

İkinci Sıra İlaç Direncinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Doç. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD
MANİSA

Sunum Planı

- Tüberkülozda ilaç direnci ilgili tanımlar
- İlaç direnci tanısının önemi
- İkinci sıra ilaç direnci tanısının endikasyonları
- Moleküler yöntemler
 - Çeşitleri
 - Avantaj ve dezavantajları
 - öneriler

Dirençle ilişkili tanımlar

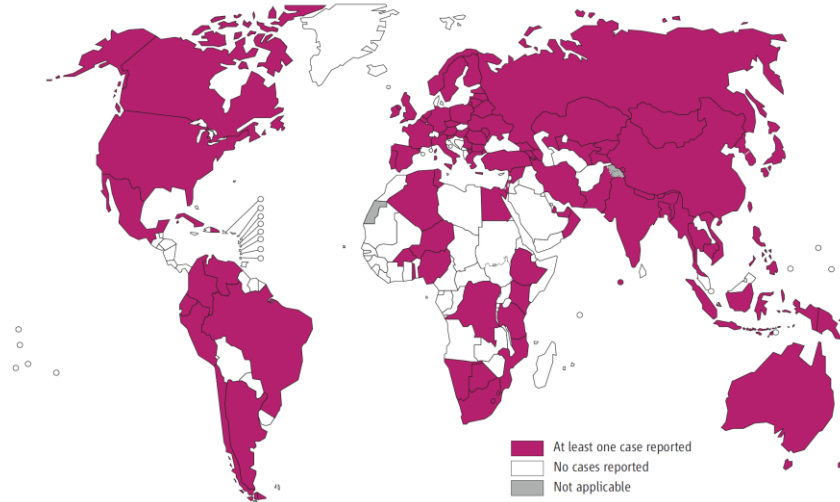
- **Çok ilaca direnç (ÇİD):** (Multidrug-resistant, MDR)
 - en az INH + RIF
- **Yaygın ilaca direnç (YİD):** (Extensively drug-resistant, XDR)
 - INH + RIF + florokinolon + kanamisin/amikasin/kapreomisin

Dünyada her yıl;
~ 500000 ÇİD-TB olgusu
%5-10'u YİD-TB olgusu



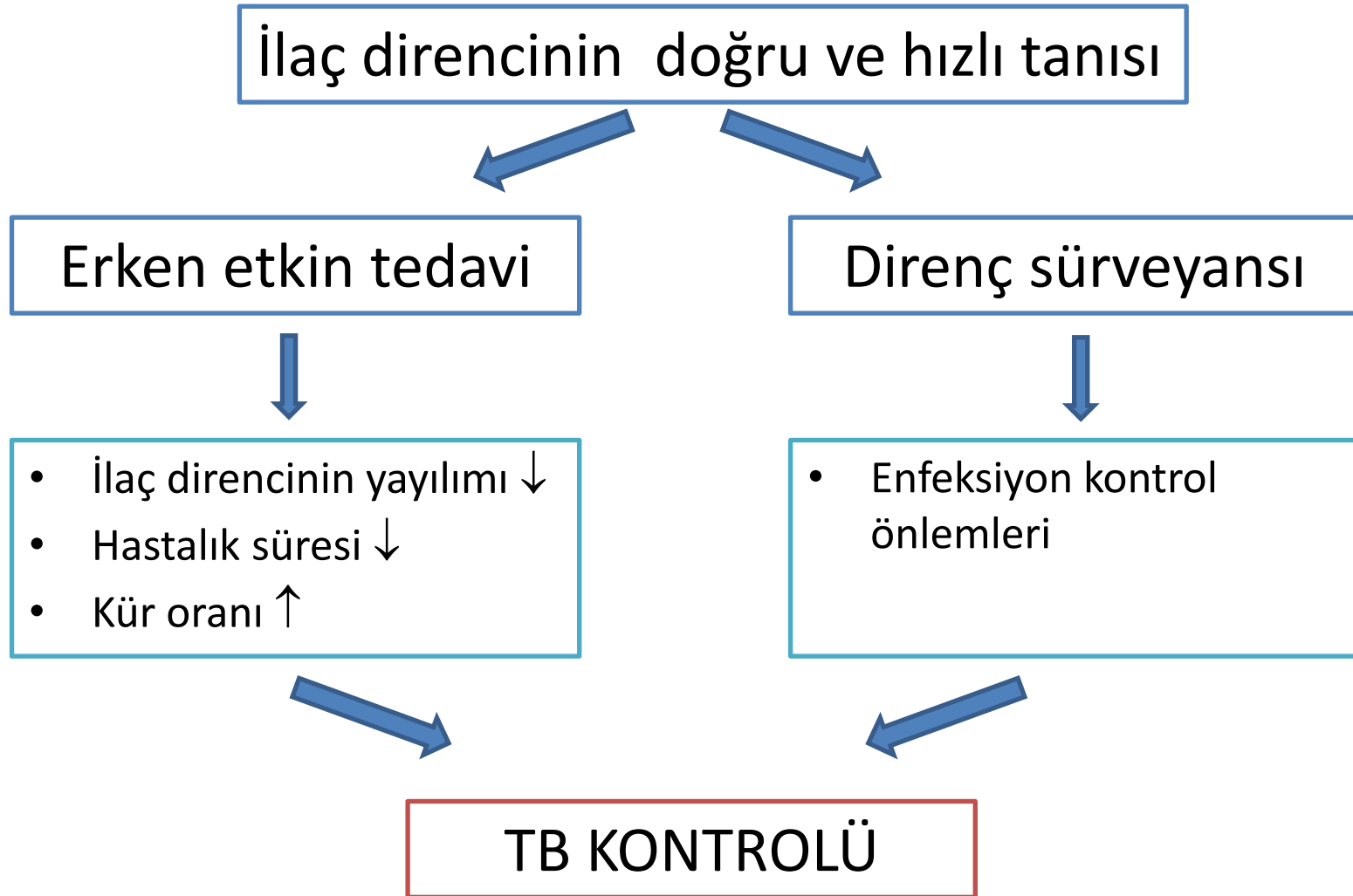
İkinci sıra ilaç duyarlılık testinin önemi artıyor

