

TÜBERKÜLOZ LABORATUVARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Prof. Dr. Rıza DURMAZ
İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Klasik laboratuvar tanı yöntemlerinden mikroskopinin özgüllük ve duyarlılığının düşük olması, kültür yöntemlerinin ise uzun zaman alması nedeniyle moleküler yöntemler tüberküloz laboratuvarlarına çok hızlı bir şekilde girmiş ve farklı uygulama alanları bulmuştur. Moleküler yöntemler klinik örneklerde bulunabilecek etkenin kısa sürede gösterilmesi, tanımlanması, alt tiplene ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılmaktadır.

Mikobakterilerin tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması

Tanıda kullanılan moleküler yöntemlerin başında polimeraz zincir reaksiyon (PZR) gelmektedir. Geliştirilen ticari kitlerle örneklerin işlenmesi, amplifikasyon ve sonuç gözleme standardize edilerek laboratuvarlar arası uyumsuzluklar giderilmeye çalışılmıştır. PZR yönteminin ticari olarak üretilmiş şekli (COBAS AMPLICOR PCR) solunum yolu örnekleri için önerilmekte ve genel olarak duyarlılık %66.7-85.2, özgüllük %98.8-99.7 olarak bulunmakta; mikroskopi pozitif olan örneklerde duyarlılık %92.6-96.1'e çıkmakta, negatif olanlarda ise %48-71.7'ye düşmektedir (1-3). Aynı kitin beyin omurilik sıvılarında uygulanması halinde duyarlılık %60 (4), solunum yolu dışındaki diğer örneklerde %61-100 (2) olmaktadır. Laboratuvarımızda "Cobas Amplicor PCR" sistemi kullanılarak incelenen 928 örnekte pozitiflik %12.5, kültürle incelenen 1179 örnekte pozitiflik %8.7, mikroskopla incelenen 1932 örnekte pozitiflik %4.6 olarak saptanmıştır (Tablo1). Mikroskopi ve/veya kültür pozitif solunum yolu örnekleri için duyarlılık %75.4, BOS ve idrar örneklerindeki duyarlılık ise %50 olarak bulunmuştur.

Solunum yolu örneklerinde kullanılmak üzere üretilmiş diğer bir kit "Gen-Probe Amplified Mycobacterium Direct Test" (Gen-Probe)'tir. Bu testte, hedef molekül olarak her hücrede yaklaşık 2000 kadar bulunabilen rRNA seçilerek, duyarlılığı artırmak hedeflenmiştir. Kültür pozitif solunum yolu örneklerinde yöntemin duyarlılığı %91-98.4 iken, özgüllük %98.5-98.9 olarak saptanmıştır (5,6). Solunum yolu dışındaki örneklerde duyarlılık %20-100, özgüllük %95-96.4 olarak belirlenmiştir (5).

Diğer bir moleküler yöntem olan zincir ayrıştırma amplifikasyon (strand displacement amplification=SDA) ile solunum yolu örneklerinden tüberküloz basillerinin araştırılmasında; kültür ve mikroskopi pozitif örneklerin tamamından pozitif sonuç alınmış, testin özgüllüğü %85-94 arasında bulunmuştur (7). Yöntemin bir versiyonu olan "BDProbeTec-SDA" ile kültür pozitif örneklerin %94.7'sinden pozitif sonuç alınırken, özgüllük %99.8 olarak saptanmıştır (8).

Tüberkülozun tanısında alternatif bir DNA amplifikasyon yöntemi olan Ligaz zincir reaksiyon (Ligase chain reaction=LCR) ticari kit halinde üretilmiştir. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda; klinik örneklerle göre değişmekle birlikte duyarlılık %84-97.5, özgüllük %95.8-100 olarak bulunmuştur (9-11).

Tüberkülozun tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemlerle moleküler tanı yöntemlerinin bir karşılaştırılması Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo1. Çeşitli klinik örneklerde mikroskopi, kültür ve PZR sonuçları.

