



TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER TANISINDA
TİCARİ SİSTEMLER

Doç.Dr.Mustafa ÖZYURT
GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi
Mik.ve Kl.Mikrobiyoloji Servisi

TÜBERKÜLOZ*

⇒ Dünyada **en sık ölüme** neden olan infeksiyonlardan biri

⇒ Dünya nüfusunun **1/3 'ü** enfekte

⇒ Yaklaşık **9 milyon** yeni tbc. olgu/yıl

Bildirimler, > %95 düşük ve orta gelirli ülkelerde

⇒ **1.8 milyon** hasta/yıl ulaşamadığından **tedavi olamıyor**

⇒ infeksiyon kaynaklı önlenebilir erişkin ölümlerin **% 26'sı**

⇒ **1.3 milyon** ölüm/ 2007 yılı (**20 kişi/100.000**)

⇒ Tedavi olmamış PTb'lu **her hasta 10-15 kişi/yıl** enfekte edebilmekte

⇒ **0.5 milyon MDR-TB /2007 yılı**

* WHO Report 2009 .Global Tuberculosis Control

*J Clin Microbiol 1999 June; 37(6):1932-34,
Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2002) 21: 455-460*

Dünyada Tüberküloz-2007*

■ İnsidans 139/100.000

* WHO Report 2009 .Global Tuberculosis Control

Ülkemizde Tüberküloz 2007*

■ İnsidans 30/100.000

* WHO Report 2009 .Global Tuberculosis Control

Ulusal Tüberküloz Kontrol Programının Temel Amacı

- ☞ *Tüberkülozu,*
- ☞ *Tüberkülozun sebep olduğu **ekonomik, sosyal ve epidemiyolojik** zararları*

ortadan kaldırmak veya azaltmak...

INTERNATIONAL COURSE ON THE MANAGEMENT OF TUBERCULOSIS LABORATORY NETWORKS IN LOW-INCOME COUNTRIES, OTTAWA, CANADA. October 2-13, 2000

TÜBERKÜLOZ LABORATUVARLARI

TB yayılımını önlemede ve kontrol altına alabilmede

- ⇒ Örnekte *M. tuberculosis* tespiti
- ⇒ İzolasyon
- ⇒ İdentifikasyon
- ⇒ Anti-tüberküloz ilaç duyarlılığı

önemli role sahiptir

TANI SÜRESİ

➔ *Konvansiyonel yöntemlerle* 2-8 hafta

➔ *Moleküler yöntemlerle* 2-8 saat



CDC

Hasta takibi ve halk sağlığı
yönünden;

*“Tanısal mikobakteriyolojide mevcut
en hızlı metodların kullanımı”*

önerilmektedir

Tenover et al. 1993; JCM 31,767

Tanısal Mikobakteriyolojide Hızlı Tanı Teknikleri

- Radyometrik yöntemler
(*BACTEC*)
- Kromatografik yöntemler
(*HPLC ve Gaz likid kromatografisi*)
- Faj amplifikasyonu
(*Fast Plaque TB*)
- İmmunolojik testler
(*ELISA, RIA, ESAT, ELISPOT*)
- Nukleik aside dayalı moleküler yöntemler
(*PCR, NASBA, TMA, SDA, DNA prob hibridizasyon, DNA microarray, PCR-RFLP, PCR-DNA dizi analizi..*)

MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

- Nükleik Asit Amplifikasyonu
- Nükleik Asit Hibridizasyonu
- PCR-DNA Dizi Analizi
- DNA Microarray Analizi
- PCR-RFLP Analizi
- Spoligotyping
- PFGE
- RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) Analizi
- MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat) Analizi

MOLEKÜLER TİCARİ TANI SİSTEMLERİ

■ Hasta örneklerinden *M. tuberculosis* aranma

☞ *NAA esaslı ticari sistemler*

■ Kültürden tür düzeyinde tanımlama

☞ *Prob Hibridizasyon, PCR-DNA dizi analizi , DNA Microarray , PCR-RFLP ve Spoligotyping esaslı ticari kit ve sistemler*

