

# Tüberkülozda Mikrobiyolojik Tanı (Güncel Tanısal Yaklaşımlar)



Dr. Güneş Şenol

Bakırçay Üniversitesi Çiğli EAH

Enfeksiyon Hast. ve Kl. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

# Mikrobiyolojik tanı

## •Konvansiyonel yöntemler

- Mikroskobik inceleme
- Kültür (tanımlama-duyarlılık testleri)

## •Moleküler yöntemler

- Doğrudan örnekten tanı
- Tür düzeyinde tanımlama
- İlaç duyarlılık testleri

## •İmmünolojik yöntemler

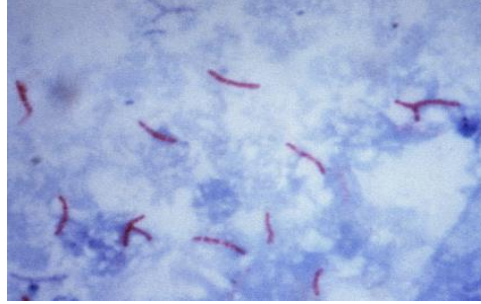
- Tüberkülin deri testi (TDT)
- İnterferon- $\gamma$  salınım testleri (İGST)

## •Biyobelirteçler

# Mikroskopik inceleme

## Boyama

ARB Tekniđi:  
Ehrlich-Ziehl-  
Neelsen/Kinyoun

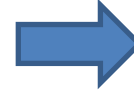
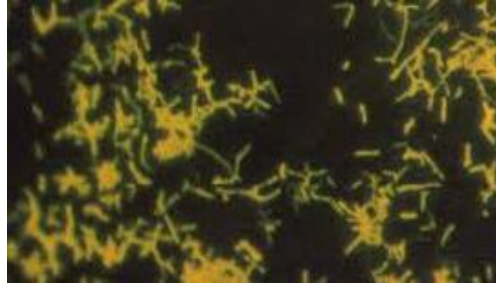


## Mikroskop



Işık mikroskobu

Floresan boyama:  
Auramine-Rhodamine



Floresan mikroskobu

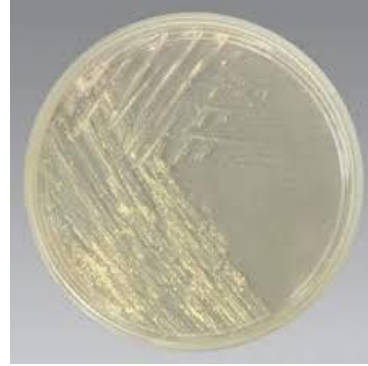
- Kolay, hızlı ve ucuz
- Boyama yöntemlerinin duyarlılığı düşüktür (%40-60)
- Rutin boyalı inceleme ile *M. tuberculosis* diğer mikobakteri türlerinden ayıramaz

