media                                                                                     |
| <i>M. fortuitum</i> ATCC 2841       | Growth on all media                                                                                     |
| <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950 | Growth on all media (not included when testing selective media containing penicillin or carbenicillin). |
| Negative control                    | Result                                                                                                  |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922  | Partial inhibition in non-selective media, total inhibition in selective media.                         |

- Pozitif kültür sonuçları **24 saat** içerisinde bildirilmelidir.
- Tüm pozitif sonuçlar ilgili birim/hekime ve İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne ivedilikle bildirilmelidir. (Kritik/Panik değer bildirimi)
- İşlem gerektiren pozitif kültürler haftalarca oda ısısında saklanabilir.

- **Kültürde Kalite Göstergeleri**

- Ayda 1 kültür kont. oranları incelenmeli.
- (Katı by %3-5, sıvı by %5-10)
- Kültür pozitiflik oranları takibi
- !!!!Yoğun üremenin olduğu pozitif kültür örneklerinin ardından görülen seri pozitifliklerde
- !!!!Mikroskopi pozitifliğine göre beklenenden daha az (%90'ın altında) kültürde üreme olması

- **Kalite Kontrol**

- **Laboratuvarda hazırlanan besiyerlerinin kontrolü:** Görünüm, renk, kontaminasyon vs. Her partinin % 1-3'ü izlenir
- Üretme ve seçicilik; pozitif ve negatif kontrol suşlarının üremeleri test edilir.
- **Ticari by kull. kk raporu istenmelidir.**
- Ekipman kontrolü: Soğutucu, inkübatör sıcaklık takibi, kalibrasyon/bakımı, otomatize sistemlerin kalibrasyon ve bakımları , ortam sıcaklığı
- **DKK- Ulusal veya uluslar arası bir Dış Kalite değerlendirme programına katılmak gereklidir.**



Kültürde  
olası  
sorunlar  
/kısıtlılıklar

Kültür - geç sonuç

Koloni morf.,  
pigmentasyon- katı  
by.de

Yumurta by'de-  
yumurtanın tazeliği

**Sıvı by- kontaminasyon**

Middlebrook 7H10,  
7H11 by; ısı/ ışığa maruz  
kald. **serbest**  
**formaldehit** artışı –  
üreme inh.

Oleik asit-albümin-  
dekstroz-katalaz (OADC)  
ile kültür üretim  
zenginleştirme

Otom. Sist.: Üreticinin  
önerdiği  
homojenizasyon ve  
dekontaminasyon işlemi

Kanlı örnekler  
floresansı  
maskeleyebilir.

Kont. önleyici  
antimikrobiyaller bazı  
mikobakterilerde üreme  
inh.

**MTBC ve TDM üremesi  
birlikte olabilir.**  
Moleküler yöntemlerle  
ileri analiz yapılması  
önerilir.

Kültürde görülen  
kontaminasyonlar

\*\*\*\*Tüberküloz Dışı  
Mikobakteriler(TDM):  
Hızlı/yavaş üreyen, ARB,  
genellikle kord oluşumu yok

Mantar: Genellikle yavaş  
üreyen, ARB değil, hif  
yapıları mikobakterilerden  
daha kalın

Bakteri: Bazı yakın  
türler(Gordonia,  
Tsukamurella, Nocardia,  
Rhodococcus, Dietzia) ve  
Legionella micdadei dışında  
ARB değil

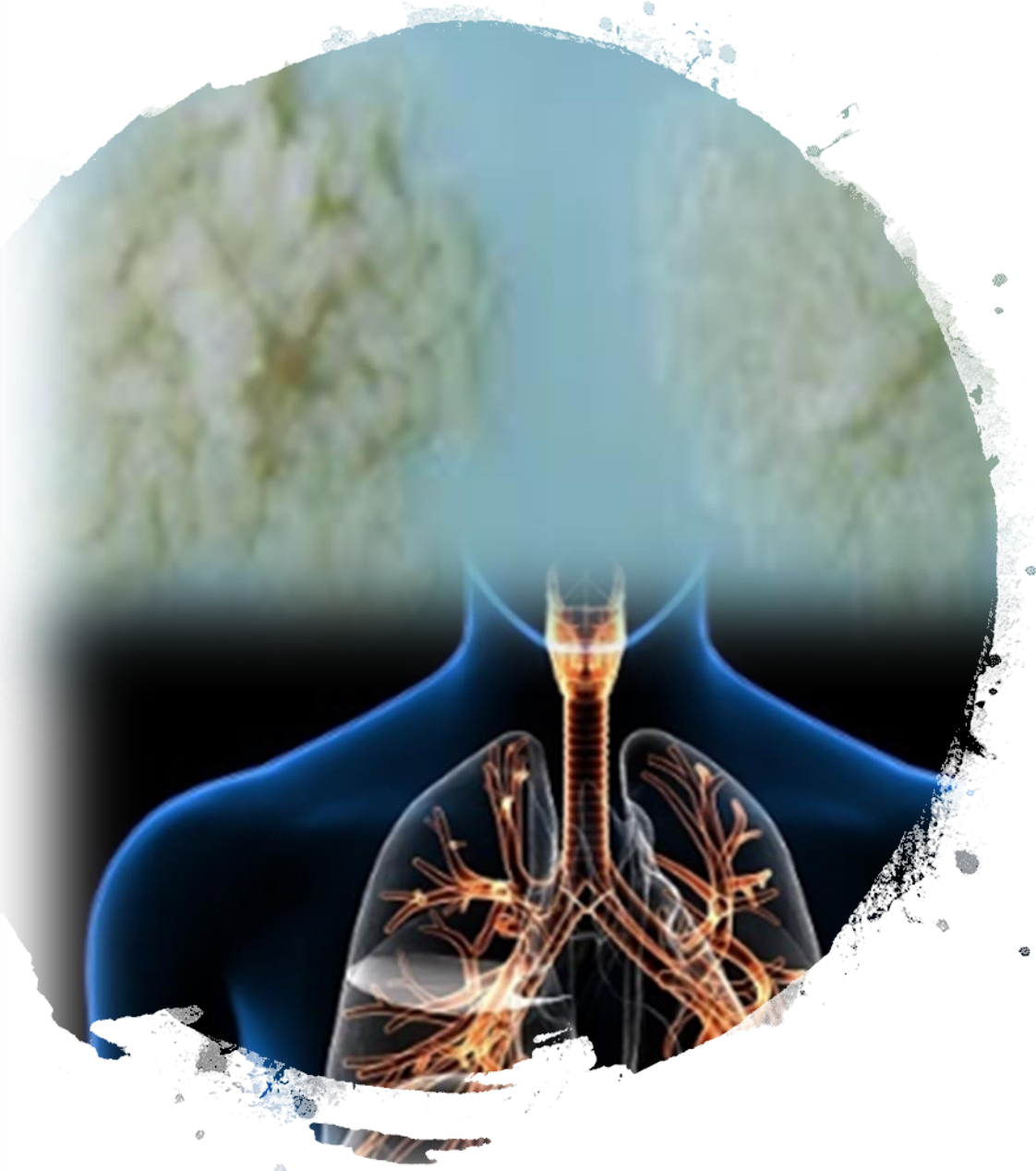
Maya: Genellikle ARB değil.

