

TÜBERKÜLOZUN LABORATUVAR TANISINDA KULLANILAN MOLEKÜLER TİCARİ TANI SİSTEMLERİ

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT

GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Haydarpaşa, İstanbul

Tüberküloz (TB), dünyada yaygın olarak halk sağlığını tehdit edebilen major tehlikelerden biri olup en sık ölüme neden olan enfeksiyon hastalığıdır. Çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinden fazlası *M.tuberculosis* ile enfektidir. WHO verilerine göre, dünyada yaklaşık 20 milyon TB vakası bildirilmiş olup her yıl ortalama sekiz milyon yeni TB olgusu rapor edilmektedir. Yılda yaklaşık iki-üç milyon insan sadece TB nedeniyle ölmekte ve tedavi görmemiş kontrol dışı pulmoner TB'lu her hasta, yılda 10-15 insana hastalığı aktararak TB tehdidini körüklemektedir.

Hastalığın yayılımının önlenmesi bakımından *M.tuberculosis*'in tespiti ve identifikasyonunun mümkün olan en kısa sürede yapılması bir zorunluluktur. Bu nedenle klinik mikobakteriyoloji laboratuvarları, hasta örneğinde *M.tuberculosis*'in aranması, izolasyonu, identifikasyonu ile anti-tüberküloz ilaç duyarlılığını test ederek tüberkülozun yayılımını önlemede ve kontrol altına

alabilmede önemli bir role sahiptir. Etkin TB kontrol programının en önemli aşaması ise aktif olguların tespiti ve doğru tanının konabilmesidir.

Mycobacterium genusu içinde *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) ve 80'den fazla *M.tuberculosis* dışı mikobakteri (MOTT) türü vardır. Tüberkülozda ilk tanı klinik verilerle yapılmış olsa bile kesin tanı için etken mikroorganizmanın konvansiyonel olarak direkt bakıda tespiti ve laboratuvarıda üretilerek tanımlanması esastır. Bu nedenle tanıda "gold standart" kültür ve klinik tanı birlikteliğidir. Ancak mikobakteriler, yavaş üreyen mikroorganizmalar olduklarından bu testlerin tamamlanması için ortalama 2-8 haftaya gereksinim duyulur. Son yıllarda TB ilaçlarına dirençli basillerin izolasyonlarındaki artış ve tanıya yönelik konvansiyonel testlere ait sürenin uzunluğu, hastalığı kontrol edebilmede karşılaşılan sorunları ve çözümüne yönelik arayışları yeniden gündeme getirmiştir. Bu amaçla son 10 yıl

içinde mikobakterilerin hastalık örneklerinden saptanması, tür düzeyinde tanımlanması ile duyarlılık testleri için, özgüllük ve duyarlılığı yüksek, güvenilir, hızlı sonuç verebilen, kolay uygulanabilir yeni yöntemler üzerinde çalışılmış ve otomasyona uygun birçok sistem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin bir kısmı diagnostik amaçla bu gün mikobakteriyoloji laboratuvarlarında rutin çalışmalar ve epidemiyolojik araştırmalar için kullanılmasına rağmen bir kısmının halen faz çalışmaları devam etmektedir. Bunlardan, Radyometrik (*BACTEC*) ve kromatografik (*HPLC*) sistemler, nükleik aside dayalı moleküler yöntemler (*PCR*, *DNA prob hibridizasyon*, *DNA microarray*, *PCR-RFLP*, *PCR-DNA dizi analizi*), mikobakteriyofajlarla RIF direnç tayini (Faj amplifikasyonu) gibi fenotipik ve genotipik teknikler tanı süresini kısaltmada ve tedaviye yönelik antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında umut verici yöntemlerdir. Rutinde pek kullanılmamakla birlikte RIA, ELISA ve lateks aglütinasyonu gibi immünolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak monoklonal antikorlarla tür tayini yapılabilmektedir. Ayrıca tüberküloz menenjitte mikobakteriyel antijenlere karşı gelişen özgül antikorları saptayabilen ELISA IgM ve IgG kitleri klinik tanıya yardımcı olarak kullanılabilir.

İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından PCR tekniğinin geliştirilmesi ile başlayan moleküler çalışmalar sonrası, tüberkülozun tanısında kromozomal DNA veya rRNA aranmasına yönelik çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Hasta örneklerinden direkt olarak MTBC'in tanısı için bugün pek çok laboratuvar

uygulanmakta olan in-house PCR tekniğine ait protokol ve reagent'larda henüz bir standardizasyonun bulunmaması, sıklıkla yalancı negatiflik ve pozitif sonuçların oluşmasına neden olabilmektedir.

PCR uygulamalarında sıkça gözlenebilen kontaminasyon riskini ortadan kaldırabilmek, duyarlılık ve özgüllüğü arttırabilmek için bir çok yeni yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte bir kısmı için halen araştırma çalışmaları devam etmektedir. Bu amaçla günümüzde, hasta örneklerinden direkt olarak MTBC varlığını araştırmak amacıyla nükleik asit amplifikasyon (NAA) esaslı sistemler ile kültürde üreyen mikobakterilerin kısa sürede tür düzeyinde tanımlanmasını ve/veya TB ilaçlarına karşı direnç ile ilişkili mutasyonları saptamaya yönelik; DNA prob hibridizasyonu esaslı ürünler, DNA sequence analiz kitleri ve moleküler biyoloji ile bilgisayar teknolojisi birleştiren DNA microarray teknolojisi ürünler geliştirilmiştir.

