

TÜBERKÜLOZDA HIZLI MOLEKÜLER TANI TESTLERİ

Rıza DURMAZ

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KIRIKKALE
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı,
Sıhhiye, ANKARA
rizadurmaz@ymail.com

ÖZET

İlaç direnci tüberküloz kontrol programları için önemli bir problemdir. Direncin hızlı ve etkin bir biçimde saptanması ilaca dirençli basillerin çoğalması, toplum ve nosokomial yayılımının engellenmesi bakımından önemlidir. Direncin saptanabilmesi için geleneksel agar proporsiyon metodu altı-sekiz, sıvı kültür metotları ise dört-altı haftalık süreye gereksinim duymaktadır. Moleküler metotlar gereken süreyi bir-iki güne indirmektedirler. Direncin erken saptanması ve etkili ilaç tedavisinin erkenden başlanması nedeniyle, hızlı moleküler metotlar çoğul ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB)'un infeksiyöz periyodunu altı hafta kadar azaltabilmekte, ÇİD-TB'nin daha fazla yayılmasını engelleyebilmekte ve tedaviden olumlu yanıt alınmasını sağlayabilmektedir. Hızlı moleküler teknikler, izoniazid ve rifampisin direnciyle ilişkili mutasyonların saptanmasında başarıyla uygulanmaktadır. Bu yazıda ÇİD-TB veya RİF dirençli TB tanısı için yaygın olarak kullanılan üç ticari moleküler metot üzerinde durulmuştur. Yöntemlerin özgüllük ve duyarlılıkları yanında, avantajları, dezavantajları ve etkinlikleri hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar sözcükler: çok ilaca direnç, hızlı moleküler testler, tüberküloz

SUMMARY

Rapid Molecular Diagnostic Tests for Tuberculosis

Drug resistance in tuberculosis (TB) is a matter of grave concern for TB control programs. Accurate and rapid identification of resistance are important to avoid nosocomial and community transmission, and amplification of drug-resistant bacilli. Conventional agar proportion method typically requires six to eight weeks to provide results while the liquid culture methods can provide results in four to five weeks. Molecular methods can reduce the time required for detection of drug resistance to one to two days. Because of the earlier detection of resistance and earlier initiation of effective therapy, rapid molecular methods may reduce periods of infectiousness of multidrug-resistant (MDR) TB cases by as much as six weeks, reduce the further spread of MDR TB, and improve treatment outcomes. Rapid molecular techniques had been successfully applied for the identification of mutations related to resistance to isoniazid and rifampin (RIF). This review focused on three commercial molecular methods commonly used for detection RIF resistant or MDR TB. Beside sensitivity and specificity of the methods, information regarding advantage, disadvantage, and accuracy of the methods has been provided.

Keywords: multidrug-resistant, rapid molecular tests, tuberculosis

Tüberkülozda direnç gittikçe artan global bir problemdir ve tüberkülozla mücadele çabalarını önemli ölçüde zayıflatmaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 500,000 yeni çok ilaca dirençli (ÇİD) tüberküloz (TB) bildirilmesine rağmen bunların yalnızca 30,000 kadarı tanımlanıp, rapor edilebilmektedir⁽⁵⁾. 2008 yılında dünya genelindeki TB olgularının % 3.6'sının ÇİD-TB olduğu hesaplanmış ve 150,000 kişinin ÇİD-TB nedeniyle öldüğü rapor edilmiştir. Aynı yıl içerisinde 46 ülkeden yaygın ilaç dirençli TB (YİD-

TB) bildirimi yapılmış ve ÇİD-TB olgularının % 5.4'ünün YİD-TB olduğu belirtilmiştir⁽²⁷⁾.

Tüberküloz şüpheli hastalarda *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve ilaç direncinin hızlı ve doğru olarak tanımlanması etkili tedavi protokolünün oluşturulması ve kontrol önlemlerinin zamanında uygulanmasında son derece önemlidir. İlaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan geleneksel proporsiyon metodu katı veya sıvı besiyerlerini kullanmakta ve bakterinin üretilmesine gerek duymaktadır. Agar

proporsiyon yönteminde bakterinin ilaçlara duyarlı veya dirençli olarak değerlendirilebilmesi için 6-8 haftalık süreye gereksinim vardır. Sıvı kültür sistemlerinde bu süre 4-6 hafta kadar olabilmektedir⁽⁶⁾. Moleküler testler sonuç almak için gerekli süreyi 1-2 güne indirmekte, ÇİD-TB'nin infeksiyöz periyodunu 6 hafta kadar kısaltabilmektedir. Böylece ÇİD-TB'nin daha fazla yayılması önlenmekte ve tedavinin etkinliği artırılmaktadır^(6,11). Duyarlılığı mikroskopi negatif ve pozitif olan örneklerde >% 85 ve özgüllüğü % 97 olan hızlı, etkin ve yaygın kullanıma sahip moleküler tanı testlerinin uygulanmasıyla, her yıl 400,000 yaşam kurtarılabilceği tahmin edilmektedir⁽¹⁸⁾.

Tüberküloz basillerinde direnç mekanizmasının anlaşılmasından sonra, birçok moleküler test direnci belirlemede denenmektedir. Bu yazıda; kullanılan yöntemler arasından ticari ürün haline gelmiş ve hızlı sonuç verebilen üç sistemden ("Xpert® MTB/RIF", "MTB-MDRplus" ve "Inno Lipa") bahsedilecektir. Sistemlerin özgüllük ve duyarlılıkları yanında maliyet etkinlikleri konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılacaktır. Mevcut verilerden yararlanılarak nerede, ne zaman ve nasıl kullanılmalrı konusunda açıklamalar yapılacaktır.

