

***Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve Tüberküloz Dışı Mikobakterilerin Tanınmasına Yönelik Yenilikler**

Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Bornova/İZMİR

Mikrobiyolojik tanı

- **Mikroskopik inceleme**
- **Kültür**
 - **İdentifikasyon**
 - » Fenotipik yöntemler
 - » Moleküler yöntemler
 - **Duyarlılık testleri**
 - » Fenotipik yöntemler
 - » Moleküler yöntemler
- **Doğrudan moleküler yöntemler**
 - *M. tuberculosis* ve ilaç direncinin saptanması
 - Tüberküloz dışı mikobakterilerin (TDM) saptanması
- **Biyobelirteçler**
 - **İnterferon gama salınım testleri (İGST)**
 - » Latent tüberküloz enfeksiyonu (LTBE) tanısı

Mikroskobik inceleme

Boyama



Ehrlich-Ziehl-Neelsen



Auramine-Rhodamine



LED mikroskobu

Kinyoun Mikroskop



Işık mikroskobu

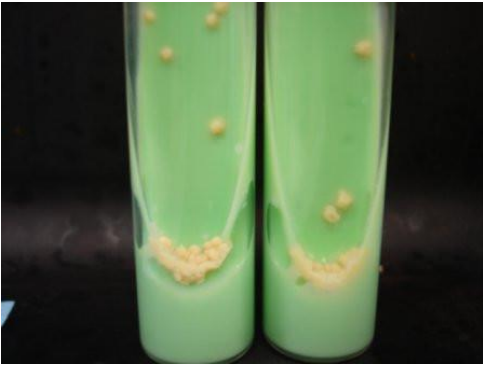


Floresan mikroskobu

- Boyama yöntemlerinin duyarlılığı düşüktür (%20-80)
- Boyalı inceleme ile *M.tuberculosis* diğer mikobakteri türlerinden ayrılamaz

Kültür

Kültür tüberküloz ve tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında altın standarttır



Löwenstein-Jensen



Otomatize ticari sistemler



- Üreme süresi kısaldı (10-14 gün süre gerekiyor)
- Üreme oranları arttı (Üreme için 10 canlı basil yeterli)

İdentifikasyon-Fenotipik yöntemler

MPT64 kart test



POSITIVE

M.tuberculosis kompleksi



NEGATIVE

Tüberküloz dışı mikobakteri

- Hızlı (10-15 dakika)
- Ucuz
- TDM türlerini tanımlamıyor

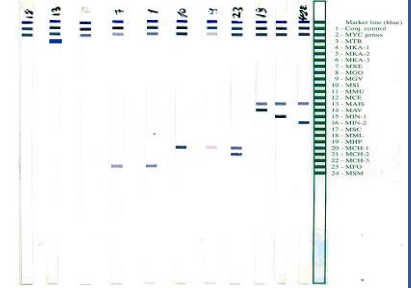
İdentifikasyon-Moleküler yöntemler

- Mikobakteri türlerini tanımlamak için
- PCR-Ters hibridizasyon
- DNA dizi analizi



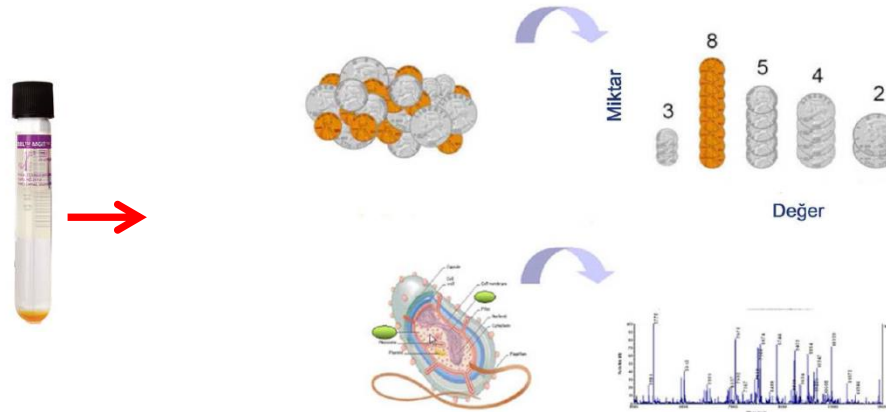
- *M.tuberculosis* kompleks (MTBK) üyelerinin ayırımını yapmak için
- PCR-Ters hibridizasyon
- Spoligotiplendirme

