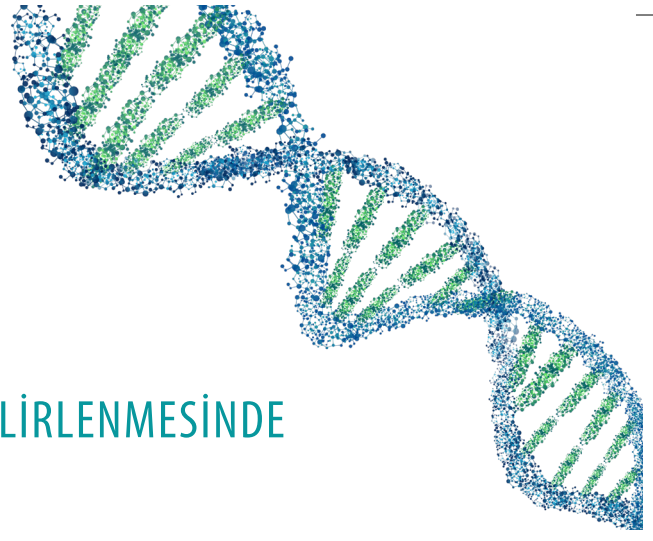


BÖLÜM 41

TÜBERKÜLOZUN TANISI VE DİRENCİN BELİRLENMESİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI



Süheyla SÜRÜCÜOĞLU¹

Giriş

Tüberküloz (TB) dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) "Küresel Tüberküloz Raporu"na göre 2020 yılında 10 milyon kişinin TB olduğu ve 1,5 milyon kişinin TB'den öldüğü tahmin edilmektedir ¹. Tüberküloz önlenilebilen ve tedavi edilebilen bir enfeksiyon hastalığıdır. İlaça duyarlı bir TB hastası altı aylık tedavi ile %85 oranında tam olarak iyileşir. Tüberkülozda en büyük endişe ilaç direncidir. Tedavi başarısı çok ilaca dirençli TB'de (ÇİD-TB) %57'ye, yaygın ilaca dirençli TB'de (YİD-TB) ise %35'e düşer ². İlaç direncinin en önemli nedeni ise tanı ve tedaviye başlamadaki uzun gecikmeler ve uygun olmayan tedavilerdir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre 2020 yılında TB olgularının sadece %59'una bakteriyolojik tanı konmuş ve bildirim yapılmıştır ¹. Başlangıç testi olarak önerilen moleküler tanı testleri ise bu hastaların sadece üçte birine uygulanmıştır.

Tüberkülozun erken tanısı hastanın izolasyonuna, temaslı taramasına ve erken tedaviye izin

verdiğinden küresel TB kontrolünün temel öğelerinden biridir. Hastalığın erken tanısının önündeki en büyük engel TB basilinin yavaş üremesidir. Klinik örneğin aside dirençli basil (ARB) boyalı mikroskopik incelenmesi (yayma) hızlı, ucuz ve kolay olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür (%46-78) ³. Yaymanın pozitif olması için klinik örnekte 5.000-10.000 "colony forming unit" (CFU)/ml basil olması gerekir. Ayrıca mikroskopik inceleme ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK), tüberküloz dışı mikobakterilerden (TDM) ayırt edilemez. Kültür ise TB tanısında halen altın standart yöntemdir. Kültürün duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksektir. Pozitif sonuç için klinik örnekte 10-100 cfu/mL basil olması yeterlidir. Aynı zamanda tür tanımlamasına ve ilaç duyarlılık testine olanak sağlar. Ancak kültür uzun sürer, sonuçlanması 6-8 haftaya kadar uzayabilir. Kültüre dayalı fenotipik duyarlılık testleri için de ek zaman gerekir. Moleküler tanı yöntemleri ise kültür pozitif örneklerde haftalar, hatta aylar öncesinden TB tanısına ve direnç özelliklerinin belirlenmesine katkı sağlar (Tablo 1).