Ookist: Cryptosporidium,  
Isospora, Cyclospora dışında  
genellikle ARB değil

# Kültür ekimi

- Katı sistemlerde-Çökeltiden 200uL katı by'ne aktarılır.
- Sıvı sistemlerde-önerilen miktarda ekim yapılır.
- **İnkübasyon:**
- Yumurta bazlı by'ne (LJ, Ogawa,vb.) ekilen örnekler emilinceye kadar kapakları gevşek, besiyeri yüzeyi yukarı bakacak şekilde yatık pozisyonda 35-37 C'de bir hf. süresince inkübe edilir.
- 1. hf. sonra kapakları sıkıştırılarak dik konumda inküb. devam edilir.
- MB 7H10 veya MB 7H11 by'leri, ekilen örnek emilinceye kadar by aşağıda kalacak şekilde 35-37 C'de ve %5-10 CO2'li ortamda inkübe edilir.
- **Kontaminasyon kontrolü-** Tüm katı by'leri, hızlı üreyen mikobakterilerin erken sapt. ve kont.'nun uzaklaştırılması için inokülasyondan 3-5 gün sonra incelenir.
- By üreme- kontaminasyon kontrolü- ARB boyama
- Örnekte kont.- işlem görmüş örnekten yeniden dekont. ve ekim



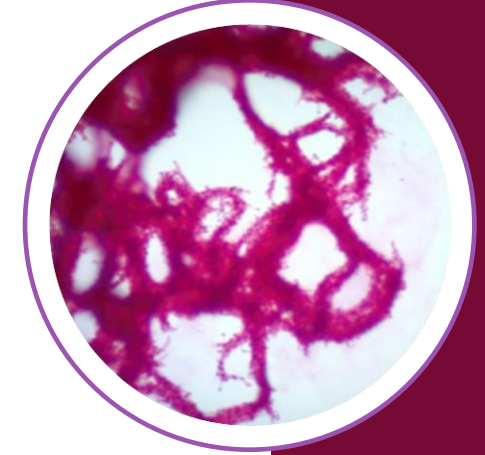


ARB pozitif tüm üremelerde MTBC ve TDM ayırımı yapılmalıdır. (TDM- klinik anlamlılık)

- **MTBC-TDM Ayırımı**
- Biyokimyasal testler zaman alıcı/ zahmetli- sonuç değerlendirilmesi güç
- **Fenotipik yöntemler**
- Üreme özellikleri, biyokimyasal testler,
- **HPLC(High performance liquid chromatography)**
- **Genotipik yöntemler**
- **PCR restriksiyon enzim analizi, ters hibridizasyon testleri**
- **İmmünokromatografik yöntemler**

# Tür tayini- Fenotipik yöntemler

- Üreme Özellikleri- MTBC-TDM ayırımında yardımcı-kesin tanı koydurmaz.
- Katı by'ne kültür pasajında 7.günden sonra ürer
- R tipi (düzensiz)kuru, devetüyü renginde koloniler oluşturur.
- Pigment yapmaz.
- Sıvı kültürden ARB boyama-yılanvari/halat benzeri yapılar (**kord faktör**)
- **Biyokimyasal testler- MTBC'nin TDM ayırımında kullanılır.**
- **MTBC sonuçları :**
- Katalaz testi; Bazı INH dirençli MTBC ve M. bovis dışındaki bütün mikobakteriler **katalaz pozitif**
- **Niasin birikim testi; pozitif**
- MTBC ve M.simiae ile M.chelonae'nin bazı izolatları daha fazla nikotinik asidi metabolize edemezler ve ortamda daha fazla birikir .
- **Nitrat indirgenme testi; pozitif –strip**
- **Paranitrobenzoik asit(PNB)'li besiyerinde üremez. Kontrol**
- **Katalaz, niasin ve nitrat indirgenme testleri bir arada kullanılmalıdır, tek başlarına MTBC-TDM ayırımı yapamazlar.**



# Interferon Gama Salınım Testleri (IGST)



- MTBC kompleksin özgül antijenlerine karşı in vitro IFN- $\gamma$  salınımının saptanmasına dayanır. **MTBC kompleks aj'lerine karşı hücresel immün yanıtı ölçen in vitro testlerdir.**
- MTBC RD 1 (region of difference) bölgesindeki genler tarafından kodlanan ESAT-6, CFP10 ve bazılarında TB 7.7 proteinleri aj ol. kull.
- Bu antijenler TDM türleri (**M.kansasii, M. szulgai ve M.marinum dışında**) ve M.bovis BCG'de bulunmaz-IGST'lerin özgüllüğü yüksektir.
- IGST testleri, tüberkülin deri testi(TDT)'ne alternatif olarak geliştirilmiş, TDT ve IGST, LTBE tanısında kullanılan ancak aktif tüberkülozu dışlamayan, LTBE ve aktif TB ayırımı yapamayan testlerdir.
- \*\*\*\*\*
- a) QuantiFERON-TB Gold In Tube test (QF-GIT): Tam kanda özgül antijenler(ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7) ile uyarılan T-hücrelerden salınan IFN- $\gamma$  düzeyini ölçen bir ELISA testidir.
- b)T-SPOT TB; periferik kan mononükleer hücreleri ile ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine spesifik IFN- $\gamma$  üreten T hücreleri sayan ELISPOT (enzime bağlı immunospot) testidir.

# İdentifikasyon

## • PCR restriksiyon enzim analizi (PRA)

• Kültür izolatlarının hsp65 geninin 441 bp'lık parçasının PCR ile amplifikasyonunu takiben amplifiye ürünlerin **BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri** ile kesimi esasına dayanmaktadır.

• Restriksiyon paternleri, fragman büyüklüğü karşılaştırması- mikobakteri tipi belirlenir.

• Test bir günde çalışılır. **Maliyeti uygun**

## • Ters hibridizasyon testleri

• Kültür izolatından amplifiye edilmiş biyotinle işaretli PCR ürünlerinin, nitrosellüloz şeritler üzerine bağlanmış özgün DNA problemleri ile hibridize edilmesi temeline dayanır.

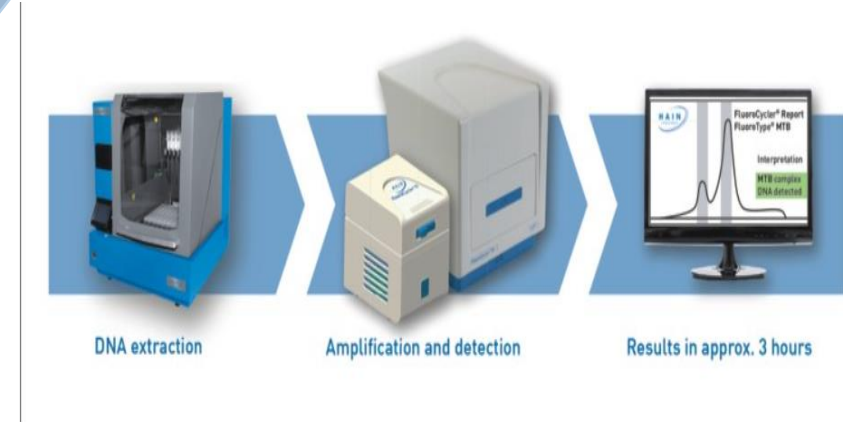
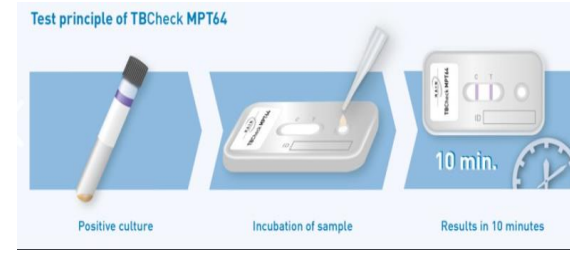
• Ters hibridizasyon testleri «**Line Probe Assay (LPA)**» hızlı, uygulanması ve değerlendirilmesi kolay, ancak ekipman gerektiren ve **maliyeti yüksek** testlerdir.

## • İmmünokromatografik yöntemler

• MTBC'ye özgü hücre duvar antijenlerini (MPT-64) saptamaya yönelik geliştirilmiş testlerdir.

• Katı/sıvı kültürden çalışılabilir, dklar içerisinde sonuç alınır.

• Basit , uygulanması kolay, hızlı, ekipman gerektirmeyen ve **maliyeti düşük** testlerdir.



