

# ***Mycobacterium tuberculosis*'de Direncin Genomik Tanımı ve Hızlı Direnç Testleri**

Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

- **End TB Stratejisi**

- 2035'e yılına kadar TB insidansının ise %90 azaltılarak yılda 10/100.000 yeni olgu düzeylerine indirilmesi amaçlanmaktadır.

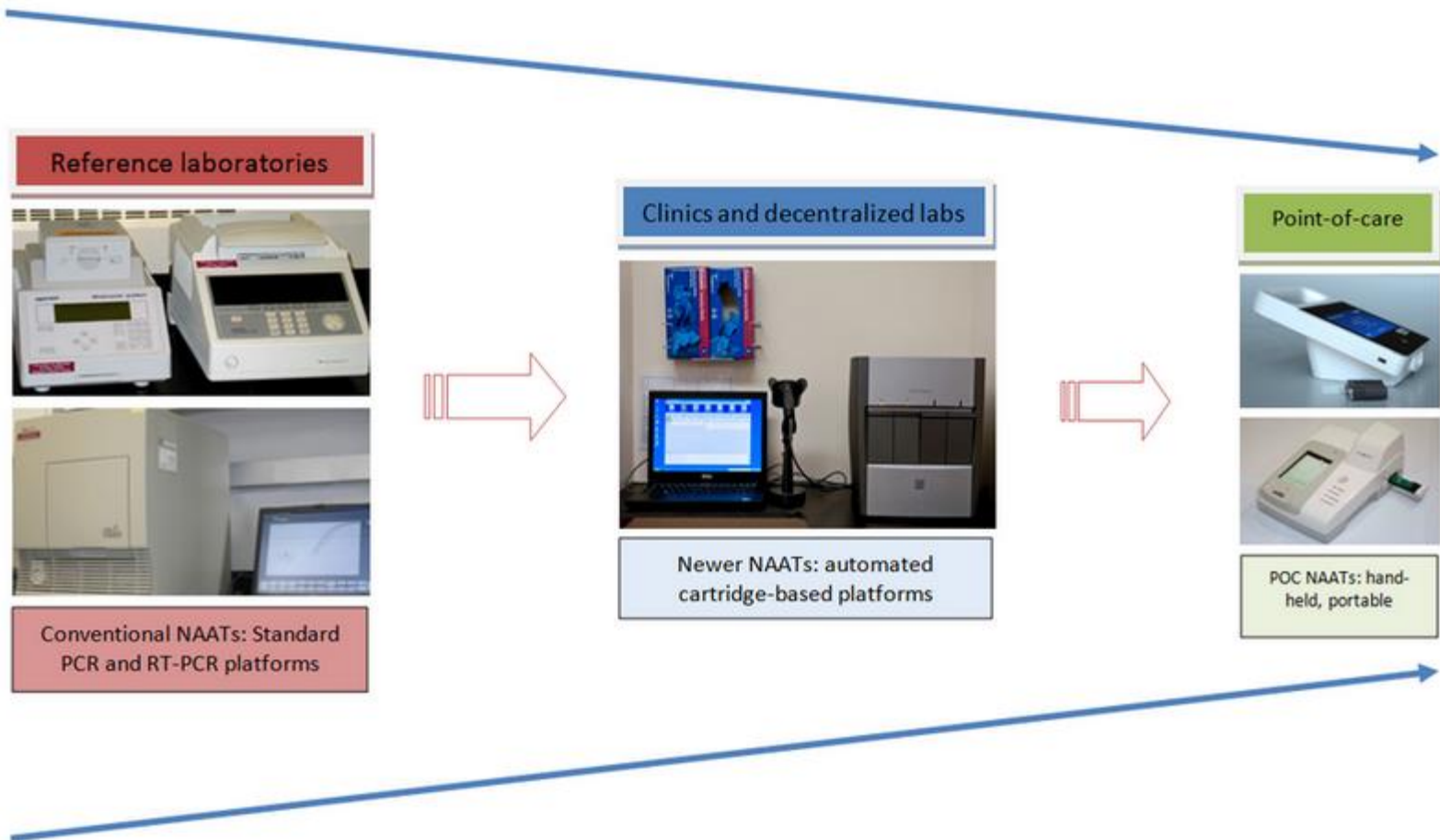
- **End TB Stratejisi**

- 2025 yılına kadar TB olgularının en az %90'ında tanı sırasında DSÖ'nün önerdiği hızlı tanı testlerinin kullanılması hedeflenmektedir.
  - TB ve ilaç direncini hızlı ve doğru olarak saptayabilen yeni sistemlerin geliştirilmesi,