¹ Prof. Dr., Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., suheyla.surucuoglu@cbu.edu.tr

bir sürveyans çalışması ile NGS'nin rifampisin, izoniyazid, florokinolonlar ve enjekte edilen ikinci seçenek ilaçlar için direnç saptamada güvenilir olduğu gösterilmiştir³⁶. Bu sonuca göre TB sürveyansında ilaç direncinin gerçek prevalansını tahmin etmek için NGS fenotipik test yerine kullanılabilir. Uluslararası NGS uzmanlarından oluşan gruplar dünya çapında binlerce MTBK türünden toplanan genomik ve fenotipik veri havuzları oluşturmuştur. Bu gruplar, kullanıcılar için ham WGS verilerinin mutasyon listelerine ve ilaç direnç panellerine otomatik olarak işlenmesine izin veren sistemleri sağlamaktadır.

Pirodizileme ise kısa (<100 bp) DNA parçalarını dizilemede kullanılan gerçek zamanlı çoğaltmaya dayalı, hızlı (1 nükleotit/dk) bir dizileme sistemidir⁵⁵. Ticari moleküler sistemlere göre daha fazla ilaca karşı direnci saptayabilir. Klinik örnekten veya izolattan çalışılabilir. Birinci ve ikinci seçenek ilaçlara karşı direnç sonuçlarının duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bulunmuştur⁵⁵.

Sonuç

Tüberkülozun ve ÇİD-TB'nin hızlı tanısı küresel TB kontrolünün temel öğelerinden biridir. Tüberküloz tanısında altın standart yöntem kültürdür. Ancak kültüre dayalı yöntemlerin sonuçlanması haftalarca sürmektedir. Moleküler yöntemler ise haftalar, hatta aylar öncesinden TB tanısının ve direnç özelliklerinin belirlenmesini sağlar. Yayma pozitif örneklerde moleküler yöntemlerin duyarlılığı çok yüksektir. Duyarlılığı daha düşük olmakla birlikte çocuk hasta, HIV pozitif hasta ve akciğer dışı TB gibi basil sayısının az olduğu olguların tanısına da yardımcı olur. Bu nedenle moleküler testler tüm dünyada TB tanısı için veya TB tanısını dışlamak için iş akış şemalarına girmiştir.

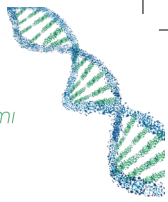
Moleküler testlerin maliyeti geleneksel tanı yöntemlerine göre daha yüksek olmakla birlikte, kültür ve kültüre dayalı birinci veya ikinci seçenek ilaç duyarlılık testlerinin toplam maliyetleri ile karşılaştırıldığında kullanımları maliyet etkindir. Dünya Sağlık Örgütü moleküler testlerin kullanımını

güçlü bir şekilde desteklemektedir. Ancak hiçbir tanı testi %100 doğrulukta değildir. Moleküler testlerin kısıtlı yönlerinin iyi bilinmesi ve sonuçların mutlaka yayma sonucu ve hastaların klinik özelliklerine göre değerlendirilmesi gerekir. Moleküler testler kültürün ve fenotipik duyarlılık testlerinin yerini almamalıdır. Fenotipik ve moleküler direnç test sonuçlarının uyumsuz olduğu durumlarda tedavi fenotipik test sonucuna göre düzenlenmelidir.

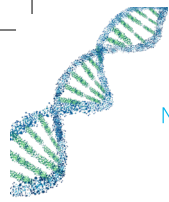
Moleküler testlerde yalnızca duyarlı veya dirençli sonucu vermek yerine saptanan mutasyonu yorumlayarak çapraz direnç olasılıkları veya direnç düzeyi hakkında yorum yapılması klinisyenin tedaviyi düzenlemesinde daha yararlı olacaktır. Bu bilgilerin edinilmesi için tam gen dizileme çalışmaları ile eş zamanlı fenotipik duyarlılık testlerinin epidemiyolojik amaçlı yapılması gerekir. Bu çalışmaların referans laboratuvarlarında yapılması daha uygundur. Tüberküloz laboratuvarlarında moleküler veya fenotipik test ile rifampisine dirençli veya ÇİD/YİD-TB izolatlarının referans laboratuvarına gönderilerek ileri moleküler analizlerin yapılması, direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve tanı testlerinin iyileştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Kritski AL, Viveiros M, Carvalho ACC. Rapid molecular diagnostics to detect resistance to second-line anti-TB drugs. *Int J Tuberc Lung Dis* 2022;26(5): 385-387.
3. Acharya B, Acharya A, Gautam S, et al. Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Rep* 2020;47(5): 4065-4075.
4. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. Nimesh M, Joon D, Pathak AK, Saluja D. Comparative study of diagnostic accuracy of established PCR assays and in-house developed *sdaA* PCR method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in symptomatic patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect* 2013;67(5): 399-407.
7. Doyle RM, Burgess C, Williams R, et al. Direct Whole-Genome Sequencing of sputum accurately identifies drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* faster than MGIT culture sequencing. *J Clin Microbiol* 2018;26;56(8): e00666-18.
8. Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, et al. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clin-