I. Klinik örneklerden direkt *Mycobacterium tuberculosis complex*'in tanımlanması

Bu amaçla geliştirilen ticari ürünler, Nükleik asit amplifikasyonu (NAA) esasına dayalı sistemleri içerir. Bu sistemler için primer amplifikasyon hedefleri IS 6110 insersiyon dizisi ve 16S rRNA geni ile 23S rRNA dır. Bu sistemler hasta örneğindeki MOTT basillerini tanımlamazlar. Hasta örneklerinde(*tercihan smear pozitif solunum yolu örneklerinde*) basilin DNA veya RNA'sını saptayarak kültür sonucu belli olmadan kısa sürede (3-8 saat içerisinde) tanı konmasına yardımcı olabilen yöntemlerdir. Ürünlere ait özelliklere "NAA

testlerinin çalışma prensipleri ve performansları” bölümünde daha fazla yer verilmiştir. Bu sistemleri FDA onaylarına göre iki grupta toplamak mümkündür.

a) FDA onayı alanlar : Bu grupta sadece iki ticari sistem mevcuttur: Bunlar, Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD) (*Gen-Probe*) ve Cobas AMPLICOR MTB Assay (*Roche Diagnostic System*) olup hedef çoğaltmaya yönelik sistemlerdir. FDA bu iki ürün için 1996 yılında sadece AARB pozitif solunum yolu örneklerinde kullanımına onay vermiş olup 1999 yılında MTD, AARB negatif solunum sistemi örnekleri için de FDA onayını almıştır.

b) FDA onayı olmayanlar: Klinik örneklerden direkt MTBC tayini yapabilen ancak FDA onayı olmamakla birlikte diğer kuruluşlardan onay almış ve satışa sunulmuş çeşitli ticari ürünler de bulunmaktadır. Bunlardan, BDProbeTec ET (*BD Biosciences*), Strand Displacement Amplification (SDA) yöntemiyle ve QR System Analyser (*Organon Teknika*) Nükleik Asid Dizi Bazlı Amplifikasyon (NASBA) yöntemiyle hedef çoğaltarak, LCx Analyser (*Abbott*) ise Ligase Chain Reaction (LCR) yöntemiyle ve Q beta replicase amplified probe assay-Galileo versiyon(*Downers Grove, IL*), Q beta replicase amplifikasyon yöntemi ile prob çoğaltarak etkili olmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR yöntemi

esasına dayalı MTBC ticari tanı sistemleri (*LightCycler- Roche*, *iCycler - BIO-RAD*, *ABI PRISM 7000 System-Applied Biosystem*) ile ilgili ürünlerin klinik çalışmaları devam etmektedir.

II. Kültürde üretilen mikobakterilerin identifikasyonu ve TB ilaç direnci ile ilgili

mutasyonların saptanması

Günümüzde epidemiyolojik çalışmalar ile katı veya sıvı kültür ortamlarında sıklıkla üreyen *M.tuberculosis* complex, *M.avium* complex, *M.kansasii*, *M.gordona* gibi mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları için mikobakterilerin rRNA'sı ile hibridize olan özgül DNA problemleri geliştirilmiştir. Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında genellikle 16S rRNA, hsp65, rpoB ve daha pek çok gen bölgesi hedef olarak seçilir

Prob teknolojisi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanısı için en sık kullanılan ürünler AccuProbe (*Gen-Probe*) ile Line Probe Assay (*INNO-LiPA Mycobacteria;Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium*)'dir. Ayrıca kolorimetrik hibridizasyon esaslı bir mikroplate hibridizasyon ürünü olan DDH Mycobacteria (*Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co*) ticari olarak mevcuttur. AccuProbe ile altı, Line Probe Assay ile dokuz ve DDH Mycobacteria ile 18 mikobakteri türü tanımlanabilmektedir. Test süresi, AccuProbe ile 1-2 saat, Line Probe Assay ile yaklaşık 3 saatlik bir periyottur.

DNA dizileme ve DNA mikroarray analizleride mikobakterilerin tür

düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik direnci ile ilgili mutasyonların saptanmasında kullanılan yöntemlerdir. Mikobakterilerin identifikasyonunda altın standart olarak düşünülen DNA dizileme analizi en yüksek seviyede doğru sonuç veren güvenilir bir yöntem olmasına rağmen, manuel dizileme işleminin zorluğu ve deneyim gerektirmesi, otomatize sekans cihazlarının(ABI PRISM 310 Genetic analyzer , *Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Foster city, California*) pahalı olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu amaçla ticari olarak geliştirilen MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (*PE Applied Biosystems*) kullanılarak 16S rRNA geninin 500 bp lik bir bölümüne ait DNA dizilemesi yapılabilmektedir. Bu yöntem ile *M.tuberculosis*' in diğer MTBC üyelerinden ayrımı mümkün olabilmekle birlikte sıkça izole edilen bazı mikobakteri türleride tanımlanabilmektedir.

