

GÜNÜMÜZDE TÜBERKÜLOZ TANISI / GÜÇLÜKLERİ

Orhan Kaya KÖKSALAN

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Tüberküloz Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı,
Çapa, İSTANBUL
okkoksalan@hotmail.com

ÖZET

Son 20 yıl içinde gelişen teknikler tüberküloz tanısında genel bir hızlanma sağlamıştır. Yeni yöntemler içinde en çok ümit vaad edenler moleküler genetik tekniklerdir. Ne var ki, yeni yöntemlerin de eksiklikleri vardır, yöntemleri geliştirmeye olan ihtiyaç sürmektedir. Yöntemlerdeki gelişmeler hem bireysel tedavilerin hem de kontrol programlarının başarısına etki edecektir

Anahtar sözcükler: direnç genleri, genotiplendirme, mikobakteri identifikasyonu, moleküler tanı, tüberküloz

SUMMARY

Tuberculosis Diagnosis and its Weaknesses Today

Molecular techniques evolved within the past two decades have yielded an overall rapidity in tuberculosis diagnosis. Molecular genetic tools are apparently the most promising among the novel methods. This does not necessarily mean that they are without shortcomings, thus efforts to improve them keep going. The improvement of the methods, in turn, directly influence the success both of the treatment of individual patients and the control programmes.

Keywords: genotyping, molecular diagnosis, mycobacterial identification, resistance genes, tuberculosis

Klinik tüberküloz (TB) laboratuvarlarında verilen hizmetler başlıca şu dört ana grupta toplanabilir:

1. Muayene maddesinde tüberküloz varlığının saptanması (direkt tanı)
2. Mikobakteri identifikasyonu
3. İlaç duyarlılık testleri
4. Kaynak olgu ve bulaş saptanması,

Koch basilinin tanımlanmasından itibaren geçen yüzyılı aşkın süre içinde, yukarıda belirtilen dört ana grupta da daha hızlı, kolay ve ucuz tanı sağlamaya yönelik değişik yöntemler ortaya atılmıştır. Birçoğu laboratuvarlarımıza önemli kolaylıklar ve hız kazandırmakla beraber, daha iyiye olan arayışlarımız sürmektedir. Bu yazıda, bu dört ana başlık kapsamında günümüzde TB laboratuvarlarında ulaştığımız son nokta ve halen mevcut güçlükler/eksiklikler sırasıyla konu edilecektir.

1. Muayene maddesinde TB varlığının saptanması (Direkt tanı)

Hızlı TB tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için süren çabalara rağmen, 1800'lü yılların sonlarında iki Alman doktor (Ziehl ve Neelsen) tarafından geliştirilen ilk hızlı yöntem olan aside dirençli boyama⁽⁶⁾ en sık kullanılan ve güvenilen yöntem olmaya devam etmektedir. Aside dirençli boyama yöntemi her yeni geliştirilen direkt tanı yönteminin adeta karşısına dikilmekte ve üstün özellikleri dolayısıyla, çoğunun arkasında büyük endüstri desteği olan bu yeni yöntemleri tercih edilemez duruma getirmektedir.

Her yeni yöntem aside dirençli yöntemden daha duyarlı olduğu iddiasıyla ortaya çıkmakta fakat kısa zaman içinde aside dirençli boyama tekniği kadar yüksek spesifisite (özgülük) ve pozitif prediktif değere sahip olmadığı anlaşılmaktadır; 1980'li yıllarda ticari ELISA kitlerinin ve 90'lı yıllarda piyasaya sürülmeye başlayan ticari nükleik asit amplifikasyon test (NAAT) kitlerinin başlarına gelen budur.

Gelişmiş ülkelerde atipik mikobakteri/TB oranı 2-3/1'dir ve mikroskop pozitif olgulara tüberküloz tedavisi başlanması büyük olasılıkla hatalı olacaktır. Bu durumda *Mycobacterium tuberculosis* için spesifik olan NAAT kitleri, TB/atipik mikobakteri ayrımı da yapabildiğinden, kullanım bulabilmektedir. Tüberküloz sorunun atipik mikobakteri hastalıklarına göre çok daha yüksek olduğu ülkelerde ki, buna ülkemiz de dahildir^(2,3), mikroskop pozitifliği hemen her zaman tüberküloz lehinedir ve pahalı NAAT testlerinin kullanımı gereksizdir.