- cal Practice Guidelines: Diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis* 2017;64(2): 111-115.
9. Report of an expert consultation on the uses of nucleic acid amplification tests for the Diagnosis of Tuberculosis. www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/amplification_tests/amplification_tests.pdf. Erişim tarihi:29 Temmuz 2022
 10. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi", Sağlık Bakanlığı Yayın No 1129, 2. Baskı, Ankara, 2019.
 11. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2018;31(2): e00038-17.
 12. Banaei N, Musser KA, Salfinger M, Somoskovi A, Zelazny AM. Novel assays/applications for patients suspected of mycobacterial diseases. *Clin Lab Med* 2020;40(4): 535-552.
 13. Huang M, Tan Y, Zhang X, et al. Effect of mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria on diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: A retrospective multicentre study in China. *Infect Drug Resist* 2022;20;15: 157-166.
 14. Singh, K., Kumari, R., Tripathi, R. et al. Mutation in *MPT64* gene influencing diagnostic accuracy of SD Biline assay (capilia). *BMC Infect Dis* 2019;19(41): 1048.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. MM18-A: interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 16. Somoskovi A, Salfinger M. The race is on to shorten the turnaround time for diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2015;53(12): 3715-3718.
 17. Nguyen TNA, Anton-Le Berre V, Bañuls AL, Nguyen TVA. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis; A literature review. *Front Microbiol* 2019;16;10: 794.
 18. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 19. Mukinda FK, Theron D, van der Spuy GD, et al. Rise in rifampicin-resistant tuberculosis in Western Cape, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16(2): 196-202.
 20. Boyd R, Ford N, Padgen P, Cox H. Time to treatment for rifampicin-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2017;21(11): 1173-1180.
 21. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 935, Ankara, 2014.
 22. Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, et al. TBNET; RESIST-TB networks. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016;20(1): 24-42.
 23. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.5). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 24. Walz G, McNerney R, du Plessis N, et al. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *Lancet Infect Dis* 2018;18(7): e199-e210.
 25. Singh P, Saket VK, Kachhi R. Diagnosis of TB: From conventional to modern molecular protocols. *Front Biosci* 2019;11(1): 38-60.
 26. Cirillo DM, Miotto P, Tortoli E. Evolution of phenotypic and molecular drug susceptibility testing. *Adv Exp Med Biol* 2017;1019: 221-246.
 27. Dohál M, Porvazník I, Pršo K, Rasmussen EM, Solovič I, Mokry J. Whole-genome sequencing and *Mycobacterium tuberculosis*: Challenges in sample preparation and sequencing data analysis. *Tuberculosis (Edinb)* 2020;123: 101946.
 28. Machado D, Couto I, Viveiros M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. *Infect Genet Evol* 2019;72: 93-112. Cazabon D, Pande T, Kik S, et al. Market penetration of Xpert MTB/RIF in high tuberculosis burden countries: A trend analysis from 2014-2016. *Gates Open Res* 2018;2: 35-38.
 29. Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio* 2017;8(4): e00812-17.
 30. Köser CU, Feuerriegel S, Summers DK, Archer JA, Niemann S. Importance of the genetic diversity within the *Mycobacterium tuberculosis* complex for the development of novel antibiotics and diagnostic tests of drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(12): 6080-6087.
 31. Feliciano CS, Namburete EI, Rodrigues Plaça J, et al. Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. *Tuberculosis (Edinb)* 2018;110: 59-67.
 32. Somoskovi A, Salfinger M. How can the tuberculosis laboratory aid in the patient-centered diagnosis and management of tuberculosis? *Clin Chest Med* 2019;40(4): 741-753.
 33. Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29Suppl1: 34-40.
 34. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(5): 1138-1151.
 35. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 36. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.19). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 37. Hofmann-Thiel S, Hoffmann H, Hillemann D, Rigouts L, Van Deun A, Kranzer K. How should discordance between molecular and growth-based assays for rifampicin resistance be investigated? *Int J Tuberc Lung Dis* 2017;21(7): 721-726.
 38. Cohen KA, Manson AL, Desjardins CA, Abeel T, Earl AM. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges. *Genome Med* 2019; 11(1): 45.
 39. Sonnenkalb L, Strohe G, Dreyer V, et al. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* subpopulations and heteroresistance in a patient receiving 27 years of tuberculosis