Countries that had notified at least one case of XDR-TB by the end of 2012



WHO/HTM/TB/2013.11
CLSI M24-A2

TB'da İlaç Direncinin Saptanmasının Önemi



Her hasta için
kültürde izole edilen ilk *M.tuberculosis* izolatına
birinci sıra ilaç duyarlılık testi uygulanmalıdır.

- RIF
- INH
- EMB
- PZA

İkinci sıra ilaçları ne zaman test edelim?

- Birinci sıra ilaçlara karşı test edilen izolat;
 - RIF'e dirençli ise
 - İki ilaca dirençli ise
 - INH'a monorezistan + tedaviye ikinci sıra ilaç eklenmesi planlanıyorsa (ör. FQ)



İkinci sıra ilaçlar test edilmeli

- Hızlı, ticari kültür sistemi veya moleküler yöntem ile ÇİD-TB saptanmış, sonucun doğrulanması için fenotipik yöntem ile test tekrarı planlanıyorsa



İkinci sıra ilaçlar da eşzamanlı test edilmeli

Hangi ikinci sıra ilaçları test edelim?

- Enjektabl ajanlar;
 - Streptomisin
 - Kanamisin
 - Amikasin
 - Kapreomisin
- Florokinolonlar (sadece biri)
 - Ofloksasin
 - Siprofloksasin
 - Levofloksasin
 - Moksifloksasin
- Oral bakteriyostatik ajanlar
 - Etyonamid
 - PAS

- Kanamisin
- Amikasin
- Kapreomisin
- Ofloksasin

Hız?



Konvansiyonel katı kültür ve İDT

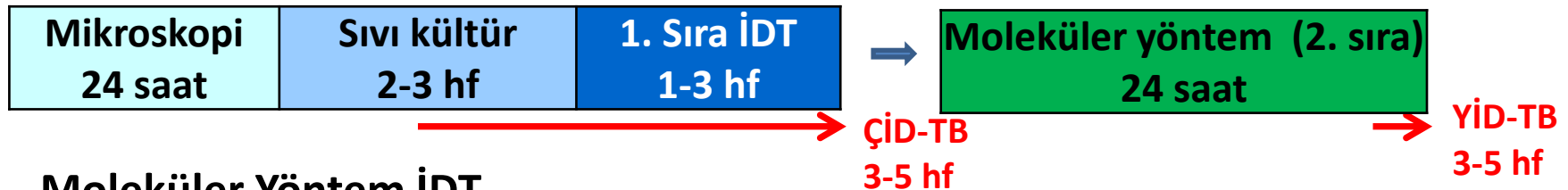


Sıvı kültür ve İDT

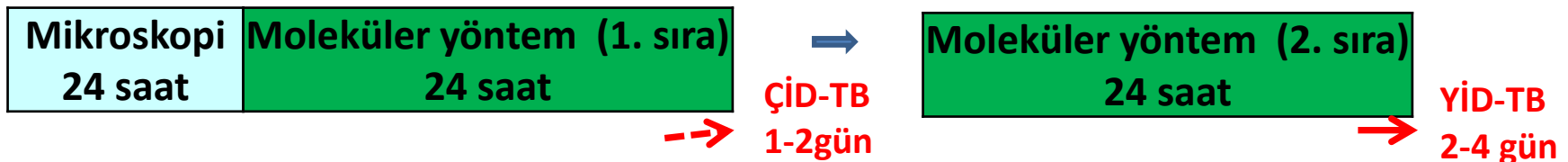


Çözüm?