Aside dirençli boyama teknik olarak her laboratuvarıda uygulanacak kadar basit, 15-30 dakikada sonuç verecek kadar hızlı ve yüksek özgünlüğü ile yeni yöntemlere meydan okumaya devam etmektedir ve en çok kullanılan yöntemlerdir.

Bugün kullandığımız yeni kültür yöntemleri de yumurta bazlı katı besiyerlerine göre daha hızlıdır. Otomatize sıvı besiyeri sistemleri üretme sürelerini kısaltmışlardır (Heifets). İlk otomatize kültür sistemi radyometrik ve enjektör kullanmayı gerektirirken, yeni yöntemler non-radyometrik ve enjektör kullanımı gerektirmez hale getirilmiştir.

2. Mikobakteri identifikasyonu

1983 yılında 53 mikobakteri türü tanımlanmışken⁽¹¹⁾ bugün bilinen mikobakteri tür sayısı 150'den fazladır. Tür sayısındaki bu artış son 20 yıl içinde geliştirilen genetik yöntemlere bağlıdır. Başlangıçta taksonomi çalışmaları yapabilen sınırlı sayıda merkezde kullanılabilecek kadar pahalı olan bu yöntemler giderek ucuzlatılıp, kolaylaştırılarak klinik laboratuvarlarda kullanılabilecek hale getirilmiştir. Konvansiyonel biyokimyasal ve fenotipik tür tanısı yöntemleri çok zahmetli, üremeden sonra 3-6 hafta kadar uzun bir zamana ihtiyaç duyması ve ayırd etme gücü düşük olduğundan yerlerini tamamen moleküler yöntemlere bırakmıştır. Bugün artık hsp65 PCR-REA⁽⁹⁾, 16S rDNA dizilendirme⁽⁴⁾ yöntemleri TB laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sadece klinik önemi olan mikobakteri türlerini tanımlama edebilmeyi sağlayan ticari DNA hibridizasyon kitleri yoğun rutin yük altındaki laboratuvarlara ucuz olmayan fakat daha kolay bir

alternatif sunmaktadır.

3. İlaç duyarlılık testleri

1980'li yılların sonlarında kullanıma giren otomatize sıvı besiyeri sistemleri Löwenstein-Jensen besiyerinde yapılan direnç testlerine göre daha hızlı sonuç vermektedir. Bu yeni yöntemlerle duyarlılık testi sonucu verme süresi 4-6 haftadan iki haftaya düşmüştür. Pratik açıdan bakıldığında, bu süre de çok uzun kalmaktadır. Çünkü ulusal kontrol programımıza göre, tedaviye başlandığında tedavi hiç değiştirilmeksizin beş ay boyunca devam eder. Mikroskop sonucundan üç-dört hafta sonra rapor edilen duyarlılık testlerinde direnç saptansa bile, klinisyen standard tedaviyi kesmemekte, duyarlılık testi sonucu işe yaramamaktadır.

Moleküler direnç genlerinin hızla incelenerek direnci kodlayan mutasyonların tedavi başlanmadan saptanması bu noktada imdadımıza yetişmiştir. Özellikle klinik önemi yüksek olan rifampisine karşı dirençli mutasyonların fenotipik direnç testleri ve klinik durumla % 96'nın üzerinde uyumlu olması yüz güldürücü olmuştur. Bugün artık yayma pozitif hastalara aynı gün içinde moleküler testler uygulayarak rifampisin ve hatta izoniazid direnci bakılabilmektedir.

Ne var ki, moleküler direnç testleri de eksiksiz değildir. Rifampisin dirençli suşların % 4-5'inde, izoniazid dirençli suşların % 10-15'inde mutasyon saptanamamaktadır. Diğer antibiyotikler için bu oranlar daha da artabilmektedir. Bunun sebebi mutasyonu kodlayan gen bölgelerinin hepsinin henüz bilinmemesi, incelenen hotspot bölgelerin dışında da mutasyonların oluşabilmesidir.