- **Mikobakteri türlerinin MALDI-TOF ile tanımlanması**

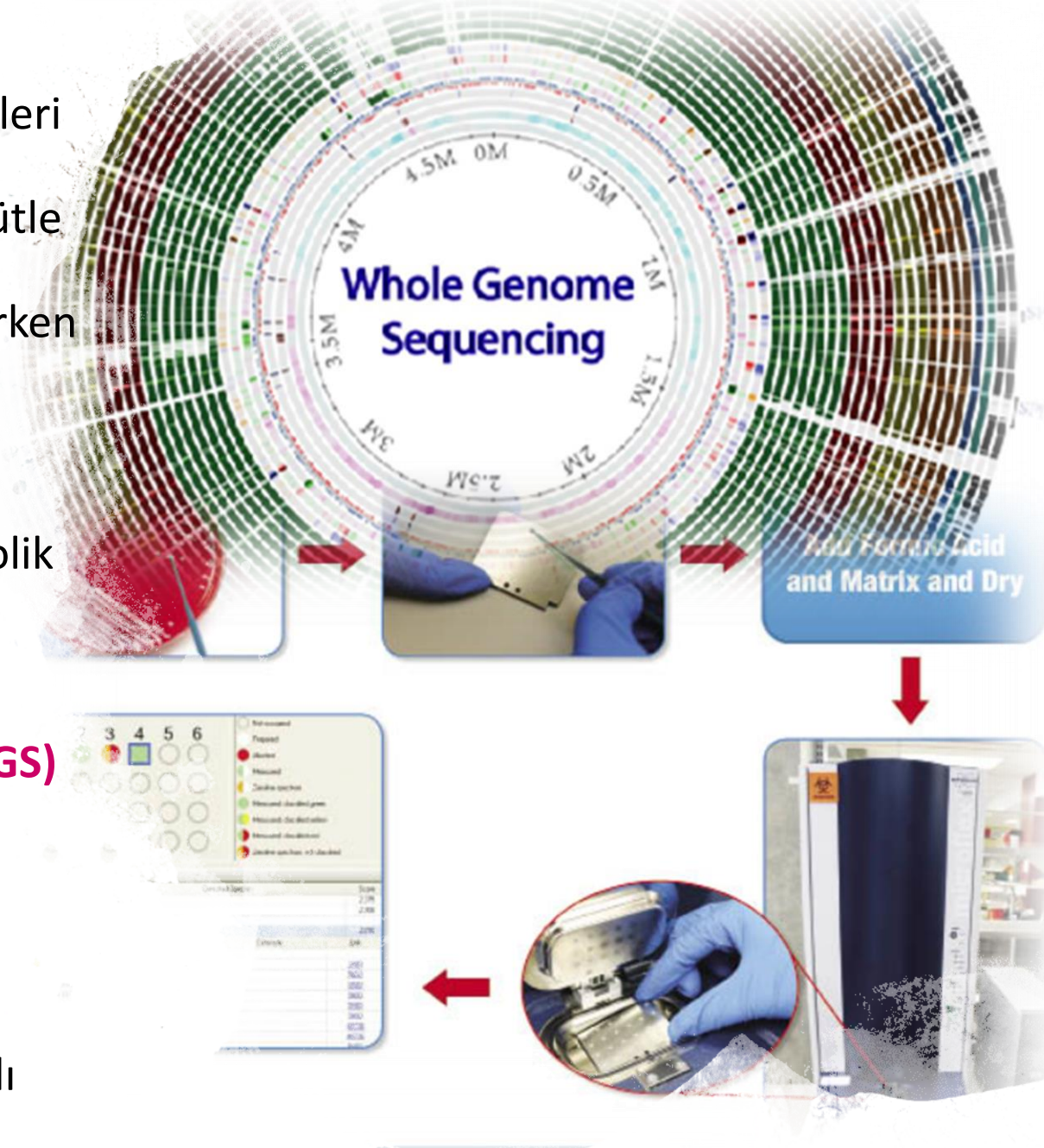
- MALDI-TOF kütle spektroskopisi 16s ribozomal proteinleri inceler.
- Test edilen kökenler ile bilinen referans kökenlerinin kütle pikleri kıyaslanarak tanımlama yapılır.
- Bir organizma 20 dk içerisinde tanımlanır. Erken tanı-erken tedavi

- **HPLC(High performance liquid chromatography)**

- Mikobakteri kültür izolatlarının tanımlanmasında, mikolik asitlerin ekstraksiyonu ve ayrıştırılmasına dayanan kimyasal bir yöntemdir.

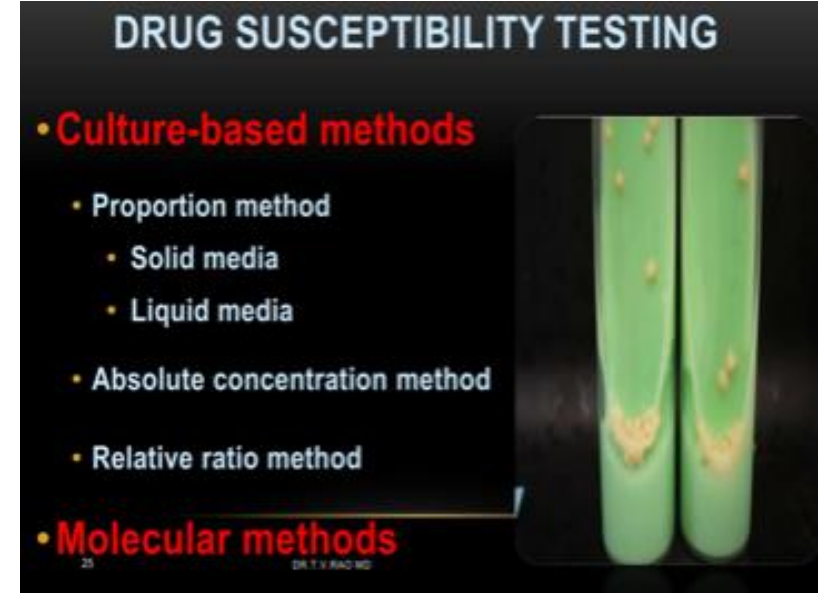
- **Tüm Genom Dizilimi –Whole genome sequencing (WGS)**

- Bir organizma genomu DNA dizilimini tek bir seferde tanımlayan bir sistemdir.
- Hastane ve toplu yaşanan yerlerde mikroorganizma tanımlanmasının hızlı ve kesin olmasını ve enfeksiyon, morbidite ve maliyetlerde azalmayı sağlayacaktır.
- WGS çok ilaca dirençli olguların saptanmasında da hızlı tanımlama sağlamaktadır.



# İlaç Duyarlılık testleri

- Tüberkülozda ilaç direncinin doğru ve hızlı tanısı, erken tedavi ile ilaç direncinin yayılımını azaltabilir, hastalığın süresini kısaltabilir, kür oranını arttırabilir.
- İlaç direncinin doğru ve hızlı tanısı, uygun klinik **takip** ve enfeksiyon **kontrol** önlemlerinin oluşturulmasında son derece önemlidir.
- İlaç direncinin doğru tanısı; iyi standardize edilmiş ve güvenilir test yöntemlerini kullanan, deneyimli, iyi donanımlı ve kalite değerlendirme programlarına katılan laboratuvarlarda uygulanması ile sağlanabilir.



# Categories of Antituberculosis Drugs: WHO

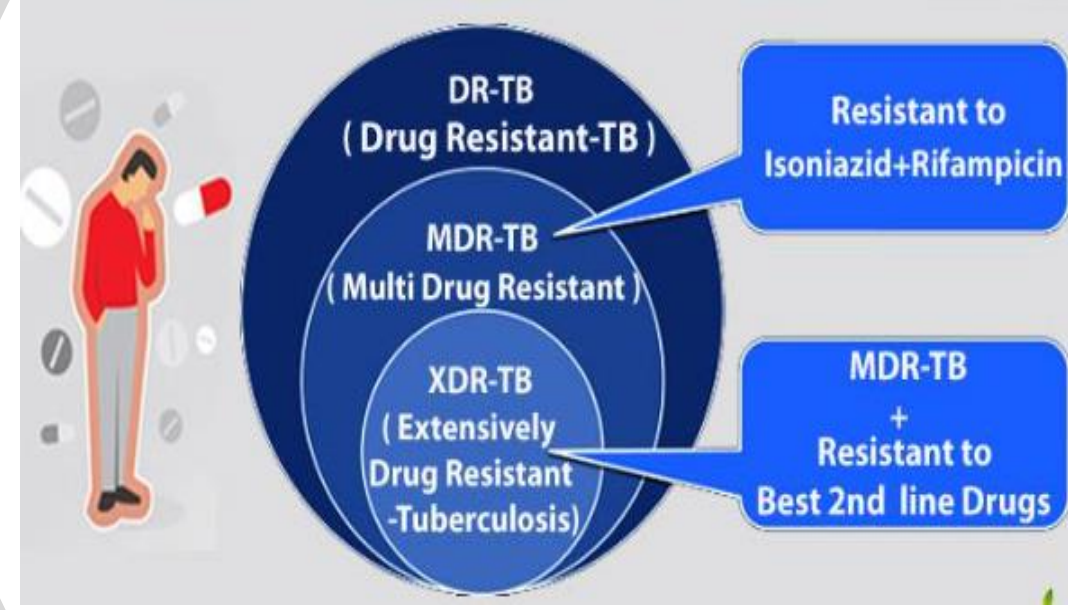
- **Group 1 – First-line drugs:** Isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide
- **Group 2 - Injectable agents:** Kanamycin, amikacin, capreomycin, streptomycin
- **Group 3 - Fluoroquinolones:** Levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin
- **Group 4 - Oral bacteriostatic agents:** Ethionamide, cycloserine, para-aminosalicylic acid (PAS), prothionamide, terizadone
- **Group 5 – Unclear role:** Clofazamine, linezolid, amoxicillin/clavulanate, Imipenem/cilastatin, thioacetazone, high-dose isoniazid, clarithromycin,