Sıvı kültür + Moleküler Yöntem İDT



Moleküler Yöntem İDT



İkinci sıra ilaç direnç mekanizmaları

İlaç	Dirençle ilişkili gen	Gen ürününün fonksiyonu
Kinolonlar	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	DNA giraz subunit A DNA giraz subunit B
Amikasin	<i>rrs</i>	16S rRNA
Kanamisin	<i>rrs</i> <i>eis</i>	16S rRNA
Kapreomisin	<i>rrs</i> <i>tlyA</i>	16S rRNA 2'-O-metiltransferaz

ilaç direncinin belirlenmesinde moleküler yöntemler

- Dirençle ilişkili, bilinen mutasyonları saptamada duyarlı ve özgül
 - Kültürden çalışıldığında çok az bir üreme yeterlidir
 - Klinik örneklerden direkt çalışılabilmektedir.
- Laboratuvar tehlikelerini en aza indirmektedir.
- Çok hızlı

Belli durumlarda **ÇİD-TB**'nin hızlı tanısı için
moleküler yöntemlerin
(LPA'lar ve Xpert MTB/RIF)
kullanılabileceği
onaylanmıştır.

İkinci Sıra İlaç Direncinin Saptanmasında Moleküler Yöntemler

– DNA dizi analizi

- Sanger yöntemi
- Pirosekanslama

– DNA microarray

– Gerçek zamanlı PZT

– Line probe Assay (Ters hibridizasyon testi, LPA)

- GenoType MTBDRsl (Hain LifeScience)



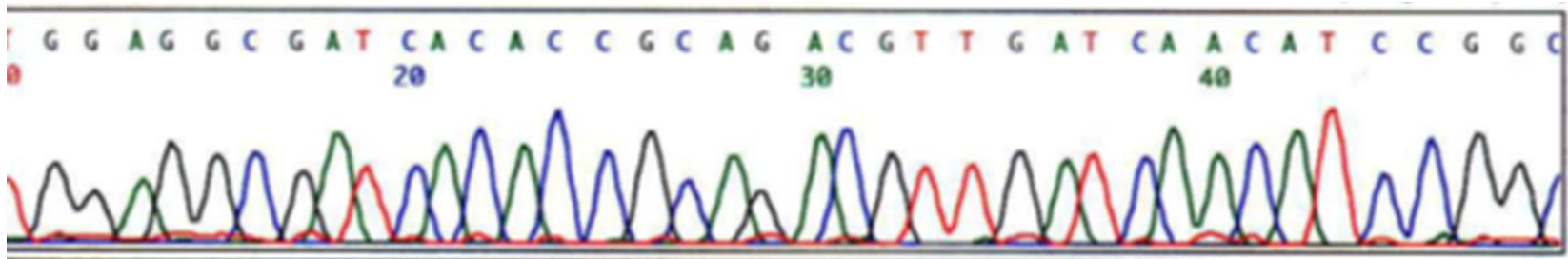
DNA dizi analizi

Sanger yöntemi

- Yüksek doğruluk,
- Genotipik düzeyde yüksek ayırım gücü
- Büyük DNA parçalarına uygun



İlaç direnci ile ilişkili mutasyonların saptanmasında
referans moleküler yöntem



Sanger yöntemi;

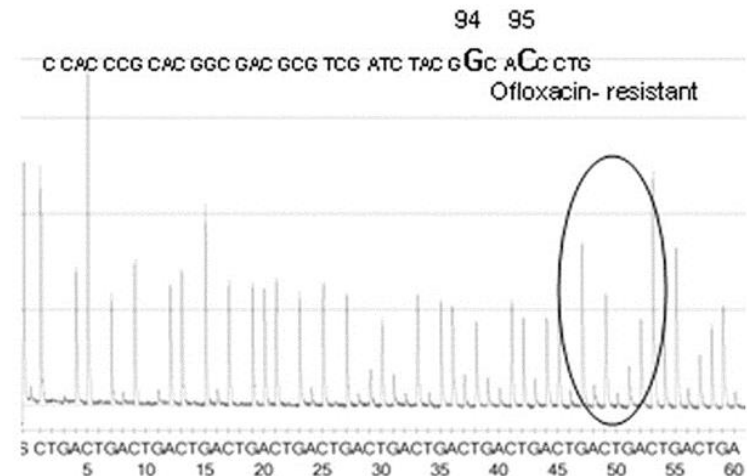
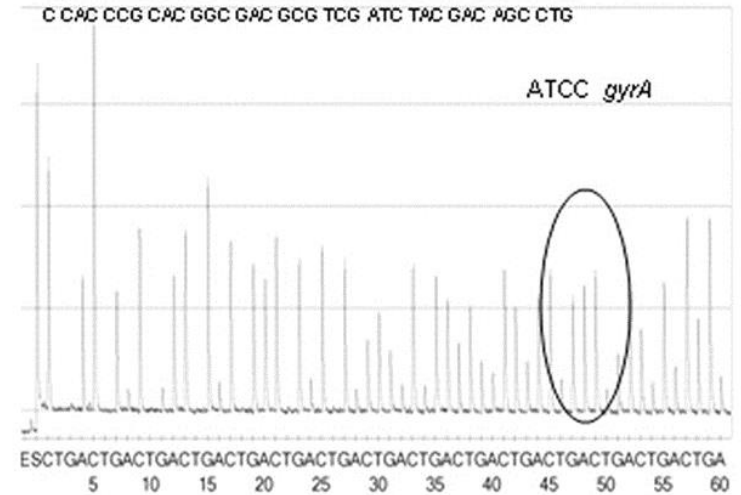
- Zahmetli, zaman alıcı, deneyim gerektirir.
- Rutin tanıda kullanım için uygun değil.