- Hızlı(6 saat), duyarlı yöntemler



İdentifikasyon-MALDI-TOF MS

- **MALDI-TOF MS**
- *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*
- Sadece 10 yıl önce rutin laboratuvarlarda kullanılmaya başlanmasına rağmen, hızlı mikrobiyal identifikasyonda yeni bir çığır açmıştır.
 - Tıbbi önemi olan yeni mikobakteri türleri henüz ticari veri tabanlarına dahil edilmemiştir.
 - *MTBK* tanımlaması genel olarak yüksek duyarlılık ve özgüllük ile gerçekleştirilebilmesine rağmen *MTBK* üyelerinin ayrımını yapmak şu anda mümkün değildir.



İdentifikasyon-MALDI-TOF MS

- **MALDI Biotyper 3.0 Microflex LT**
 - Mikobakteri türlerinin yaklaşık% 88'ini güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlamak için MALDI-TOF MS'i kullanabileceğini gösterdi.
- **MBT Mikobakteri Kütüphanesi (ML) 4.0 (Bruker, Daltonics)**
 - *MTBK* % 100'ü ve TDM izolatlarının% 87'si için doğru olarak yapıldı.
 - *MTBK* alt türlerinin ayrımı yapılamamıştır.

M.tuberculosis'de ilaç direncinin belirlenmesi

Life Magazine March 3, 1952



SEA VIEW DOCTORS Irving Selikoff and Edward Robitzek were first to use the new drugs on patients.



FIRST PATIENT treated, Hilda Carrion, takes a pill. One lung has improved, other may need surgery.



PATIENTS DANCE in a hallway at Sea View Hospital to demonstrate for a newspaper photographer how miraculously the drugs have restored their energy.

ÇİD-TB (MDR-TB)
YİD-TB (XDR-TB)
TİD-TB (TDR-TB)
tüberküloz tedavisinde önemli bir sorun

Fenotipik yöntemler



MGIT960

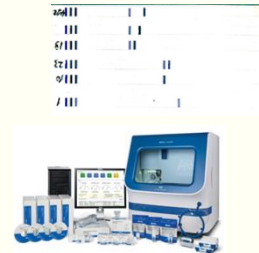
•4-13 gün

M.tuberculosis'de ilaç direncinin belirlenmesi

- **Moleküler yöntemler**

- PCR-Ters hibridizasyon

- DNA dizi analizi



- **Dirence yol açan mutasyonlar saptanır**

- Rif direnci → *rpoB* % >95
- INH direnci → *katG* ve *inhA*
- Etambutol direnci → *embB*
- Amikasin, kanamisin direnci → *rrs*
- Kinolon direnci → *gyrA*

TDM ilaç direncinin belirlenmesi

- Tüm TDM için standardize edilmiş duyarlılık testleri yoktur
- Duyarlılık testleri standardize edilmiş TDM
- Yavaş üreyen mikobakteriler
 - *M. avium-intracellulare* kompleks, *M. kansasii*, *M. marinum*
- Hızlı üreyen mikobakteriler

NCCLS (CLSI), Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition, M24-A Vol. 23 No. 18, 2003

TDM ilaç direncinin belirlenmesi

- Sensititre mikrodilüsyon

Thermo SCIENTIFIC TREK Diagnostic Systems

Sitemap | Contact Info

Products Technical Information Newsroom Company

Products
Sensititre: Clinical

- Instrumentation
- Standard Susceptibility MIC Plates
- Fastidious MIC Plates
- Standard ID Plates
- Custom Susceptibility Plates
- YeastOne
- Antimicrobials

Sensititre.

The FIRST Dry Microdilution Plate for *Mycobacterium* spp.** Isolates

the New Energy in Automated Microbial Detection.