TİCARİ HIZLI MOLEKÜLER DİRENÇ TANI TESTLERİ

Xpert® MTB / RIF: Tüberküloz tanısı ve / veya rifampisin (RİF) direnci için yeni geliştirilmiş basit, hızlı ve yaygın kullanım olanağı sunan kolay bir testtir. Doğrudan hasta materyalinden semî kantitatif "nested" gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle *M.tuberculosis* kompleks ve RİF direnci iki saatten kısa bir sürede saptanabilmektedir. Tek bir kartuş temelli test, 15-30°C sıcaklıklarda ve yüksek nemli ortamlarda bile çalışabilmektedir⁽²⁶⁾. Örneklerin çapraz bulaşması için hemen hiçbir risk yoktur ve özel bir biyogüvenlik ortamına gerek duyulmaz⁽²⁾. Periferdeki sağlık merkezlerinde bile uygulanabilme potansiyeli vardır^(20,28).

Testin TB tanısındaki özgüllüğünün % 97-100 olduğu gösterilmiştir^(4,5). Duyarlılığı mikroskopi ve kültür pozitif örnekler ile mikrosko-

bisi negatif olan akciğer TB hastalarınınkindedir. Kültür altın standart olarak kabul edildiğinde duyarlılık mikroskopi pozitif örneklerde > % 95, mikroskopi negatif örneklerde % 48-90 arasında değişmektedir^(1,4,5,9,14,16). Mikroskobisi negatif örneklerdeki duyarlılık incelenen örnek sayısı birden üçe çıkarılınca anlamlı derecede artmaktadır (% 72.5'den % 90'a)⁽⁴⁾. Mikroskobisi negatif solunum yolu dışı örneklerde testin duyarlılığı % 37'ye kadar düşmektedir⁽¹⁾. Duyarlılık mikroskobiden daha yüksek olmasına rağmen, negatif Xpert MTB/RIF test sonucu TB olasılığını ortadan kaldırmaz. Bu durum özellikle HIV ile infekte hastalarda önemlidir⁽²⁴⁾. Klinik olarak TB şüpheli, kültür ve mikroskopi negatif olan 153 hastanın yalnızca 24'ünde Xpert MTB/RIF testi pozitif sonuç vermiş, takipleri sonucunda hastalardan 20'sinde radyolojik bulguların TB ile uyumlu olduğu ve TB tedavisinden olumlu yanıt alındığı kaydedilmiştir. Diğer taraftan Xpert MTB/RIF testinin negatif sonuç verdiği 118 hastanın 67'sinde (% 57) klinik, radyolojik ve tedavi takip bulguları TB olduğunu doğrulamıştır⁽⁵⁾.

Xpert MTB/RIF testi, TB tanısı yanında RİF-dirençli TB tanımlamasını da saatler içerisinde sağlayan bir testtir. Bu testin kullanılmasıyla mikroskobisi negatif olan TB hastalarında tedaviye başlamak için geçen süre ortalama 56 gün (39-81 gün)'den 5 güne (2-8 gün) inmektedir⁽⁵⁾. RİF direnci, ÇİD-TB'nin başlangıç tanısı için güvenilir bir gösterge olduğundan⁽²⁵⁾, izole RİF direncinin yaygın olmadığı ABD gibi ülkelerde pozitif prediktif değeri (PPD) % 95'in üzerinde⁽⁶⁾, Hindistan'da ise % 85'dir⁽⁵⁾. Testin RİF direncini saptamadaki duyarlılığı kültür ve mikroskopi pozitif örneklerde % 95-100, özgüllüğü % 98-100'dür^(1,5,16). Ancak, mikroskobisi negatif örneklerde direnci saptamada yetersizlikler vardır⁽¹⁾.

GenoType MTBDR/ MTB DRplus: Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan sistem, klinik örneklerde *M.tuberculosis* saptanması yanında RİF ve izoniazid (İNH) direncini araştırmak üzere geliştirilmiştir. Mikroskobisi pozitif 536 balgam örneğinde RİF ve İNH direncini araştırmada örneklerin % 97'sinde 1-2 günde yorumlanabilir sonuçlar alınmış, testin RİF ve İNH dirençli suşları saptamadaki duyarlılığı

sırasıyla % 99 ve % 94; özgüllüğü ise % 99 ve % 100 olarak bulunmuştur. ÇİD suşları % 99 duyarlılık ve % 100 özgüllükle saptanabilmiştir⁽³⁾. Meta analiz çalışmasında GenoType MTBDRplus yönteminin özgüllük ve duyarlılığının sırasıyla % 98 ile % 99 olduğu belirtilmiştir⁽¹³⁾.

Duyarlılık kültür ve mikroskopi pozitifliği ile doğrudan etkilenmektedir. Afrika'da her hastadan yalnızca bir balgam olmak üzere toplanmış olan 2510 örnek üzerinde mikroskopi, MGIT ve GenoType MTBDRplus testleri karşılaştırılmış. Kültür negatif olan örneklerde testin özgüllüğü % 99 olarak saptanmıştır. Yöntemin duyarlılığı balgamdaki basil yüküyle doğrudan ilişkili bulunmuştur. Kültür pozitif bulunan 529 balgam örneğinin 256'sında (% 48) GenoType MTBDRplus pozitif bulunmuştur. Duyarlılık mikroskopi negatif örneklerde % 14; mikroskopi şüpheli olanlarda % 46; mikroskopi 1+ olanlarda % 69; mikroskopi 2+ olanlarda % 86 ve mikroskopi 3+ olanlarda % 90 olarak saptanmıştır. Pozitif örneklerde RİF direncini belirlemede testin duyarlılığı % 86, özgüllüğü % 97; İNH direncini belirlemede bu değerler sırasıyla % 62 ve % 98 olarak kaydedilmiştir⁽⁶⁾. Bulgular, GenoType MTBDRplus testinin mikroskopi negatif veya basilin nadir olduğu balgam örneklerinde kullanılmaması önerilerini desteklemektedir.