- Bilinmeyen veya yeni mutasyonları saptamada
- Fenotipik ve genotipik tabanlı sonuçlar arasındaki uyumsuzluklarda
kullanılması daha uygun olabilir.

Pirosekanslama

- Kısa DNA segmentlerinin analizinde kullanılır (<50 nükleotid)
- Yarı otomatik, gerçek zamanlı, alternatif bir yöntem



JCM 2014;52(2):475-82

Pyrosequencing for Rapid Detection of Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Isolates and Clinical Specimens

S.-Y. Grace Lin, Timothy C. Rodwell, Thomas C. et.al.

Hedef genler: fQ → *gyrA* (QRDR)
AMK, CAP, KAN → *rrs*

PSQ sonucu (no.)	Fenotipik İDT sonucu (örnek sayısı)						duyarlılık	özgüllük
	İzolat		Klinik örnek		Kombine			
	R	S	R	S	R	S		
fQ (125)								
Mutasyon	17	0	3	0	20	0	87.0	100
Mutasyon yok	2	79	1	23	3	102		
AMK (120)								
Mutasyon	14	1	1	0	15	1	100	99.0
Mutasyon yok	0	79	0	25	0	104		
CAP (119)								
Mutasyon	14	1	1	0	15	1	100	99.0
Mutasyon yok	0	79	0	24	0	103		
KAN (55)								
Mutasyon	11	0	1	0	12	0	85.7	100
Mutasyon yok	2	28	0	13	2	41		

JCM 2012;50(6):2026-33

Detection of First- and Second-Line Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates by Pyrosequencing

Anna Engström, Nora Morcillo, Belen Imperiale, Sven E. Hoffner, Pontus Juréena.

Hedef genler: *gyrA* (QRDR), *rrs*, *eis* promotor

PSQ sonucu (no.)	Fenotipik İDT sonucu (örnek sayısı)		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
	R	S		
OFL				
Mutasyon	54	0	87.1	100
Mutasyon yok	8	184		
AMK				
Mutasyon	69	0	82.1	100
Mutasyon yok	15	155		
CAP				
Mutasyon	62	4	79.5	97.2
Mutasyon yok	16	139		
KAN				
Mutasyon	82	2	83.7	98.4
Mutasyon yok	16	126		

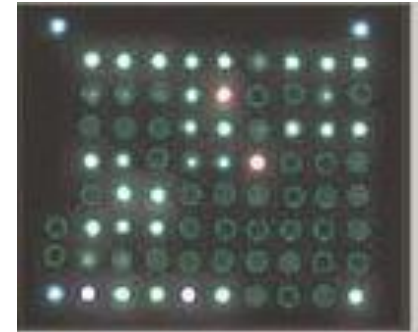
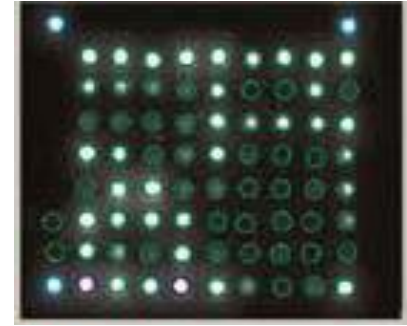
- Sonuç olarak pirosekanslama, dirençle ilişkili mutasyonların saptanmasında;
 - Sangere göre;
 - Daha basit ve daha hızlı → daha çok örnek çalışılabilir.
 - Klinik örneklerden de çalışılabilir.
 - Ancak, büyük gen bölgelerini kapsamaz
 - LPA'ya göre;
 - Genotipik düzeyde ayırım gücü daha yüksek
 - Dahil edilecek lokusların sayısı daha kolay ayarlanabilir



- Tanısal ve halk sağlığı laboratuvarlarında rutin kullanılabilme potansiyeline sahip
- Kapsamlı ekipman gerektirmesi ve maliyeti (?) rutin kullanımını kısıtlamaktadır.

DNA microarray

- Tek bir test ile MTB ve birden fazla ilaç için direnç mutasyonlarını eş zamanlı saptayabilir.
- Ticari olarak umut vadeden testlerdir.
- İkinci sıra ilaçlar için ticari test henüz yok
 - Infiniti MDR-TB (AutoGenomics) → Rif, INH, PZA
 - TB-Biochip (Biochip-IMB) → Rif, INH
 - CombiChip Mycobacteria™ (GeneIn) → Rif, INH
- Pahalı olması yaygınlaşmasını kısıtlamaktadır.