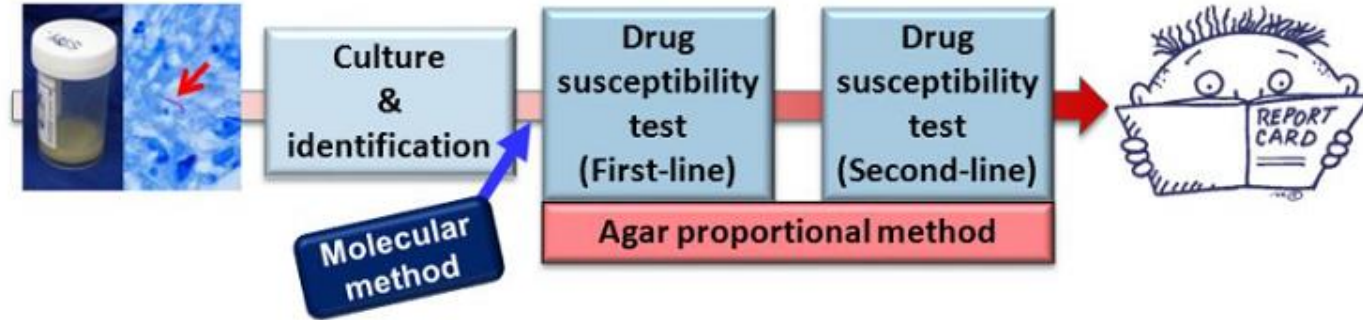


# İlaç Direncini Tetikleyen Klinik Etkenler

- Gecikmiş tanı, izolasyon
- Uygun olmayan başlangıç tedavisi
- Tamamlanmamış tedavi
- Uygun olmayan tedavi değişiklikleri
- Başarısız tedaviye tek ilaç eklemek
- Kemoproflaksinin uygunsuz kullanımı
- ÇİD TB hastalarının izolatlarını elde etmede başarısızlık
- DOT başarısızlığı
- Sahte ilaç
- ÇİD TB: INH+RIF
- YİD: ÇİD TB+ florokinolonlar ve en az enjektebl ilaçlardan en az 1 tanesine(amikacin, kanamycin veya capreomycin) direnç



## İDT 'de kültür yöntemi kısıtlılığı



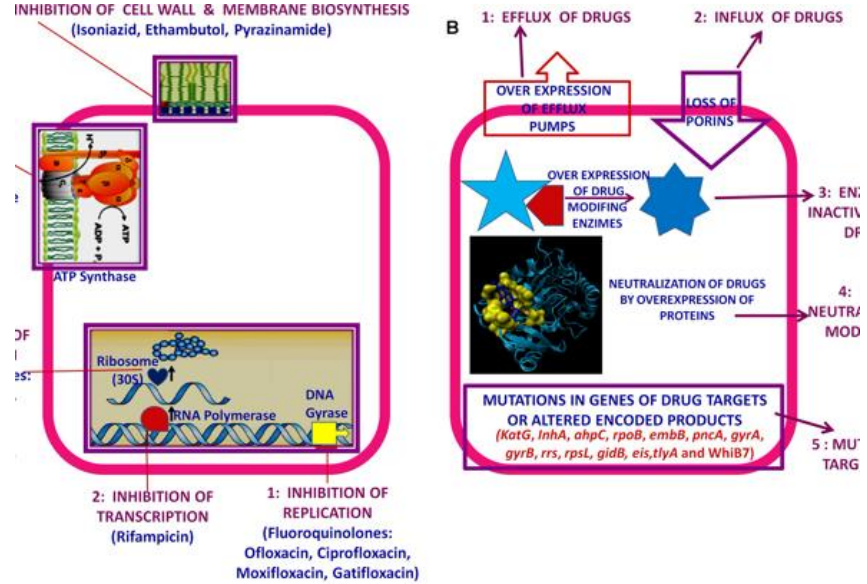
- Many XDR-TB cases are not diagnosed since testing for resistance to 2nd-line drugs is not routinely performed.

Blaschitz *et al.*, 2011

- **Accurate diagnosis** and **early** initiation of treatment are important to reduce transmission and hinder the emergence of drug-resistant TB.

Ajbani *et al.*, 2011.

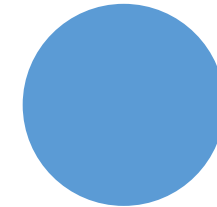
# İlaç Direnç Mekanizmaları



- 1. Tüm ilaçlara duyarlı wild tip kökenlerin tedavi sırasında ilaca dirençli kökenlere dönüşümü **(kazanılmış direnç)**
- 2. Uygunsuz ilaç tedavisi nedeniyle ilaca dirençli kökenlerde direnç gelişiminin artması **(güçlendirilmiş direnç)**
- 3. İlaça dirençli olgulardan
- geçiş olması **(geçiş yolu ile direnç)**