GenoType MTBDRplus testinin mikroskobisi negatif olan örneklerdeki yetersizliğini dikate alan firma bu testin yeni versiyonunu geliştirdi. Genotype MTBDRplus ver2.0 (Hain Lifescience, Nehren, Germany) olarak geliştirilen yeni versiyonun etkinliği, yüksek TB insidansına sahip bir ülke olan Moldova'da 348 balgam üzerinde araştırılmıştır. Kültür ve klinik bulgular referans alındığında genel duyarlılık ve özgüllük % 88 ve % 99 olarak bulunmuştur. Mikroskobisi negatif örneklerde duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 80 ve % 99 olarak kaydedilmiştir. Mikroskopi negatif olan 257 örneğin 104'ünde kültür pozitif, 20'sinde kültür negatif fakat klinik bulgular TB'ü doğrulamıştır. Genotype MTBDRplus ver2.0 RİF ve İNH direncini % 94 duyarlılık ve % 96 özgüllükle saptayabilmiştir⁽⁷⁾. Sonuçlar MTBDRplus ver2.0 testinin mikroskopi pozitif ve negatif klinik örneklerdeki *M.tuberculosis*'in tespiti için hızlı ve duyarlı

bir test olduğunu; ilave olarak RİF ve İNH direnci hakkında bilgi vermesi nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki TB tanı algoritmasına eklenebileceğini göstermektedir.

Kısa bir süre önce Hain firması tarafından YİD-TB tanısı için Genotype MTBDRsl testi geliştirilmiştir. Bu testle florokinolon, etambutol ve aminoglikozid direnci bakılabilmektedir. Sınırlı sayıda dirençli klinik izolat (63 izolat) üzerinde yapılan çalışmada yöntemin duyarlılığı etambutol için % 59, amikasin için % 83, kapreomisin için % 87 ve ofloksasin için % 90 olarak rapor edilmiştir⁽¹⁰⁾. Elli dört klinik örnek (49 mikroskopi pozitif, 5 mikroskopi negatif) üzerinde yapılan diğer bir çalışmada kültür ile Genotype MTBDRsl arasındaki uyum florokinolonlar için % 72, kanamisin/kapreomisin için % 89, etambutol için % 68 olarak saptanmıştır⁽¹²⁾.

Line probe assay (Innolipa, LiPA): Katı fazda ters hibridizasyon esasına dayanan Innolipa testinin rifampisin dirençli suşları saptamadaki duyarlılığı % 95, özgüllüğü % 99.6, pozitif prediktif değeri (PPD) % 93, negatif prediktif değeri (NPD) % 99.7 ve sonuçlar arasındaki uyum % 99 olarak bildirilmiştir⁽¹⁵⁾. Yapılan bir derlemede testin duyarlılığı klinik izolatlarda % 95'in üzerinde, mikroskopi pozitif klinik örneklerde % 80 ve özgüllüğü % 100 olarak rapor edilmiştir⁽¹³⁾.

İngiltere'de LiPA testini kullanan ulusal moleküler tanı laboratuvarında retrospektif bir analiz yapılmıştır. Bütün balgam örnekleri (n=3382) için testin TB tanısı koymadaki duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve etkinlik değerleri sırasıyla % 93, % 86, % 93, % 87 ve % 91 olarak saptanmıştır. Mikroskopi pozitif balgam örnekleri (n=2606) için bu değerler sırasıyla % 95, % 81, % 94, % 83 ve % 91'dir. RİF direncini saptamada bütün balgam örnekleri (n=1667) için duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve etkinlik sırasıyla % 92, % 99, % 89, % 99.5 ve % 99 olarak bulunmuştur. RİF direncini saptamada mikroskopi pozitif balgam örnekleri (n=1477) için duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD ve etkinlik sırasıyla; % 93, % 99, % 88, % 99.6 ve % 99 olarak kaydedilmiştir. LiPA testi üç yılda (Ocak 2006 ve Aralık 2008) mikroskopi pozitif olan örneklerde TB tanısı için 25.3, RİF direncinin gösterilmesinde 32.2 gün daha erken sonuç vermiştir. Yazarlar

bu verilere bakarak; İngiltere'deki ulusal moleküler tanı laboratuvarının, TB tanısı ve RİF direncinin belirlenmesinde hızlı ve güvenilir hizmet verdiğini belirtmişlerdir⁽¹⁹⁾.

HIZLI MOLEKÜLER DİRENÇ TESTLERİ NE ZAMAN? NEREDE? NASIL KULLANILMALI?

Herhangi bir moleküler tanı testinin kullanımını yaygınlaştırılmadan önce üzerinde durulması gereken en kritik soru; bu testin gerçekten TB ve ÇİD-TB kontrolünde maksimum yarar sağlayıp, sağlamadığıdır. Bu soru özellikle düşük gelirli ülkelerdeki Ulusal Tüberküloz Programlarında (UTP), prensip olarak moleküler direnç tanı testinin "ne zaman, nerede ve nasıl" kullanılacağına belirlenmesi açısından önemlidir.

