

Tüberküloz Tanısında Yeni Moleküler Testler

Prof. Dr. Cengiz ÇAVUŞOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Bornova-İZMİR

Hızlı tanıda kullanılan yöntemler

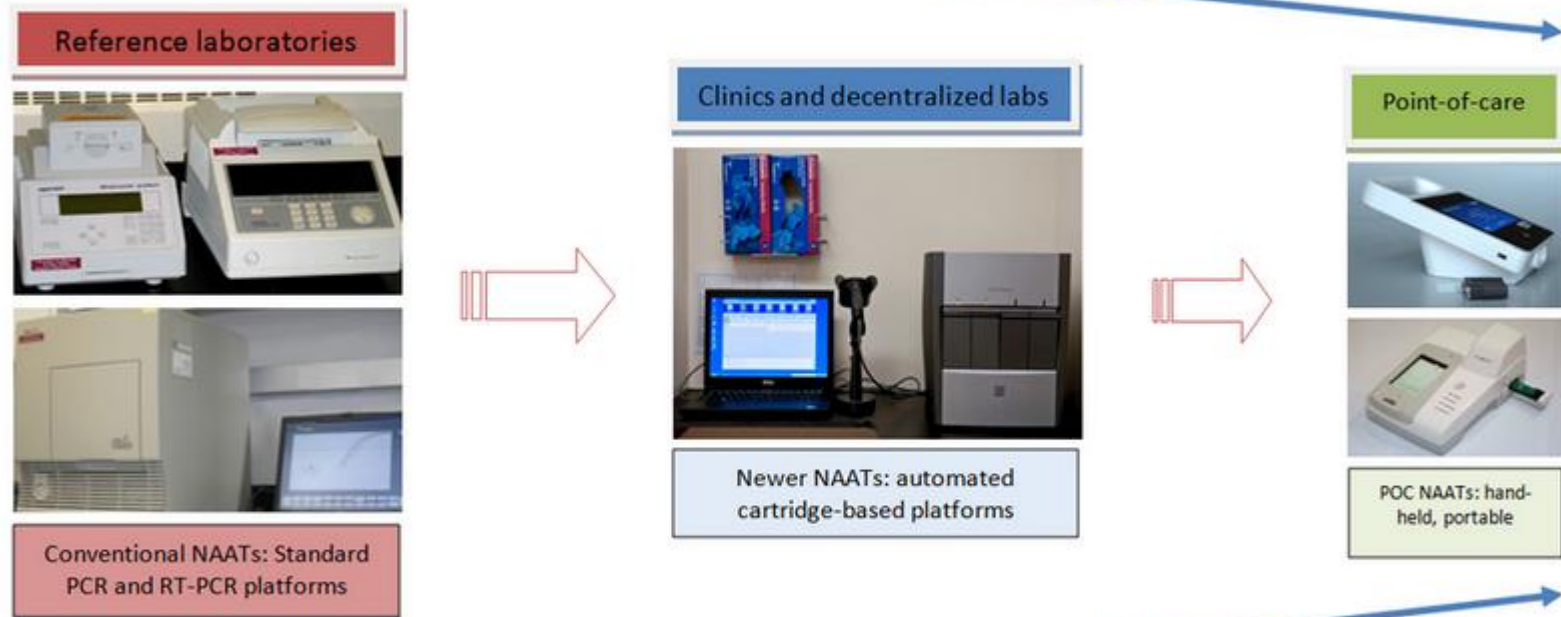
- PCR (Polymerase chain reaction)

- Konvansiyonel PCR
- Real-time PCR

- İzotermal amplifikasyon yöntemleri

- TMA (*Transcription-mediated amplification*)
- NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*)
- SMART (*Signal mediated amplification of RNA technology*)
- SDA (*Strand displacement amplification*)
- LAMP (*Loop mediated amplification*)
- CPA (*Cross priming amplification*)
- NEAR (*Nicking enzyme amplification reaction*)
- RPA (*Recombinase polymerase amplification*)
- HDA (*Helicase-dependent amplification*)
- RCA (*Rolling circle amplification*)
- RAM (*Ramification amplification*)
- SMART-AMP (Smart amplification)
- NEMA (*Nicking enzyme mediated amplification*)
- ICA (*Isothermal chain amplification*)
- EXPAR (*Exponential amplification reaction*)