Örnek cinsi	ARB (+)	ARB (-)	KÜLTÜR (+)	KÜLTÜR (-)	PZR (+)	PZR (-)
Balgam	39 (6.31)	579	47 (11.98)	345	43 (14.3)	256
İdrar	18 (2.94)	594	16 (5.1)	296	14 (5.88)	224
BOS	3 (1.38)	214	8 (3.96)	194	16 (7.8)	187
Pl. mai	4 (5.4)	70	5 (7.24)	64	7 (14.2)	42
BAL	8 (12.5)	56	11 (20.7)	42	13 (27.6)	34
Doku	1 (14.2)	6	3 (37.5)	5	6 (54.5)	5
AMS	4 (7.54)	49	4 (14.8)	23	7 (21.2)	26
Kan	-	12	2 (14.2)	12	3 (33.3)	6
Diğer	12 (4.36)	263	7 (6.86)	95	7 (17.9)	32
Toplam	89 (4.6)	1843	103 (8.7)	1076	116 (12.5)	812

Tablo 2. Tüberkülozun tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.

Yöntem	Duyarluluk	Özgüllük	Süre	Maliyet
Mikroskopi (ARB)	Orta	Orta*	Dakikalar	Düşük
Kültür	İyi	Mükemmel	3-12 hafta	Orta
Nükleik asit çoğaltma yöntemleri	Kültür/mikroskopi(+)		Saatler	Yüksek
PZR	%92-96	%99-100		
TMA	%91-98	%98.5-99		
LCR	%84-97.5	%96-100		
SDA	95-100	%85-94		

* İdrar, açlık mide suyu veya dışkıda normal florada bulunan mikobakterilere bağlı hatalı pozitif sonuçlar alınabilmektedir.

Tüberküloz laboratuvarlarında fazla sayıda değişik moleküler tanı yöntemleri denenmiş olmakla birlikte, bu yöntemlerin hiç biri henüz mikroskopi ve kültür gibi konvensiyonel yöntemlerin yerini alamamışlardır. Bunun başlıca nedenleri şunlardır (1,12): (1) Amplifikasyona dayalı yöntemlerin genel pozitiflik oranlarının ve duyarlılığının kültürden anlamlı derecede yüksek olmayışı. Bu durum; balgam, idrar ve BOS gibi örneklerde bulunan inhibitörlere veya uygun olmayan örnek alma ve işleme koşullarının kullanılmasına bağlıdır. Homojenizasyon ve dekontaminasyon ile örnekteki canlı basillerin %80'inin kaybolabileceği hesaplanmıştır (13). Ayrıca kültür için kullanılan örnek miktarı, genelde, moleküler yöntemler için kullanılan 4-20 kat daha fazladır. Tüberküloz basillerinin küme halinde bir arada bulunma özellikleri göz önüne alındığında, iyice homojenize edilmemiş örneklerde çalışılan hacim azaldıkça duyarlılık da azalmaktadır. (2) Amplikon veya pozitif klinik örneklerin birbirine karışmasına bağlı olarak hatalı pozitiflikler olabilmektedir. (3) Her klinik örnek için kullanılacak, standardize edilmiş ticari kitin henüz bulunmayışı. Mevcut ticari kitler genelde solunum yolu örnekleriyle çalışılmaya uygundur. (4) Tedavi görmüş olan hastalarda, klinik örnekte ölü basil varlığında bile DNA yöntemleriyle pozitif sonuç alınabileceğinden, tedavinin etkinliğini takip için kültür gerekli olmaktadır. Bir çalışmada altı aylık tedaviden sonra örneklerin tamamında kültür negatif olduğu halde, %25 örnekte SDA ve PZR yöntemleriyle pozitif sonuç alınmıştır (14). Genelde teknik tam olmadan, gerekli internal ve eksternal kontroller sağlanmadan, PZR yönteminin tüberkülozun rutin tanısında kullanılmaması önerilmektedir (15).

DNA prob tekniği kullanılarak klinik örneklerden mikobakterilerin saptanması, identifikasyonu, genotipleme ve antimikrobial ilaçlara direnç durumunu belirlemek olasıdır. İdeal olarak hibridizasyonun kültürden daha duyarlı olması beklenir. Ancak ticari olarak geliştirilmiş olan Gen-Probe sistemi, klinik örnekle pozitif sonuç verebilmesi için yaklaşık $1-3 \times 10^7$ basil gereksinir (16).

Mikobakterilerin tanısı ve tiplendirmelerinde moleküler yöntemlerin kullanılması

Lowenstein-Jensen veya Bactec 460 sıvı ortamlarından alınan örneklerde tüberküloz basillerine özgü amplifikasyon (IS6110 gen bölgesine özgü primerler kullanılarak) yapılarak, üreyen bakterinin *M. tuberculosis* kompleksi içinde olup olmadığı anlaşılabilir. Mikobakterilerde tür ayrımı yapabilmek için;

- 16s rRNA/DNA amplifikasyonunu takiben dizi analizi veya hibridizasyon yapılarak veya
- "Heat shock protein 65" (*hsp*) geninin amplifikasyonu ve restriksiyon endonükleazlar ile kesimi kullanılmaktadır.