Ticari sistemlerin en önemli avantajları, hızlı, emniyetli ve güvenilir olmasının yanı sıra, kontaminasyon riskinin düşük buna bağlı olarak sensitivite ve spesivitelerinin yüksek olmasıdır. Ayrıca bir çoğunun teknik olarak otomatize veya yarı otomatize olmaları, reaktif ve standartlarının kullanıma hazır olması laboratuvar kullanımlarını kolaylaştıran faktörler olarak önemlidir. En önemli dezavantajları ise pahalı olmaları , çoğunun henüz FDA onayı olmaması ve bir kısmında faz çalışmalarının tamamlanmamış olmasıdır. Bu nedenle sistemlere ait mevcut ticari ürünlerin screening test olarak kullanılmamaları, daha çok smear pozitif klinik örneklerde kullanılmaları tercih edilmelidir.

Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2000 yılında FDA onayı almış NAA esaslı ticari moleküler sistemlerin kullanıldığı laboratuvarlarda tanıya yönelik yararlanmak üzere yeni bir algoritma rehberi hazırlamıştır. Buna göre, Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyaması ile direkt mikroskopi ve mikobakteri kültürü için hastalardan üç ayrı günde üç balgam örneği alınmalıdır. İlk örnekte direkt bakıda asit fast bakteri (AFB) ve NAA test sonuçları pozitif ise; hastanın tüberkülozlu olduğu kabul edilir, test tekrarına gerek yoktur. Eğer ilk balgam AFB pozitif, ancak NAA test sonucu negatif ise; örnekte inhibitör varlığı araştırılmalıdır. Araştırma sonucu herhangi bir inhibitör madde tesbit edilemez ise; ikinci bir balgam örneği ile NAA test tekrarı yapılmalıdır. İkinci balgamda da AFB pozitif, NAA test sonucu negatif bulunup herhangi inhibitör madde saptanmaz ise; hastanın muhtemel olarak MOTT basili ile enfekte olduğu kabul edilir. Eğer inhibitör varlığı tespit edilmiş ise bu durumda NAA test sonucunun tanı değeri yoktur. Böyle bir durumda ikinci balgam örneğinde NAA test işlemi tekrarlanmalıdır (*Test tekrarının üçten fazla yapılmasının yararı yoktur*) .

Bu sunuda ağırlıklı olarak direkt tanıda kullanılmakta olan NAA sistemleri içerisinde FDA onayı almış olan *COBAS AMPLICOR* ve *MTD (M.tuberculosis Direkt Test)* tanı sistemlerinin çalışma prensipleri ile diğer ticari sistemlerin karşılaştırmalı performansları konu edilecektir.

TİCARİ OLARAK HAZIR NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TESTLERİNİN ÇALIŞMA PRENSİPLERİ VE PERFORMANSLARI

Mycobacterium tuberculosis Direct Test (MTD; Gen-Probe, San Diego California)

Amplifiye örnekten doğrudan *M.tuberculosis*'i tanımlayan bir sistemdir. Bu sistemde, Transkripsiyon esasına dayalı amplifikasyon (TMA) ve Gen-Probe Hibridizasyon Protection Assay (HPA) tekniği birleştirilmiş olup amplifikasyon ve arama iki aşamalı olarak ard arda gerçekleşir. Hedef, mikobakterinin rRNA'sı olup test süresi yaklaşık 3.5 saattir.

Hazırlanan örneklerden sonikasyonla elde edilen mikobakteri hedef nükleik asidi (16S rRNA) izotermal olarak TMA yöntemi ile 42°C'de tek bir tüpte amplifiye edilir. Ribozomal RNA her mikobakteri hücrelerinde yaklaşık 2000 kopya olarak bulunur. Bu yöntemde kendi kendine devam eden bir dizi kopyalama işlemi olur. Oluşan ampikonlar HPA aşamasında akrinyum esterle işaretli DNA problemleri ile birleşerek kararlı RNA:DNA hibridleri oluşturur. İşaretli RNA:DNA hibritleri luminometrede Bağlı Işık Birimi (Relative Light Unit-RLU) cinsinden ölçülür. İnhibitör varlığını araştırmak için sistemde internal amplifikasyon kontrol bulunmamaktadır. MTD için inhibitör testi, kuşkulu durumlarda veya gerektiğinde ekstrakte edilmiş balgamın içerisine yaklaşık 10-100 MTBC basili konularak test tekrarı ile yapılır. Negatif sonuç inhibitör varlığını gösterir.

MTD'nin performansının değerlendirildiği ilk klinik çalışmalarda solunum örnekleri için

testin duyarlılığı ve özgüllüğü klinik tanı ile karşılaştırıldığında %83-91.4 ve % 96.4-100 olarak saptanmıştır. Solunum örneklerinde *M.tuberculosis* complex saptanmasında kültür sonuçlarına göre MTD'in duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 88.0 - 91.2, % 99.1-100 , % 93.9 – 98.6 ve % 91.7 – 99.4 arasında bulunmuştur. Direkt bakı pozitif örneklerde bu değerler sırasıyla % 100, %100, %100 ve %87.5 olarak saptanırken direkt bakı negatif örnekler için sırasıyla %72.3-85.7 ,%99.4, %85.7-94.7 ve %99.4 olarak değerlendirilmiştir.