# Kültür

Kültür yöntemleri mikobakteri enfeksiyonlarının tanısında altın standarttır



**Löwenstein-Jensen**

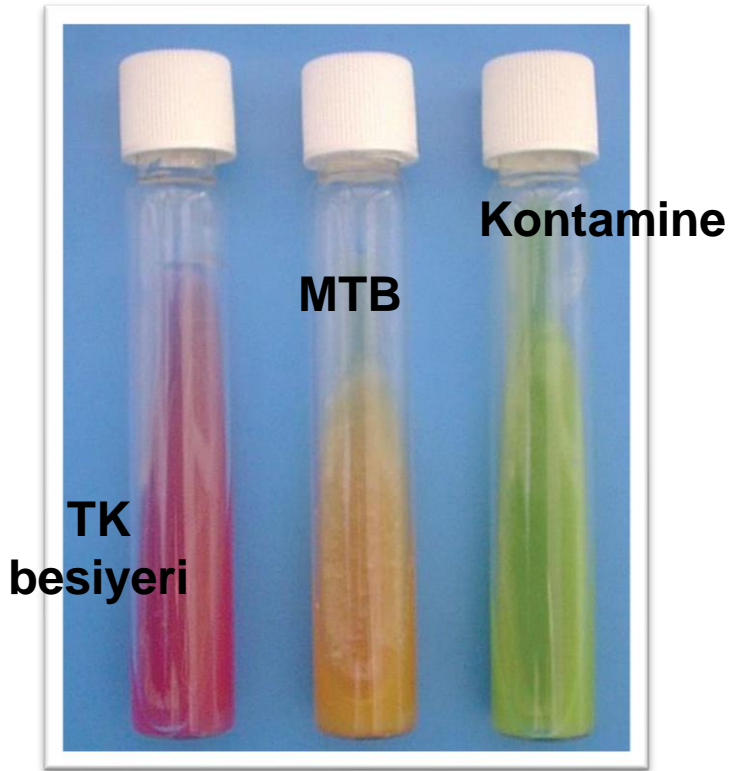


**Middlebrook 7H10**



**Otomatize ticari sistemler**

- Katı besiyerlerinde (Lj) 40-42 gün
- Sıvı besiyerlerinde üreme süresi daha kısa (10-14 gün süre gerekiyor)
- Duyarlılık arttı (Üreme için 10 canlı basil yeterli)

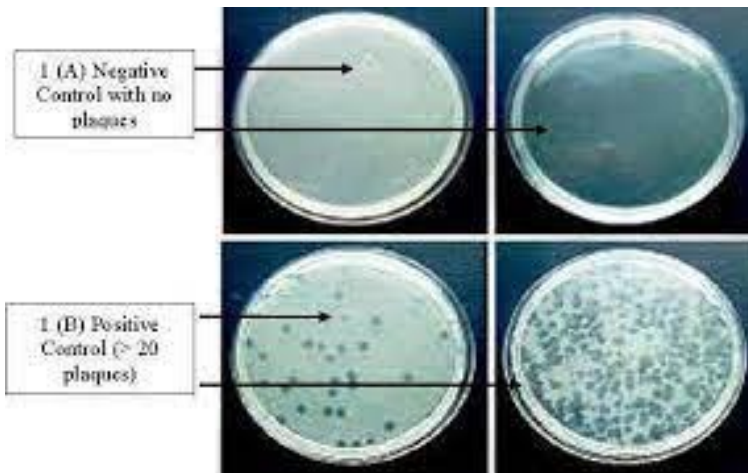


**TK medium**

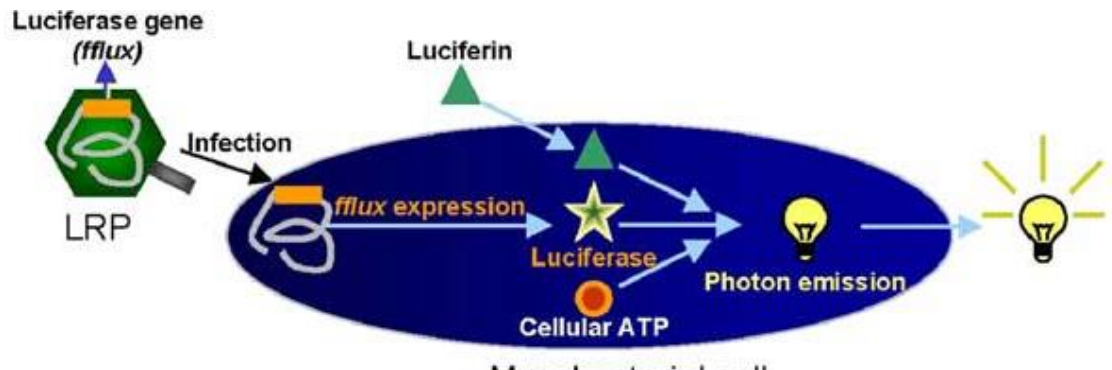


Fig. 1. Colony morphology and growth characteristic of *M.tuberculosis* in AYC.2.2 agar.