  - Ulusal ya da uluslararası algoritmalar dahilinde, kontrol programının bir parçası olarak kullanımı hedeflenmektedir

# En iyi hızlı tanı testi

- Kullanımı kolay
- Ucuz
- Hızlı
- Duyarlı
- Özgöl
- İlaç direnci saptasın

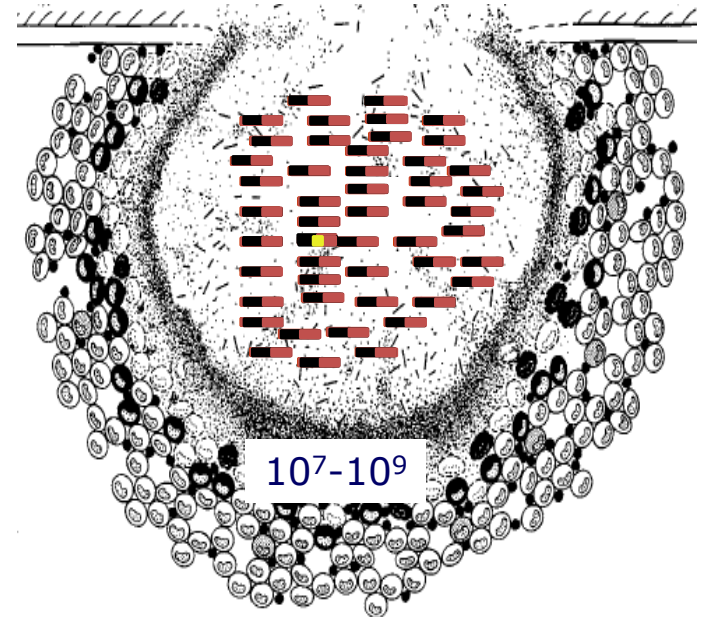
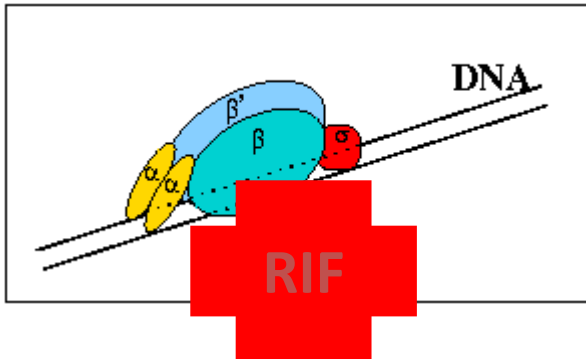




# *Mycobacterium tuberculosis*'de Direncin Genetik Temeli

- Kromozomdaki mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır
- Horizontal gen transferine (transpozon veya plazmit ile) bağlı direnç görülmemektedir