16S rRNA/DNA gen bölgesinin tüm bakterilerde ortak olan korunmuş bölgesinin olması ve bu korunmuş bölge içinde her bir mikroorganizma için özgül olan bölgenin (signature /hyper variable bölge) bulunmasından yararlanılmaktadır. Önce tüm bakterilerde ortak olan korunmuş bölgeye özgü primerlerle amplifikasyon yapılmakta, sonra ya aşırı değişken bölgenin dizi analizi yapılarak veya türe özgü problemlerle hibridizasyon yapılarak tür ayrımına gidilmektedir.

Hsp gen bölgesinin bir bölümü tüm mikobakterilerde ortak olan bölgeye özgü primerler ile amplifiye edilmekte, amplifikasyon ürünü *Bst*II ve *Hae*III restriksiyon endonükleazlar ile kesilmekte, oluşan parçaların elektroforezdeki farklılıklarına göre tür ayrımı yapılmaktadır.

Moleküler tiplendirme yöntemleriyle salgın esnasında izole edilen tüberküloz basillerinin epidemiyolojik yönden birbiriyle olan ilişkilerini belirlemek, salgının kaynağını bulmak ve laboratuvar kontaminasyonunu ortaya çıkarmak mümkün

olabilmektedir (17-20). Standart referans yöntem olan “IS6110 restriction fragment length polymorphism (IS 6110-RFLP)” yöntemi kullanılarak, tüberküloz insidansının yüksek olduğu ilimizde, 2000 yılında aktif tüberküloz hastalarından kültürü pozitif olan 94 hastaya ait *M. tuberculosis* suşunun tipleniş yapıldı. İncelenen izolatların içerisinde 74 (%78.7) farklı RFLP profili saptandı. Dirençli ve duyarlı suşlar arasındaki DNA profil farklılığı sırasıyla %85.7 ve %93.2; ortak profil bulundurma oranları ise sırasıyla %25.7 ve %18.64 olarak saptandı.

Mikobakterilerde direncin saptanmasında moleküler yöntemlerin kullanılması

Moleküler yöntemlerin direnç takibinde kullanılmaları da tanıda olduğu gibi tüberküloz basilleri üzerinde yoğunlaşmıştır. PZR teknolojisi ile mikobakterilerin başta rifampin olmak üzere, izoniazid, streptomisin, etambutol, klaritromisin ve florokinolonlara olan direnç durumları hakkında bilgi edinilebilmektedir (21,22).

Mikobakterilerde rifampin direnci, özellikle çoğul ilaç direncinin önemli bir göstergesidir. Kısa sürede saptanması tedavi protokolünün belirlenmesi açısından oldukça yararlıdır. Rifampin RNA polimeraz enziminin β alt ünitesine bağlanarak transkripsiyon ve RNA'nın uzamasını engellemektedir. Mikobakterilerdeki rifampin direnci, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin β alt ünitesini kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Dirençli suşların %95'inde mutasyonlar *rpoB* genindeki 81-baz çiftlik kor bölgesinde bulunmaktadır. Bu bölgedeki mutasyonların kısa sürede gösterilmesi amacıyla PZR-“single-strand conformation polymorphism”, “heminested” PZR, PZR “heteroduplex analysis”, PZR-baz dizi analizi, PZR-“line probe assay” gibi yöntemler geliştirilmiştir (22-25).

Ticari kit olarak geliştirilmiş olan “line probe assay kit” (Inno-LiPA Rif.TB) ile mutasyonları içeren 255 bazlık bölgenin amplifikasyonu yapıldıktan sonra, mutasyonlara özgü problarla hibridizasyon yapılarak rifampin direnci araştırılmaktadır. Bu yöntem, fenotipik duyarlılık test sonuçlarıyla %90.2 oranında uyumlu bulunmuştur (24).

“Real-time” PZR yöntemiyle, rifampin direnci yanında, yüksek seviyede izoniazid direnci de araştırılabilmektedir. Tek tüp içerisinde yapılan real-time PZR'da; rifampin ve izoniazid direncinde en fazla görülen mutasyonları (rifampin için 526 ve 531 nolu kodonlarda, izoniazid için 315 nolu kodonda) içine alan bölgelerin amplifikasyonunu sağlayacak primerler, floresans veren madde ile işaretli prob ve mutasyonlarla uyumlu işaretli problar kullanılmaktadır. Amplifikasyon, hibridizasyon ve analiz işlemlerinin kapalı tek tüp içinde yapıldığı bu yöntem 30 dakikada tamamlanmakta, rifampin ve izoniazide dirençli olan suşların tamamı doğru olarak saptanabilmektedir (23,26).