Hızlı tanıda kullanılan yöntemler



İdeal bir hasta başı tanı testinde olması gereken özellikler

- *Point-of-care (POC) diagnostic test*
- Duyarlı (Kültürle karşılaştırıldığında)
 - Yayma pozitif örneklerde >%95
 - Yayma negatif örneklerde >% 60
- Özgül
 - Kültürle karşılaştırıldığında >%95
- Hızlı
 - < 3 saat içinde sonuçlanmalı
- Direnci saptamalı
- Ucuz
 - <10 USD

İdeal bir hasta başı tanı testinde olması gereken özellikler

- Kullanım kolaylığı

- Kullanımı için minimal eğitim yeterli olmalı
- Değerlendirmesi kolay olmalı
- Günde en az 20 örnek çalışabilmeli
- Batarya ile çalışabilmeli
- Raf ömrü olmalı >24 ay olmalı
- Yüksek ısılarda ve nemli koşullarda saklanabilmeli
- Farklı tipte örnekler çalışabilmeli
- Çevre dostu olmalı



TB'nin moleküler tanısındaki gelişmeler Temmuz 2013

- **DSÖ tarafından desteklenenler**

- Xpert MTB/RIF
- *Line probe assay*ler (yayma pozitif balgam örnekleri veya kültür pozitif örnekler)

GeneXpert MTB/RIF

• Temmuz 2013 itibarıyla *M.tuberculosis* ve RIF direncini birlikte saptayan tek tam otomatize real-time PCR temelli kartuş testtir

• 2010 yılından sonraki gelişmeler

– Kartuşta yapılan geliştirmelerle duyarlılıkta azalma olmadan özgüllük artışı sağlandı

– Programda, akışkanlarda ve B probunda modifikasyonlar yapıldı

• Prop sayısının 10'a çıkartıldığı MBR-TB prototipi geliştirme aşamasındadır

GeneXpert MTB/RIF

1) Örneğin
"Sample reagent"
ile inaktivasyonu



- Cihazda 1-64 modül bulunabilir

- Kartuşlar oda ısısında 6-9 ay saklanabilir
- Ekstraksiyon, amplifikasyon ve tanımlama için reagenler liyofilize halde kullanıma hazır olarak cihazda bulunur
- Kontaminasyon riski çok azdır

- 5 adet «Molecular beacon» prop kullanılır
- *rpoB* geni çoğaltılır
- MTB ve RIF direnci saptanır
- Referans laboratuvar sonuçları ile moleküler testler konusunda deneyimsiz laboratuvarın sonuçları uyumlu



abini
yama

Lancet Infect Dis. 2013 ;13(4):349-61
Respirology (2013); 18, 217-232
J Clin Microbiol. 2010 ;48(7):2495-501
J Clin Microbiol 2010 ;48(1):229-37
WHO; Global Tuberculosis Report 2012

GeneXpert MTB/RIF

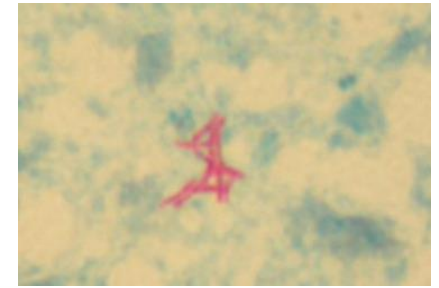
- Duyarlılık

- Tüm akciğer tüberkülozlu olgularda %90(%86)
- Yayma (+) olgularda %99 (%100)
- Yayma (-) olguların %75 (%74)

- Yanlış pozitif RİF direnci olabilir

- Yayma negatif solunum dışı örneklerde duyarlılık düşük (%37-67)