**TGG CAC GGA GTA GCG**  
Trp His Gly Val Ala



# *Mycobacterium tuberculosis*'de İlaç Direnç Genleri

| İlaç    | Etki mekanizması                                                                                | Direnç geni   | Görevi            | Mutasyonun sıklığı (%) |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------|------------------------|
| RİF     | Transkripsiyonun inhibisyonu                                                                    | <i>rpoB</i>   | İlacın hedefi     | 96-100                 |
| INH     | Mikolik asit sentezinin inhibisyonu.<br>DNA, lipid, karbonhidrat ve NAD metabolizmasını etkiler | <i>katG</i>   | İlaç aktivasyonu  | 42-58                  |
|         |                                                                                                 | <i>inhA</i>   | İlacın hedefi     | 21-34                  |
|         |                                                                                                 | <i>kasA</i>   | İlacın hedefi     | -                      |
|         |                                                                                                 | <i>ahpC</i>   | Direnç göstergesi | 10-15                  |
| PZA     | Sitoplazmanın asidifikasyonu                                                                    | <i>pncA</i>   | İlaç aktivasyonu  | 72-97                  |
| EMB     | Arabinogalaktan sentezinin inhib.                                                               | <i>embCAB</i> | İlacın hedefi     | 47-65                  |
| STR     | Protein sentezinin inhibisyonu                                                                  | <i>rpsL</i>   | İlacın hedefi     | 52-59                  |
|         |                                                                                                 | <i>rrs</i>    | İlacın hedefi     | 8-21                   |
| AMİ/KAN | Protein sentezinin inhibisyonu                                                                  | <i>rrs</i>    | İlacın hedefi     | 76                     |
| FQ      | DNA girazın inhibisyonu                                                                         | <i>gyrA</i>   | İlacın hedefi     | 75-94                  |
|         |                                                                                                 | <i>gyrB</i>   | ?                 | -                      |

# Genotipik yöntemler

- Dirençten sorumlu genlerdeki mutasyonları saptanır
  - *rpoB*, *katG*, *inhA* vb.

**TGG CAC GGA GTA GCG**

**Trp** His Gly Val Ala

- **Avantajları**
  - Bakterinin üremesi gerekmez veya çok az üreme yeterlidir
  - Hızlıdır
  - Kontamine kültürlerde çalışılabilir.

# Genotipik yöntemler

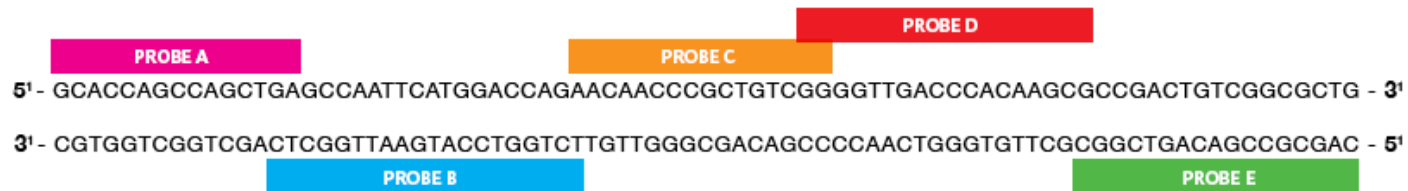
- **Dezavantajları**

- Sessiz mutasyonlar direnç olarak saptanabilir

|                            |
|----------------------------|
| <b>TGT CAC GGA GTA GCG</b> |
| Cys His Gly Val Ala        |

- Hedef bölge dışındaki mutasyonlar saptanamaz

*rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION





# Genotipik yöntemler

- Doğrudan klinik örneklerden direnci saptayan
- Birden fazla ilaç direncini saptayan
- Hasta başı test cihazları

## TECHNOLOGIES ENDORSED BY WHO

### Molecular detection of TB and drug resistance

- Line probe assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), isoniazid and rifampicin resistance in acid-fast bacilli smear positive sputum or MTB cultures (FL-LPA), Hain Lifescience, Germany and Nipro, Japan
- Line probe assays for the detection of resistance to fluoroquinolones and second-line injectable agents (SL-LPA), Hain Lifescience, Germany
- TB LAMP for detection of TB, Eiken, Japan

## SCHEDULED FOR WHO EVALUATION IN 2018/19

### Molecular detection of TB and drug resistance

- Molecular technologies for genotypic drug resistance testing (including sequencing technologies)
- FluoroType MTBDR, Hain Lifescience, Germany
- m2000 RealTime MTB System, Abbott, USA
- BD Max MDR-TB, Becton Dickinson, USA
- Roche cobas® MTB system, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland

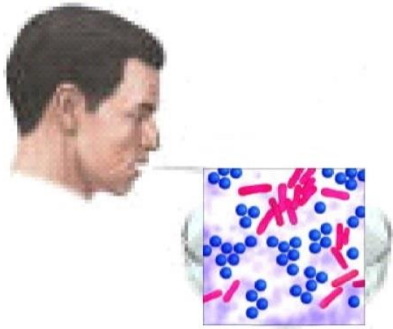
## WHO POLICY UPDATES SCHEDULED FOR 2018/2019

### Molecular detection of TB and drug resistance

- Alere Determine TB-LAM, Alere, USA (TB detection in people seriously ill with HIV)
- Xpert MTB/RIF Ultra for detection of TB and rifampicin resistance in pulmonary, extrapulmonary and paediatric samples, Cepheid, USA

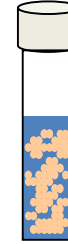
# Direncin genomik tanımı nasıl belirleniyor?

Direkt yöntem

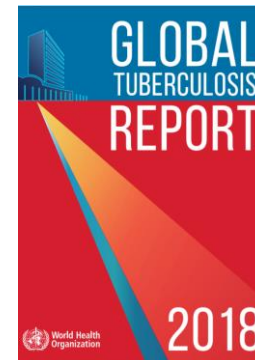


- GeneXpert
- Line probe assays (LPA)] testleri

İndirekt yöntem



- Line probe assays (LPA)] testleri



# Doğrudan klinik örneklerden

- Klinik örneklerden RIF direncini saptamak için
  - GeneXpert MTB/RIF
  - GeneXpert MTB/RIF Ultra
- Yayma (+) balgamdan RIF ve INH direncini saptamak için
  - Line probe assays (LPA)] testleri
- Yayma (+) balgamdan ikinci seçenek ilaç direncini saptamak için
  - Line probe assays (LPA)] testleri



# GeneXpert MTB/RIF

- Kartuşlar oda ısısında 6-9 ay saklanabilir (2-28 °C)
- Ekstraksiyon, amplifikasyon ve saptama için gerekli tüm reagenler liyofilize halde kullanıma hazır durumda kartuşun içinde bulunur.
- Test 2 saat içinde sonuçlanır.
- Kontaminasyon riski çok azdır.



- DSÖ tarafından TB tanısı ve RIF direnci saptamak için önerilen testtir.
- 5 adet «Molecular beacon» prop kullanılır.
- Hedef *rpoB* genidir.

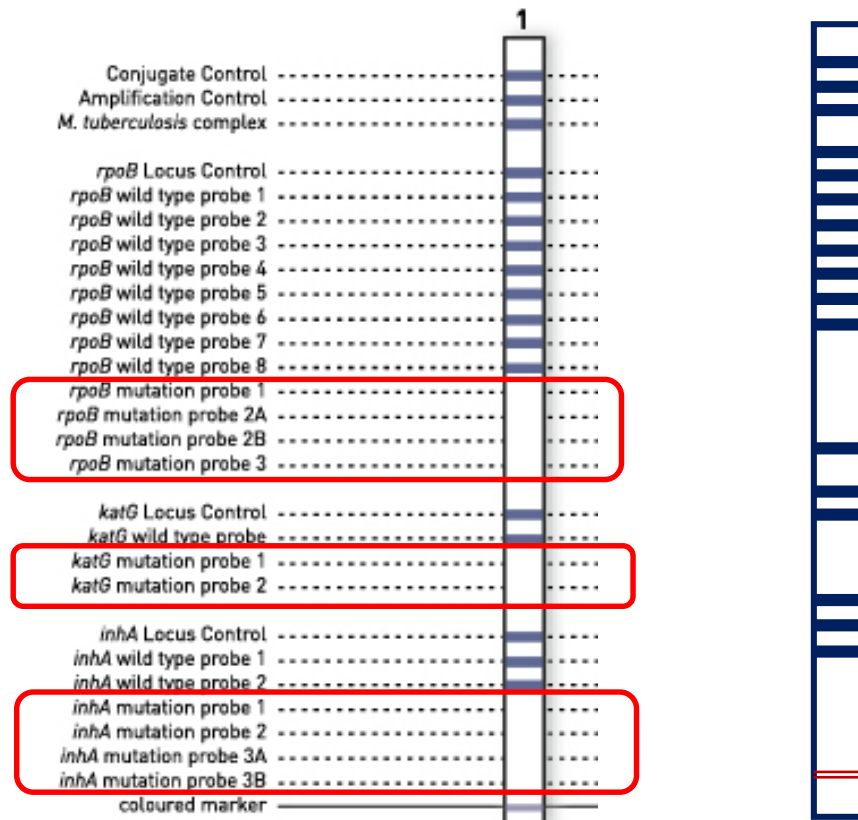
- **GeneXpert MTB/RIF Ultra**
- Yayma-negatif TB olgularında artmış duyarlılık
  - Kopya sayısı fazla bölgeler (*IS6110* ve *IS1081*) hedef alınmıştır.
  - Alt saptama limiti 1-log artmıştır.
- Sonuçlanma süresi <80 dakikadır.
- Bazı sessiz RIF mutasyonlarının daha iyi saptanmaktadır.
- Karışık enfeksiyonlarda rifampisin direnci daha iyi saptanmaktadır.
- Kartuşun raf ömrü kısadır.