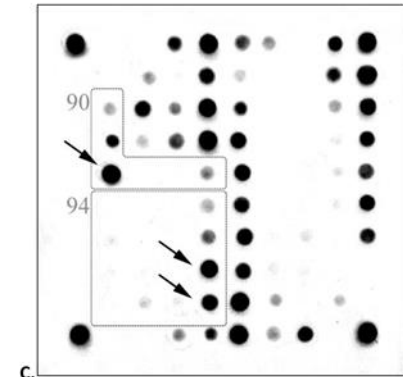
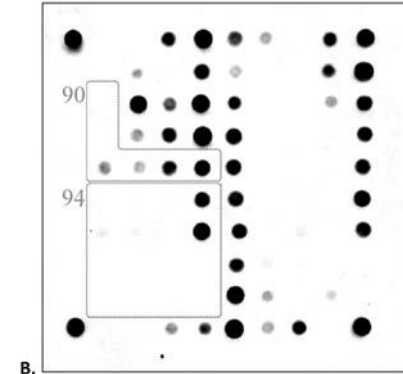
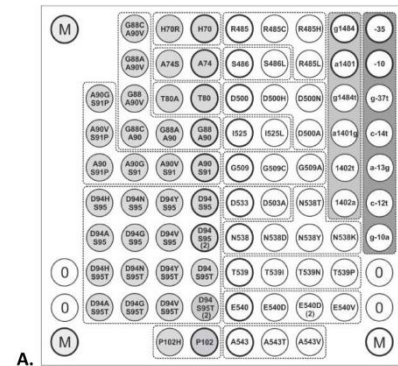


Detection of second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using oligonucleotide microarrays

Danila V Zimenkov, Olga V Antonova, Alexey V Kuz'min, et.al.

Hedef genler: *gyrA*, *gyrB* (QRDR), *rrs*, *eis* promotor
Teknoloji: Biochip-IMB

Biochip sonucu		Fenotipik İDT sonucu		Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
		R	S		
KAN	R	33	2	97	94
	S	1	29		
CAP	R	16	1	100	94
	S	0	48		
OFL	R	41	0	98	100
	S	1	23		



Sonuç olarak;

Bu test,

ÇİD -TB tanısı için ticari olarak mevcut olan

TB-Biochip ile kombine kullanıldığında,

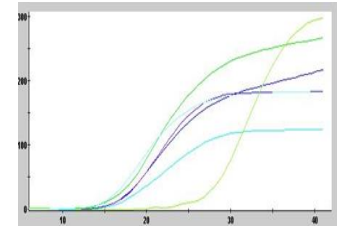
ÇİD ve YİD-TB tanısının

bir günde, eşzamanlı, klinik örnekten bile
konulabileceği iddia edilmiştir.

Gerçek zamanlı PZT

- Hızlı, kolay → rutin tanı laboratuvarlarında uygulanabilir
- Kapalı sistem → çapraz kontaminasyon ↓

- RIF için başarılı sonuçlar
 - Xpert MTB/RIF (Cepheid)



- **İkinci sıra ilaç direncini saptamaya yönelik hazır ticari kit henüz yok**

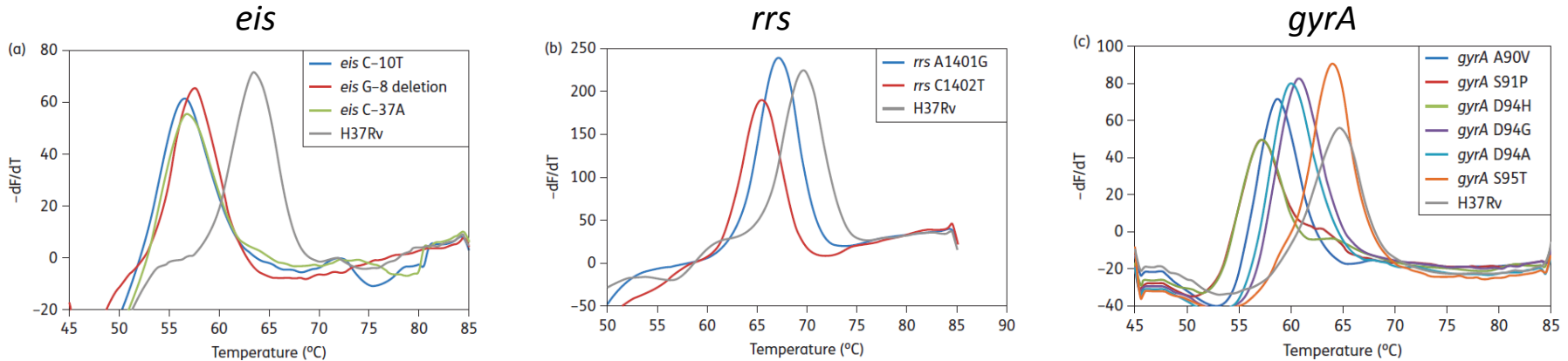
- Anyplex II mtb/MDR/XDR (Seegene, South Korea) ??