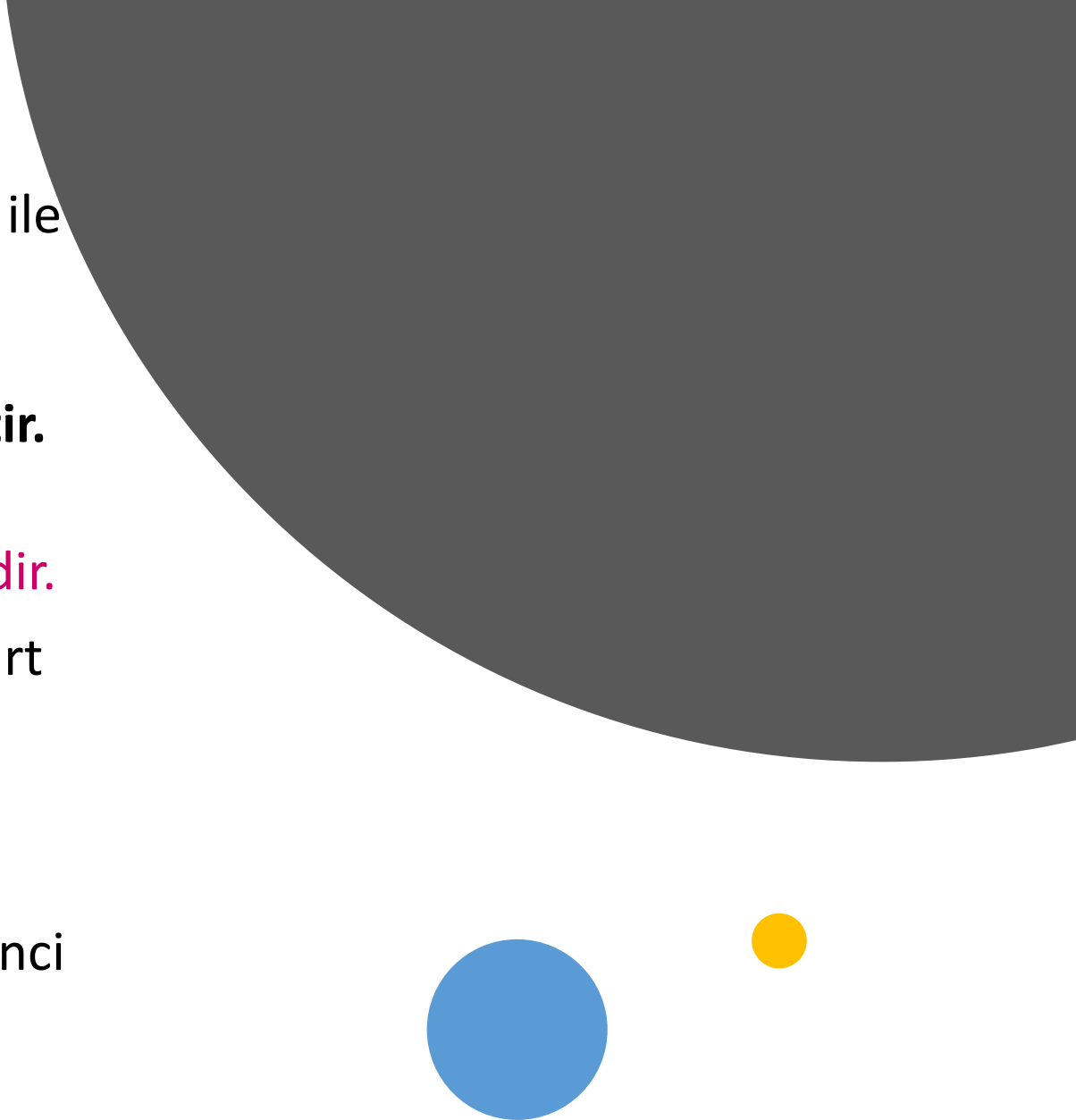
| Drug                                                                    | Mechanism of Action                                        | General Resistance Mechanism                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Rifampicin</b>                                                       | RNA synthesis inh.                                         | Mutation in <i>rpoB</i> gene                                                                                      |
| <b>Isoniazid</b>                                                        | Mycolic acid biosynthesis inh.                             | Mutation in <i>Kat G</i> gene                                                                                     |
| <b>Pyrazinamide</b>                                                     | Membrane potential destruction                             | Mutation in <i>pncA</i> gene                                                                                      |
| <b>Ethambutol</b>                                                       | Arabinogalactan biosynthesis inh.                          | Mutation in <i>embB</i> gene <i>embB306</i> codon                                                                 |
| <b>Amikacin/ Kanamycin</b>                                              | Protein synthesis inh.                                     | Modulation in 16S rRNA target zone(1400 and 1401 <i>rrs</i> gene)                                                 |
| <b>Capreomycin</b>                                                      | Protein synthesis inh.                                     | Mutation of <i>tlyA</i> which depletes rRNA methyltransferase and cross reaction with aminoglycosides             |
| <b>Streptomycin</b>                                                     | Protein synthesis inh.                                     | Mutation in <i>rpsL</i> and <i>rrs</i> zone                                                                       |
| <b>Fluoroquinolones</b>                                                 | DNA gyrase and topoisomerase IV inh.                       | Mutation in <i>gyrA</i> and <i>gyrB</i> and enhanced ABC-type efflux pump expression                              |
| <b>Ethionamide</b>                                                      | Mycolic acid biosynthesis inh.                             | Mutation in <i>ethA</i> and <i>inhA</i><br>Overexpression-cross reaction with isoniazid                           |
| <b>Cycloserine</b>                                                      | Peptidoglycan biosynthesis inh.                            | Overexpression of <i>alrA</i>                                                                                     |
| <b>Para-amino salicylic acid</b>                                        | Folic acid and iron metabolism inh.                        | Mutation in <i>ThyA</i> and <i>folC</i> mutations                                                                 |
| <b>Clofazimine</b>                                                      | Destruction of reactive oxygen species(ROS) and cell wall  | Mutation in <i>Rv0678</i> cross reaction with Bedaquiline                                                         |
| <b>Linezolid</b>                                                        | Protein synthesis inh.(50 S)                               | Mutation in <i>rplC</i> T460C                                                                                     |
| <b>B-lactam /B-lactamase inhibitor:Amoxicillin, meropenem, imipenem</b> | Destruction of cell Wall due to peptidoglycan modulation   | Over expression of B-lactamases( <i>BlaC</i> ), point mutations in target zone, enhanced efflux ( <i>Rv0194</i> ) |
| <b>Tiacetazone</b>                                                      | Methyltransferases inhibition in mycolic acid biosynthesis | Mutation in <i>ethA</i>                                                                                           |
| <b>Clarithromycin</b>                                                   | Protein synthesis inh.(50 S)                               | <i>emr37</i> expression                                                                                           |
| <b>Bedaquiline</b>                                                      | Mitochondrial ATP synthase inh.                            | Mutation in <i>atpE</i> cross reaction with clofazimine                                                           |
| <b>Delamanid</b>                                                        | Mycolic acid biosynthesis inh.                             | Mutation in <i>RV3547</i>                                                                                         |

- MTBC İD spontan mutasyonların bir sonucudur.
- Kültüre dayalı İDT, hst oluşt. mikobakteri topluluğu içerisinde dirençliler bir oranın üzerinde olduğunda ilacın tedavide etkili olamayacağı temeline dayanır.
- **Proporsiyon yönt. amacı bir ilacın kritik konsantrasyonuna dirençli olan bakterilerin kritik proporsiyon olan %1'in üzerinde olup olmadığını saptamaktır. Sıvı by. kültüre dayalı ticari otomatize yöntemlerde de benzer şekildedir. Moleküler yönt.- direnç ile ilişkili gen mutasyonlarını saptamaya yönelik genotipik yöntemlerdir.**
- Kültüre dayalı yönt.'de kull. ilaç konsant. (kritik konsant.) kull. yöntem, by ve test ed. antibiyotiğe göre değişir.
- İDT'ler direkt/indirekt yapılabilir. Direkt İDT yayma pozitif örnekten doğrudan yapılan testtir; kont. yüksek, başarı oranı düşüktür. **İndirekt İDT ise üremiş kültürden yapılır; başarı oranı yüksektir, ancak zaman alır.**



İlaç Direnci

- TB ilaç direnci, tedavi gören hastalarda dirençli mutant basiller yoluyla ortaya çıkabildiği gibi(**sekonder direnç**), doğrudan dirençli kökenler ile bulaş olan, daha önceden tedavi görmemiş hastalarda da (**primer direnç**) görülebilir.
- **Genel olarak sekonder direnç oranı daha yüksektir.**
- Primer direnç oranının yüksek olması tüberküloz kontrol programının başarısızlığının bir göstergesidir.
- Yeni, nüks ve terkten dönen tbc olgularının standart ted.de kull. ilaçlar **birinci seçenek ilaçlar** olarak adlandırılır.
- İDT en kısa zamanda çalışılmalıdır.
- İzoniazid, rifampisin, etambutol, streptomisin birinci seçenek ilaçlardır. Standart tedavilerin önemli bir parçası olan pirazinamid de birinci seçenek ilaçlardandır. Ancak güvenilir sonuçlar elde etmek zordur.