**AYC 2.2 agar bazlı besiyeri**



## FASTPlaqueTB™



## Luciferase reporter mycobacteriophages (LRPs)

# Mikobakteri türlerinin tanımlanması

## Fenotipik yöntemler

### Biyokimyasal testler



- Laboratuvar alt yapısı
- Zaman alıcı
- Zahmetli
- Yorumlaması güç

### MPT64 kart test



POSITIVE

*M.tuberculosis kompleks*



NEGATIVE

*Tüberküloz dışı mikobakteri*

- Hızlı ve ucuz
- TB basilini diğer türlerden ayırır

### Kord oluşumu



Çok kısa sürede sonuç alınmaktadır

# *M.tuberculosis*'de ilaç direncinin belirlenmesi

## Fenotipik yöntemler

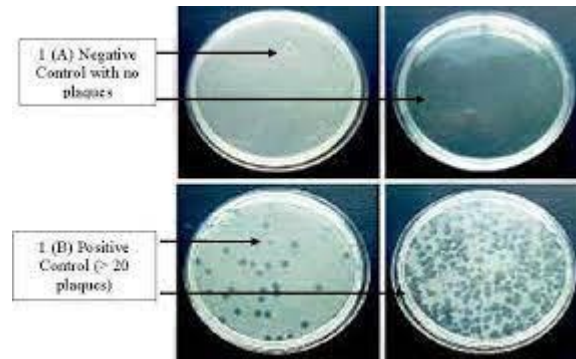


### Agar proporsiyon

•2-3 hafta

### MGIT960

•4-13 gün



## FASTPlaqueTB-MDRi™ Luciferase reporter mycobacteriophages (LRPs)



Bronx box® for detection of drug resistance.



# Moleküler yöntemler

- Doğrudan klinik örnekten tüberküloz tanısı
- Mikobakteri türlerinin tanımlanması
- *M.tuberculosis*'de ilaç direncinin belirlenmesi

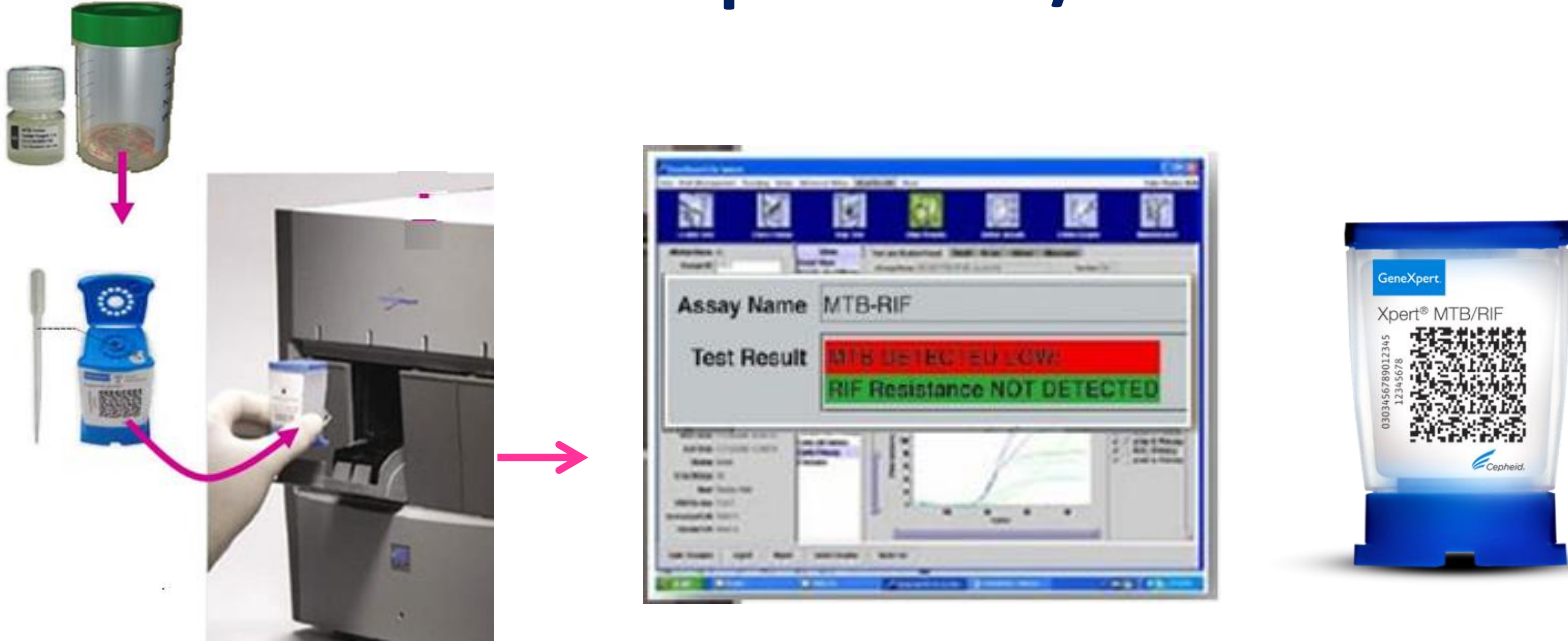
Kısa sürede sonuçlanır (2-6 saat)