J Antimicrob Chemother 2013; 68: 1097–1103

Triplex real-time PCR melting curve analysis for detecting *Mycobacterium tuberculosis* mutations associated with resistance to second-line drugs in a single reaction

Liu Q, Luo T, Li J, Mei J, Gaol Q.

Hedef genler: *gyrA*, *rrs*, *eis* promotor



Sonuç olarak;

- Tek bir reaksiyon ile 3 gendeki mutasyonları basit ve duyarlı olarak saptayabilen test çoğu laboratuvarında uygulanabilir,
- MTB ve ÇİD'i saptayabilen ticari bir test ile kombine kullanıldığında YİD-TB'nin hızlı tanısında etkin ve güvenilir bir yöntem olabilir.

Line Probe Assay (LPA)

(Ters hibridizasyon testi)

GenoType MTBDRsl (Hain LifeScience)

- Direkt örnekten veya izolattan
- MTBC ve ikinci sıra ilaç direnci tanısı
- Hızlı, kolay uygulanabilir
- hedef genler;
 - Amikasin, kanamisin, kapreomisin direnci → *rrs*
 - Kinolon direnci → *gyrA*
 - Etambutol direnci → *embB*

GenoType MTBDR*plus* → RIF+INH → ÇİD-TB

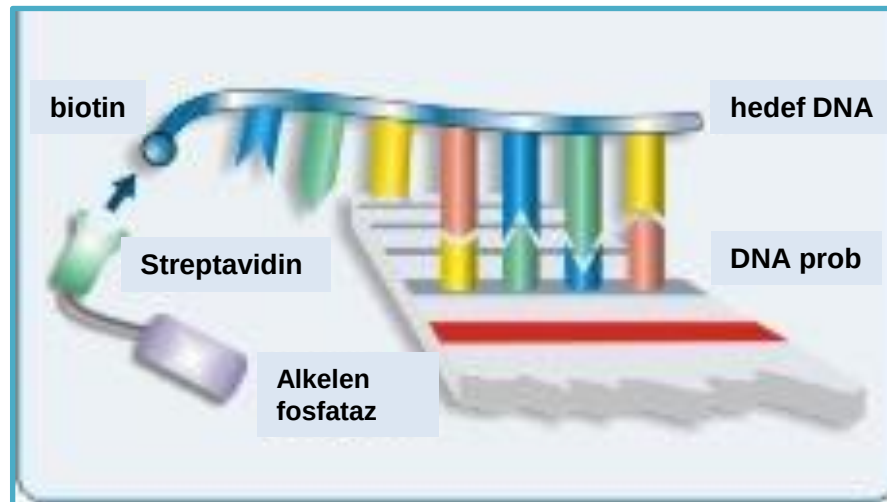
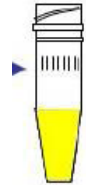
+

GenoType MTBDRsl → FQ+KAN+AMK+CAP+EMB → YİD-TB

GenoType MTBDRsl

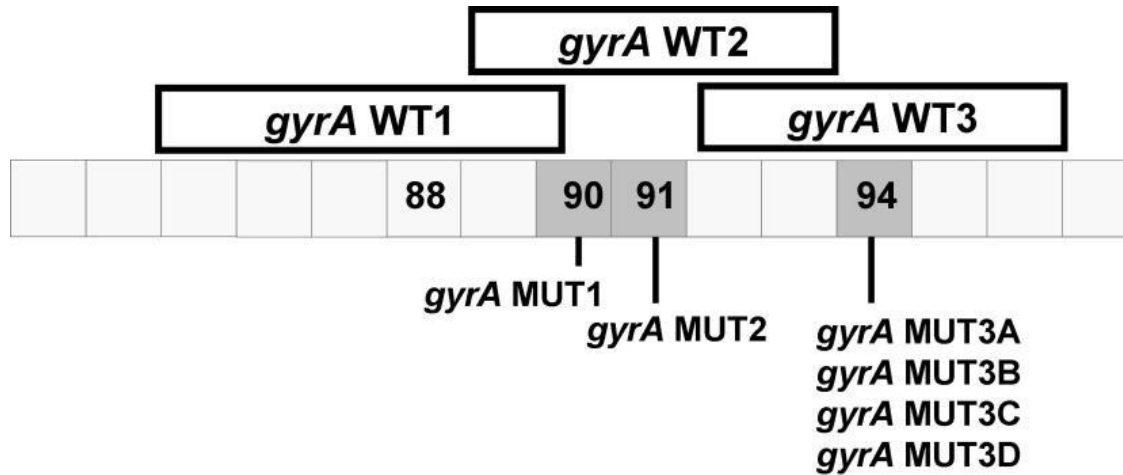
Test aşamaları

- I. DNA izolasyonu
- II. Hedef DNA'nın amplifikasyonu
 - Biotinle işaretlenmiş primerler
 - Multipleks PZT
- III. Hedef DNA'nın saptanması
 - Ters Hibridizasyon