İlaç Duyarlılık Testi

İlaç duyarlılık  
testlerinin  
yapılması  
gerekten  
durumlar

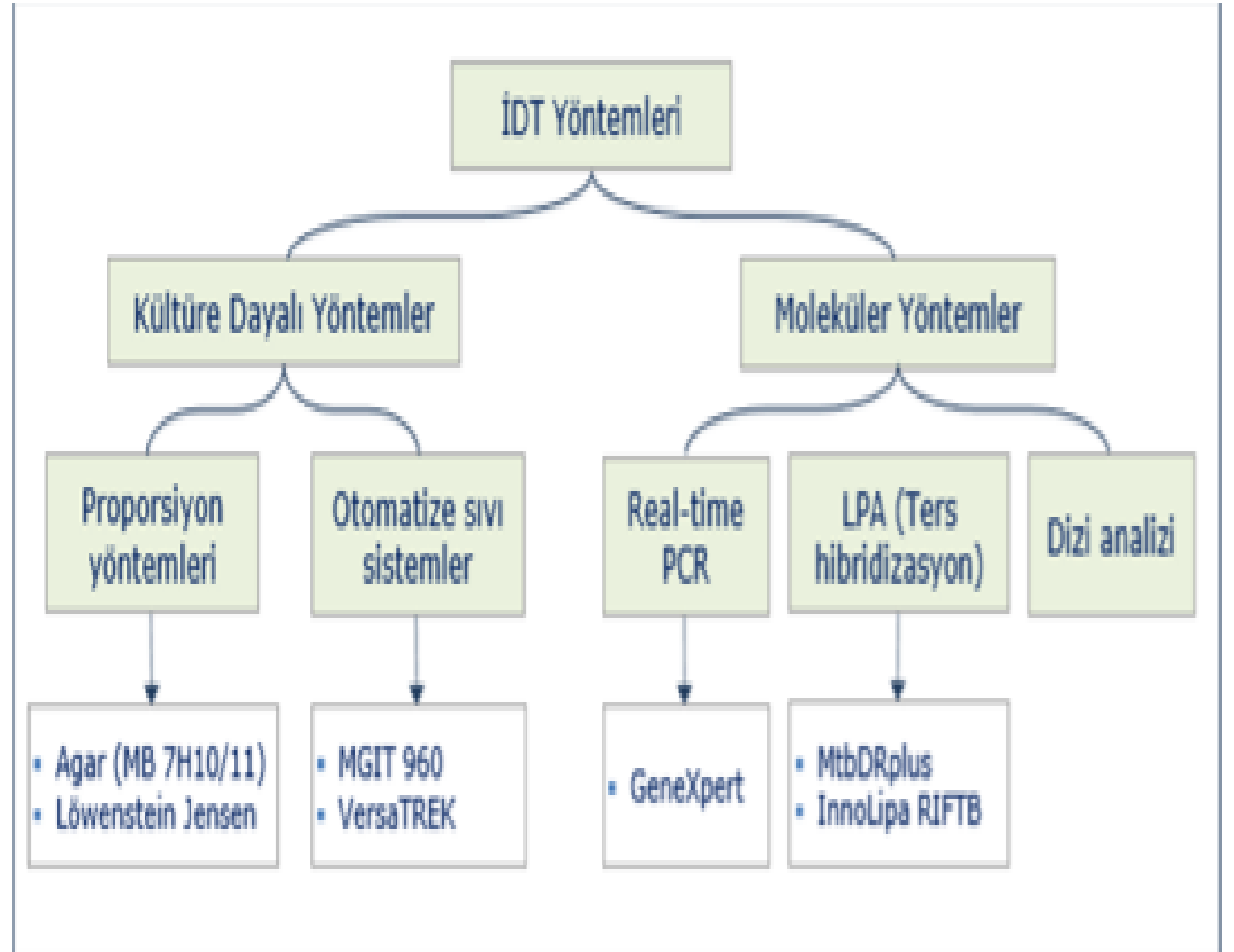
Her hasta için izole edilen ilk M.tbc kompleks kökenine İDT yapılır.

Tedavinin 3.ayı ve sonrasında kültürde üreme saptanması durumunda yeni izolattan test tekrarlanır.

Tedavinin 3.ayından önce klinik olarak tedaviye yanıt olmadığı düşünülüyorsa yeni örnekten test tekrar edilir.

Nüks, terkten dönen, tedavi başarısızlığı ve kronik olgularda mutlaka İDT yapılır.

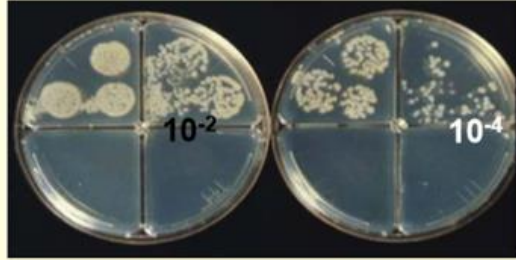
En yaygın  
kullanılan ilaç  
duyarlılık  
testleri



# İDT Yöntem Çeşitleri Avantaj ve Dezavantajları

## Agar Proporsiyon Yöntemi:

- Referans yöntemdir.
- $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  dilüsyonlu inokulumlar kullanılır.

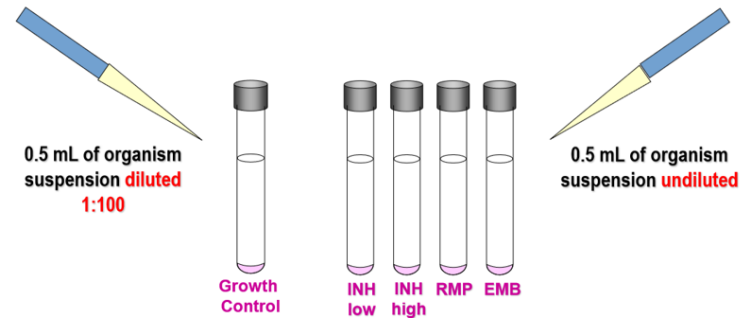


- MTBC'in antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığını belirlemede, kültüre dayalı yöntemler ve direnç neden olan mutasyonu belirlemeye yönelik moleküler yöntemler kullanılmaktadır.
- \***Agar proporsiyon yöntemi** iyi standardize edilmiş güvenilir bir yöntemdir.
- \***LJ Proporsiyon yöntemi** ekonomik olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.
- \* **Sıvı besiyerinde kültüre dayalı otomatize yöntemler** sonuç alma süresini önemli derecede kısaltmaktadır.
- \***Moleküler** bir yöntemle ise direkt klinik örnekten direnci göstermek 1-2 günde mümkün olabilmektedir.

## Kültüre Dayalı İDT'lerin Karşılaştırılması

|                                                             | LJ Proporsiyon<br>Yöntemi | Agar Proporsiyon<br>Yöntemi | Otomatize Kültür<br>Sistemleri |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Besiyeri                                                    | Katı                      | Katı                        | Sıvı                           |
| Test süresi                                                 | 4-6 hafta                 | 3 hafta                     | 1-2 hafta                      |
| Örnek kabulünden sonra<br>sonuçlanma süresi (indirekt test) | 9-12 hafta                | 7-10 hafta                  | 3-5 hafta                      |
| Güvenilirlik                                                | İyi                       | İyi                         | İyi                            |
| Kolaylık                                                    | Orta                      | Orta                        | Kolay                          |
| Maliyet                                                     | Düşük                     | Orta                        | Yüksek                         |
| Özel cihaz ve ekipman gereksinimi                           | Yok                       | Yok                         | Var                            |
| Deneyimli personel gereksinimi                              | Yüksek                    | Yüksek                      | Orta                           |

### Broth-based DST MGIT 320/960



## Kültüre Dayalı İDT

|              | MGIT 320 or 960  | VersaTREK        | Indirect Agar<br>Proportion          | Sensititre                  |
|--------------|------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Company      | Becton Dickinson | Thermoscientific | N/A                                  | Thermoscientific            |
| Media        | Liquid broth     | Liquid broth     | Solid                                | Liquid broth                |
| Format       | Tube             | Tube             | Petri plate                          | 96-well microtitre<br>plate |
| FDA approved | Yes<br>(cleared) | Yes<br>(cleared) | No<br>(laboratory<br>developed test) | No<br>(research use only)   |

## Kültüre Dayalı Yöntemlerin Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırılması

|                                             | Kültüre Dayalı Yöntemler<br>(Fenotipik) | Moleküler Yöntemler<br>(Genotipik)                 |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Prencip                                     | İlaç varlığında üremenin<br>inhibisyonu | Dirence yol açan gen<br>mutasyonlarının saptanması |
| Test süresi                                 | 1-6 hafta                               | 2-8 saat                                           |
| Örnek kabulünden sonra<br>sonuçlanma süresi | 9-12 hafta                              | Direkt test 1-2 gün<br>İndirekt test 2-6 hafta*    |
| Direkt örnekten test                        | Olası, ancak önerilmez                  | Olası                                              |
| Kontamine örnekten test                     | Olası değil                             | Olası                                              |
| Mikst kültürden test                        | Olası değil                             | Olası                                              |
| Güvenilirlik                                | Yüksek                                  | Bilinen mutasyonun<br>saptanmasında iyi**          |
| Kolaylık                                    | Kolay-Orta                              | Kolay-Orta                                         |
| Maliyet                                     | Düşük-yüksek                            | Yüksek                                             |
| Özel cihaz ve ekipman gereksinimi           | Yok-var                                 | Var                                                |
| Deneyimli personel gereksinimi              | Orta-Yüksek                             | Orta-Yüksek                                        |
| Biyolojik riski                             | Yüksek                                  | Düşük                                              |

\* Direkt test, örnekten çalışılan duyarlılık testini; indirekt test kültürde üreme olduktan sonra çalışılan testtir.