- Epidemiyolojik çalışmalar (Genotiplendirme)

# Doğrudan klinik örnekten tüberküloz tanısı

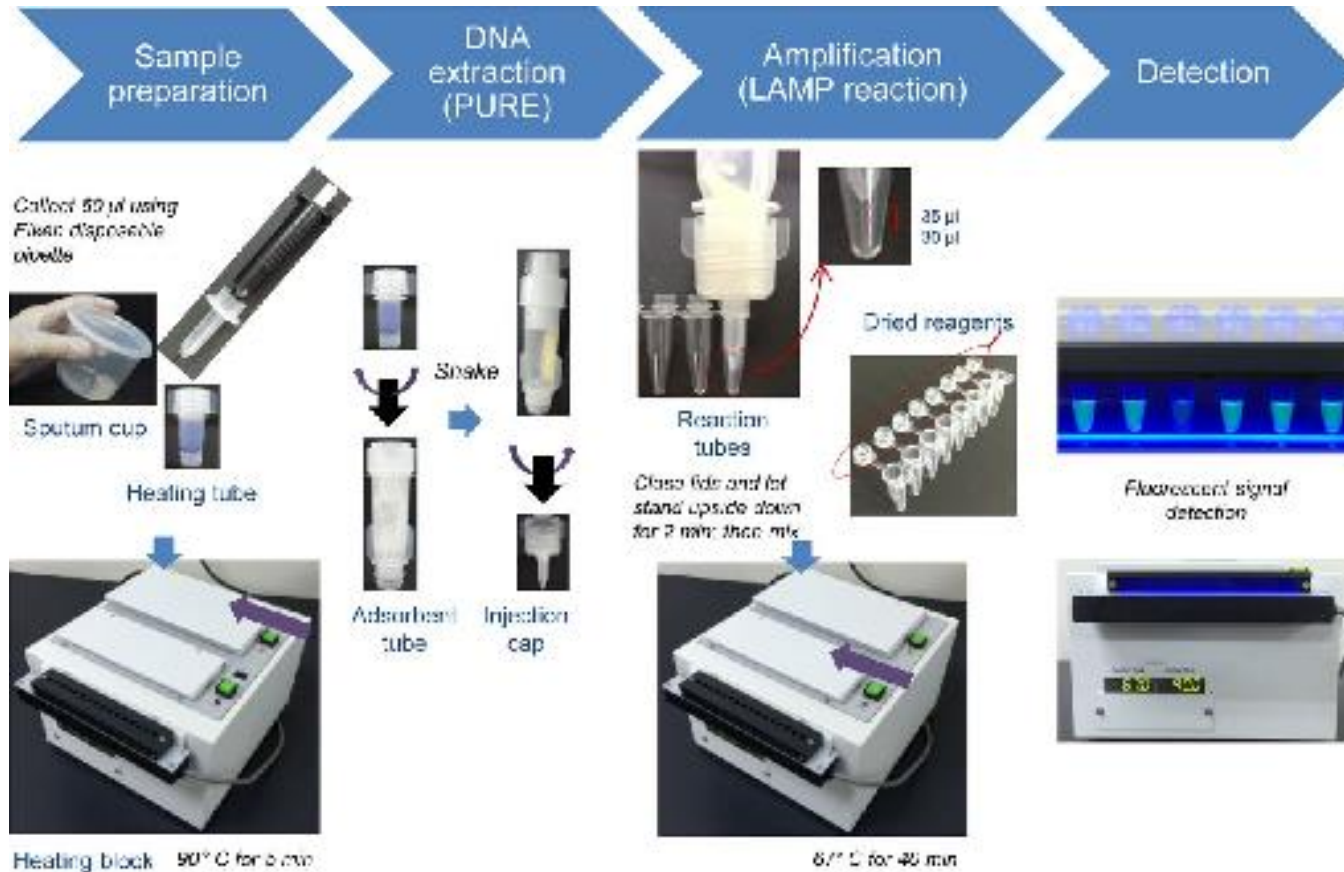
- Klinik örnekte *Mycobacterium tuberculosis*'e ait genetik materyali (DNA/RNA) saptar
  - **GeneXpert MTB/RIF, GeneXpert MTB/RIF ultra**
  - **TB-LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)**