MTD pozitifliği, direkt bakı pozitif, kültür pozitif solunum sistemi örneklerinde %100 ve direkt bakı negatif, kültür pozitif örneklerde %83.3 ve kültür negatif örneklerde %1.3 'tür.

Ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalarda *M.tuberculosis* complex'in örneklerden direkt tanısında sistemin duyarlılık ve özgüllüğü genel olarak sırasıyla % 74-86.8 ve %98.5-100 olup duyarlılık, direkt bakı pozitif örneklerde artış gösterirken (%92.6) direkt bakı negatif örneklerde düşüktür (%83).

Cobas Amplicor MTB Assay (Roche Diagnostic Systems, Inc.. Branchburg, N.J.)

Amplicor, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayanan bir sistemdir. Bakterinin 16S rRNA geni biyotinlenmiş primerler kullanılarak amplifiye edilir, oluşan ampikonlar manyetik partiküllerin yüzeyine kaplanmış *M.tuberculosis* kompleks'e özgül oligonükleotit problemleri ile hibridize edilir. Daha sonra avidinle bağlı yabanturpu peroksidazı (Av-HRP) biyotinle işaretli ampikona bağlanır. Bağlanmış konjugat hidrojen

peroksit varlığında 3,3', 5,5' – tetrametil bezidin (TMB) ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur, sonuçlar fotometreyle ölçülerek saptanır. Amplicor'da kontaminasyonu önlemek için urasil-N-glikozilaz (UNG) enzimi kullanılır. Bu sitemde ayrıca örneklerdeki inhibitör madde varlığında Internal amplifikasyon control (IAC) ile monitörize edilir. Cobas Amplicor yaklaşık 4 saat içinde sonuçlanmaktadır .

Cobas Amplicor'un performansının klinik tanıya göre değerlendirildiği çalışmalarda, duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %76.4-91.9 ve %99.8-100 olarak bulunmuştur. Solunum örnekleri ile yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde kültür sonuçlarına göre Cobas Amplikor'un duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %78.3 - 96.1 , % 99.7-100 , % 90.9 - 100% ve % 97.5 – 99.8 arasında bulunmuştur. Direkt bakı pozitif örneklerde bu değerler sırasıyla % 96.9, %100, %100 ve %99.2 olarak saptanırken direkt bakı negatif örnekler için sırasıyla %68.0-91.7, %89.4-100, %100 ve %99.3 olarak değerlendirilmiştir. Sistemin direkt bakı ve kültür pozitif solunum örneklerinde performansı % 96.9 iken direkt bakı negatif, kültür pozitif örneklerde %83.3, ve direkt bakı negatif, kültür negatif örneklerde %3.8 'dir.

Ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalarda *M.tuberculosis complex*'in örneklerden direkt tanısında sistemin duyarlılık ve özgüllüğü genel olarak sırasıyla % 60-85 ve %93.1-100 olup duyarlılık, direkt bakı pozitif örneklerde artış gösterirken (%90-100) direkt bakı negatif örneklerde düşüktür (%53-75).

Cobas Amplikorun özgüllüğü oldukça iyi olmasına rağmen direkt bakısı negatif hasta örneklerinde duyarlılığının düşük olması bu örneklerde kullanımını sınırlandırmaktadır.

LCx MTB Assay (Abbott Laboratories, Chicago, III)

LCx, ligaz zincir reaksiyonu (LCR) prensibi temeline dayanan yarı otomatize bir sistemdir . LCx 'de amplifiye edilen hedef, bakterinin 35-kDa'luk protein antijen b (Pab)'ını kodlayan kromozomal genidir . Bu gen *M. tuberculosis complex*'e özgüdür ve tüm *M. tuberculosis complex* bakterilerinde bulunur. Amplifikasyon yarı otomatize bir sistemde gerçekleşir, oluşan ürün abbott LCx Analyzer cihazında mikropartikül enzim immünassay (MEIA) tekniği ile saptanır. Test 5 saat içinde sonuçlanır.

Solunum örneklerinde *M.tuberculosis complex* saptanması için LCx MTB'nin performansının araştırıldığı çalışmalarda klinik tanıya göre duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %70-90.2 ve %95.8-98.7 olarak bulunmuştur. Kültür sonuçlarına göre sistemin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; % 85-100 , %99.3-100, % 98.7-100 ve % 98.0-100 arasında bulunmuştur. Direkt bakı pozitif örneklerde, duyarlılık , özgüllük ve pozitif prediktif değer %100 ve negatif prediktif değer % 94.2, direkt bakı negatif örnekler için sırasıyla; %72-100, %97.9-99.3 , % 92.3 ve % 100 olarak saptanmıştır. Sistemin direkt bakı pozitif, kültür pozitif solunum örneklerinde pozitif saptama oranı % 100 bulunurken direkt bakı negatif, kültür pozitif hasta örneklerindedede %100 bulunmuş ve

direkt bakı negatif, kültür negatif örneklerde ise %4.4 olarak saptanmıştır.

Ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalarda *M.tuberculosis* complex'in örneklerden direkt tanısında sistemin duyarlılık ve özgüllüğü genel olarak sırasıyla % 53.6-79.2 ve %98-99.3 olup duyarlılık, direkt bakı pozitif örneklerde artış gösterirken (%93.4) direkt bakı negatif örneklerde düşüktür (%68).

BD ProbeTec ET (Becton Dickinson Biosciences, Sparks, Md.)

BDProbe Tec ET sistemi , Strand displacement amplification” (SDA) yöntemi prensibi ile çalışan ve floresan enerji transfer saptama teknolojisiyle birleştirilmiş, direkt olarak solunum örneklerinden *M.tuberculosis* complex'i saptayabilen kullanım kolaylığı olan yarı otomatize bir sistemdir. Söz konusu bu sistem örneklerin amplifikasyonunu ve saptanmasını kapalı bir sistem formatında gerçekleştirerek kontaminasyona karşı kısmen güvenli bir ortam sağlar. Sistemde, inhibitör varlığını saptamak amacıyla IAC yapılarak yalancı negatiflik önlenilmektedir. Hasta örneğinden veya pozitif kültür ortamlarından *M.tuberculosis* complex'in BDProbeTec ET ile saptanmasında toplam test süresi yaklaşık 3 saat'tir. Bu yöntemde, *M.tuberculosis* complex'e özgül IS6110 geni ile birçok mikobakteri türünde ortak olan 16S rRNA geni (16S rDNA) izotermal olarak birlikte amplifiye edilir (6). *M.tuberculosis* complex'de hem IS6110 hemde 16S rDNA Amplifiye olurken, *M.tuberculosis* dışı mikobakterilerde yalnız 16S rDNA amplifiye olmaktadır . Sistemde DNA saptanması

Floresan Enerji Transferinin simultane amplifikasyonu ile meydana çıkar.

Solunum örneklerinde *M.tuberculosis* complex saptanması için BDProbeTec ET sisteminin performansının araştırıldığı çalışmalarda klinik tanıya göre duyarlılığı % 95.8 , özgüllüğü %99.8 ve kültüre göre duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; % 87.5-92.7 , %96.0-99.0, % 70.0-97.0 ve % 96.0-99.7 arasında bulunmuştur. Direkt bakı pozitif örneklerde duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %100 ve % 96.2-100, direkt bakı negatif örnekler için %75 -85.1 ve %94.4-97.3 olarak saptanmıştır.

Ekstrapulmoner örneklerde *M.tuberculosis* complex'in aranmasına yönelik yapılan çalışmalardan birinde BDProbeTec ET sisteminin duyarlılığı %60.7, özgüllüğü %96.7 olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmada direkt bakısı pozitif örneklerde sistemin duyarlılığı % 98.5'e çıkarken negatif örneklerde %40.3 olarak tespit edilmiştir.

Değerlendirmeler dikkate alındığında, özellikle solunum örnekleri ile direkt bakısı pozitif olan ekstrapulmoner örneklerde tüberküloz basilinin aranmasında BDProbeTec ET sistemi, güvenilir bir sistem olarak görünmektedir.

Q-Beta replicase-amplified prob assay (Downers Grove, IL)

Bu sistem, MBTC için hedef bölge olarak 23S rRNA ya yönelik özgül dedektör problemlerin kullanıldığı Galileo versiyonu otomatize bir NAA sistemidir. Solunum örneklerinden yapılan direkt tanıda, hedefe bağlanan özgül detektör RNA prob, Q-Beta

replicase enzimi ile geometrik olarak amplifiye olur. Sistemle ilgili bu güne kadar yapılan çalışmalarda solunum örneklerinde testin duyarlılığı kültürle karşılaştırıldığında %79, özgüllüğü %98, pozitif prediktif değeri %97, negatif prediktif değeri %85 olarak rapor edilmiştir. Klinik tanı ile karşılatırıldığında duyarlılığı % 84 özgüllüğü %97 bulunmuştur. Kültür pozitif, smear negatif örneklerin %69.2'sinin bu yöntemle tanımlanabildiği bildirilmiştir. Yöntemin yalancı pozitiflik oranı yüksektir. Sistemle ilgili klinik çalışmalar devam etmekte olup test süresi yaklaşık 6 saattir.

Real-Time PCR MTB Assay (*LightCycler-Roche, iCycler - BIO-RAD, ABI PRISM 7000 – Applied Biosystem*)

Bu ticari sistemler, real-time PCR esasına bağlı olarak geliştirilmiş ve örnekte *M.tuberculosis* complex varlığını amplifikasyon ile eş zamanlı olarak saptayabilen sistemlerdir. Bu amaçla hedefe(16S rRNA) özgül primer veya problemler kullanılır. Hedef nükleik asitlerin varlığı, amplifikasyonla eş zamanlı olarak artış gösteren bir floresan sinyalin ölçülmesi ile saptanabilmektedir.