- Duyarlılık



Sıvı kültür <

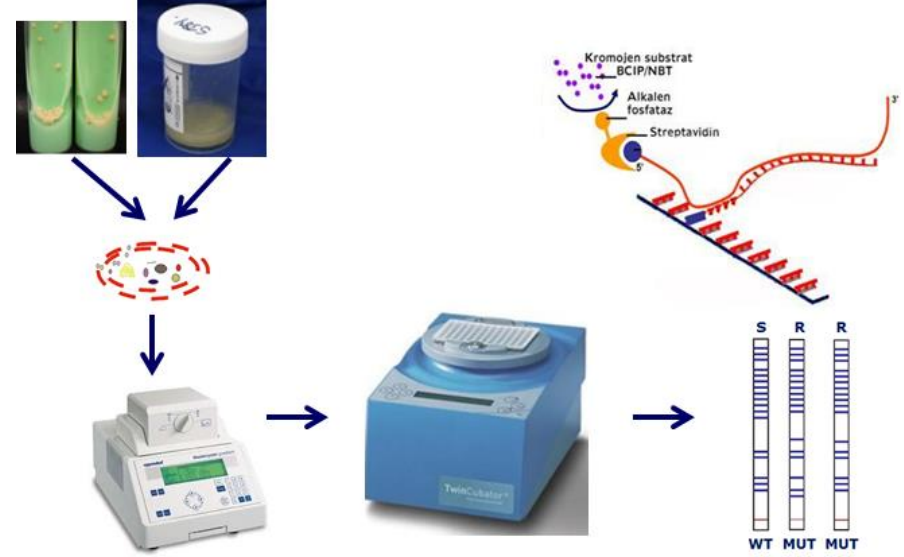
Xpert =

Katı kültür >

Mikroskopi

MTBDR_{plus} V2

- PCR-revers hibridizasyon temelli
- Yayma pozitif/negatif solunum örneklerinden ve kültürden çalışılabilir
- Tüm işlemler ~5 saat içinde tamamlanır
- RIF direnci → *rpoB*
- INH direnci → *katG* ve *inhA*



- Yayma (-) örneklerde duyarlılık düşük
- DSÖ referans laboratuvarlarda yayma pozitif solunum örneklerinden ve kültürden çalışılmasını onaylıyor

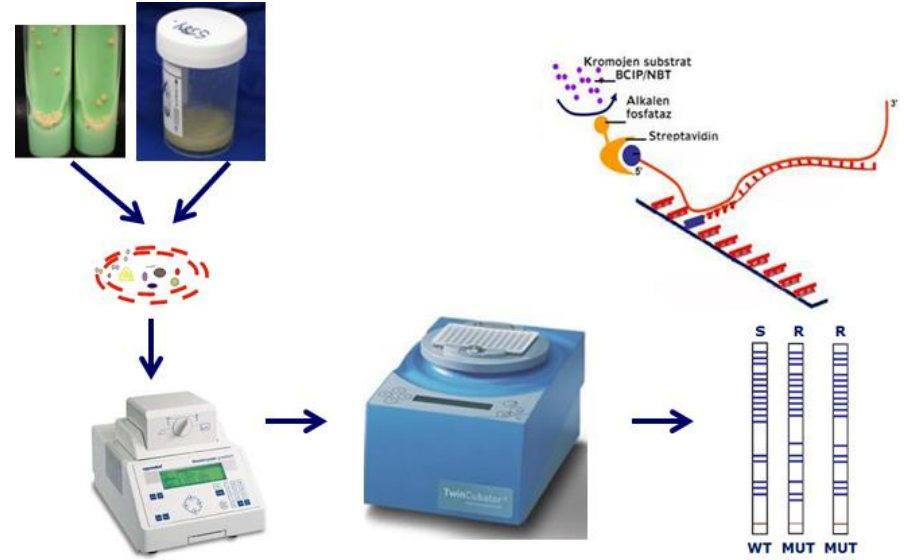
J Clin Microbiol 2012; 50 (11): 3712-16, PLOS
Medicine 2011; 8 (7); e1001061
WHO GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2013

TB'nin moleküler tanısındaki gelişmeler Temmuz 2013

- **DSÖ tarafından değerlendirilen ve henüz desteklenmeyenler**
- TB LAMP, Eiken, Japonya
- Genotype MTBDRsl, Hain LifeScience, Almanya

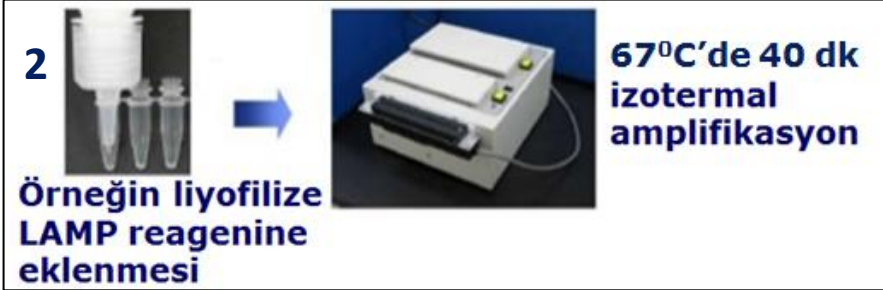
MTBDRs/

- PCR-revers hibridizasyon temelli
- Yayma pozitif solunum örneklerinden ve kültürden çalışılabilir.
- Tüm işlemler ~5 saat içinde tamamlanır
- Etambutol direnci → *embB*
- Amikasin, kanamisin direnci → *rrs*
- Kinolon direnci → *gyrA*