Antimicrobial Agents and Dilutions – Rapid Growing Mycobacteria Plate (Part No. RAPMYCO**)

Rapid Growing Mycobacteria, Nocardia, and other Aerobic Actinomycetes

Antimicrobial	Dilution Range µg/ml
Amikacin	1-64
Amoxicillin/Clavulanic Acid	2/1-64/32
Cefepime	1-32
Cefoxitin	4-128
Ceftriaxone	4-64
Ciprofloxacin	0.12-4
Clarithromycin	0.06-16
Doxycycline	0.12-16
Imipenem	2-64
Linezolid	1-32
Minocycline	1-8
Moxifloxacin	0.25-8
Tigecycline	0.015-4
Tobramycin	1-16
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0.25/4.75-8/152

Antimicrobial Agents and Dilutions – Slow Growing Mycobacteria Plate (Part No. SLOMYCO**)

Slow Growing Non-Tuberculosis Mycobacteria

Antimicrobial	Dilution Range µg/ml
Amikacin	1-64
Ciprofloxacin	0.12-16
Clarithromycin	0.06-64
Doxycycline	0.12-16
Ethambutol	0.5-16
Ethionamide	0.3-20
Isoniazid	0.25-8
Linezolid	1-64
Moxifloxacin	0.12-8
Rifabutin	0.25-8
Rifampin	0.12-8
Streptomycin	0.5-64
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0.12/2.38-8/152

- E-test



TDM ilaç direncinin belirlenmesi

- Moleküler yöntemler

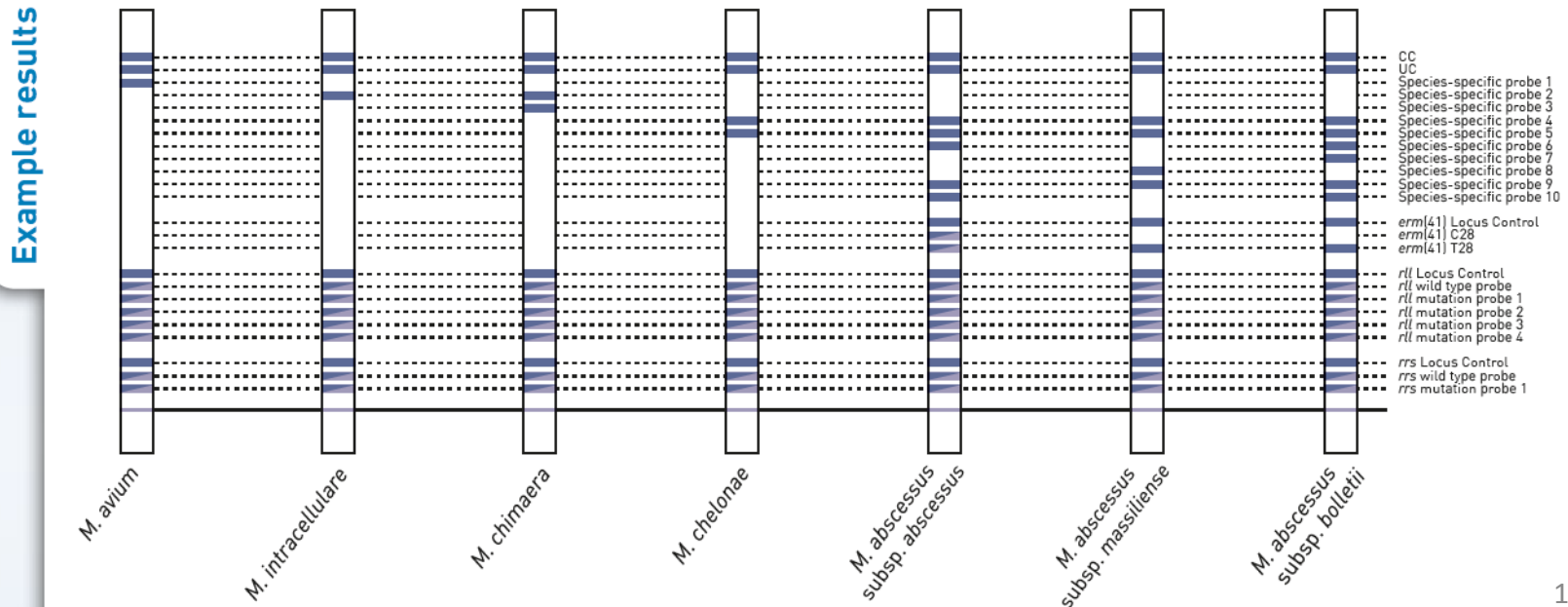
- PCR-Ters hibridizasyon

- Aminoglikozid direnci → *rrs*

- Makrolid direnci → *erm*

GenoType NTM-DR VER 1.0

Molecular genetic assay for the detection of resistances to macrolides and aminoglycosides in various clinically relevant NTM