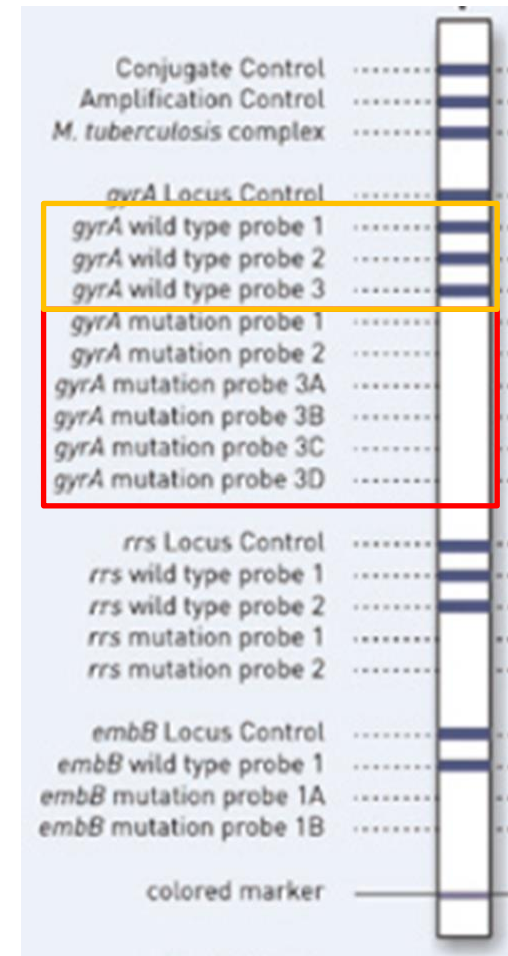


MTBDRs/

- Kinolon direnci

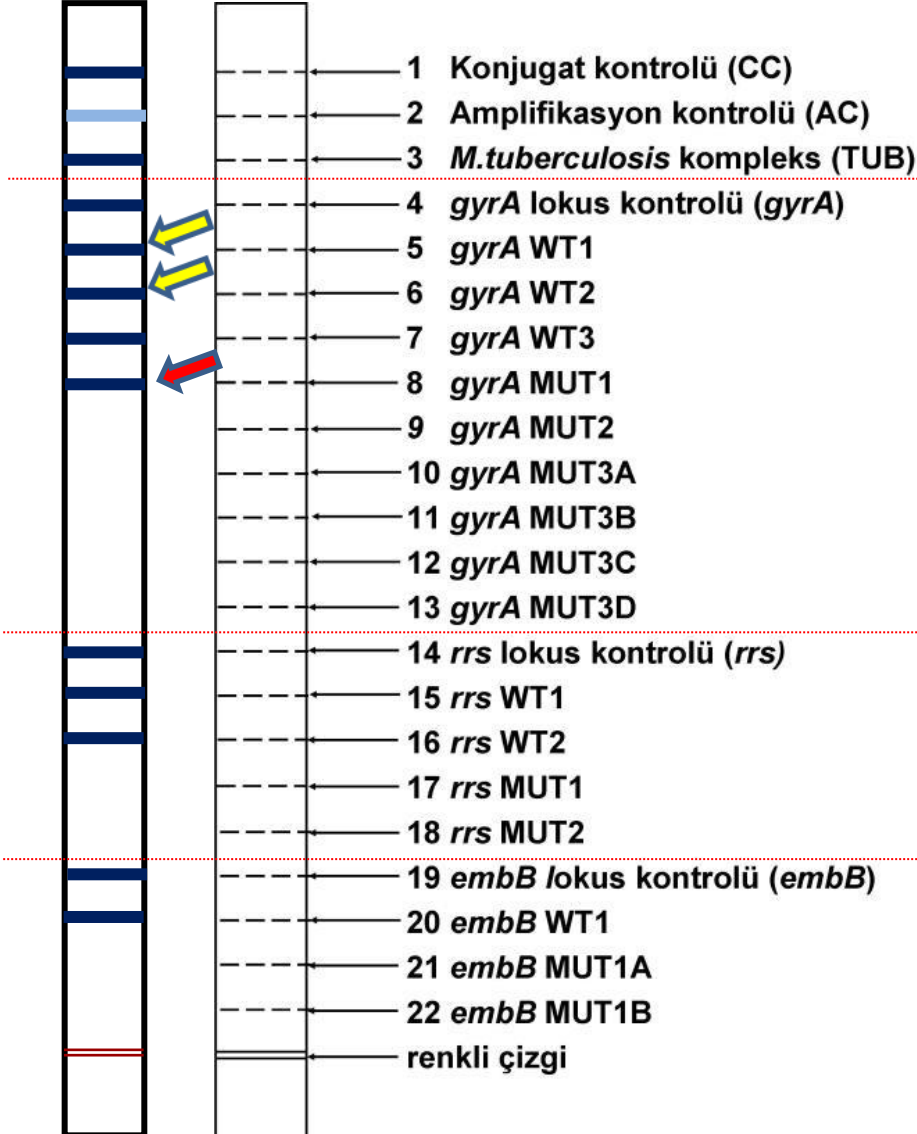


wild-tip prop	kodon	mutasyon probu	Mutasyon
<i>gyrA</i> WT1	85-90		
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V
		<i>gyrA</i> MUT2	S91P
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A
		<i>gyrA</i> MUT3B	D94N/Y
		<i>gyrA</i> MUT3C	D94G
		<i>gyrA</i> MUT3D	D94H



MTBDRs/ değerlendirme

gyrA MUT1



wild-tip prop	kodon	mutasyon probu	Mutasyon
<i>gyrA</i> WT1	85-90		
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V
		<i>gyrA</i> MUT2	S91P
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A
		<i>gyrA</i> MUT3B	D94N/Y
		<i>gyrA</i> MUT3C	D94G
		<i>gyrA</i> MUT3D	D94H

wild-tip prop	kodon	mutasyon probu	Mutasyon
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G
	1402		
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T

wild-tip prop	kodon	mutasyon probu	Mutasyon
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1A	M306I
		<i>embB</i> MUT1B	M306V

The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs

WHO- Expert Group Meeting Report 2013

- İzolatta ve klinik örnekte GenoType MTBDRsl performansını değerlendiren 18 çalışmanın analizi

		Duyarlılık		Özgüllük	
		(%)	%95CI	(%)	%95CI
FQ	İndirek test	88.8	82.7, 92.9	97.9	94.8, 99.2
	Direkt test	83.5	69.1, 91.9	97.4	95.7, 98.4
KAN	İndirek test	67.0	50.4, 80.2	99.4	97.0, 99.9
	Direkt test	96.2	67.5, 99.7	99.0	78.4, 100
AMK	İndirek test	89.6	84.0, 93.5	99.5	96.1, 100
	Direkt test	93.2	76.8, 98.3	99.4	95.7, 100
CAP	İndirek test	80.3	64.7, 90.1	97.1	92.5, 98.6
	Direkt test	97.4	70.4, 99.8	96.6	88.9, 99.0
YİD-TB	İndirek test	63.3	36.8, 83.5	98.5	96.0, 99.4