Tüberküloz Strateji ve Teknik Danışma Grubu (Strategic and Technical Advisory Group for TB:STAG-TB) tarafından 2010 Eylül ayında onaylanmasından bu yana, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Xpert MTB/RİF testinin hızlı ve geniş ölçekte kullanımını önermiştir⁽²⁹⁾. Ancak, bu sistemin bazı özellikleri yaygın kullanımında operasyonel sorunlara neden olabilmektedir. Bunlar; kartuşun raf ömrünün kısa (sadece 18 ay) olması, sistemin çalışabilmesi için çok istikrarlı bir elektrik kaynağına gerek duyması, aletin her yıl kalibrasyon gerektirmesi, çevre sıcaklık döngüsünün kritik öneme sahip olması, sübvans ekipman maliyeti ve kalibrasyonu da dahil olmak üzere bir testin maliyetinin yaklaşık 20.3 ABD doları bulmasıdır⁽²⁹⁾. Ayrıca, fazla miktarlarda kullanılan plastik kartuşların güvenli şekilde bertaraf edilmesi problem oluşturmaktadır⁽²⁶⁾.

WHO uzmanlar grubu "ÇİD veya HİV-TB birlikteliğinden şüphe edilen bireylerde Xpert MTB/RİF bir başlangıç testi olarak kullanılabilir" demektedir ve bu öneri STAG-TB tarafından da desteklenmektedir⁽²⁸⁾. WHO, ÇİD-TB veya HİV-TB'nin yaygın olduğu ülkeler için mikroskopinin devamına ihtiyaç olduğunu belirgin bir biçimde belirtmekle birlikte, mikroskopiyi Xpert MTB/RİF testinden veya radyografik taramadan bile sonra gelen ikinci bir seçenek olarak onaylamış, mikroskopiyi ise tedavinin takibinde

ilk seçenek test olarak önermiştir⁽²⁹⁾. Peki, bu öneri TB hastaları arasında HİV'in çok yüksek olduğu ve düşük ekonomik düzeye sahip olan ülkelerin 2/3'ünü bulandıran Sahra-altı Afrika ülkeleri için geçerli midir? Sahra-altı Afrika ülkelerinde, gelir düzeyi ne olursa olsun kıta boyunca daha önce TB tedavisi görmemiş olanlar arasında RİF direnç yaygınlığı % 4'den daha azdır⁽³⁰⁾. Ayrıca ÇİD-TB ve HİV arasındaki ilişkiyi destekleyen kanıtlar çelişmektedir⁽²²⁾. Bu nedenle, HİV ile infekte ya da infekte olmaya bakmaksızın, bu bireylerdeki Xpert MTB/RİF'in vermiş olduğu RİF direnç sonucunu yorumlamada ihtiyatlı olmak gereklidir⁽²⁴⁾.

Moleküler direnç saptama testlerinin pozitif prediktif değeri (PPD), çalışılan popülasyondaki ÇİD-TB prevalansından doğrudan etkilenmektedir^(21,24). RİF direnç prevalansı % 15'den fazla olması halinde Xpert MTD/RİF testinin PPD % 90'ın üzerindedir. RİF direnç prevalansı % 2 ise PPD yalnızca % 49, prevalans % 1 ise PPD % 32'dir⁽²⁴⁾. ÇİD-TB ve HİV enfeksiyon birlikteliğinin yüksek olduğu düşük gelirli ülkelere Kırgızistan ve Tacikistan hariç diğerlerinde önceden tedavi görmemiş olan TB hastalarında RİF direnci % 5'den azdır ve çoğunda % 2'den bile azdır⁽³⁰⁾. Bu naive TB hastaları için Xpert MTD/RİF testinin vermiş olduğu herhangi bir sonucun alternatif bir testle doğrulanmaya ihtiyacı vardır⁽²⁴⁾. Önceden yetersiz tedavi almış veya rölaps olan hastalarda RİF direnç prevalansı sıklıkla % 10 civarındadır⁽²⁴⁾. Bu özellikli grupta Xpert MTD/RİF direncinin doğrulanıp doğrulanmaması ülkedeki RİF direnç seviyesine bağlıdır. Diğer taraftan, tedavinin başarısız olduğu hastalar veya ÇİD-TB teması sonucu hastalanan kişilerde RİF direnç prevalansı % 15'i aşmaktadır ve bu grupta Xpert MTD/RİF test sonucu tek başına ÇİD-TB tanısına karar vermede yeterli olabilir⁽²⁴⁾.

T.C Sağlık Bakanlığı, Verem Savaşı Dairesi Başkanlığının 2011 yılı raporuna göre ülkemizde 2009 yılında 17,402 (15,493 yeni olgu) tüberküloz hastası verem savaşı dispanserleri kayıtlarına girmiştir. İlaç duyarlılık testi yapılan 4,320 hastanın % 5.1'i (222 kişi) çok ilaca dirençli bulunmuş olup, ÇİD oranı yeni olgularda % 2.9 (99 hasta), önceden tedavi görmüş olgularda % 20.5 (123 hasta) olarak saptanmıştır⁽²³⁾.