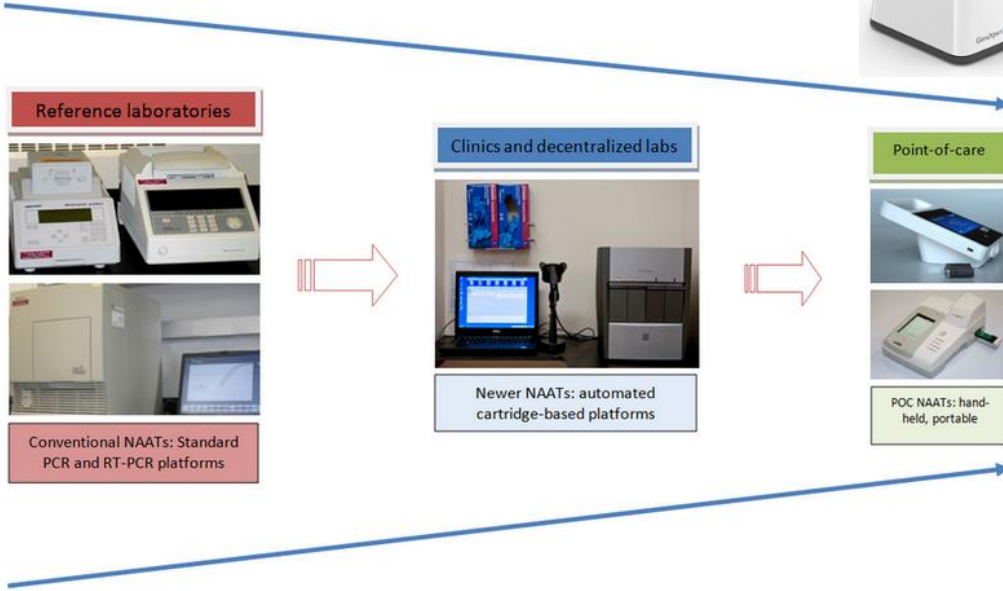
Doğrudan klinik örnekten tüberküloz tanısı

Moleküler yöntemler

- GeneXpert Omni
- Hasta başı tanı testi



An overview of progress in the development of TB diagnostics, August 2017^a



TECHNOLOGIES ENDORSED BY WHO

Molecular detection of TB and drug resistance

- Xpert MTB/RIF Ultra for detection of TB and rifampicin resistance in pulmonary, extra-pulmonary and paediatric samples, Cepheid, USA
- 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

- Klinik örnekte *Mycobacterium tuberculosis*'e ait genetik materyali (DNA/RNA) saptar

GeneXpert MTB/RIF

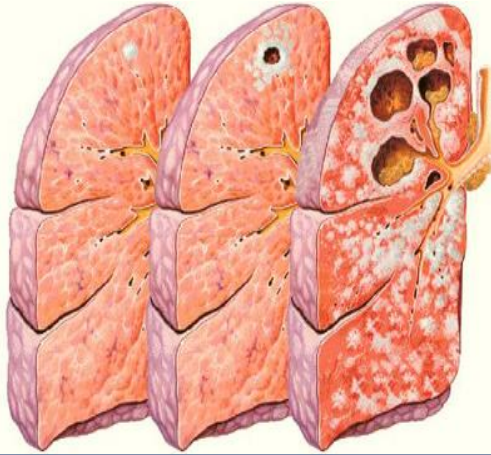


- *Real-time PCR* (*rpoB* geni çoğaltılır)
- Kontaminasyon riski çok azdır
- 1.5 saat içinde MTB ve RİF direnci saptanır

