

8. Tüberküloz Laboratuvarında Yeni Ne Var?

Uzm. Dr. Derya CENGER¹, Doç. Dr. Hatice YAZISIZ²

¹ SBÜ, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya

ÖZET

Tüberküloz, birçok ülkede ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Etkin hasta yönetimi için aktif hastalığın erken tanı zorunludur. Klinik tanının mikrobiyolojik tanı yöntemleriyle desteklenmesi gerekir. Tüberküloz laboratuvarları, tüberküloz teşhisinin yanı sıra ilaç duyarlılık testlerinde her zaman kritik bir rol oynamıştır. Geleneksel tanı yöntemleri birçok laboratuvarında kullanılmaya devam etmektedir. Son yıllarda daha erken tanı ve ilaç duyarlılık testi sonuçlarına imkan veren yeni yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu yazımızda tüberküloz laboratuvarlarındaki yenilikleri tartışacağız.

Tüberküloz (TB), dünya genelinde görülen yüksek morbidite ve mortalitesi olan bir enfeksiyon hastalığıdır. Tüberkülozla mücadelenin başarısı, hastalığın doğru ve hızlı teşhisi için uygun laboratuvar sistemlerinin varlığına bağlıdır. 2018 yılında, Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) 7 milyon yeni/nüks TB (%85'i akciğer tüberkülozu) olgusu, 186.772 çoklu ilaç direnci (ÇİD) veya rifampisin (R) dirençli vaka bildirilmiştir. Akciğer tüberkülozu olan vakaların sadece %55'i bakteriyolojik yöntemler ile doğrulanmıştır. Bakteriyolojik olarak doğrulanmış akciğer tüberkülozlu vakaların ancak %51'i R direnci için test edilmiştir. Tanısal yöntemlerin çoğuna sahip olan gelişmiş ülkelerde TB vakalarının bakteriyolojik yöntemlerle doğrulanma oranı %80 iken tanı imkanları sınırlı ülkelerde bu oran yaklaşık %50'dir (1). Bu veri, kaynakları sınırlı olan ülkelerde tanısal yöntemlerin kullanılabilirliğinin artması gerektiğini göstermektedir.

Klinik olarak TB şüphesi olan hastalarda mikrobiyoloji laboratuvarının iki ana soruyu hızlı ve güvenilir bir şekilde yanıtlaması gerekmektedir.

1. Hasta örneğinde *M. tuberculosis* saptandı mı?

2. *M. tuberculosis* saptandı ise, suş hangi ilaçlara dirençlidir? (2).

Ülkemizdeki, TB laboratuvarları ve özellikleri Türkiye'de Verem Savaşı 2018 Raporu'nda yayınlanmıştır. Bu rapora göre laboratuvarlar üç seviyeye ayrılmaktadır; sadece yayma mikroskopisi yapan (Seviye 1), yayma + kültür yapan (Seviye 2) ve yayma + kültür + ilaç duyarlılık testi (İDT) yapan laboratuvarlar (Seviye 3). Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü bünyesinde yer alan Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı ve ülke genelindeki 270 TB laboratuvarının, %53.0'ü Seviye 1, %22.6'sı Seviye 2, %24.4'ü Seviye 3'tür. Ayrıca, laboratuvarların 85'inde *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC)-tüberküloz dışı mikrobakteri (TDM) ayrımı, 59'unda moleküler tanı ve 19'unda hızlı direnç testi yapılmaktadır (3).

Dünyada TB ilaç dirençlerini izlemek amacıyla, DSÖ önderliğinde 1994 yılında küresel bir proje başlatılmıştır. Bu çalışma kapsamında tüm ülkeler kendi ilaç

direnci sürveyans sistemlerini kurmaya başlamıştır (4). Türkiye’de, Sağlık Bakanlığı tarafından ilaca dirençli TB olgularının seyirinin izlendiği, direnç yükünün belirlendiği ve TB laboratuvarların kalitesi ile kapasitelerinin belirlendiği Tüberküloz Laboratuvar Sürveyans Ağı (TuLSA) projesi 2011 yılında başlatılmıştır (5). Bu proje halen Türkiye Ulusal Tüberküloz Sürveyans Araştırması (TUTSA) olarak devam etmekte olup sonuçları verem savaş raporlarında sunulmaktadır (6).

Bu makalede TB laboratuvarında yapılan incelemeleri aşağıdaki başlıklar altında inceleyeceğiz:

I. Mikroskop;

1. Karbol fuksin yöntemi, sıcak (Ziehl-Neelsen)
2. Karbol fuksin, soğuk (Kinyoun)
3. Florokrom yöntemi (Auramine O/Auramine O+Rhodamine B)

II. Dekontaminasyon Yöntemleri

III. Kültür;

1. Katı bazlı,
2. Sıvı bazlı

IV. İdentifikasyon

V. Moleküler testler

VI. İlaç Duyarlılık testleri

I. Mikroskopi

Klinik örneklerin yaymalarını mikroskop altında değerlendirilmek hızlı ve ucuz bir tarama yöntemidir. *Mycobacterium spp.* hücre duvarında yer alan mikolik asit diğer bakterilerden ayırt edilmesini olanak sağlar. Mikobakteriler asit ve alkolle yapılan renksizleştirme işlemine yapılarından dolayı dirençlidirler. Bu nedenle “aside dirençli basil” veya “ARB” olarak adlandırılırlar. Ancak TB için hızlı bir tarama testi olan ARB yöntemlerinin duyarlılığı düşüktür (yeni TB olgularında %44, çocuklarda %15-20) (7).