	Direkt test	90.2	79.0, 95.8	96.6	93.8, 99.9

Sonuç;

GenoType MTBDRs/ testi;

- Florokinolon ve ikinci sıra enjektebl ilaçlara direncin saptanmasında yüksek test özgüllüğü göstermektedir.
- Ancak ılımlı test duyarlılığı nedeni ile negatif sonuçlar direnci güvenilir şekilde dışlamaz.
- Test geleneksel fenotipik İDT yerine kullanılamaz, daha fazla veri elde edilinceye kadar, YİD-TB tanısında fenotipik testler referans standart olarak kalmalıdır.

Uzman grubu önerileri;

GenoType MTBDRsl,

- I. YİD-TB tanısı için kullanılabilir, Ancak
 - I. YİD-TB'yi dışlamak için kullanılamaz,
 - II. Sürveyans amaçlı YİD-TB'yi tanımlamak için kullanılamaz,
- II. İkinci sıra enjektabl ilaçlar arasında her zaman çapraz direnç olmayabilir. Bu nedenle test, tedavide kullanılacak ilacı belirlemek için güvenilir şekilde kullanılamaz,
- III. Fenotipik doğrulama testlerinin sonuçları beklenirken, enfeksiyon kontrol önlemlerine yol göstermesi için bu test kullanılabilir.

Moleküler Yöntem Kısıtlılıkları

- Hedef bölge dışında, ilaç direncine yol açan tanımlanmış veya tanımlanmamış mutasyonlar
 - yanlış duyarlı
- Hedef bölgedeki sessiz veya dirence yol açmayan mutasyonlar
 - yanlış dirençli
- Heterorezistansın güvenilir olarak saptanamaması
 - saptama limiti ~ %10
- Yüksek maliyet,
- İleri altyapı ve deneyimli personel gereksinimi

Sonuç olarak;

Günümüzde değil, fakat belki de gelecekte,

mikobakterilerdeki ilaç direncinin moleküler mekanizmaları ile ilgili bilgilerimiz arttıkça, moleküler tanı teknolojileri geliştikçe,

direkt klinik örnekten,
hem *M.tuberculosis*'in

hem de birinci ve ikinci sıra ilaç direncinin eşzamanlı, bir günde saptanması mümkün olabilecektir.