# GeneXpert MTB/RIF



- *Real-time PCR*
- Kontaminasyon riski çok azdır
- 90 dakikada MTB varlığı ve RIF direnci (*rpoB* geni) saptanır
- Moleküler testler için gereken ağır alt yapıya ihtiyaç yok.

# TB-LAMP



TB-LAMP, bir saatten az süren ve ultraviyole ışık altında çıplak gözle okunabilen manuel bir testtir

# Moleküler testlerin kısıtlılıkları

- *M.tuberculosis* kompleks üyelerini ayırmaz
  - *M.tuberculosis*
  - *M.bovis*
  - *M.bovis* BCG
  - *M.caprae*
  - *M.pinnipedii*
  - *M.microti*
  - *M.canettii*
- *M.tuberculosis* DNA'sını saptar
  - Ölü basili canlı basilden ayırmaz
  - Tedavinin takibinde kullanılamaz
- Tübeküloz dışı mikobakterileri saptamaz

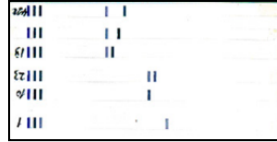
# Mikobakteri türlerinin tanımlanması

Bilinen 160'den fazla mikobakteri türü var

Moleküler yöntemler tür tanımlamasında altın standarttır

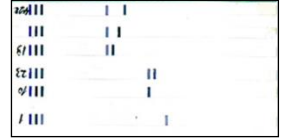
## •Yöntemler

- PCR-Ters hibridizasyon
- DNA dizi analizi



## •Yöntemler

- PCR-Ters hibridizasyon
- Spoligotiplendirme



- Tüberküloz dışı mikobakteri türlerinin tanımlanması
- Etken türün saptanması
  - (*M.avium*, *M.intracellulare*, ...)
- Yeni türlerin tanımlanması
  - *M.celeriflavum*

- *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin tanımlanması

# Genotiplendirme

- Spoligotiplendirme
- MIRU-VNTR

- Laboratuvar içi çapraz bulaş
- Kişiler arasında bulaş
- Toplum temelli çalışmalar
  - Bir bölgedeki suşların coğrafik dağılımı
  - Suşların dağılımında yıllar içinde görülen değişim
  - Dışarıdan gelen yabancı suşların varlığı