Türkiye’de HIV-TB sıklığı hakkında sağlıklı veri yoktur. Ancak, düşük olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’deki bulguları yukarıda sunulan literatür verileriyle birlikte değerlendirecek olursak, moleküler direnç testlerinin Türkiye’deki ÇİD-TB temas öyküsü olmayan yeni TB olgularında kullanılmasının maliyet-etkin olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Xpert MTD/RIF test kullanımının yaygınlaştırmadan önce dikkate alınması gereken diğer bir faktör, Ulusal Tüberküloz Programları, yeni TB olgularını tanımlama üzerinde yoğunlaşmadan önce tanımladıkları olgularda maksimum kür oranlarına ulaştıklarından emin olmalıdır. ÇİD-TB tanımlama kapasitesinin artırılmasına paralel olarak maksimum tedavi için gerekli olan kapasite artışına gidilmelidir. Aksi halde ÇİD-TB tedavisindeki problemin bir sonucu olarak birçok ülkede YİD-TB olguları rapor edilme-ye başlanmıştır ve YİD-TB olgularının sayısı giderek artmaktadır⁽²⁷⁾.

Moleküler yöntemlerle direnç tespiti özellikle şu durumlarda faydalıdır⁽⁶⁾:

- Dirençli TB şüphesi olan hastalar,
- Tedavisi ilaç duyarlılık sonucuna göre yeniden düzenlenecek olan çok kritik hastalar, örneğin standart ilk seçenek ilaçlarla tedavisi devam etmesine rağmen durumunda düzelme olmayanlar,
- Kaynak olgunun dirençli TB basili olduğu salgın veya temaslı araştırmalarında,
- HIV ile infekte veya hemodiyaliz alan immünsüprese kişiler,
- *M.tuberculosis* ve diğer mikobakterilerle karışık olan izolatlarda veya ölü basil bulunduran solunum yolu örneklerinde.

HIZLI MOLEKÜLER DİRENÇ TESTLERİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

Moleküler direnç saptama testlerinin en büyük avantajı hızlı olmalarıdır. Ancak beklenen yarar sağlanabilmesi için örnek alımından test sonucunun hasta yönetiminde kullanımına kadar geçen zaman (turnaround time) olabildiğince kısa tutulmalıdır. Örnek laboratuvara ulaştığından itibaren 2 gün içinde moleküler direnç testi sonuçlanmalıdır. Sonuç telefonla klinisyen ve ilgili sağlık otoritesine iletilmelidir.

Moleküler testler mikroskopi pozitif balgam örnekleri ve klinik izolatlarda kullanıldığında güvenilir sonuçlar vermekle birlikte, mikroskopi negatif olanlarda daha az güvenilirdir. Solunum yolu dışı klinik örneklerdeki performansları hakkında sınırlı veri vardır. Moleküler testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü RİF için % 97’nin üzerindedir. Ancak, İNH için duyarlılık yeterli düzeyde değildir, negatif sonuç İNH direncini ortadan kaldırmaz. ABD’deki gibi İNH direnç oranı % 8’lerde olduğunda, moleküler yöntemlerle saptanmış olan İNH direncinin PPD oldukça yüksektir⁽⁶⁾.

Moleküler testler basilin canlılığının devamı için gerekli olan özel örnek saklama ve transfer koşullarına gereksinim duymazlar.

Testlerin uygulaması kolay olmakla birlikte, sonuçlarının yorumlanmasında eğitimli uzman görüşüne ihtiyaç vardır.

Bütün ilaçlara karşı dirençten sorumlu moleküler mekanizma henüz tam olarak açıklanmadığı için hedef bölgede moleküler yöntemlerle saptanan mutasyonlar, suşların hepsinde fenotipik dirençten sorumlu olmayabilir. Diğer taraftan bilinen moleküler mekanizmalar fenotipik dirençle yüksek düzeyde uyum gösterse bile (*rpoB* ve RİF, *katG* ve İNH direnci gibi), kitler olası mutasyonların tamamını saptamada yeterli olmayabilir. Örneğin moleküler testlerin çoğu *rpoB* geninin 81 bazlık sıcak bölgesini ve *katG* geninin 315. kodonundaki mutasyonları saptamak üzere tasarlanmıştır. Oysa dirençten sorumlu mutasyonlar bu bölgelerin dışında da olabilmektedir⁽¹⁸⁾.

Kritik soru moleküler yöntemlerle saptanan ilaç direncinin klinik öneminin ne olduğudur? Bu noktada dikkate alınması gereken iki husus vardır. Birincisi, moleküler direnç testinin heterorezistan (wilde tip ve mutant karışımı) hücre popülasyonundaki saptama limitinin ne olduğudur. *M.tuberculosis* popülasyonunda, ilaç direncinin gelişmesinin başlangıç aşamasında, total bakteri popülasyonunda oldukça sınırlı oranda dirençli bakteri bulunmaktadır. Dirençli basillerin oranı klinik olarak anlamlı olabilecek düzeye (agar proporsiyon yöntemine göre bu oran % 1) ulaşıncaya kadar tedavi yetersiz kalmaktadır. Moleküler testlerin bir hastadaki klinik olarak anlamlı olan dirençli basil oranını sapta-

ma yeteneği henüz tam olarak çalışılmamıştır. Bu testlerin değerlendirilmesi primer olarak analitik duyarlılık (total DNA sayısı) üzerine olmaktadır. Inno-LiPA testinin RİF dirençli ve RİF duyarlı suşların karışımından hazırlanan DNA örneklerindeki dirençli saptama limiti üzerine yapılmış olan bir çalışmada; bu yöntem % 80'i RİF duyarlı olan karışımdaki % 20 RİF dirençli DNA ile pozitif sonuç vermiştir. Benzer şekilde dirençli ve duyarlı bakterilerin farklı oranlardaki karışımından hazırlanan DNA örneklerinde Genotype MTBDRplus yöntemi % 5 kadar düşük orandaki dirençli hücreleri saptayabilmiştir. Xpert TB sistemi ile ilgili veriler ise RİF duyarlı ve dirençli olan basil karışımındaki direncin saptanabilmesi için örnekte bulunması gereken mutant DNA oranı, saptanan mutasyonlara bağlı olarak % 65-100 arasında değişmektedir. Düşük orandaki dirençli hücreleri saptamadaki sınırlamaları, Xpert TB testinin RİF direnç gelişiminin erken evresindeki direnç tespitinde kullanımını sınırlandırabilir. Bu bilgiler 18 nolu derlemeden çıkarılmıştır.