Rifampin direncinin saptanmasında kullanılan real-time PZR yönteminin diğer bir uygulama şeklinde “molecular beacon” olarak adlandırılan yeni hibridizasyon problarından yararlanılmaktadır (26). Yöntemin duyarlılığı %97, özgüllüğü %100 olarak bulunmuş ve mikroskopisi pozitif örneklerle direkt olarak uygulanabileceği gösterilmiştir (27).

İzoniazid direncinin moleküler yöntemlerle araştırılması oldukça kompleks bir işittir. Araştırmalar en az dört (*katG*, *inhA*, *ahpC* ve *kasA*) gende değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Bunlardan *katG* genindeki mutasyonun dirençteki önemi açık olarak gösterilmiştir. Bu gendeki yalnızca bazı mutasyonların (315 nolu kodon) yüksek seviyede ilaç direncinden sorumlu olduğu, diğerlerinin ise dirençle ilişkili olmadıkları belirtilmektedir (23).

Kaynaklar:

- 1-Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, et al. Muticenter study of a 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.
- 2- Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2853-2860.
- 3- D'amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1832-1834.
- 4-Bonington A, Strang G, Klapper PE et al. Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculosis meningitidis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1251-1254.
- 5-Vlaspolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2699-2703.
- 6-Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 393-397.
- 7- Down JA, O'Connell MA, Dey MS et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by strand displacement amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 860-865.
- 8- Ichiyama S, Ito Y, Sugiura F, et al. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997 ; 35 : 3082-3085.
- 9-Ruiz-Serrano MJ, Albadalejo J, Martinez-Sanchez L, Bouza E. LCx: a diagnostic alternative for the early detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 259-264.
- 10-Viinanen AH, Soini H, Marjamaki M, Liippo K, Viljanen MK. Ligase chain reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacterioses. *Ann med* 2000; 4: 279-283.
- 11-Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N et al. Comparison of the ligase chain reaction with solid and liquid culture media for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis* in nonrespiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect* 1998; 17: 767-772.
- 12- Durmaz R. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde sorunlar ve standardizasyon. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp kitabevleri Ltd.şti., İstanbul, 2001. s:45-56.
- 13-Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, et al. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution end points of its detection by the Amplicor PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1944-1947.
- 14-Hellyer TJ, Fletcher TW, Bates JH, et al. Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1996 ; 173(4): 934-941.
- 15-Grosset J, Mounton Y. Is PCR a useful tool for the diagnosis of tuberculosis in 1995?. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 183-184.
- 16-Pfaller MA. Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacteria*. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:329-337.
- 17-Montoro E, Valdivia J, Leao SC. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3099-3102.
- 18-Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD, Riley LW. Double-repetitive -element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1383-1384.
- 19-Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- 20-Durmaz R. Türkiye'de tüberküloz basillerinin moleküler epidemiyolojisi. XXIX Türk Mikrobiyolojisi Kongresi Program ve Özet Kitabı. Cengiz AT, Erdem B, Dolapçı Gİ, Tekeli FA (eds). Ankara, 2000. s:119-121.
- 21-Shanson D.C. *Microbiology in Clinical Practice*. 3rd ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp:234-249, 1999.

- 22-Imboden P, Cole S, Bodmer T, Telenti A. Detection of rifampin resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae*. In Diagnostic Molecular Microbiology, ; Principles and Applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ(Eds), ASM Press, Washington D.C, 1993. pp:519-526.
- 23-Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and flourometry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000; 38: 3194-3199.
- 24- Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT. Evaluation of a Line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutation in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York city. J Clin Microbiol 1997; 35: 1281-1283.
- 25-Williams DL, Limbers CW, Spring L et al. PCR-heteroduplex detection of rifampin-resistant *M. tuberculosis*. In PCR Protocols for Emerging Infectious Disease, Persing DH (Editor in Chief) ASM Press Washinton, D.C. 1996, pp:122-129.
- 26-Garcia De Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detection in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 988-995.
- 27-El-Hajj HH, Marras SAE, Tyagi S, Kramer FR, Alland D. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. J Clin Microbiol 2001; 39: 4131-4137.