- DSÖ tarafından kinolon ve enjektabil ilaç direnci saptamada duyarlılığı yeterli bulunmadı
- YİD-TB'nin saptanmasında referans standart fenotipik duyarlılık testleri

Loopamp



- LAMP temelli izotermal amplifikasyon
- Tüm test 1 saat içinde tamamlanıyor
- Akciğer tüberkülozunda
- Duyarlılık
 - Yayma (+) %97.7-98.2
 - Yayma (-) %48.8-55.6
- Özgüllük %96.2
- DSÖ tarafından özellikle yayma (-) örneklerde performansı yeterli bulunmadı

TB'nin moleküler tanısındaki gelişmeler Temmuz 2013

•Geliştirme aşamasındakiler

- Gendrive MTB/RIF ID, Epistem, BK
- Alere Q, Alere, ABD
- B-SMART, LabCorp, ABD
- LATE-PCR, Brandies Univesity, ABD
- GeneXpert XDR kartuşu, Cepheid, ABD
- TruArray MDR-TB, Akkoni, ABD
- INFINITIMTB Assay, AutoGenomics, ABD

Gendrive MTB/RIF ID

- 560 g ağırlığında, taşınabilir, kartuş temelli, Real-time PCR sistemidir.
- MTB ve RIF direncini saptıyor.
- Amplifikasyon ve saptama aynı cihazla yapılır.
- Saptama için prop ve erime eğrisi analizi kullanılır.
- Tüm işlemler <45 dakika içinde sonuçlanır.
- Cihaz 12 V doğru akımla çalışabiliyor.
- Duyarlılık >%90–95, özgüllük >%95
- Cihazın ücreti 2000-4000 USD, kartuşlar 10-17 USD olarak öngörülüyor.



Alere Q

- Tüberküloz tanısı (NEAR-temelli izotermal amplifikasyon)
- Direnç saptama (PCR)
- Birinci seçenek ilaçlar
 - RiF (*rpoB*)
 - INH (*katG, inhA*)
 - Etambutol (*embB*)
- İkinci seçenek ilaçlar
 - Kinolonlar (*gyrA*)
 - AK/KAN/CAP (*rrs, eis*)



TB'nin moleküler tanısındaki gelişmeler Temmuz 2013

•Piyasada bulunan ancak DSÖ tarafından henüz değerlendirilmeyenler

- Truelab/Truenat MTB, Molbio/bigtec Diagnostics, Hindistan
- EasyNAT TB Diagnostic kit, Ustar Biotechnologies, Çin
- iCubate System, iCubate, ABD
- TB drug resistance array, Capital Bio, Çin

Truelab /TruenatMTB

- DNA eldesi
 - Truepre-MAG 1.6 kg ağırlığında yarı otomatik manyetik boncuk temelli sistemdir.
- Amplifikasyon ve saptama
 - Truelab Uno 0.9 kg ağırlığında, kartuş temelli, Real time PCR sistemidir.
- Cihazlar batarya ile çalışabilir.
- Test 1 saat içinde sonuçlanır.
- Cihazların toplama maliyeti <6000 USD
- Kullanılan malzemeler 10–12 USD



EasyNAT TB

- DNA eldesi manuel olarak yapılıyor. Basitleştirmek için çalışılıyor.
- *IS6110* bölgesinin CPA-temelli izotermal amplifikasyonu (63°C'de 1 saat)
- Saptama «Lateral flow» yöntemi ile (5-10 dakika)
- Toplam test süresi 90 dakika. Fiyatı 15USD
- Reagenler oda ısısında <2 ay saklanabiliyor
- Duyarlılık
- Yayma pozitif örneklerde % 96.9 yayma negatif örneklerde %87.5
- Özgüllük %98.8