İkinci husus moleküler yöntemin direncin seviyesi hakkında bilgi verebilmesiyle ilgilidir. Bu durum özellikle İNH için önemlidir. Genotype MTBDRplus yönteminde İNH direnciyle ilişkili *katG* ve *inhA* gen bölgelerindeki mutasyonlara bakılmaktadır. Genel olarak *katG*'deki mutasyonun yüksek düzey İNH direncine, *inhA*'daki mutasyonun ise düşük düzey dirençle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu bölgelerdeki mutasyonların tanımlanması, hekime yüksek doz İNH'la tedaviye devam edebilme konusunda yararlı bilgi sunmaktadır⁽¹⁸⁾.

Yukarıda sunulan katkılarına rağmen, CDC'nin 2011 yılında güncellenen raporuna göre moleküler ilaç direnç testleri, direnç tespitinde konvansiyonel testlerin yapılmasındaki gerekliliği ortadan kaldırmamıştır⁽⁶⁾. Nedenler şöyle sıralanmıştır:

- Bu testler, *M.tuberculosis* kompleks saptamada kültürden daha duyarlı değildir.
- Moleküler direnç testleri, dirençli ve duyarlı bir bakteri karışımındaki dirençli bakterilerin oranını saptamada kültüre dayalı proporsiyon testi kadar duyarlı değildir.
- Moleküler duyarlılık testleri RİF için çok

yararlı, İNH için daha az etkindir. Üzerinde çalışmalar olmakla birlikte diğer ilaçlar için henüz tatminkâr sonuç alınmamaktadır.

- Yalancı pozitif ve negatif moleküler direnç test sonuçları olmaktadır. Klinik örneklerde bulunabilecek inhibitörler nedeniyle (solunum yolu örneklerinde % 2-5 oranında) yalancı negatif sonuç alınabilmektedir.
- Moleküler direnç testi ve konvansiyonel test sonuçları arasında uyumsuzluk olduğunda, uyumsuzluk çözülmüncüye kadar konvansiyonel test sonucu dikkate alınmalıdır.
- Yurt dışı hesaplamalarda kit maliyeti yeni valide edilmiş moleküler direnç testlerinde \$ 8 - 30 /örnek arasında değişmektedir.

HIZLI DİRENÇ SAPTAMA TESTLERİNİN TANI ALGORİTMASINDAKİ YERİ

Sağlık Bakanlığı (Ministry of Health, MOH), Ulusal TB kontrol programları (National Tuberculosis Control Programs, NTCP) ve Ulusal TB referans laboratuvarı (National TB Reference Laboratory, NTRL) birlikte çalışarak, ilk iş olarak hedef hasta popülasyonunu tanımlamalı ve ona göre ulusal düzeyde bir tanı algoritması oluşturmalıdır. Endüstrileşmiş ülkelerdeki tanı algoritması genellikle herhangi bir TB hastasının tanımlanmasını hedeflemektedir. Buna karşın kaynakları sınırlı ve yüksek düzey HIV ve dirençli TB insidansına sahip olan ülkelerin ilaca dirençli TB, ÇİD-TB veya YİD-TB ile enfeksiyon riski olan hastalar üzerine yoğunlaşmaları gerekmektedir. İkinci grup toplumlarda klinisyenin en uygun tarama yöntemlerini kullanarak riskli hastaları olabildiğince doğru olarak belirlemesi çok önemlidir. Aksi halde laboratuvar gereksiz yere fazla sayıda test yapmakla karşı karşıya kalabilir⁽¹⁸⁾.

WHO'nun ÇİD-TB şüphesi olan hastaların laboratuvar tanısı için önermiş olduğu algoritmada; alınan örnekler ilk olarak mikroskopi ile incelenir. Mikroskopi pozitif ise moleküler test uygulanarak ÇİD-TB araştırılır. Moleküler test direnci gösterdiğinde iki seçenek vardır: Birinci seçenekte antibiyotik tedavisine başlanır, üç ay

sonra kültür yapılarak tedavinin etkinliğine bakılır. Kültür pozitif ise ikinci seçenek ilaçlara duyarlılık testi yapılır. Diğer seçenek olarak, beklemeden ikinci seçenek ilaçlara duyarlılık testinin uygulanmasıdır. Bu aşamada, henüz WHO tarafından onaylanmamış olmakla birlikte, ÇİD-TB tanısını erkenden koymak ve biran önce izolasyon işlemlerini başlatmak için Genotype MTBDRsl testi kullanılabilir. Moleküler test sonucunda direnç saptanamaz ise ÇİD-TB açısından düşük riske sahip olan popülasyon için moleküler test sonucuna göre suş duyarlı rapor edilir, standart birinci seçenek ilaçlarla tedaviye başlanır. ÇİD-TB açısından yüksek risk var ise Genotype MTBDRsl testi ile ikinci seçenek ilaçlara duyarlılık araştırılabilir.