■ Antibiyotik direnci ile ilgili mutasyon analizi

☞ *PCR-DNA dizi analizi, Line-Probe Assay, DNA Microarray, RNA/RNA Mismatch Assay, FASTPlaque TB-RIF*

M. tuberculosis complex Moleküler Tekniklerle Aranması

Sistem	Hedef	Metod	Tanımlama	Kullanım
Amplicor*	16S rRNA	PCR	Kolorimetrik	Smear(+) balgam
MTD *	16S rRNA	TMA	Kemilüminesen	Smear(+/-) balgam
GTMD	16S rRNA 23SrRNA	NASBA	Görsel-strip	Smear (+) balgam
ProbeTec ET	IS 6110 geni 16S rRNA	SDA	Florimetrik	Smear(+) balgam
Real-Time	IS 6110 16S rRNA	PCR	Floresan ışına ölçümü grafik ile anlık izlem	Smear(+) balgam

* FDA ONAYLI

Clinical Chemistry 47(8):1553-58 (2001)

	MTD <i>GenProbe</i>	ProbeTecET <i>BD</i>	GTMD <i>Hain</i>	AMPLICOR <i>Roche</i>	REAL-TIME LightCycler TaqMan iCycler, SmartCycler ABI 7700 RotorGene
Hedef	RNA 16S rRNA	DNA IS6110 ve 16S rDNA	RNA 16S rRNA	DNA 16S rRNA	DNA IS6110
Termal koşullar	İzotermal	İzotermal	İzotermal	T.cycler	T.cycler
Amplifikasyon	TMA	SDA	NASBA	PCR	PCR
Pozitif Kontrol	Yok	Yok	Var	Yok	Var
İnternal Kontrol	Yok	Var	Var	Var	Var
identifikasyon	M. tuberculos is complex	M. tuberculosis complex	M. tuberculo sis complex 4 MOTT basili	M. tuberculosi s complex	M. tuberculosi s complex

I. NA Amplifikasyon Esaslı Ticari Sistemler

Hedef Çoğaltma

- **PCR** (*Cobas Amplicor MTB System-Roche*)
Hedef, **16S rRNA** geni.
- **TMA** (*Mycobacterium tuberculosis Direct Test , MTD- Gen-Probe*)
Amplifikasyon hedefi **16S rRNA**
- **NASBA** (*GenoType® Mycobacteria Direct testi , Hain Lifescience*)
Amplifikasyon hedefi **16S rRNA, 23S rRNA**
- **SDA** (*BD ProbeTec ET- Becton Dickinson*)
Hedef özgül **IS6110** geni ile **16S rRNA** geni (*16 S rDNA*)
- **Real-Time PCR** (*iCYCLER-Bio-Rad, LightCycler-Roche, ABI PRISIM -Applied Biosystem*)
Hedef özgül **IS6110** geni 105 bp bir bölge, **16S rRNA**

II.NA Hibridizasyon Esaslı Ticari Sistemler

■ The AccuProbe System (*Gen-Probe*)

- Hedef, Mikobakterilerin tür spesifik **rRNA**'larıdır

- Yaklaşık 1-2 saat içerisinde tür düzeyinde tanımlama (**6 patojen mikobakteri**)
(*M.tuberculosis complex, M.avium complex, M.avium, M.intracellulare, M.kansasii, M.gordoniae*)

- Duyarlılığı **%92-99** , Özgüllüğü **%87- 99**

■ Line-Probe Assay (**LİPA-DNA STRİP TEKNİĞİ**)

* **INNO-LİPA Mycobacteria v2;** (*Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium*)

-Hedef, 16S-23S rRNA spacer bölgesidir

- 3 saatte (**amplifikasyonu takiben**) tür düzeyinde tanımlama
(**16 patojen mikobakteri /NTM**)

- Duyarlılığı ve Özgüllüğü **% 100**, Laboratuvar identifikasyon testleri ile uyum **%99.6**