ARB yaymaları için yaygın olarak üç ana yöntem kullanılmaktadır. Ziehl-Neelsen ve Kinyoun yöntemlerinde ışık mikroskobu kullanılarak inceleme yapılırken, florokrom boyama yönteminde floresan mikroskobu kullanılır. Florokrom boyama yönteminde, Auramin O tek başına veya rodamin B ile beraber kullanılır (8). Floresan mikroskobisi konvansiyonel ışık mikroskobisine göre daha pahalıdır. Ancak boya protokolünün daha basit olması, ısıtmaya ihtiyaç duymaması ve yaymaların daha hızlı okunması avan-

tajlarıdır. Bu nedenlerden dolayı örnek sayısının fazla olduğu büyük laboratuvarlarda kullanılması önerilir (9). DSÖ’de 2009 yılı sonrası geleneksel Ziehl-Neelsen ışık mikroskobisi dışında Auramin boyama lehine öneride bulunmuştur (10).

Yaymanın genel klinik duyarlılığı, mikobakterilerin yüküne, kullanılan ARB boyama tipine ve laboratuvar teknisyeninin deneyimine bağlı olarak %20-80 arasında değişmektedir (11). Örneklerin dekontaminasyon-homojenizasyon işleminden sonra yayma yapılması duyarlılığı arttırır (9). Türkiye’deki güncel kılavuzlar akciğer tüberkülozu tanısı için art arda üç balgam örneğinde mikroskopi yapılmasını önermektedir (12). DSÖ ise 3 yayma önerisinin aksine 2 ARB yayma yapılmasını önermiştir. Çünkü, ilk iki yayma negatif ise üçüncü bir yayma ile değerlendirmenin sadece %3.1 oranında katkı sağladığı bildirilmiştir (13,14).

II. Dekontaminasyon Yöntemleri

Mikobakteriler yavaş büyüyen mikroorganizmalardır. Numunelerin daha hızlı büyüyen bakterilerle kontaminasyonu, kültürde üremiş olan mikobakterilerin tespit edilmesini engelleyebilir. Bu nedenle, kültür yapılmadan önce numunelerin mikobakteriyel canlılığı olumsuz etkilemeden, kontamine bakteri yükünü azaltacak şekilde işlenmesi gerekir. Laboratuvar kontaminasyon oranlarının belli bir aralıkta olması gereklidir. Steril olmayan örnekler için yapılan bu işlemlerde en yaygın kullanılan ajanlar N-asetil-L-sistein (NALC) ve sodyum hidroksit (NaOH) (9). Geleneksel yöntemler dışında farklı ajanların (Klorheksidin vb.) kullanıldığı ya da çözelti hazırlama, santrifüj uygulaması ihtiyaçlarını ortadan kaldıran, işlem süresini kısaltmayı hedef alan çalışmalar yapılmaktadır (15-18). Emici boncuklar da dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işleminde kullanılmaya başlanmıştır. Santrifüj işleminin ortadan kalkması ile işlem çok kolaylaşmış ve süresi kısalmıştır. Bu yöntem, kullanılan sıvı kültür yöntemine de bağlı olarak mikobakteriyel tespit süresini üç-beş gün kısaltır. Ancak bu dekontaminasyon kiti ile işlenen numunelerde izolasyon oranının biraz daha düşük olduğunu bildiren çalışmalar vardır (19).

III. Kültür

TB tanısı için kültür altın standarttır. Kültür için katı (yumurta ve agar bazlı), sıvı ve otomatize sıvı kültür sistemleri kullanılmaktadır (20).

Katı besiyeri: Löwenstein-Jensen (LJ), yumurta bazlı besiyerlerinden olup, rutin laboratuvarlarda en sık kullanılanıdır. LJ besiyeri, MTBC’nin üreme-

sini destekler (9). LJ besiyerinde, MTBC ve TDM türlerinin yavaş büyümeleri nedeniyle kültür plaklarında görünür hale gelmeleri birkaç hafta sürebilir. Bu nedenle, kültürler atılmadan ve negatif olarak bildirilmeden önce altı-sekiz hafta boyunca bekletilir (21).

Mikobakterilerin üretilmesinde agar bazlı besiyerleri de (Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11) kullanılmaktadır. LJ ortamı ile kıyaslandığında agar bazlı besiyerlerinde MTBC kolonileri yaklaşık 10-12 gün daha erken görünür hale gelir (20).

Sıvı besiyeri: Katı besiyerlerine oranla daha hızlı sonuç veren ve izolasyon oranları daha yüksek olan besiyerleridir. Middlebrook 7H9 ile subkültür, İDT ve biyokimyasal testler yapılabilir iken Dubos Tween-albumin broth subkültür ve İDT duyarlılık testi çalışmaları için kullanılır (9).