Günümüzde, hasta örnekleri ile kültür pozitif örneklerde *M.tuberculosis* complex'in varlığını ve diğer mikobakterilerden ayırımı için geliştirilmiş en hızlı sistem olup diagnostik mikobakteri laboratuvarlarında geliştirilmiş NAA esaslı teknolojiler içinde ileriye yönelik olarak iyi bir alternatif olabilir. Bu konuda sisteme ait ürünlerle ilgili klinik-laboratuvar çalışmaları halen araştırma aşamasındadır. Yaklaşık 1 saat gibi kısa sürede sonuç alınabilmesi, elektroforeze

gereksinim duyulmadan amplifikasyon sırasında sonucun izlenebilmesi, kontrol standartları ve kullanıma hazır PCR master mix reagentları ile sonuçlarının tekrarlanabilir oluşu ve kontaminasyon riskinin düşük olması sistemin önemli avantajları olarak görülmektedir.

The AccuProbe System (*Gen-Probe, San Diego California*),

AccuProbe Mycobacterium kültür identifikasyon testi, Nükleik asit hibridizasyon yöntemi esasına dayalı bir rapid DNA prob test olup, kültürden izole edilen *Mycobacterium tuberculosis complex*' in yanısıra *M.avium* complex, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.gordonae*'ı yaklaşık 1-2 saat içerisinde tanımlayabilmektedir. Sistemde hedef organizmanın rRNA'sına komplementer olan, işaretli, tek zincirli DNA probu kullanılır. Organizmaya ait rRNA, işaretli DNA prob ile birleşerek kararlı bir DNA:RNA hibriti oluşturur. İşaretlenmiş olan bu hibridler luminometre ile ölçülerek değerlendirilir. Pozitif sonuç, luminometrenin cut-off değerine eşit veya üstünde olan değerlerdir. *M.tuberculosis* complex'in İdentifikasyonuna yönelik çalışmalarda sistemin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 92-99.2 ve %87-99 arasında bildirilmiştir. Diğer türler için duyarlılık oranları %99.3 -100 ve özgüllüğü ise %99 -100 arasında saptanmıştır.

Line Probe Assay (*INNO-LiPA Mycobacteria;Innogenetics V,Ghent,Belgium*)

Line-probe teknolojisi ve revers hibridizasyon esasına göre identifikasyon yapabilen bir DNA prob yöntemidir. Kit, sıvı veya katı

besiyerlerinde izole edilen *Mycobacterium* türlerinin eşzamanlı olarak aranması ve identifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Hedef, 16S-23S *rRNA* spacer bölgesidir. Bu amaçla amplifiye edilmiş, biyotinle işaretli DNA materyali, spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridize edilir. Hibridizasyon sonrası, ortama ilave edilen alkalen fosfatazla işaretlenmiş streptavidin hibride bağlanır. Kromogen ile inkübasyon sonrası biotin-streptavidin bağlanması kolorimetrik bir sistemle tespit edilerek yorumlanır. Line Probe Assay ile patojen dokuz mikobakteri (*M.tuberculosis complex*, *M.avium* - *M.intracellulare complex*, *M.chelonae* - *M.abscessus complex*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.xenopi*, *M.scrofulaceum*) tanımlanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda INNO-LİPA *Mycobacteria*'nın sıklıkla karşılaşılan mikobakterilerin rutin identifikasyonlarında yorumu ve çalışılması kolay bir yöntem olduğu bildirilmiş ve laboratuvar identifikasyon testleri ile LİPA arasında büyük bir uyum (%99.6) rapor edilmiştir. Duyarlılık ve özgüllüğü % 100 bulunmuştur. Test süresi, PCR amplifikasyon ve gel elektroforezini takiben yaklaşık 3 saattir.

MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (PE Applied Biosystems)

Mikobakterilerin identifikasyonu amacıyla geliştirilen moleküler tekniklerden biridir. Bu amaçla izole edilen mikobakteri türlerinde 16S *rRNA* genine ait yaklaşık 500 bp'lik büyük bir bölge (16S *rDNA*) incelenir.

İdentifikasyonda, öncelikle hedef bölgenin amplifikasyonu yapılır. Bunu takiben amplifiye edilen ürün sekans analizi ile tür boyutunda tanımlanır. Test işlemi, amplifikasyon ve elektroforez işlemlerini takiben yaklaşık 4 saatte tamamlanır. Daha önceden fenotipik metodlarla yapılan tanımlamalar ile sekanslama kiti'nin uyumu % 82-87 arasında değişmektedir. American Type Culture Collection (ATCC) suşları ile yapılan bir başka çalışmada tür, grup veya kompleks seviyesinde nükleik asit sekanslama ile %98.3 oranında doğru tanımlama yapılabildiği saptanmıştır.

DNA ölçümleme, miktar tayini ve sekans analiz işlemlerinin tamamının otomatize edildiği cihaz, ABI PRISM 310 Genetic analyzer (*Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Foster city, California*) ticari olarak mevcuttur. Bu sistemde örneklerin analizi "multicolor floresans" teknolojisi ile yapılmakta ve değerlendirmeler için geliştirilmiş uygun programlar kullanılmaktadır.