- treatment in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;17;65(7): e0252020.
45. Metcalfe JZ, Streicher E, Theron G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subculture results in loss of potentially clinically relevant heteroresistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;24;61(11): e00888-17.
 46. Van Rie A, Whitfield MG, De Vos E, Scott L, Da Silva P, Hayes C, Heupink TH, Sirgel FA, Stevens W, Warren RM. Discordances between molecular assays for rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: frequency, mechanisms and clinical impact. *J Antimicrob Chemother* 2020;75(5): 1123-1129.
 47. Chopra KK, Sidiq Z, Hanif M, Dwivedi KK. Advances in the diagnosis of tuberculosis- Journey from smear microscopy to whole genome sequencing. *Indian J Tuberc* 2020;67(4S): S61-S68.
 48. Lange B, Khan P, Kalmambetova G, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF cycle threshold level to predict smear positivity: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2017;21(5): 493-502.
 49. Jiang J, Yang J, Shi Y, Jin Y, Tang S, Zhang N, Lu Y, Sun G. Head-to-head comparison of the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis: a meta-analysis. *Infect Dis (Lond)* 2020;52(11): 763-775.
 52. Foundation for Innovative New Diagnostic, 2017. Report for WHO: A multicentre noninferiority diagnostic accuracy study of the Ultra assay compared to the Xpert MTB/RIF assay. FIND, Geneva.
 53. Kay AW, González Fernández L, Takwoingi Y, et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra assays for active tuberculosis and rifampicin resistance in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;27;8(8): CD013359.
 55. Opota O, Mazza-Stalder J, Greub G, Jaton K. The rapid molecular test Xpert MTB/RIF ultra: towards improved tuberculosis diagnosis and rifampicin resistance detection. *Clin Microbiol Infect* 2019;25(11): 1370-1376.
 56. Kohli M, Schiller I, Dendukuri N, et al. Xpert MTB/RIF Ultra and Xpert MTB/RIF assays for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2021;1(1): CD012768.
 57. Ramachandran R, Muniyandi M. Rapid molecular diagnostics for multi-drug resistant tuberculosis in India. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2018;16(3): 197-204.
 58. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016. WHO/HTM/TB/2016.13
 59. de Vos M, Derendinger B, Dolby T, et al. Diagnostic accuracy and utility of FluoroType MTBDR, a new molecular assay for multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2018;27;56(9): e00531-18.
 60. Shah M, Paradis S, Betz J, et al. Multicenter study of the accuracy of the BD MAX Multidrug-resistant Tuberculosis assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and mutations associated with resistance to rifampin and isoniazid. *Clin Infect Dis* 2020;22;71(5): 1161-1167.
 61. Shete PB, Farr K, Strnad L, Gray CM, Cattamanchi A. Diagnostic accuracy of TB-LAMP for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2019;19(1): 268.
 63. Satta G, Lipman M, Smith GP, Arnold C, Kon OM, McHugh TD. *Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? *Clin Microbiol Infect* 2018;24(6): 604-609.
 64. Getachew E, Adebeta T, Gebrie D, Charlie L, Said B, Assefa DG, et al. Pyrosequencing for diagnosis of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: A systemic review and meta-analysis. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 2021;29;24: 100254.