Sıvı otomatik kültür sistemleri, TB'nin erken tanısında yüksek duyarlılığa sahiptir ve daha kısa sürede sonuç verme avantajı sunar. Günümüzde kullanılan ticari kültür sistemleri BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (Becton Dickinson), VersaTREK Kültür Sistemi II (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) ve MB/BacT Alert 3D Sistem (bioMérieux)'dir. Çok sayıda çalışmanın sonuçları, bu sistemlerin TB tanısında altın standart olarak kullanılacaklarını göstermiştir. Her üç sistem mikobakterilerin izolasyonunda Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır (9).

MGIT 960 sisteminde her tüp, modifiye edilmiş bir Middlebrook 7H9 broth içerir. Cihaz sürekli olarak tüp floresanını izleyerek laboratuvar personelinin pozitif tüpleri hızla tanımlamasını ve mevcut mikobakterileri tanımlama görevini başlatmasını sağlar. Daha hızlı üremeye ek olarak, katı kültüre kıyasla yüksek duyarlılığa sahiptir. MGIT 960 sisteminin LJ besiyeri ile karşılaştırıldığı bir meta-analizde, mikobakteri türlerini tanımlamada duyarlılığı LJ'den yüksek (MGIT için %81.5, LJ için %67) bulunmuş, sistemin bir katı besiyeri ile birlikte kullanıldığında duyarlılığın arttığı (%87.7) gösterilmiştir (22). Yazısız ve ark. oldukça fazla sayıda örnekle (17 183) yaptıkları bir çalışmada LJ kültür ve MGIT 960 sıvı kültür yöntemlerini karşılaştırmış; duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla LJ besiyeri için %92 ve %98; MGIT 960 için %96 ve %99 bulunmuştur. Ayrıca, çalışmada ortalama üreme zamanı LJ kültür için 24.5 ± 7.3 gün, MGIT 960 için 10.4 ± 5.3 gün olarak hesaplanmıştır. MGIT 960 sisteminin en önemli avantajının kısa sürede sonuç vermesi olduğu bildirilmiştir (23).

VersaTREK sisteminde, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerine bağlı olarak gelişen gaz basınç değişikliği izlenir (24). MB/BacT Alert 3D sisteminde ise kolorimetrik bir karbondioksit sensörü kullanılır (25).

IV. İdentifikasyon

Konvansiyonel yöntemler bakterilerin üreme hızına, üreme ısısına, koloni görünümüne, pigment üretimi ve biyokimyasal özelliklerine dayalıdır. Bu yöntemler zaman alıcı ve uygulanması zor olmakla birlikte maliyetleri yeni yöntemlere göre oldukça düşüktür ve TB basillerinin identifikasyonunda geçerliliklerini halen korumaktadırlar. Mikobakteri türü öncelikle çoğalma karakteristiklerine göre (üreme hızı, üreme ısısı, pigment oluşturma, koloni morfolojisi) alt gruba ayrılır. Daha sonra, niasin birikimi, nitrat indirgemesi, katalaz, pirazinamidaz, tioen -2- karboksilik asitli (T2H) ortamda üreme gibi biyokimyasal testler kullanılarak tür bazında kesin tanısı yapılır (20). Kültürde üretilmiş örneklerin moleküler yöntemlerle hızlı identifikasyonu yapılabilir. Konvansiyonel yöntemlere göre pahalı olmaları nedeniyle moleküler yöntemlerin her laboratuvarında edinilmesi güçtür. Bu testlerin elde bulunmaması halinde pozitif kültürlerin referans halk sağlığı laboratuvarına gönderilmesi önerilir (26). MGIT 960 sistemi, para-nitro benzoik asit (PNBA) ile tür tanımlamasına izin verir. PNBA ile MTBC'in tanımlanmasında, MGIT 960 sisteminin hızlı ve kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (27).

V. Moleküler Testler

Moleküler yöntemler, MTBC identifikasyonu ve İDT'lerinde konvansiyonel yöntemlere alternatifir (28). Moleküler testlerin çoğu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi amplifikasyon teknikleri kullanılarak hem DNA hem de RNA'da MTBC'ye özgü nükleik asitlerin saptanmasına dayanır. Ayrıca, ilaç dirençleri ile ilişkili gen mutasyonlarının saptanmasına olanak sağlar (29).

MTBC'in doğrudan klinik örnekten saptanması için iki nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) FDA tarafından onaylanmıştır;

1. Transkripsiyon aracılı amplifikasyon yöntemini kullanan "Gen-Probe Hologic Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct testi",
2. Gerçek zamanlı PCR yöntemini kullanan "Cepheid Xpert MTB/R testi" (26,30).

Gen-Probe Hologic Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test: İşlenmiş balgam örnekleri (yayma pozitif veya negatif) ile bronşiyal ve tra-

keal aspirat örneklerinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (26). BACTEC MGIT 960 sistemi ve LJ besiyeri ile yapılan bir karşılaştırmada, MTD (Mycobacterium tuberculosis direct test) Gene-Probe® yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif tahmin değerleri sırasıyla %89, %100, %100 ve %93 bulunmuştur (31).