DNA microarray

Bu teknoloji, diğer nükleik asit tabanlı teknolojiler gibi birbirine komplementer dizilerin hibridizasyonu ve görüntülenmesi esasına dayanır. Sistem gerek sıvı veya katı besiyerlerinde üretilen mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması gerekse TB ilaçlarına direnci saptamak için kullanılabilir. Henüz bu teknolojinin TB tanısı ile ilgili çalışmaları araştırma aşamasında olup ilaç direnci ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda dizi analizi ile uyumlu sonuçları rapor edilmiştir. DNA microarray teknolojisi ile 54 mikobakteri türünü ayırt edebilen 82 farklı 16S *rRNA*

dizisi ve 51 farklı rpoB gen mutasyon dizisi bulunmaktadır.

Tanımlamalar, mikobakteriden PCR ile elde edilen ampikonların, çok sayıda farklı oligonukleotid prob içeren minyatür analitik araçlar üzerinde (*DNA chipleri'nde*) kendine uyan prob ile hibridize olması sonrasında ortama yayılan floresan sinyallerin bir tarayıcı tarafından saptanmasıyla gerçekleşir. Testin ortalama sonuçlanma süresi yaklaşık 4 saattir.

Sonuç olarak; Konvansiyonel yöntemlerin altın standart olduğu göz ardı edilmeksizin günümüzde pekçok mikobakteri laboratuvarında ticari moleküler sistemler, rutin uygulamalarda özellikle solunum yolu örneklerinden hızlı tanı amaçlı kullanılmaktadır. Özellikle FDA onayı almış olanlar ile FDA onayı olmayan ancak ülkemiz dışında pek çok ülkede diagnostik amaçla kullanılmakta olan diğer ticari sistemlerin bir kısmı, şüpheli hastaların takibinde, hızlı taranmasında, hastalığın eradikasyonu savaşında ve optimal tedavilerinin yönlendirilmesinde oldukça etkili görünmektedir. Ancak ekstrapulmoner örneklerden *M.tuberculosis*'in ticari moleküler sistemlerle tanısı için daha pekçok kontrollü geniş çalışmalara ve yöntem modifikasyonlarına gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Alcaide F., Benitez M.A, Escriba J.M, Martin R.:** Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT Systems for recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens and for species identification by DNA AccuProbe . Journal of Clinical Microbiology, Jan.2000, p.398-401
2. **Barret A, Magee J.G , Freeman R .:** An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* (2002) Oct; 51(10):895-98
3. **Bemer MP, Germaud P, Drugeon HB. :** Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by a commercial polymerase chain reaction kit. *Pathol Biol (Paris)* 1998 Oct ; 46 (8):597-603
4. **Bergmann J.S, Keating W.E, Woods G.L.:** Clinical evaluation of the BD ProbeTec ET system for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* (2000) Feb; 38(2):863-65
5. **Bogard M, Vincelete J, Antinozzi R, et all. :** Multicenter study of Commercial, Automated Polymerase Chain Reaction System for the Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens in Routine Clinical Practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2001) 20 : 724-731
6. **Caludio S., Paola P.,Alessandra R., Giuliana R., Mariuccia S., Claudio P.:** Comparison of Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test with Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *Journ. Clin. Micr.*, April 2000,p.1559-1562, Vol,38,No.4
7. **Cloud J.L, Neal H, Rosenberry R, et all.:** Identification of Mycobacterium spp by using a commercial 16 S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* (2002) Feb; 40(2):400-6
8. **Çavuşoğlu C.:** Mikrobiyoloji laboratuvarında tanı ve direnç saptamada hızlı yöntemler.

Ağaçfıdan A., Anğ Ö. (Edt), 70.Yıl Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti ,70.Yıl Bilimsel Toplantı Kitabı, "Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında Hızlı Tanı ve Otomasyon Simpozyumu" , sayfa 110-122, İstanbul – 2001

9. Durmaz R , Günal S.: Tüberkülozun tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması. Durmaz R. (Edt), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2.baskı, Kozan Ofset, Ankara, Sayfa ; 173-179, 2001

10. Garrino M.G, Glupczynski Y, Degraux J, Nizet H, Delmee M. : Evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in human samples. *J Clin Microbiol* 1999 Jan; 37(1): 229 – 32

11. Hall L, Doerr KA, Wohlfel SL, Roberts GD. :Evaluation of the MicroSeq System for Identification of Mycobacteria by 16 S Ribosomal DNA sequencing and Its integration into a Routine Clinical Mycobacteriology Laboratory . *J Clin Microbiol* (2003) Apr; 41(4):1447-53

12. Hui M, Cheung SW, Chan CY, Cheng AF.: Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Bactec 12 B Broth cultures originating from non-respiratory secretion specimens: comparison between Accuprobe and in-house polymerase chain reaction. *Pathology* 2001 Feb; 33(1): 61-5

13. Johansen I.S, Thomsen V, Johansen A, Andersen P, Lundgren B.: Evaluation of a New Commercial Assay for Diagnosis of Pulmonary and Nonpulmonary Tuberculosis . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2002) 21 : 455-460