Mikroskobisi negatif olan risk grubundaki hastalarda line-prob assay (LPA) testlerinin kullanımı onaylanmamıştır. Bu durumda sıvı besiyerlerinde kültür yapılmalı, pozitif kültürlerden moleküler yöntemlerle direnç araştırılmalıdır. HIV ile infekte TB hastalarında mikroskopi negatifliği yaygın olduğundan bu hasta grubundan alınan örnekler için algoritmaya Xpert MTB/RIF sistemi eklenebilir. Anormal akciğer grafisi veya klinik bulgularına dayanarak kuvvetle TB düşünülen hastalarda, mikroskopi negatifliğini takiben Xpert MTB/RIF testinin yapılması tanıda faydalı olabilir⁽¹⁷⁾. Ancak, LiPA yöntemlerinde olduğu gibi bu sistemle alınan direnç sonucunun konvansiyonel duyarlılık testi veya Genotype MTBDRsl yöntemleriyle doğrulanmaya ihtiyacı vardır⁽¹⁸⁾. Ayrıca, Hain firması tarafından yeni geliştirilen Genotype MTBDRplus ver2.0 testinin mikroskopi negatif örneklerdeki kullanılabilirliği dikate alındığında, bu grup hastalar için mikroskobiden sonra algoritmaya girme potansiyeli vardır.

ÇİD-TB prevalansının düşük olduğu durumlarda Xpert MTB/RIF testinin vermiş olduğu RIF direnç sonucunun sıklıkla doğrulanmasına gereksinim vardır. Hangi hastalardaki RIF direncinin doğrulanmasına gerek olduğu ve bu aşamada kullanılacak olan tekniğin ne olacağı açık olarak belirlenmelidir. Risk grupları ve referans laboratuvarlarının ülke genelindeki dağılımına göre tanı algoritması düzenlenmeli-

dir⁽²⁴⁾.

WHO uzmanlar grubu "HIV-TB birlikteliğinden şüphe edilen bireylerde Xpert MTB/RIF bir başlangıç testi olarak kullanılabilir" önerisine rağmen, Trébucq ve ark.⁽²⁴⁾'na göre yüksek HIV prevalansına sahip olan düşük ekonomik gelirli ülkelerde şu aşamada periferdeki sağlık merkezlerinde mikroskobinin yerine, Xpert MTB/RIF testini koyma çalışmalarını akıllıca bulmamaktadır. Bunu birkaç nedene bağlamaktadırlar:

- 1) Testin kullanımı, sıcaklığın sürekli olarak 30°C altında olduğu laboratuvarlarla sınırlıdır. Tropikal ülkelerin çoğunda bunun sağlanabilmesi için klimalara gereksinim vardır. Ancak, düşük gelirli ülkelerin periferdeki laboratuvarlarının birçoğunda hâli hazırda klima bulunmamaktadır.
- 2) Xpert MTB/RIF testinin maliyeti 20 dolar'dır⁽²⁸⁾. Bu maliyet iki mikroskopi fiyatının (0.5 dolar) kırk katı kadardır. Mikroskopi yerine Xpert MTB/RIF'in alınması durumunda hükümetler ve hastalar büyük bir maliyetle karşı karşıya kalacak ve yerine konulamayacak bir bütçe açığı oluşunca da TB tanısı durma noktasına gelebilecektir.
- 3) Başlangıç için bütçe bulunsa bile, sürdürülebilirlik sıkıntısı olacaktır. 18 aylık kullanım süresi olan Xpert MTB/RIF testlerinin yenilerinin alınması periferdeki her laboratuvar için mümkün olmayacaktır.
- 4) Düşük gelirli ülkelerin çoğunda elektrik kaynağının devamlılığını ve stabilizesini sağlama sorunu vardır.

Trébucq ve ark.⁽²⁴⁾'na göre yeni bir testin 50,000-150,000 nüfusa hizmet veren periferde kullanıma alınmasından önce testin etkinliği, mikroskopiye üstünlüğü ve ilk tanı algoritmasındaki yerinin ne olacağı konularında ayrıntılı çalışmalara gerek vardır⁽²⁴⁾. Xpert MTB/RIF testinin periferdeki laboratuvarlarda bulunulması yerine, bu testin belirli illerde veya bölge hastanelerinde kurulması sağlanabilir ve ihtiyacı olan hastalar bu merkezlere yönlendirilebilir.

SONUÇ

Yeni ÇİD-TB olgularının önüne geçilebilmesi için TB ve ÇİD-TB'in erken ve doğru tanısı üzerine yoğunlaşmalıdır. Bu amaçla moleküler testler önemli katkı sağlamaktadır. Ancak, geleneksel yöntemler TB tanı algoritmasında köşe taşı olarak kalmalıdır. Mevcut durumda moleküler testler, mikroskobiyi takiben kullanılacak testler olarak değerlendirilmelidir. Özellikle HİV'in yüksek prevalansa sahip olduğu toplumlarda, mikroskobisi negatif TB olgularının daha iyi tanısı için Xpert MTB/RIF testi önerilebilir. Ancak, alınan direnç sonucu dikkatle yorumlanmalıdır. RİF direnci için beklenen prevalans, popülasyon ve bireysel riskler dikkate alınmalıdır. Ülkelerin çoğunda yeni TB hastalar arasında ÇİD-TB direnç prevalansı çok düşüktür. Bu nedenle direnci gösteren bir moleküler test sonucunun, her zaman başka bir test tarafından onaylanması gerekmektedir. RİF direnç riskinin yüksek (>% 15) olduğu bir popülasyonda, Xpert MTB/RIF testinin RIF direnci için PPD yüksektir⁽²⁴⁾.