Xpert MTB/R testi: GeneXpert MTB/R testi (Cepheid, Sunnyvale, California, ABD), MTBC identifikasyonu ve R direncini (rpoB) eş zamanlı olarak tespit eden, prob tabanlı, tam otomatik bir PCR testidir (28). Testin direk ve işlenmiş balgam örneklerinden yapılan yayma pozitif ve yayma negatif örneklerde kullanılması için FDA onayı vardır (26). Xpert MTB/R testinin duyarlılığı yayma pozitif örneklerde, yayma negatif örneklerle oranla daha yüksektir (32). Canlı ve ölü basilleri ayırt edememesi nedeniyle sonuçların dikkatli yorumlanması gerekir. Akciğer dışı TB olguları gibi daha düşük basil seviyeleri olan durumlarda duyarlılığının düşük olması ve maliyetinin yüksek olması testin dezavantajlarıdır (28).

MTBC'nin saptanmasında XpertMTB/R testi de dahil olmak üzere NAAT'leri, tek başına mikroskopie oranla, daha duyarlı ve özgüldür (30). Daha önce solunum izolasyonunun kaldırılması için ardışık üç negatif balgam ARB yayma sonucunun görülmesini öneren Hastalık Kontrol ve Korunma Merkez (CDC) Xpert MTB/R sonucunun pulmoner tüberkülozu dışlamak için yeterli kanıt olduğunu belirtmiştir (30). Afşar ve ark. İzmir'de klinik olarak TB düşünülen hastalardan alınan 790 klinik örnekte yaptıkları bir çalışmada, GeneXpert MTB/R (GX) (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) testinin performansını referans yöntem olarak kültür ile karşılaştırmışlar, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla solunum örneklerinde %100 ve %99; solunum dışı örneklerde %87 ve %99 bulmuşlardır (33). Akciğer dışı TB tanısında GeneXpert MTB/R testinin performansının değerlendirildiği bir başka çalışmada, GeneXpert MTB/R'nin duyarlılığı ve özgüllüğü, akciğer ve akciğer dışı örneklerde benzer saptanmıştır (akciğer için %78.2 ve %90.4, akciğer dışı için %79.3 ve %90.3) (34). Çocuklardan alınan solunum örneklerinde Xpert MTB/R Ultra (Ultra; Cepheid) testinin akciğer tüberkülozunun hızlı ve doğru tanısına yardımcı olduğu belirtilmiştir (35,36). Alp ve ark., multipleks gerçek zamanlı PCR yöntemi olan Anyplex MTB/NTM testinin (Seegene, Güney Kore) hızlı tanıdaki etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada; akciğer kökenli örneklerde duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %84 ve %99, akciğer dışı örneklerde ise sırasıyla %74 ve %99 olarak hesaplanmıştır. Any-

plex MTB/NTM testinin rutin TB tanısında kullanılabilir hızlı, pratik ve güvenilir bir test olduğunu bildirmişlerdir (37). Balgam örnekleri kullanılan bir başka çalışmada, kültür yöntemleri (LJ ve BACTEC MGIT 960) ve moleküler yöntemler [COBAS TaqMan 48 MTB Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ve 85B mRNA temelli gerçek zamanlı PCR kiti] karşılaştırılmıştır. Moleküler testlerin duyarlılık ve özgüllükleri, COBAS TaqManMTB Test için %93.3 ve %83.3; 85B mRNA temelli gerçek zamanlı PCR için %98.3 ve %95.0 olarak saptanmıştır. *M. tuberculosis* basilinın tespitinde, 85B genini hedefleyen gerçek zamanlı PCR yönteminin daha kullanışlı ve hızlı sonuç veren bir teknik olduğu bildirilmiştir (38).

Nükleik asit hibridizasyon problemleri: Nükleik asit hibridizasyon problemleri (AccuProbe; Hologic/GenProbe, Marlborough, MA) ile kültürden MTBC, *M. avium* kompleksi, *M. intracellulare*, *M. gordonae* ve *M. kansasii* tanımlanabilir Kültürde üreyen mikobakterileri tanımlanma ve iki saat içinde sonuç verme avantajına sahiptir (39).

Moleküler Line Prob Assay (LİPA): Kültürden ve direk klinik örneklerden MTBC hızlı identifikasyonunu sağlayan yöntemlerdir. Çeşitli firmalara ait ticari LİPA testleri bulunmaktadır. Bunların MTBC tespitinde Avrupa'da CE onayı bulunmaktadır ancak Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA onayları yoktur. INNO-LiPA *Mycobacteria* v2 (Fujirebio, Ghent, Belçika), GenoType MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Almanya), Speed-oligo *Mycobacteria* (Vircell, Granada, Spain) MTBC'ye ek olarak farklı sayılarda TDM saptayabilmektedirler (26). Her üç test sıvı ve katı kültürden çalışılabilmekte ve ilk ikisi yaklaşık dört-altı saat, üçüncü ise üç saat içinde sonuç verebilmektedir. LİPA'lar sık karşılaşılan mikobakterilerin %90'ından fazlasını hızlı bir şekilde identifiye edilebilmektedir. Az sayıda da olsa yanlış tanımlama yaptıkları için tüm sonuçların fenotipik özellikler (üreme hızı, pigmentasyon, koloni morfolojisi vb.) ile konfirme edilmesi önerilmektedir (39). Aricha ve ark. yaptığı bir çalışmada *M. tuberculosis* tespitinde LPA testinin duyarlılığı %98.4, özgüllüğü %66.0 olarak saptanmıştır (40).