** **GenoType® MTBC , Mycobacterium CM/AS,** (*Hain Lifescience*)

-Hedef, 16S-23S rRNA spacer bölgesidir

- 3-4 saatte (**amplifikasyonu takiben**) tür düzeyinde tanımlama
(**6-14-16 patojen mikobakteri /NTM**)

*** **INNO-LİPA Rif.TB** (*Inno-Genetics NV, Ghent, Belgium*)- RIF Direnci

**** **GenoType® MTBDR** (*Hain Lifescience*)- RIF ve INH direnci

III. PCR-DNA Dizi Analizi

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

- Hedef , 16S rRNA genine ait yaklaşık 500 bp' lik bölge (16S rDNA) dir
- Test süresi amplifikasyon sonrası yaklaşık 4 saat
- ATCC suşları ile tür, grup veya kompleks düzeyinde %98 doğru tanımlama

IV. DNA Microarray Analizi

■ NanoChip Electronic Microarray (NANOGEN)

- Hedef , 16S rRNA dizisi ve rpoβ gen mutasyon dizileri
- Test süresi ortalama 4 saat

V. PCR-RFLP Analizi

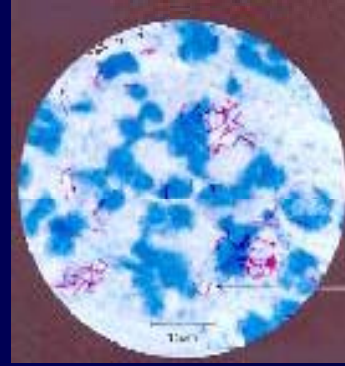
■ MYCO-TYPE-ALL (DIOMED)

- Hedef , hsp65 genine ait 441 bp'lik bölge
- Test süresi ortalama 6 saat

VI. SPOLIGOTYPING

■ Spoligotyping Kit (ISOGEN, Bioscience BV)

- Hedef, kromozomal DR spacers



TANIDA KONVANSİYONEL VE TİCARİ SİSTEMLERİN PERFORMANS ANALİZLERİ



AFB

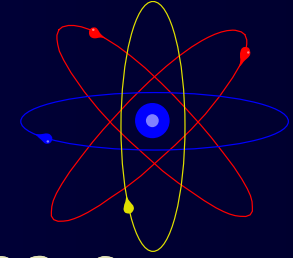
- Duyarlılık % 55.5-67.0
- Özgüllük % 92.2- 99.1
- Pozitif Prediktif Deđer (PPD) % 67.7-87.0
- Negatif Prediktif Deđer(NPD) % 90.1-97.0

J Clin Microbiol 1999 Jan; 37(1): 229 - 32



- ☞ *Aynı gün sonuç alınmakta*
- ☞ *Pozitif olabilmesi için 5000-10000 basil/ml*

BACTEC 460 TB/ BACTEC MIGIT 960



■ Duyarlılık	% 83.3- 89.3
■ Özgüllük	% 99.2-100
■ PPD	% 100
■ NPD	% 96.4-99.2

J Clin Microbiol 1999 Jan; 37(1): 229 - 32



- ☞ *Ortalama sonuç alma süresi 15 gün*
- ☞ *Otomatize sistemler*

MTD (*M. tuberculosis* Direct Test)

(*Gen-Probe*)



■ Duyarlılık	% 88.0 - 91.2
■ Özgüllük	% 99.1 - 100
■ PPD	% 93.9- 98.6
■ NPD	% 91.7 - 99.4

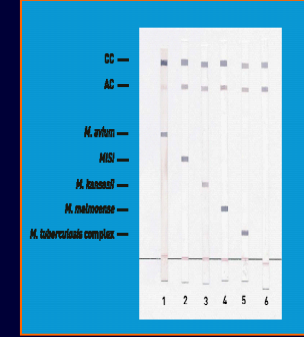
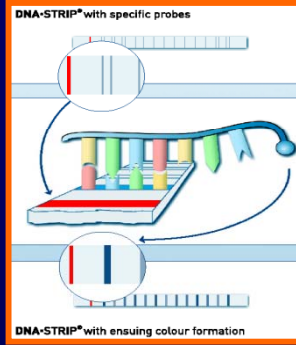
J Clin Microbiol 1999 June; 37(6):1932-34