Moleküler testlerin hasta başına maliyet etkin kullanımı için de popülasyondaki ÇİD-TB prevalansının bilinmesi çok önemlidir. Peru'da Genotype MTBDRplus'ın da aralarında olduğu üç hızlı yöntemin farklı TB hasta grubunda (Yeni TB hastası, önceden tedavi görmüş TB) maliyet etkinlik çalışmaları karşılaştırılmıştır. Hasta ayrımı yapmaksızın genel olarak bakıldığında ülkenin Sağlık Bakanlığı verilerine göre Genotype MTBDRplus'ın hasta başı maliyeti 176.4 dolar olarak hesaplanmıştır. Yeni hastalarda maliyet 720 dolar daha fazla, önceden tedavi görenlerde 360 dolar daha az olmaktadır⁽²¹⁾. Bu bulgulardan hareketle araştırmacılar moleküler testleri ÇİD-TB'nin yüksek prevalansa sahip olduğu gruplar için önermişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens, *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1772-6.
2. Banada PP, Sivasubramani SK, Blakemore R et al. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings, *J Clin Microbiol* 2010;48(10):3551-7.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01053-10>
PMid:20720033 PMCID:2953088
3. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa, *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(7):787-92.
<http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200709-1436OC>
PMid:18202343
4. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance, *N Engl J Med* 2010;363(11):1005-15.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>
PMid:20825313 PMCID:2947799
5. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multi-centre implementation study, *Lancet* 2011;377(9776):1495-505.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60438-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60438-8)
6. Center for Diseases Control. Report of Expert Consultations on Rapid Molecular Testing to Detect Drug-Resistant Tuberculosis in the United. <http://www.cdc.gov/tb/topic/laboratory/rapidmoleculartesting/default.htm>. Page last reviewed: July 1, 2011.
7. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances, *J Clin Microbiol* 2012 [Epub ahead of print].
8. Dorman SE, Chihota VN, Lewis JJ et al. Genotype MTBDRplus for direct detection of Mycobacterium tuberculosis and drug resistance in gold miners in South Africa, *J Clin Microbiol* 2012 [Epub ahead of print].
9. Helb D, Jones M, Story E et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology, *J Clin Microbiol* 2010;48(1):229-37.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01463-09>
PMid:19864480 PMCID:2812290
10. Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium

- tuberculosis strains and clinical specimens, *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1767-72.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00081-09>
 PMid:19386845 PMCid:2691112
11. Jonsson G, Will JF. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis improve patient outcomes? *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16(1):4-5.
<http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0419>
 PMid:22236840
 12. Lacombe A, García-Sierra N, Prat C et al. GenoType MTBDRsl for molecular detection of second-line-drug and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis strains and clinical samples, *J Clin Microbiol* 2012;50(1):30-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05274-11>
 PMid:22075597
 13. Ling, DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis, *Eur Respir J* 2008; 32(5):1165-74.
<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00061808>
 PMid:18614561
 14. Marlowe EM, Novak Weekley SM, Cumpio J et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens, *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1621-3.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02214-10>
 PMid:21289151 PMCid:3122817
 15. Martin A, Portaels F. Drug resistance and drug resistance detection, "Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (eds): Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care, 1. baskı" kitabında s. 635-87, Bernd Sebastian Kamp and Patrica Bourciller (2007).
 16. Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martin R, Alcaide F. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method, *J Clin Microbiol* 2011;49(3):1137-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01831-10>
 PMid:21191053 PMCid:3067676
 17. Nicol MP, Workman L, Isaacs W et al. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study, *Lancet Infect Dis* 2011;11(11):819-24.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70167-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70167-0)
 18. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities, *Clin Microbiol Rev* 2011;24(2):314-50.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00059-10>
 PMid:21482728
 19. Seoudi N, Mitchell SL, Brown TJ, Dashti F, Amin AK, Drobniewski FA. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampicin drug resistance: retrospective analysis of a national UK molecular service over the last decade, *Thorax* 2012 [Epub ahead of print].
 20. Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis-time for a game change, *N Engl J Med* 2010;363(11):1070-1.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMe1008496>
 PMid:20825320
 21. Solari L, Gutiérrez A, Suárez C et al. Cost analysis of rapid methods for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in different epidemiologic groups in Perú, *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2011; 28(3):426-31.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342011000300004>
 22. Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review, *PLoS One* 2009;4(5):e5561.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005561>
 PMid:19440304 PMCid:2680616
 23. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye’de Verem Savaşı 2011 Raporu, Yayın No.845, Sağlık Bakanlığı, Ankara (2011).
 24. Trébucq A, Enarson DA, Chiang CY et al. Xpert® MTB/RIF for national tuberculosis programmes in low-income countries: when, where and how? *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15(12):1567-72.
<http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0392>
 PMid:22005110
 25. Van Deun A, Maug AK, Salim MA et al. Short, highly effective and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(5):684-92
<http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201001-0077OC>
 PMid:20442432
 26. Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, Stevens W. Xpert® MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(7):937-46.
<http://dx.doi.org/10.1586/erm.10.67>
 PMid:20964612
 27. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response, WHO/HTM/TB/2010, WHO, Geneva (2011).
 28. World Health Organization. Policy statement: Automated real-time nucleic acid amplification

technology for simultaneous and rapid detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system, WHO/HTM/TB/2011.4, WHO, Geneva (2011).

29. World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational 'How-to'. Practical considerati-

ons. WHO/HTM/TB/2011.2, WHO, Geneva (2011).

30. World Health Organization. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug resistant tuberculosis by 2015. WHO progress report 2011. WHO/HTM/TB/2011.3, WHO, Geneva (2011).