MALDI-TOF MS: Mevcut MALDI-TOF MS sistemlerinden, MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA) sadece araştırma amaçlı kullanılabilirken, Vitek MS (BioMérieux, Durham, NC) mikobakterilerin identifikasyonunda FDA onayı almıştır (26). Her iki sistem de *M. tuberculosis*'i ve birçok TDM türünü temsil eden kendi veri tabanını kullanır. Bu yöntemlerin birkaç dezavantajı vardır;

8. Tüberküloz Laboratuvarında Yeni Ne Var?

1. Veri tabanları daha az görülen mikobakterileri yeterince temsil etmeyebilir.
2. Tanımlama için saf izolat gereklidir, bunun için kültürde üretilmesi gerekir, bu da zaman alıcı bir işlemdir.
3. MTBC üyelerinin de dahil olduğu türler arasında ayırım yapamamaktadır (41,42).

Mikobakteri türlerinin, her iki MALDI-TOF MS sistemi tarafından da doğru bir şekilde tanımlandığını bildiren yayınlar da mevcuttur (41,43). Akyar ve ark. MALDI-TOF MS (Bruker, Daltonics) değerlendirdikleri çalışmada, MALDI-TOF MS'in mikobakteri izolatlarının %94'ünü tanımladığını, MTBC'yi TDM izolatlarından ayırt etmede başarılı olduğu göstermişlerdir (44).

PCR temelli sekanslama: Nükleik asit amplifikasyon ve sekanslama, MTBC ve TDM'nin identifikasyonunda altın standart olup, tanımlamada sıklıkla 16S rRNA kullanılır (26). Sekanslamasının en önemli avantajı, *M. tuberculosis* dahil olmak üzere birçok mikobakteri türünün tanımlanmasına izin vermesidir. Mikobakterilerin tanımlanması için 16S ribozomal RNA (rRNA) sekans tabanlı tanımlama yöntemlerini kullanan çalışmalar, bu tekniğin geleneksel yöntemlerden daha hızlı (haftalara karşı saatler) ve daha doğru olduğunu göstermektedir. Ancak deneyimli personel gerektirmesi ve oldukça yoğun emek gerektiren protokoller içermesi dezavantajlarıdır (45,46).

Türkiye'de aynı merkezde yapılan iki farklı genotiplendirme çalışmasının sonuçları yayınlanmıştır. İlk çalışmada, 470 *M. tuberculosis* suşundan yapılmış olup, en baskın spoligotipin ST53 olduğu, bunu ST41 (LAM7-TUR), ST50, ST284 ve ST4 izlediği (47); 171 ekstrapulmoner örnekte yapılan ikinci çalışmada, majör spoligotiplerin T, LAM7-TUR (ST41) ve H1 genotipleri olduğu bildirilmiştir (48).

VI. Antitüberküloz İlaçlara Karşı Duyarlılık Testleri

MTBC için, kültür temelli ve moleküler İDT olarak iki ana başlık altında inceleyebiliriz.

- I. Kültür temelli İDT
 1. Proporsiyon yöntemi
 2. Sıvı sistemler
 3. Sensititre MycoTB MIC plak yöntemi
- II. Moleküler İDT
 1. Prop temelli metodlar; Xpert MTB/R testi, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl
 2. Sekans temelli metodlar (26).

Kültür temelli İDT:

Proporsiyon yöntemi: Belli bir ilaç konsantrasyonunda dirençli mikroorganizmaların oranının belirlenmesini sağlar. Katı besiyerindeki agar proporsiyon yöntemi, geleneksel büyüme bazlı İDT için referans yöntemdir. Ancak üç-dört haftada sonuçlanır (28). MTBC izolatlarında birinci basamak ilaçların [streptomisin (S), isoniazid (H), R, etambutol (E)] duyarlılık testi için LJ proporsiyon yöntemi ile BACTEC 460 TB sistemini karşılaştırılan bir çalışmada, bu ilaçlar için LJ proporsiyon ile BACTEC 460 TB sistemi arasındaki tutarlılık oranları sırasıyla %85.3, %92.4, %95.4 ve %92.4 bulunmuştur (49).