J Clin Microbiol (2002) May; 40(5):1723-27

- ☞ *Test süresi yaklaşık 3.5 saat*
- ☞ *internal amplifikasyon kontrolü (IAC) yoktur*

GenoType Mycobacteria Direct

(Hain, Lifescience)



- Duyarlılık % 82.5
- Özgüllük % 99.6
- PPD % 96.3
- NPD % 97.7

Weizenegger M., et al., Annual Congress of the 25. th ESM, Italy -2004

- ☞ Test süresi yaklaşık 4-6 saat
- ☞ internal amplifikasyon kontrolü (IAC) ve konjugat (CC) kontrolü var

BD ProbeTec ET

(*Becton Dickenson*)



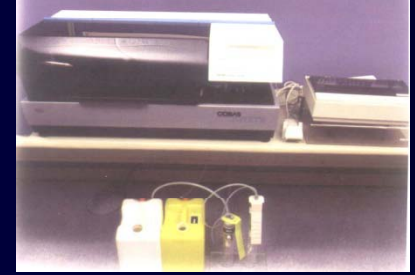
■ Duyarlılık	% 87.5- 92.7
■ Özgüllük	% 96.0 - 99.0
■ PPD	% 70.0- 97.0
■ NPD	% 96.0 - 99.7

J Clin Microbiol (2000) Feb; 38(2):863-65

J Clin Microbiol (2002) Oct; 51(10):895-98

- *Toplam Test süresi yaklaşık 3 saat*
- *Kontaminasyonu önlemek için Urasil -N-Glikozilaz (UNG)*
- *İnternal amplifikasyon kontrolü (IAC)*

COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test (Roche Diagnostic System)



■ Duyarlılık	% 78.3 - 96.1
■ Özgüllük	% 99.7 - 100
■ PPD	% 90.9 - 100
■ NPD	% 97.5 - 99.8

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2001) 20 : 724-731
J Clin Microbiol 1999 June;37(6):1932-34

- ☞ *Test süresi yaklaşık 4 - 4.5 saat*
- ☞ *Kontaminasyonu önlemek için Urasil -N-Glikozilaz (UNG)*
- ☞ *internal amplifikasyon kontrolü (IAC)*

REAL-TIME PCR ile *M. tuberculosis complex* Arama (*iCycler-BioRad*)



■ Duyarlılık	% 86.3- 99.5
■ Özgüllük	% 98.2-100
■ PPD	% 100
■ NPD	% 94.5

Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Mar;54(3):217-22

J Clin Microbiol 2003 Oct;41(10):4783-4786

- ☞ *Test süresi yaklaşık 4 - 4.5 saat*
- ☞ *internal amplifikasyon kontrolü (IAC)*

SMEAR POZİTİF ÖRNEKLER

(SOLUNUM ÖRNEKLERİ)

Test	Duyar. (%)	Özgül. (%)	PPD (%)	NPD (%)
■ MTD	100	100	100	87.5
■ AMPLICOR	96.9	100	100	99.2
■ BD PROB TEC	100	96.2-100	93.4	100
■ GTMD	94.6	99.6	97.2	97.7
■ REAL_TIME	99.5	98.2	-	-
■ BACTEC	96.9	100	100	87.5
■ LJ	87.5	100	100	63.6
■ 7H10/7H11	96.7	100	100	87.5

J Clin Microbiol 2003 Oct;41(10):4783-4786

J Clin Microbiol 1999 Jan; 37(1): 229-32

"Kl.Mik.Laboratuvarında Hızlı Tanı ve Otomasyon Simpozyumu", sayfa 110-122, İstanbul - 2001

Weizenegger M., et al., Annual Congress of the 25.th ESM, İtaly -2004

KÜLTÜR SONUCUNA GÖRE MOLEKÜLER TANI SİSTEMLERİNİN PERFORMANSI (SOLUNUM ÖRNEKLERİ)

Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Mar;54(3):217-22

Weizenegger M., et al., Annual Congress of the 25.th ESM, İtaly -2004

J Clin Microbiol 1999 Jan; 37(1): 229-32 J.Clin.Microbiol.2002,May. 40(5)1723-7

"Kl.Mik.Laboratuvarında Hızlı Tanı ve Otomasyon Simpozyumu", sayfa 110-122, İstanbul - 2001

TİCARİ SİSTEMLER	DUYARLILIK %	ÖZGÜLLÜK %	PPD %	NPD %
MTD	88.0 - 91.2	99.1 - 100	93.9 - 98.6	91.7 - 99.4
COBAS AMPLICOR	78.3 - 96.1	99.7 - 100	90.9 - 100	97.5 - 99.8
BD Probe Tec ET	87.5 - 92.7	96.0 - 99.0	70.0 - 97.0	96.0 - 99.7
GTMD	82.5	99.6	96.3	97.7
Real-Time	86.3	100	100	94.5

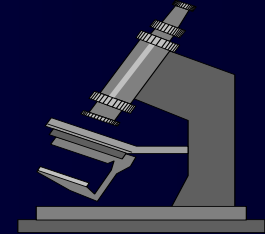
KÜLTÜR SONUCUNA GÖRE MOLEKÜLER TANI SİSTEMLERİNİN PERFORMANSI (EKSTRAPULMONER ÖRNEKLER)

PLoS One. 2009;4(2):e4526

*J. Clin. Microbiol. 2002, May. 40(5)1723-7 , J. Clin. Microbiol. 2000, Apr. 38(4)1559-62 ,
J. Cl. Microbiol. 2001, Feb. 39(2)747-9, Singapore Med. J. 2002, Aug. 43(8);415-20 ,*

TİCARİ SİSTEMLER	DUYARLILIK %			ÖZGÜLLÜK %
	GENEL	SMEAR (+)	SMEAR (-)	
MTD	74-86.8	92.6	83	98.5-100
COBAS AMPLICOR	60-85	90-100	53-75	93.1-100
BD Probe Tec ET	60.7	98.5	40.3	96.7
Real-Time	86.3	93.3	-	100

SİSTEMLERİN KÜLTÜR VE SMEAR SONUÇLARINA GÖRE PERFORMANSI

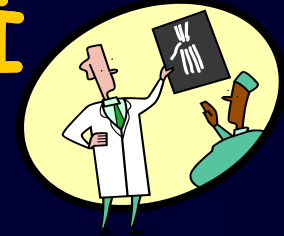
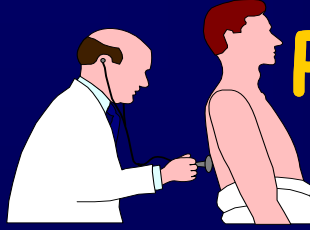


J Clin Microbiol 1999 June;37(6):1932-34

Weizenegger M., et al., Annual Congress of the 25.th ESM, Italy -2004

TİCARİ SİSTEMLER	DUYARLILIK %		
	Smear(+) Kültür(+) %	Smear(-) Kültür(+) %	Smear(-) Kültür(-) %
MTD	100	83.3	1.3
AMPLICOR	96.9	65.4	3.8
GTMD	94.6	83.3	0.3
BD PROBE TEC ET	100	85.1	-

KLİNİK TANIYA GÖRE MOLEKÜLER TANI SİSTEMLERİNİN PERFORMANS ANALİZİ



Test	Duyarlılık %	Özgüllük %
MTD	83.0 - 91.4	96.4-100
COBAS AMPLICOR MTB	76.4 - 91.9	99.8-100
BD ProbeTEC ET	95.8 - 97.6	99.8 -100

*J Clin Microbiol 1997 Jun; 35(6): 1477-83 , J Clin Microbiol 1999 Jan; 37(1): 229-32
"Kl.Mik.Laboratuvarında Hızlı Tanı ve Otomasyon Simpozyumu" , sayfa 110-122, İstanbul - 2001*