14. Kaul K.L.: Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis* : Impact on Patient Care. *Clinical Chemistry* (2001) 47:8: 1553-1558

15. Kocagöz T.: Tüberküloz tanısında yenilikler. H.Eraksoy, O.Ş.Yenen (Edt.),İnfeksiyon hastalıkları ve Klinik mikrobiyoloji 2000, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Yayınları. No.19 , sayfa :25-33, 2000

16. Lachnik J, Ackermann B, Bohrsen A , et all.: Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* (2002) Sep; 40(9):3364-73

17. Mijs W, De Vreese K, Devos A, et all.: Evaluation of a commercial line probe assay for identification of mycobacterium species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2002) Nov;21(11) : 794-802

18. Miller N , Cleary T, Kraus G, Young A.K, Supruill G, Hnatyszyn H.J.: Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-Fast Bacillus smear positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by using fluorogenic probes and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* (2002) Nov; 40(11):4143-4147

19. Miller N, Infante S, Cleary T.: Evaluation of the LIPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* (2000) May; 38(5):1915-19

20. Morcillo NS, Chirico MC, Trovero AC, Vignoles M, Dolmann AL.: Clinical utility of a commercial ligase chain-reaction kit for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in the adult. *Rev Argent Microbiol* 2001 Oct-Dec;33 (4): 187-96

21. O’Sullivan C.E,Miller D.R, Schneider P.S, Roberts G.D.: Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and non respiratory specimens in tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol* (2002) May; 40(5):1723-27

22. Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I.: Sequence-Based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan.2000,Jan;38(1) p.246-251

23. Philip A.L., Antonino C.: Guidelines for using a new technology in clinical practice. TB or not TB ? Rapid tests for pulmonary tuberculosis.

The journal of Respiratory disease , Vol. 18. No.3 March 1997, p: 299-308 .

24. Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, Penati V, et al.: Comparative evaluation of the new gen-probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semiautomated abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* (1998) Dec; 36(12):3601-4

25. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Rugiero G, Nista D, Bornigia S.: Performans assesment of two commercial amplification assays for Direct Detection for *Mycobacterium tuberculosis* Complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* (2002) Nov; 40(11):4138-42

26. Rantakokko JK, Marjamaki M, Martilla H, Makela L, Valtonen V, Viljanen MK.: LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay is valuable with respiratory specimens, but provides little help in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Ann Med* 2001 Feb; 33(1): 55-62

27. Saniç A. : Mikobakterilerin tanısında moleküler yöntemler ve standardizasyon. Öztürk R (edt.), XI .*Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, sayfa; 159-161* , 30 Mart-3 Nisan 2003 ,İstanbul

28. Scarparo C, Picolli P,Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Piersimoni C.: Direct identification of mycobacteria from MB/BacTalert 3D bottles: comparative evaluation of two commercial probe assays. *J Clin Microbiol* (2001) Sep; 39(9):3222-27

29. Scarparo C, Picolli P,Rigon A, Ruggiero G, Scagnelli M, Piersimoni C.: Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direkt test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* (2000) Apr; 38(4):1559-62

30. Smith JH, Buxton D, Cahill P, Fiandaca M, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum by using a prototype automated instrument platform in which probes are amplified with Q-beta replicase assay. *J Clin Microbiol* (1997) Jun; 35(6):1477-83

31. Smith JH, Radcliffe G, Rigby S, Mahan D, Lane DJ, Klinger JD.: Performance of an automated Q-beta replicase amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical trial. *J Clin Microbiol* (1997) Jun; 35(6):1484-91

32. Stefan E., Ralf I., Thomas R., Helmut H.: Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, Sept.34(9):.2275-79

33. Suffys P.N, Rocha A.S, Oliveria M. et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level using INNO-LİPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, Dec.39(12):.4477- 82

34. Thomas B., Andrea G., Martina S., Lukas M.; Evaluation of the Cobas Amplicor MTB System. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, June.35 (6);1604-5

35. Udo R., Norbert L, Hans W., Ludmila N.; Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB Assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1998, Oct.36(10):2853-60

36. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR* 2000 Jul 7; 49(26): 593-594

37. Vivian J., Mathew L.; Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods . *Clinics In Laboratory Medicine*, 1997 March .17(1);119-128

38. Wada Y, Saitoh H, Nakasone I, Yamane N.: Application of DNA-DNA hibridizasyon, DDH MYCOBACTERIA 'Kyokuto' to species-identification of mycobacteria grown in Middlebrook 7H9 broth. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* 2000 Aug;11(1): 47-50

39. Wang S.X, Tay L.: Evaluation of Three Nucleic Acid Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Respiratory Specimens. *J Clin Microbiol* 1999 June; 37(6):1932-34

40. Woods GL, Bergmann JS, Williams-Bouyer N.: Mycobacterium tuberculosis in select nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2001 Feb; 39(2):747-9

41. Yee YC, Gough A, Kumarasinghe G, Lim TK : The pattern of utilisation and accuracy of a commercial nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in routine clinical practice. *Singapore Med J* 2002 Aug ; 43(8):415-20