- **GeneXpert Omni**
- Hasta başı tanı testi
- 2019'dan önce çıkması beklenmiyor



# Ters hibridizasyon [line probe assays (LPA)] testleri

- Yayma pozitif balgam örneklerinde veya üremiş kültürlerde çalışılabilir.
- Birinci basamak LPA'lar ilk kez 2008 yılında DSÖ tarafından önerildi
  - *M.tuberculosis*, INH ve RIF direncinin saptanması için

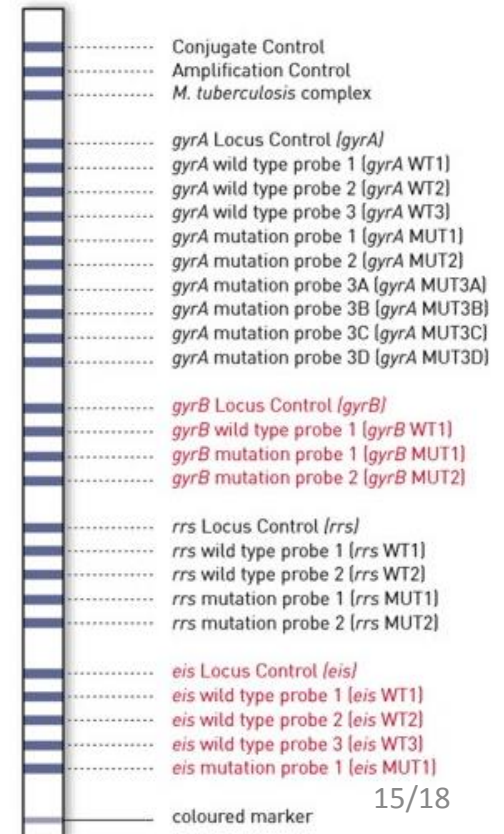


# Ters hibridizasyon [line probe assays (LPA)] testleri

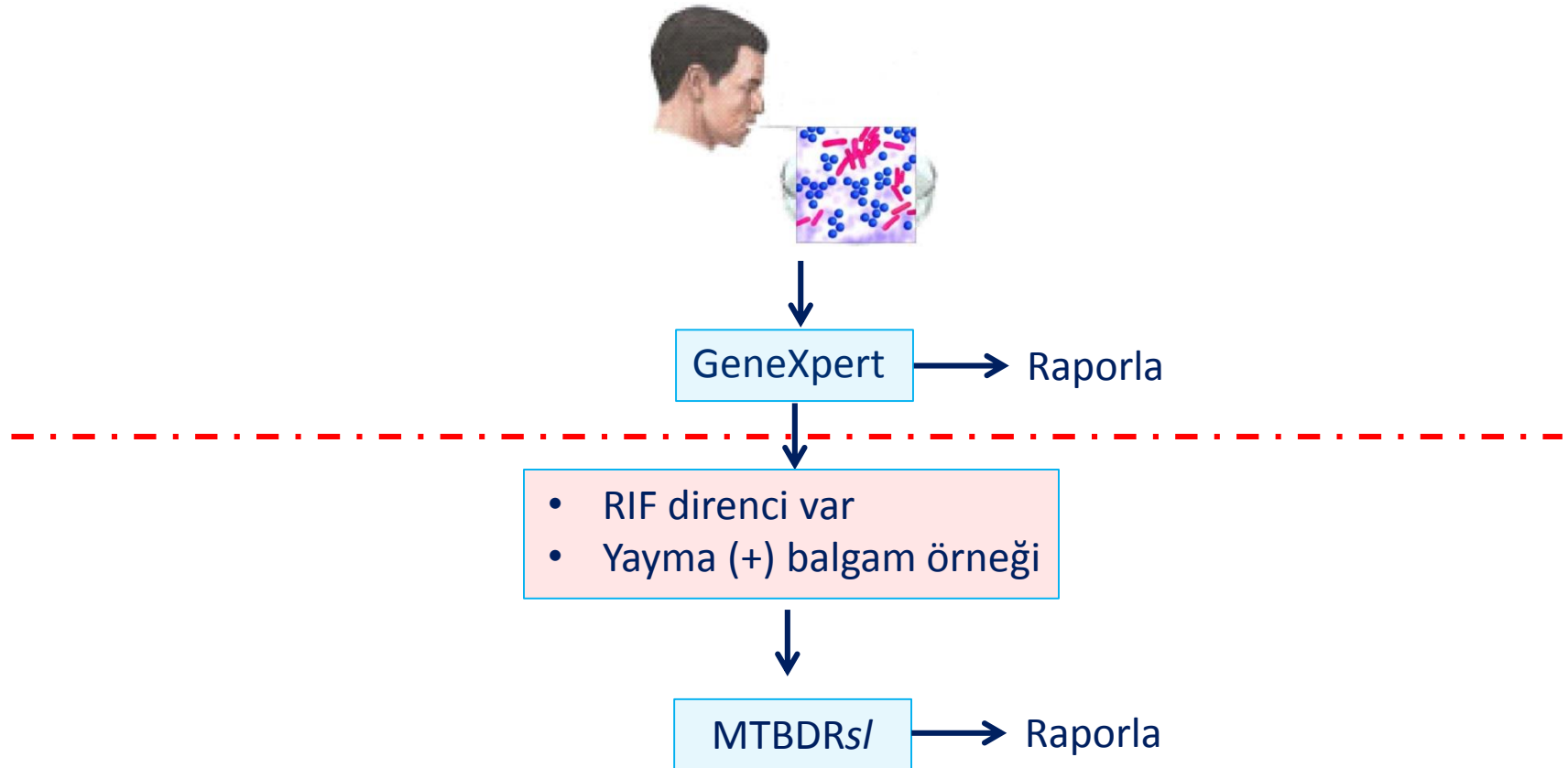
- Yayma pozitif balgam örneklerinde veya üremiş kültürlerde çalışılabilir.
- İkinci basamak LPA'lar ilk kez 2016 yılında DSÖ tarafından önerildi önerildi.
  - *M.tuberculosis*, kinolon ve enjektabil ilaç direncinin saptanması için

- MTBRsl DSÖ tarafından onaylanmış ÇİD-TB hastalarında YİD-TB saptamak için önerilen tek hızlı moleküler testtir.
- Bununla birlikte, bu yöntem laboratuvar altyapısı ve ekipmanı gerektirir.

## GenoType MTBDRsl VER 2.0



# Doğrudan klinik örneklerden-Algoritma önerisi





# Kültürden-Algoritma önerisi