Performans

• Akciğer tüberkülozu

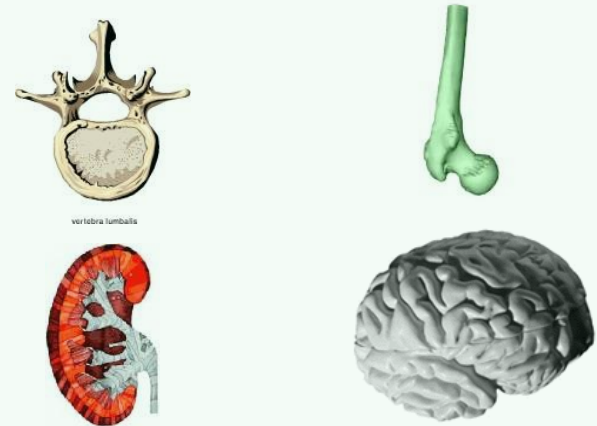
- Yayma (+) olguların %99'u (%100&)
- Yayma (-) olguların %75'i (%74&)



Lancet Infect Dis. 2013 ;13(4):349-61
& J Clin Microbiol 2011; 49(12): 4138-41

• Akciğer dışı tüberküloz

- Yayma (+) olguların %100&
- Yayma (-) olguların %37-63&



- Duyarlılık daha düşük;
 - Plevral
 - Perikardiyal
 - Peritoneal
 - Sinovyal sıvılarda

GeneXpert MTB/RIF (Kısıtlılıklar)

- *M.tuberculosis* kompleks üyelerini ayırmaz

- *M.tuberculosis*
- *M.bovis*
- *M.bovis* BCG
- *M.caprae*
- *M.pinnipedii*
- *M.microti*
- *M.canettii*



- *M.tuberculosis* DNA'sını saptar
 - Ölü basili canlı basilden ayırmaz
 - Tedavinin takibinde kullanılamaz
- Tübeküloz dışı mikobakterileri saptamaz