Tüm genom dizi analizi gibi yeni tekniklerin gelişmesi ile bu sorunların da üstesinden gelineceği umut edilmektedir.

4. Kaynak olgu ve bulaşların saptanması

Son yıllarda geliştirilen moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin konvansiyonel epidemiyolojik araçlarla birlikte kullanımı, *M.tuberculosis* suşlarının daha kesin olarak birbirinden ayırdanmasını ve hastalığın toplum içinde bulaş ve yayılma dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır⁽⁷⁾.

Moleküler epidemiyolojik yöntemlerin kullanımıyla birlikte:

- 1) Epidemiyolojik olarak şüpheli bulaşların onaylanması,
- 2) Epidemiyolojik olarak şüphelenilmeyen bulaşların saptanması,
- 3) Laboratuvarlardaki (besiyerlerindeki) kros-kontaminasyonların saptanması,
- 4) Kaynak olgunun belirlenmesi,
- 5) Tekrarlayan tüberküloz olgularının reaktivasyona mı yoksa re-infeksiyona mı bağlı olduğunun saptanması,
- 6) Tüberkülozun küresel ve yerel yayılımının ayrıntılarının anlaşılabilmesi mümkün olmuştur.

Tüberküloz suşlarının genomlarının unique (tek kopya) bölgeleri yüksek düzeyde homojenlik gösterdiklerinden, suşların birbirinden ayırdanmasında tekrarlayıcı elemanlardan faydalanır⁽⁷⁾; çünkü tekrarlayıcı elemanlar her tüberküloz suşunun genomunda farklı yerlerde yerleşir ve/veya farklı sayıda bulunurlar. Bugüne kadar onlarca farklı tekrarlayıcı eleman saptanmış olmasına rağmen, bugün için en çok kabul gören ve en sık kullanılan tekrarlayıcı elemanlar IS6110, DR ve MIRU'dur.

Tüm dünyadaki suşlarının dağılım farklılıklarının/benzerliklerinin ortaya çıkarılması amacıyla standard tek bir yöntemin kullanılmasına 1993 yılında başlanmıştır⁽¹⁰⁾. Ancak IS6110 yöntemi emek yoğun bir yöntem olup, fazla sayıda suşun tiplendirmesinin söz konusu olduğu durumlarda yetersiz kalmaktadır.

Buna karşılık PCR bazlı iki yöntem olan spoligotyping⁽¹⁾ ve 24-loci MIRU-VNTR PCR^(5,8) analizi IS6110-RFLP yöntemine göre çok daha hızlı sonuç verdiğinden, fazla sayıda suş ile çalışılması gereken durumlarda iyi bir alternatif oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology, *J Clin Microbiol* 1997;35(4):907-14.
2. Köksalan OK, Aydın MD, Eraslan S, Bekiroğlu N: Reliability of cord formation in BACTEC 12B/13A media for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratories with a high prevalence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21(4):314-7.
3. Martín-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J et al: Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey, *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8(10):1186-93.
4. Murray RGE, Brenner DJ, Colwell RR et al: Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the Protobacteria, *Int J Syst Bacteriol* 1990;40(2):213-5.
5. Oelemann MC, Diel R, Vatin V: Assessment of an optimized *Mycobacterial* Interpersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis, *J Clin Microbiol* 2007;45(3): 691-7.
6. Ryan KJ, Ray CG (editors): *Sherris Medical Microbiology* 2004, 4th ed., McGraw Hill, Philadelphia (2004).
7. Small PM, van Embden JDA: Molecular epidemiology of tuberculosis, "Bloom BR (ed): *Tuberculosis Pathogenesis, Protection, and Control*" kitabında s.569-82, ASM Press, Washington, DC (1994).
8. Supply P, Allix C, Lesjean S et al: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*, *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4498-510.
9. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, *J Clin Microbiol* 1993;31(2):175-8.
10. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology, *J Clin Microbiol* 1993;31(2):406-9.
11. Wayne LG, Kubica GP: *Family Mycobacteriaceae*, "Holt JG (ed): *Bergey's Manual*, 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore (1985).