Sıvı sistemler: BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson), VersaTREK Kültür Sistemi II (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) sistemleri MTBC'da birinci kuşak antitüberküloz İDT için FDA onayı vardır (9). Sümbül ve ark. 278 *Mycobacterium species* örneğinden MGIT-960 SIRE kiti kullanılarak yaptıkları çalışmada, MTBC izolatlarının %78.1'inin tüm birinci basamak antitüberküloz ilaçlara duyarlı, %21.9'u en az bir ilaca dirençli bulmuşlardır. ÇİD oranı, dirençli suşlarda %13.7 ve tüm suşlarda %3 olarak tespit edilmiştir (50). Yazısız ve arkadaşlarının, 1193 MTBC izolatında MGIT 960 sistemiyle yaptıkları İDT çalışmasında, %26.7 izolatta birinci basamak antitüberküloz ilaçtan en az birine direnç tespit edilmiştir. Bu çalışmada ÇİD oranı %7.0 saptanmıştır (51). VersaTREK sisteminin *M. tuberculosis* İDT için güvenilirliğini değerlendirildiği çalışmada H, R, E, S ve pirazinamid (Z) sonuçları MGIT 960 ile elde edilenlerle karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında anlamlı fark bulunmamıştır (52). MGIT 960 ve VersaTREK arasındaki kategorik uyumun değerlendirildiği çalışmada; E, H, R dirençleri her iki sistemle test edilmiş, genel kategorik uyum %96.8 olarak bildirilmiştir (53).

Sensititre MycoTB MIC plak yöntemi: Sensititre MycoTB plağı liyofilize antibiyotikler içeren birinci ve ikinci basamak antitüberküloz ilaçlara yönelik minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) belirlenmesi için yapılandırılmış bir mikrotitrasyon plağıdır. Bu yöntem çalışma amaçlı kullanılmakta olup, henüz FDA onayı almamıştır ancak MTBC için güvenilir sonuçlar verdiğini bildirilen çalışmalar mevcuttur (54,55).

Moleküler İDT: İlaç direncini belirlemede fenotipik İDT'ler altın standart olmaya devam etmektedir. Moleküler tabanlı İDT testlerinin tamamlayıcı olarak kullanılması önerilmektedir. Moleküler yöntemler ile R ve H direncini belirleme yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Çünkü mutasyonlar tahmin edilebilir

yerlerde meydana gelme eğilimindedir. Ancak, mutasyonların değişken olduğu ikinci basamak ilaçlara karşı direnci saptamak çok daha zordur (28).

Prop temelli metodlar: GeneXpert MTB/R testi, R direnci (rpoB), GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Almanya) H (katG ve inhA) ve R (rpoB) direnci, GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience, Nehren, Almanya), florokinolonlar (gyrA), aminoglikozitler ve siklik peptitler (rrs) ve etambutol (embB) ile ilişkili mutasyonları tespit eder (28). GenoType MTBDRplus ve GenoType MTBDRsl testleri ÇİD TB tanısında hızlı tarama için WHO tarafından önerilmiştir (56).

R direncinin saptanmasında MGIT İDT altın standart olarak alınıp GeneXpert ve LPA performanslarının değerlendirildiği çalışmada, GeneXpert için duyarlılık %62.50, özgüllük %96.50, LPA için duyarlılık %90.0 ve özgüllük %99.1 olarak bildirilmiştir. LPA'nın, GeneXpert'e göre daha iyi bir performans gösterdiği ve R'in direncinin saptanmasında MGIT 960'a iyi bir alternatif olduğu bildirilmiştir (40). İstanbul'dan 1329 MTBC izolatında yapılan bir çalışmada, fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak (MGIT 960, GenoType MTBDRplus version 1.0 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), GenoType MTBDRsl assays version 1.0 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) İDT yöntemler karşılaştırılmış ve moleküler paternler verilmiştir. H, R, E ve ÇİD-TB saptanması için genotipik yöntemlerin duyarlılıkları sırasıyla %77, %84, %65 ve %89, özgüllükleri %99, %98, %67 ve %94 saptanmıştır. ÇİD TB oranı MGIT 960 sistemi ile %11.1 iken, moleküler yöntem ile %10.9 bulunmuştur (57). ÇİD-TB vakalarında ikinci basamak antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılığı belirlemede MGIT 960 SIRE kiti ve GenoType MTBDRsl testinin karşılaştırıldığı bir çalışmanın sonuçları, GenoType MTBDRsl testi erken dönemde tedavi kararlarının alınmasında değerli olduğu ancak tüberküloz olgularının rutin değerlendirilmesinde ek olarak MGIT 960 SIRE kitinin kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur (58).

Sekans temelli metodlar: Bu testler, hedef organizmanın tam genetik yapısını belirleyerek mutasyonların daha doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Tüm genom sekans analizi ile yapılan çalışmada %85.0'in üzerinde duyarlılık ve özgüllük bildirilmiş (E ve moksifloksasin hariç) ve birçok ilaç direncini saptamada umut verici bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir (59). Fenotipik İDT ve tüm genom sekans analizi arasındaki uyumun değerlendirildiği

başka bir çalışmada, birinci basamak antitüberküloz ilaçlar, özellikle H ve R için, tüm genom analizine dayalı İDT ile fenotipik İDT arasında uyum oranları ikinci basamak ilaçlara göre daha yüksek bulunmuştur (60).