ALGORİTMA *CDC- 2000*



ALGORİTMA CDC- 2000

AFB
Smear
Negatif

NAA TESTİ
Pozitif

İkinci bir örnekle test
tekrarı
NAA POZİTİF İSE
Hasta **TBC**

TB tedavisi
*Duyarlılık test sonuçları
beklenir*

NAA TESTİ
Negatif

İkinci bir örnekle test tekrarı
NPD = %94.5
NAA NEGATİF İSE

MUHTEMEL TB DEĞİL
Büyük olasılıkla başka tanı
KLİNİK YARGI

TB Tanısında Moleküler Ticari Sistemlerin Avantajları

- ✓ Hızlı (saatler içerisinde) ve güvenilir tanı sağlaması
- ✓ Uygulama kolaylığı (otomatize veya yarı otomatize)
- ✓ Kontaminasyon riskinin düşük olması
- ✓ Duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olması
- ✓ Pozitif ve Negatif prediktif değerlerinin yüksek olması
- ✓ Birçok patojene uygulanabilir olması
- ✓ Patojenleri tür düzeyinde ayırt edebilmesi
- ✓ Bazılarının FDA onaylı ve /veya CE sertifikası olması
- ✓ Prosedür ve reaktiflerin standardize olması

TB Tanısında Moleküler Ticari Sistemlerin Dezavantajları

- ✓ Direkt bakısı negatif örneklerde ve ekstrapulmoner örneklerde **düşük duyarlılığa** sahiptir
- ✓ Genellikle Tüberküloz dışı mikobakteriler **saptanamamaktadır**
- ✓ Klinik olarak tedaviye iyi yanıt alınsa, klinik düzelme gözlene bile **tedavi sırasında ve sonrasında** bu testlerle **pozitif sonuçlar** alınabilmektedir.
- ✓ Direkt baki ve kültür **negatifliği** durumunda **pozitif sonuç alınabilmekte**, Altın standart kültür esas alındığından bu sonuçlar **şüphe** yaratabilmektedir
- ✓ Ortamdaki **inhibitörler ve yetersiz ekstraksiyon**, internal kontrolü olmayan testlerde **yanlış negatif** sonuçlara neden olabilmekte.

TB Tanısında Moleküler Ticari Sistemlerin Dezavantajları

- ✓ Maliyet **yüksektir.**
- ✓ Çalışılan Kurumun **Referans Merkez Özelliğine Sahip** Olması Beklenir
- ✓ Sistemin kurulmasında ve efektif kullanımında önem arzeden kriterlerin **doğru analizi** gerekir
 - Kurumda yıllık **smear (+) örnek sayısı (>500 olmalı)**
 - Smear (+) örnekli hastalar arasında **yıllık relatif pulmoner tbc prevalansı,**
 - Günlük Hasta **Solunum izolasyon ve Tedavi maliyeti**
 - Test reagentlarının **maliyeti**

Sonuç olarak,

Laboratuvar tanıda moleküler ticari sistemler;

- ☞ Smear negatif, ancak klinik olarak TB olasılığı yüksek olan şüpheli hasta örneklerinde kullanımı etkili görünmektedir
- ☞ Mevcut ticari ürünler **asla tarama amaçlı** kullanılmamalı,
- ☞ Amerikan Toraks Cemiyeti'nin sınıf 2 ve 3 standartlarını yakalayan, konvansiyonel yöntemlerin kullanımında yüksek standartlara sahip, sağlık kurum laboratuvarlarında kullanımı konusunda genel olarak kabul gören bir yaklaşımdır
- ☞ Kesin tanıda, **kültür sonuçlarının klinik bulgularla birlikte değerlendirilmesinin** daha doğru sonuç verebildiği,
- ☞ Tanıda Konvansiyonel yöntemlerin altın standart olduğu unutulmamalı



TEŞEKKÜR EDERİM