\*\*Antibiyotiğe göre değişen oranlarda, seyrek olarak mutasyon aranan gen bölgesi dışındaki mutasyonlar da dirence neden olabilir. Bu durum yalancı duyarlılığa neden olabilir.

## İDT tekniklerinin uygulanması

- **Kültüre Dayalı Yöntemler**
- **Proporsiyon yöntemi** ilacın kritik konsantrasyonunda, bakterilerin %1'den (kritik proporsiyon) daha fazlasının üremesi durumunda **dirençli olarak tanımlanması esasına dayanır**. Proporsiyon yöntemi Middlebrook 7H10 veya 7H11 agarda ve LJ by.de benzer şekilde çalışılır.
- Otomatize sistemler de benzer şekilde proporsiyon yönteminin prensibi temel alınmaktadır.

| Solvents and diluents |                             |                               |           |          |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|----------|
| Drugs                 | Substance                   | Critical concentration (mg/L) | Solvents  | Diluents |
| Isoniazid             | Isoniazid                   | 0.2                           | DW        | DW       |
| Rifampicin            | Rifampicin                  | 40                            | DMSO      | DM       |
| Ethambutol            | Ethambutol dihydrochloride  | 2                             | DW        | DW       |
| Streptomycin          | Dihydrostreptomycin sulfate | 4                             | DW        | DW       |
| Capreomycin           | Capreomycin sulfate         | 40                            | DW        | DW       |
| Amikacin              | Amikacin sulfate            | 40                            | DW        | DW       |
| Ofloxacin             | Ofloxacin                   | 2                             | 0.1N NaOH | DW       |

DW = Sterile distilled water; DMSO = dimethyl-sulfoxide; NaOH = Sodium-hydroxide.

## Recommended Equivalent Test Concentrations for First-line Drugs

| Drug     | System and Concentration (µg/mL) |           |      |           |
|----------|----------------------------------|-----------|------|-----------|
|          | 7H10 Agar                        | 7H11 Agar | MGIT | VersaTREK |
| INH low  | 0.2                              | 0.2       | 0.1  | 0.1       |
| INH high | 1.0                              | 1.0       | 0.4  | 0.4       |
| RMP      | 1.0                              | 1.0       | 1.0  | 1.0       |
| EMB      | 5.0                              | 7.5       | 5.0  | 5.0       |
| PZA      | -                                | -         | 100  | 300       |

## Recommended Concentrations for Second-line Drugs

| Drug         | System and Concentration (µg/mL) |              |             |
|--------------|----------------------------------|--------------|-------------|
|              | 7H10 Agar                        | 7H11 Agar    | MGIT*       |
| Amikacin     | 4.0                              | -            | 1.0         |
| Kanamycin    | 5.0                              | 6.0          | 2.5         |
| Capreomycin  | 10.0                             | 10.0         | 2.5         |
| Ofloxacin    | 2.0                              | 2.0          | 2.0         |
| Levofloxacin | 1.0                              | -            | 1.5         |
| Moxifloxacin | 0.5                              | 0.5          | 0.25        |
| Ethionamide  | 5.0                              | 10.0         | 5.0         |
| PAS          | 2.0                              | 8.0          | -           |
| Rifabutin    | 0.5                              | 0.5          | 0.5         |
| Streptomycin | 2.0 and 10.0                     | 2.0 and 10.0 | 1.0 and 4.0 |

# Ticari sıvı sistemler.....

## Automated cultures – WHO recommended

### □ Radiometric

□ BACTEC 460



### □ Non Radiometric

□ MGIT 960

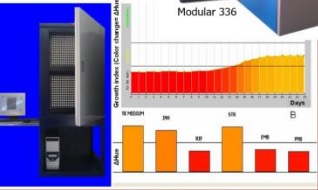
□ MB/BacT



Mycolor TK

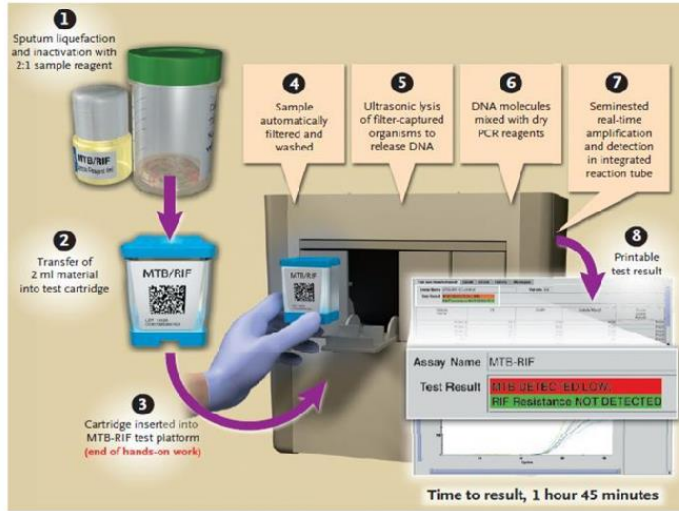
Modular 520

Modular 336

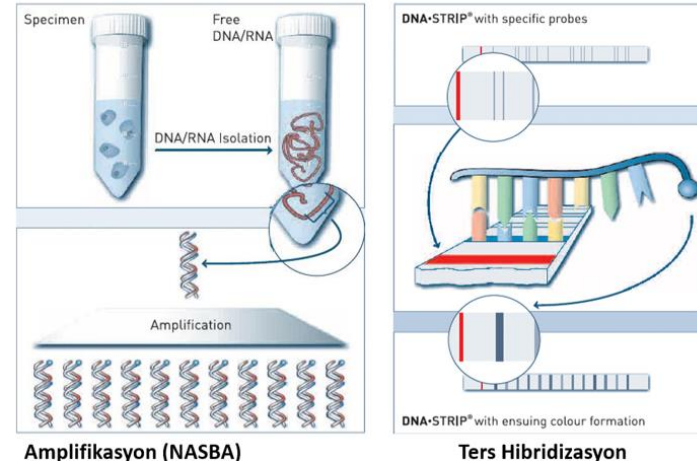


|                                        | MGIT 320 or 960                                                                                      | VersaTREK                                                                                     | Sensititre                                                                                                          |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Signal detected                        | Fluorescence released and detected due to oxygen consumption by growing microorganisms               | Pressure changes in headspace of the bottle from oxygen consumption by growing microorganisms | Plates are examined for growth either manually using view box or using the Vizion system                            |
| Turnaround times                       | Can be inoculated from either liquid or solid media and results available 4-13 days later            | Can be inoculated from either liquid or solid media and results available 4-13 days later     | Plates are inoculated from growth on solid media and can be read 10-14 days later                                   |
| Results: Susceptible, Resistant or MIC | Usually Susceptible/Resistant-                                                                       | Susceptible/ Resistant                                                                        | MIC- laboratory might provide interpretive criteria of Susceptible/Resistant                                        |
| Drugs                                  | INH, RMP, PZA, EMB, and sometimes Streptomycin (other drugs available as laboratory developed tests) | INH, RMP, PZA, EMB                                                                            | INH, RMP, EMB, streptomycin, Rifabutin, Ethionamide, Amikacin, Kanamycin, Ofloxacin, Moxifloxacin, Cycloserine, PAS |