# *M.tuberculosis*'de ilaç direncinin belirlenmesi

## • Dirence yol açan mutasyonlar saptanır

• Rif direnci → *rpoB* % >95

• INH direnci → *katG* ve *inhA*

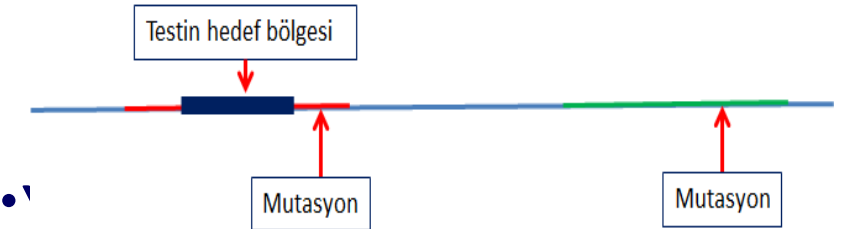
• Etambutol direnci → *embB*

• Amikasin, kanamisin direnci → *rrs*

• Kinolon direnci → *gyrA*

## • Sorunlar/Kısıtlılıklar

• Hedef aldığı bölgenin/genin dışındaki direnç mutasyonlarını saptayamaz



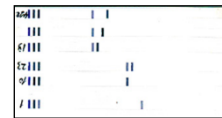
• Sessiz/nötral mutasyonları saptar

**TGC CAC GGA GTA GCG**  
ys His Gly Val Ala

## • Yöntemler

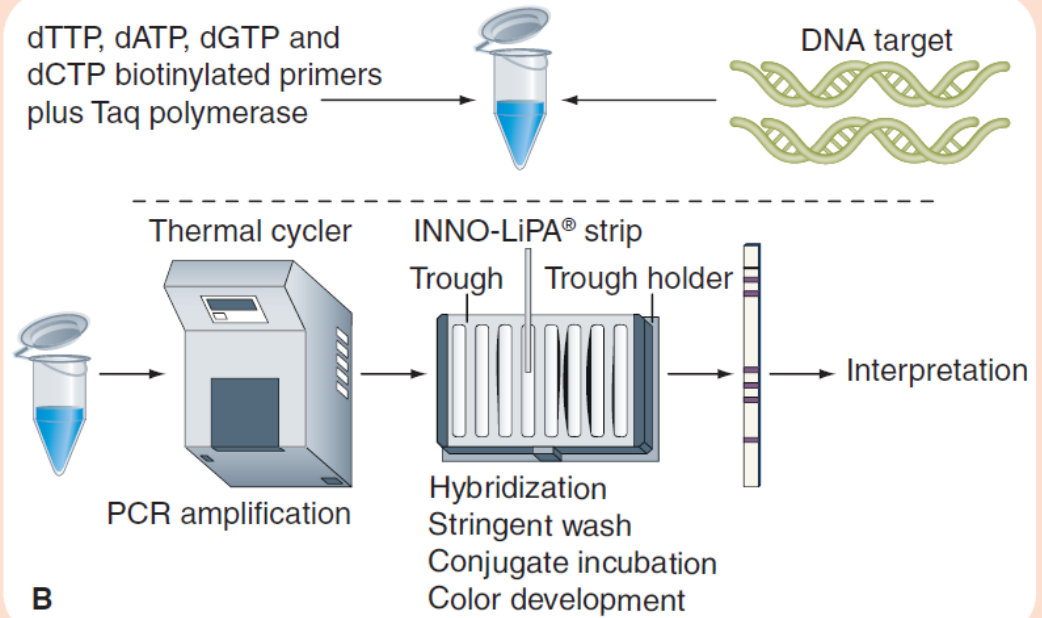
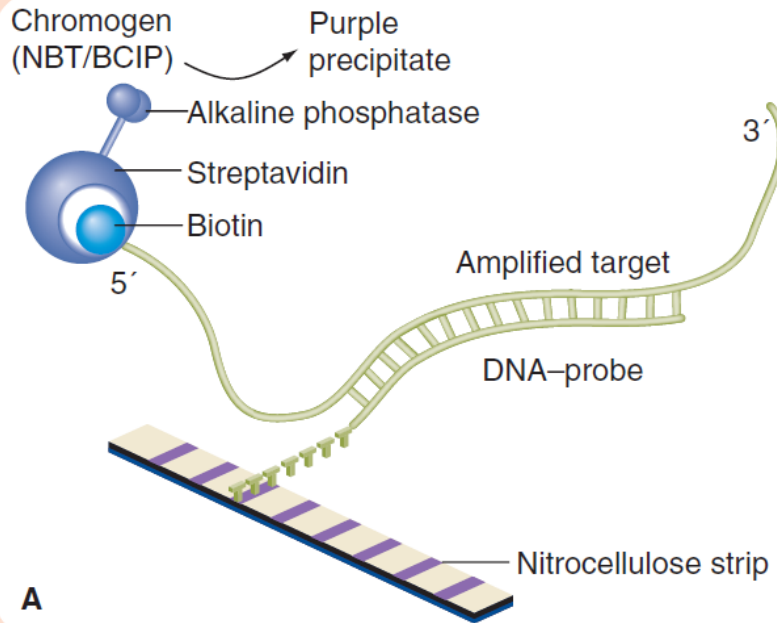
• PCR-Ters hibridizasyon