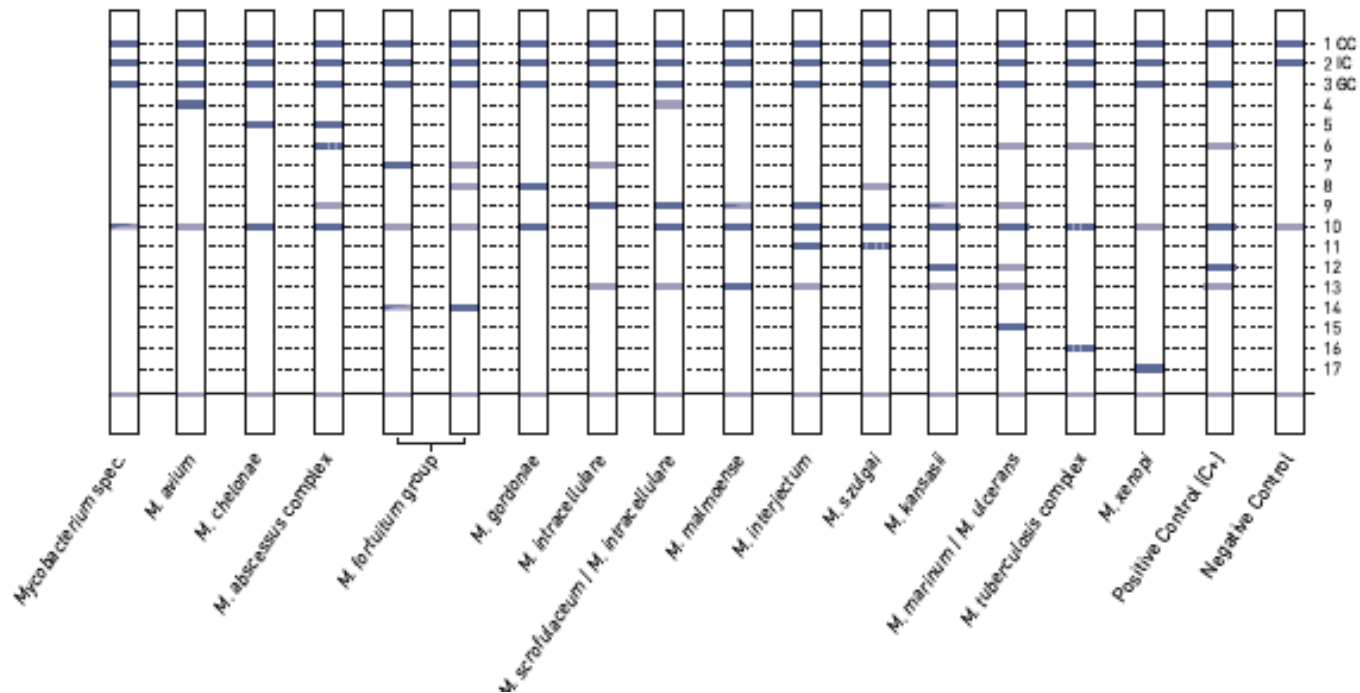
Doğrudan klinik örnekten TDM tanısı

Moleküler yöntemler

- PCR-Ters hibridizasyon
 - Balgam örneklerinden doğrudan TDM tanısı

GenoType CMdirect VER 1.0

Molecular genetic assay for detection of *M. tuberculosis* complex and more than 20 clinically relevant NTM



Biyobelirteç

Normal biyolojik süreçlerin,
patolojik süreçlerin veya
terapötik bir işleme karşı farmakolojik yanıtın bir göstergesi olarak
objektif olarak ölçülüp değerlendirilebilen özelliklere denir.



Biyobelirteçler

• Kan biyobelirteçleri

- İGST
- Neopterin, Prokalsitonin
- TB antikorları
- miRNA

• İdrar biyobelirteçleri

- Lipoarabinomannan (LAM)
- Transrenal DNA

Alere Determine™ TB LAM Ag



• Nefes biyobelirteçleri

- Uçucu organik bileşikler

• Balgam biyobelirteçleri

- TB antijenleri (MPT64, Ag85 v.b.)
- TB-spesifik beta-laktamaz
- Adenozin deaminaz, alkalın fosfataz
- İFN γ

An overview of progress in the development of TB diagnostics, August 2017^a

TECHNOLOGIES ENDORSED BY WHO

Nonmolecular technologies

- Alere Determine TB-LAM, Alere, USA (TB detection in people seriously ill with HIV)
- Interferon gamma release assay (IGRAs) for the diagnosis of latent TB infection (LTBI) Oxford Immunotec, UK, Qiagen, USA

LTBE tanısı

- Tüberkülin Deri Testi (TDT)

- İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST)
 - QuantiFERON (QFT) [Qiagen]
 - T-SPOT.TB [Oxford Immunotec]



TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE. — Le professeur Bergmann pratiquant l'injection.

- Özgül hücresel bağışıklık yanıtını araştıran testler
- Pozitif test kişinin *M.tuberculosis* ile enfekte olduğunu gösterir
- Latent tüberküloz enfeksiyonunu aktif tüberkülozdan ayırmaz

QFT

QFT (Qiagen)



- Özgöl T hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ miktarı(IU/mL) saptanır
- **Basit/Rutinde uygulaması kolay**

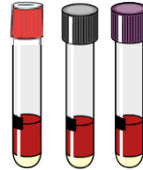
- **Pozitif**
 - *M.tuberculosis* ile enfekte
- **Negatif**
 - *M.tuberculosis* ile enfekte değil
- **Belirsiz (indeterminate) ~%2**

- **BCG aşısından**
- **TDM enfeksiyonlarından (*M.kansasii*, *M.marinum*, *M.szulgai* hariç) etkilenmezler**
- **Değerlendirmeye bağlı değişken sonuç ve «Booster» etkisi görülmez**

Performans

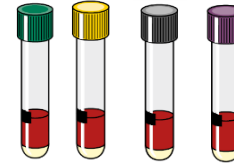
QFT-TB Gold

ESAT-6
CFP-10
TB7.7



QFT-TB Gold *plus*

C4 T _H	CD8 T _C
ESAT-6	ESAT-6
CFP-10	CFP-10



QFT-GIT

- Duyarlılık
- %81-92 (%83-84)
- Özgüllük
- >%99 (%99)

QFT-TB Gold *plus*

- Duyarlılık
- %95.3
- Özgüllük
- %97.6

Mycobacterium tuberculosis Enfeksiyonu Tanısında QuantiFERON®-TB Gold in Tube Testi ve Tüberkülin Deri Testinin Değerlendirilmesi.
Mikrobiyol Bul 2017; 51(2): 115-126

CDC; MMWR; June 25;2010; Updated Guidelines for Using IGRA's to Detect *M.tuberculosis* infection-United States, 2010
Kaynak: Ürün rehberleri

TEŞEKKÜRLER