## GeneXpert (Xpert MTB/RIF Testi)



## Line Probe Assay, DSÖ 2008



|                                                     | GeneXpert® MTB/RIF           | HAIN Genotype® MTBDRplus                                    | Sanger Sequencing                                                                                                                                                   | Pyrosequencing                                                                                              |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Company                                             | Cepheid                      | HAIN Lifescience                                            | Not Applicable (N/A) (laboratory developed test)                                                                                                                    | N/A (laboratory developed test)                                                                             |
| Genetic loci                                        | <i>rpoB</i> (for RMP)        | <i>rpoB</i> (RMP), <i>katG</i> (INH), and <i>inhA</i> (INH) | Varies but can include <i>rpoB</i> , <i>inhA</i> , <i>katG</i> , <i>aphC</i> , <i>embB</i> (EMB), <i>prnA</i> (PZA), <i>gyrA</i> (FQ), and <i>rrs</i> (injectables) | Varies but can include <i>rpoB</i> , <i>inhA</i> , <i>katG</i> , <i>aphC</i> , <i>gyrA</i> , and <i>rrs</i> |
| Format                                              | Semi-automated real-time PCR | Line probe assay                                            | DNA sequencing                                                                                                                                                      | DNA sequencing                                                                                              |
| FDA approved                                        | Market authorization         | No                                                          | N/A (laboratory developed test)                                                                                                                                     | N/A (laboratory developed test)                                                                             |
| Expected turnaround time from receipt in laboratory | 1-2 working days             | 1-2 working days (depends on how often performed in lab)    | 1-2 working days (depends on how often performed in lab)                                                                                                            | 1-2 working day (depends on how often performed in lab)                                                     |

# Moleküler yöntemler-İdentifikasyon + İDT

# Moleküler İDT



- **Moleküler Yöntemler** Direnç geni saptamak amacıyla en çok kull. ters hibridizasyon yöntemleri ve gerçek zamanlı (real-time) PCR yöntemleridir. Yayma pozitif/ kültürde üremiş örneklerden ilaç direnci saptanabilmektedir.
- Moleküler yöntemlerin kültüre dayalı testlerin yerine **kullanılmaması**, saf kültür-kültüre dayalı testlerin; moleküler yöntemlerin ise belli durumlarda kull. önerilmektedir.
- **Moleküler test sonuçlarının kültüre dayalı testler ile doğrulanması; moleküler yöntem ile ÇİD-TB ilişkili mutasyon saptandığında, hemen kültür temelli yöntem ile birinci ve ikinci seçenek ilaçlara duyarlılığın test edilmesi önerilmektedir.**
- **Moleküler İDT yapılması önerilen durumlar**
  - \*İD old. kuşku edilen hastalarda;
  - Daha önceye ait tedavi öyküsü olan
  - Yüksek direnç oranı olan ülke/yerden gelenler
  - Tedaviye iyi yanıt vermeyen
  - ÇİD-TB teması olan
  - \*Geniş temaslı grubu olan hast.da
  - Etkili antiTB tedavisinin yaşamsal aciliyet gerektirdiği hastalarda;
  - Menenjit, HIV pozitifliği, bağışıklığın baskılandığı durumlarda
  - Fenotipik testler ile İDT yapılamayan TDM ile karışık ya da diğer bakterilerle kontamine kültürü olanlarda

# İDT Bildirimi

İDT sonuçları örnek kabulünden sonra ort 30 günde bildirilmeli



Dirençli sonuçlar tetkiki isteyen birim/hekime ivedilikle bildirilmelidir.



Her hastaya ait en az bir pozitif kültür  $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 'de en az bir yıl saklanmalıdır.



Rifampisin dirençli sonuçlar ilgili İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne ivedilikle bildirilmelidir.



Her hastanın **değişen duyarlılık paternlerine** ait bir izolat  $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 'de en az bir yıl saklanmalıdır.



Rifampisin dirençli tüm izolatlar ikinci seçenek ilaç duyarlılık testi çalışılmak üzere Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarına gönderilmelidir.  
–TULSA programı

- **Kalite Kontrol çalışmaları** tüm ilaçlara duyarlı olan M.tuberculosis H37 Rv (ATCC 27294) ile yapılır ve kökenler -70 C'de saklanır.
  - By ve antibiyotik kontrolü; her yeni by/yeni lot no'da
  - Ekipman kontrolü
  - Soğutucuların sıcaklık takibi ve bakımı
  - İnkübatörlerin sıcaklık takibi, kalibrasyon ve bakımı
  - Otomatize sistemlerin kalibrasyon ve bakımları
  - Ortam sıcaklığının takibi
- 
- **Dış Kalite değerlendirme**
  - İDT çalışmalarında laboratuvarın yetkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla ulusal veya uluslararası bir Dış Kalite Değerlendirme programına katılması gerekir.



- Katı by'de kültüre dayalı yöntemler güvenli- geç sonuç
- Kültüre dayalı İDT'de- sadece MTB saf kültürü kull.
- Otomatize yönt.de direnç- kontaminasyon kontrolü
- Kültürde MTBC izolatının **TDM ile karışık olması** yanlış dirençli sonuç
- **Karışık kültürlerde moleküler yöntem kullanılır.**
- Kont. riski nedeniyle kültüre dayalı testlerin klinik örnekten çalışılması (direkt test) önerilmez.
- İD düşünülen hast.da moleküler yönt.le hızlı direnç saptanamıyorsa ARB pozitif klinik örnekten kültüre dayalı direkt İDT çalışılabilir.
- Otomatize kültür sistemlerinde kull. kritik konsantrasyonlar katı by'de proporsiyon yönt.de kullanılanlardan daha düşük
- **Direnç durumunda İDT'nin INH, SM ve EMB'nin yüksek konsant. çalışılması önerilir.**
- Katı by'de kültüre dayalı testler ile pirazinamid duyarlılığının test edilmesi standart değildir.
- Pirazinamid için otomatize sistemlerin kullanılması önerilmektedir.

İDT'de- Olası sorunlar/kısıtlılıklar

# İDT yöntemlerinin geçerli kılınması

- **Validasyon (Geçerli Kılma):** Bir yöntem/test/prosedürün performansının sürekli olarak izlenmesidir.
- **Test edilecek parametreler:** Doğruluk, tekrarlanabilirlik, doğrusallık (kantitatif testler için), duyarlılık, özgüllük
- **Verifikasyon(Doğrulama):** Geçerli kılınmış bir yöntemin laboratuvardaki beklenen **performansının** test rutin kullanıma girmezden önce bir kereliğine ölçülmesi işlemi veya FDA (veya CE) onaylı bir yöntem için üretici tarafından belirtilen performans değerlerinin laboratuvarda elde edildiğinin gösterilmesidir.
- **Test edilecek parametreler:** Doğruluk, tekrarlanabilirlik, doğrusallık (kantitatif testler için)
- **Kullanılacak kontrol materyalleri**
  - Sertifikalı referans materyali
  - Diğer referans materyali
  - Dış kalite değerlendirme materyali(farklı bir yöntem ile daha önce çalışılmış)
  - Akredite bir laboratuvarda çalışılmış hasta materyali
  - Sonucu referans yöntem ile ölçülmüş hasta materyali



# İlaç Duyarlılık Testlerinin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması

| Hata Türleri         | Denenen Yöntem | Referans Yöntem |
|----------------------|----------------|-----------------|
| Çok büyük hata (ÇBH) | S              | R               |
| Büyük hata (BH)      | R              | S               |

S, duyarlı; R, dirençli

Tablo 8. Hata oranlarının hesaplanması

|                        |                                                                                                            |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Çok büyük hata (ÇBH) = | $\frac{\text{ÇBH sonucu veren izolat sayısı}}{\text{Referans yöntem ile R olan izolat sayısı}} \times 100$ |
| Büyük hata (BH) =      | $\frac{\text{BH sonucu veren izolat sayısı}}{\text{Referans yöntem ile S olan izolat sayısı}} \times 100$  |
| Küçük Hata (KH) =      | $\frac{\text{KH sonucu veren izolat sayısı}}{\text{Test edilen izolat sayısı}} \times 100$                 |

Yapılan değerlendirme sonucunda

- Çok büyük hata  $\leq 1,5$
- Büyük hata  $\leq 3$
- Büyük + küçük hata  $\leq 7$
- Kararlılık oranları  $\geq 90\%$  olmalıdır.

- Referans yöntemle karşılaştırma yapılır.
- Yöntemin doğrulanması için kesinlik ve doğruluk çalışmaları yapılır.
- **Kesinlik çalışmalarında kategorik uyum (test kökeninin yorumlanan duyarlılık sonuçları ile (S/I/R) uyumudur.**
- **Doğruluk çalışmalarında ; büyük hata , çok büyük hata, kategorik uyum dikkate alınır.**

# Teşekkürler....