• DNA dizi analizi





# Line-probe Assays



Line-probe assays for detection of drug resistance. **(A)** Principle of reverse hybridization. **(B)** INNO-LiPA® assay.

# İmmünolojik/Serolojik yöntemler

- Özgül hücresele bağışıklık yanıtını ortaya koyarlar
- Enfeksiyona karşı bağışıklık değil aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösterir
- Pozitif test kişinin *M.tuberculosis* ile enfekte olduğunu gösterir
- Latent tüberküloz enfeksiyonunu aktif tüberkülozdan ayırmaz



**TDT**



**İGST**

# Tüberkülin Deri testi (TDT)

- Tüberkülin deri testi (TDT), kişinin tüberküloz basili ile enfekte olup olmadığını gösterir
- TB enfeksiyonu veya hastalığı geçiren kişilerde tedavi sonrası negatifleşmez ve tedavi başarısını göstermez
- Kızamık, kabakulak gibi virüs enfeksiyonu ya da canlı virüs aşısı olanlarda bağışıklığı baskılayan hastalığı olanlarda ve bağışıklığı baskılayan ilaç kullananlarda TDT yanlışı negatif
- Atipik mikobakteriler ile enfeksiyon ve BCG aşısı TDT'nin pozitif olmasına neden olabilir.
- PPD (saflaştırılmış protein türevi = “purified protein derivative”)
- PPD-S'in (TÜ) dozunun tanımı şöyledir: 0,1 mg/0,1ml dozdaki bir PPD-S'in gecikmiş deri testi aktivitesi

# TDT nasıl değerlendirilir?

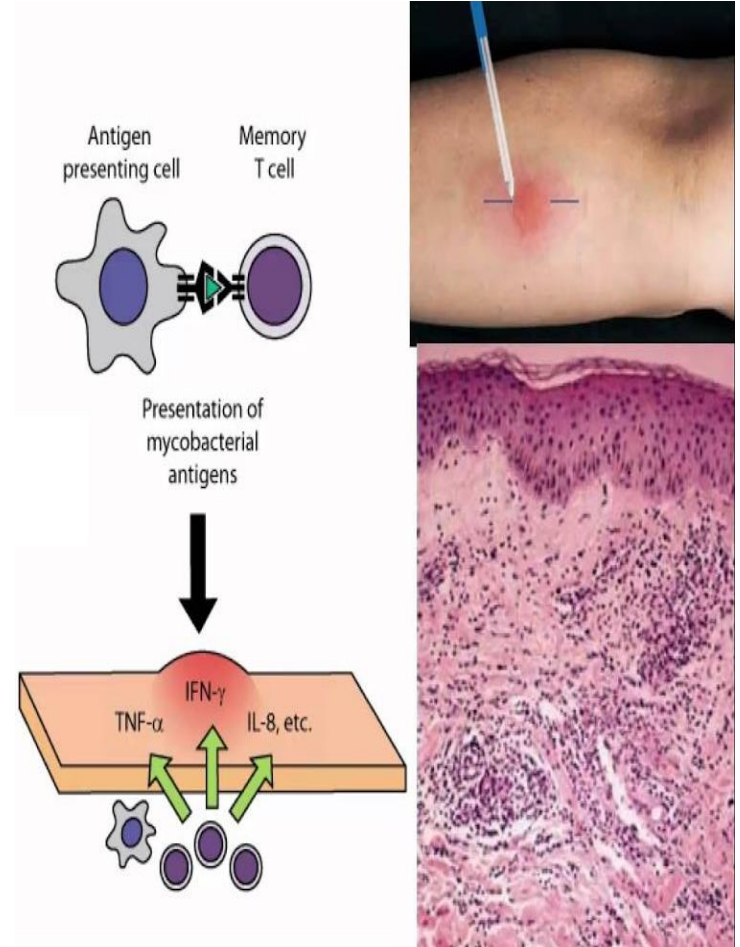
Test yapıldıktan 48-72 saat sonra endürasyon çapı şeffaf bir cetvelle milimetrik olarak ölçülür