Sonuç olarak; tüberkülozla mücadelenin başarısı, hastalığın doğru ve hızlı tanısı için uygun laboratuvar sistemlerinin varlığına bağlıdır. Tüberküloz laboratuvarlarında, geleneksel tanı yöntemleri halen kullanılmaya devam etmektedir. Günümüzde daha erken tanı ve ilaç duyarlılık testi sonuçlarına imkan veren yeni yöntemlerin kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Başta kaynakları sınırlı olan ülkelerde olmak üzere tanılal yöntemlerin kullanılabilirliğinin artırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2019*. Geneva: WHO; 2019.
2. Somoskovi A, Salfinger M. How Can the Tuberculosis Laboratory Aid in the Patient-Centered Diagnosis and Management of Tuberculosis? *Clin Chest Med* 2019; 40: 741-53.
3. Türkiye'de Verem Savaşı Derneği 2018 Raporu T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Ankara, 2018. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/dosya/raporlar/Turkiye'de_Verem_Savas_2018_Raporu.
4. Zignol M, van Gemert W, Falzon D, et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010. *Bull World Health Organ* 2012; 90: 111-9.
5. *The First Step for National Tuberculosis Laboratory Surveillance*; Ankara, 2011. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(2): 143-155.
6. Türkiye'de verem savaşı 2019 raporu T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Ankara, 2020 https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/tuberkuloz_db/raporlar/Turkiye'de_Verem_Savas_2019_Raporu.
7. Lange C, Mori T. *Advances in the diagnosis of tuberculosis*. *Respirology*. 2010;15(2):220-40.
8. Forbes B.A, Hall G.S, Miller M.B et al. *Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria*. *Clin Microbiol Rev*.2018; 31(2):1-66.
9. Martin I, Pfyffer GE, Parrish N: *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Stainin Procedures* In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, Mcadam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW, eds. *Manuel of Clinical Microbiology Vol 1.12th edition* Washington DC 2019: 558-75.
10. *Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement*. World Health Organization. 2011.
11. Steingart KR, Henry M, Ng V et al. *Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review*. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(9):570-81.
12. Kara F. *Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi*. 2. Baskı. Ankara:2019:40-1.

8. Tüberküloz Laboratuvarında Yeni Ne Var?

13. Proposed reduction of number of smears for the diagnosis of pulmonary tb: background document. World Health Organization. https://www.who.int/tb/laboratory/reduction_of_smears.pdf
14. Mase SR, Ramsay A, Ng V et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 485-95.
15. Sharma M, Misra RN, Gandham NR, et al. Comparison of modified Petroff's and N-acetyl-L-cysteine- sodium hydroxide methods for sputum decontamination in tertiary care hospital in India. *Med J DY Patil Univ.* 2012;5:97-100.
16. Asmar S, Drancourt M. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* 2015;15:155.
17. Rivas C, Coitinho C, Dafond V et al. Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42(2):87-90.
18. Ganoza CA, Ricaldi JN, Chauca J et al. Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for *Mycobacterium tuberculosis* microscopy and culture. *J Med Microbiol.* 2008;57(9):1094-98.
19. Karakeçe E, Terzi HA, Çiftci İH. Could a Step in the Isolation of *Mycobacteria* from Sputum Samples be Eliminated by New Decontamination Kits? *Polish Journal of Microbiology* 2014; 63: 369–71.
20. Sürücüoğlu S. Tüberküloz Basilinin İdentifikasyonu İç: 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. *Samsun;2003:300-10.*
21. Simner PJ, Doerr KA, Steinmetz LK, et al. *Mycobacterium* and Aerobic Actinomycete Culture: Are Two Medium Types and Extended Incubation Times Necessary? *J Clin Microbiol.* 2016;54(4):1089-93.
22. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2321-5
23. Yazisiz H, Cenger DH, Yazisiz V, et al. Comparison and evaluation of Lowenstein-Jensen medium, *Mycobacteria* growth indicator tube 960, and microscopic smear results in the diagnosis of tuberculosis: a large data analysis from a single center. *Clin Lab.* 2019;65:2111–2117.
24. Yuksel P Saribas S, Yasar Bagdatlı Y. Comparison of the VeriTrek and BACTEC MGIT 960 systems for the contamination rate, time of detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2011; 5(9):985-9.
25. Whyte T, Hanahoe B, Collins T, Corbett-Feeny G, Cormican M. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and MB BAC/T systems for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(8):3131-2.
26. Warshauer DM, Salfinger M, Desmond E, Lin SG. *Mycobacterium tuberculosis* Complex, In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, Mcadam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW, eds. *Manuel of Clinical Microbiology* Vol 1.12th edition Washington DC; 2019:576-594.
27. Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, et al. Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a high through put tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(3):217-21.
28. Dicks KV, Stout JE. Molecular Diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Annu Rev Med.* 2019;70:77-90.
29. Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, et al. Molecular Diagnosis of Tuberculosis Chonnam Med J. 2018; 54 (1): 1–9.
30. Availability of an Assay for Detecting *Mycobacterium tuberculosis*, Including Rifampin-Resistant Strains, and Considerations for Its Use — United States, 2013. *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR* 2013;62(41): 822-4.
31. Kunduracıoğlu A, Karasu I, Biçmen C, et al. Yayma negatif tüberküloz olgularının tanımlanmasında MTD Gen-Probe® testi, BACTEC 960™ sistemi ve Löwenstein-Jensen kültür yöntemlerinin performansının karşılaştırılması *Mikrobiyol Bul.* 2013;47(3):417-31.
32. 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.
33. Afsar I, Gunes M, Er H, Gamze Sener A. Comparison of culture, microscopic smear and molecular methods in diagnosis of tuberculosis. *Rev Esp Quimioter.* 2018;31(5):435-438.
34. Mechal Y, Benaissa E, El Mrimar N, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF system performances in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1069.
35. Zar HJ, Workman LJ, Prins M, et al. Tuberculosis Diagnosis in Children Using Xpert Ultra on Different Respiratory Specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 200: 1531-8.
36. Sun L, Qi X, Liu F, Wu X, et al. A Test for More Accurate Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Pediatrics.* 2019 Nov;144(5):e20190262.
37. Alp A, Saribaş Z. Evaluation of Anyplex MTB/NTM Test for The Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. *Mikrobiyol Bul.* 2019;53(4):355-363.
38. Demirci M, Saribas S, Ozer N, et al. Diagnostic performance of the RT-qPCR method targeting 85B mRNA in the diagnosis of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Infect Public Health.* 2018 Sep-Oct;11(5):662-666
39. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*; Clinical and laboratory characteristics of rapidly growing mycobacteria In: Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, Mcadam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW, eds. *Manuel of Clinical Microbiology* Vol 1.12th edition Washington DC; 2019:612-29.
40. Aricha SA, Kingwara L, Mwirigi NW, et al. Comparison of GeneXpert and line probe assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin-mono resistance at the National Tuberculosis Reference Laboratory, Kenya. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):852.
41. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and Other Aerobic Actinomycetes. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):376-84.
42. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted

- laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2875-9.
43. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol*. 2014;52(1):130-8.
 44. Akyar I, Çavuşoğlu C, Ayaş M, et al. Evaluation of the performance of MALDI-TOF MS and DNA sequence analysis in the identification of mycobacteria species. *Turk J Med Sci*. 2018;48(6):1351-1357.
 45. Esen N. Mikobakterilerin Tanısında, Tanımlanmasında ve İlaç Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Turkish Journal of Infection*. 2003;17(4): 507-11.
 46. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3637-48.
 47. Çavuşoğlu C, Yılmaz FF, Durusoy Onmuş İR, et al. Genotype distribution of *Mycobacterium tuberculosis* in the Aegean Region and associated demographic factors. *Turk J Med Sci*. 2017;47(5):1593-1601.
 48. Taşbakan MS, Akdağ D, Kahraman H, et al. Culture proven extra pulmonary tuberculosis: drug susceptibility and genetic profile analysis. *Tuberk Toraks*. 2018;66(3):234-238.
 49. Yurtsever SG, Biçmen C, Gündüz AT, et al. *Mycobacterium tuberculosis* İzolatlarının Antitüberküloz İlaçlara Duyarlılığının Saptanmasında Antibiyotikli Löwenstein-Jensen Besiyerinde Proporsiyon Yönteminin BACTEC 460 TB Sistemi ile Karşılaştırılması *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(4):623-31.
 50. Sumbul B, Doymaz MZ. A Current Microbiological Picture of *Mycobacterium* Isolates from Istanbul, Turkey. *Pol J Microbiol*. 2020;69(2):1-7.
 51. Yazısız H, Hırçın Cenger D, Yazısız V, et al. First-line anti-tuberculosis drug resistance trends of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. A tertiary hospital study in Turkey. *Tuberk Toraks*. 2019;67(2):92-101.
 52. Espasa M, Salvadó M, Vicente E, et al. Evaluation of the VerSaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for first-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):488-91.
 53. Martin IW, Dionne K, Deml SM, et al. Automated broth-based systems versus the MYCOTB plate for antimicrobial susceptibility testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: challenges in interpretation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91(1):38-41.
 54. Varıcı Balcı FK, Çavuşoğlu C. Comparison of two methods for the detection of antituberculous drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates: sensititre MycoTB MIC plate and the indirect agar proportion methods. *Mikrobiyol Bul*. 2018;52(2):123-134.
 55. Ceyhan İ, Vezir S. Using of the Sensititre MycoTB Plate Method for the Detection of Anti-tuberculous Drug Susceptibility of Rifampin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Mikrobiyol Bul*. 2020;54(2):211-222.
 56. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 57. Yazısız H, Hırçın Cenger D, Uçarman N, Altın S. The molecular patterns of resistance to anti-tuberculosis drugs: an analysis from Istanbul, Turkey. *J Chemother*. 2020;32(2):66-74.
 58. Tekin K, Albay A, Simsek H, et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 SL DST Kit and the GenoType MTBDRsl Test for Detecting Extensively Drug-resistant Tuberculosis Cases. *Eurasian J Med*. 2017;49(3):183-87.
 59. Chen X, He G, Wang S, et al. Evaluation of Whole-Genome Sequence Method to Diagnose Resistance of 13 Anti-tuberculosis Drugs and Characterize Resistance Genes in Clinical Multi-Drug Resistance *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From China. *Front Microbiol*. 2019;10:1741.
 60. Faksri K, Kaewprasert O, Ong RT, et al. Comparisons of whole-genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54(2):109-16.