<b>BCG'lilerde</b>	
0-5 mm*	Negatif kabul edilir.
6-14 mm*	Negatif kabul edilir (BCG'ye ya da TDM'lere bağlı olabilir).
15 mm ve üzeri	Pozitif kabul edilir.
<b>BCG'sizlerde</b>	
0-5 mm*	Negatif kabul edilir.
6-9 mm*	Negatif kabul edilir (TDM'lere bağlı olabilir).
10 mm ve üzeri	Pozitif kabul edilir.
Bağışıklığı baskılanmış kişilerde** 5 mm ve üzeri pozitif kabul edilir.	

**İkili TDT uygulaması:** Negatif bulunan TDT durumunda 1-4 hafta içinde ikinci TDT yapılır. Sönmüş olan bağışıklık yanıtının tekrar hatırlanması sağlanır. İkinci test sonucu esas alınır ve kaydedilir. Periyodik tarama yapılacak kişilerin başlangıç testinde yapılır. Temaslı muayenesinde kullanılmaz

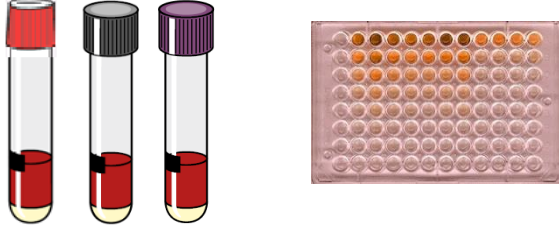
# Tüberküline Yanıtı Azaltan Faktörler

Test edilen kişiye ait faktörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enfeksiyonlar Viral (kızamık, kabakulak, su çiçeği, HIV) Bakteriyel (tifo, tifüs, brusella, boğmaca, yaygın TB, TB plörezi) Mantarlar (Güney Amerika blastomikozu)</li><li>• Canlı virüs aşılı (kızamık, kabakulak, polio, su çiçeği)</li><li>• Metabolik bozukluklar (kronik böbrek yetmezliği)</li><li>• Proteinlerin düşüklüğü (ciddi protein düşüklüğü, afibrinopeni)</li><li>• Lenfoid organları etkileyen hastalıklar (Hodgkin hastalığı, lenfoma, kronik lösemi, sarkoidozis)</li><li>• İlaçlar (kortikosteroidler ve bağışıklığı baskılayıcı diğer birçok ilaç)</li><li>• Yaş (yenidoğanlar, "azalmış" duyarlılığı olan yaşlı hastalar)</li><li>• Stres (cerrahi, yanıklar, mental hastalıklar, graft versus host reaksiyonları)</li></ul>
Kullanılan tüberküline ait faktörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Uygunsuz depolama (ısı ve ışığa maruziyet)</li><li>• Uygunsuz sulandırmalar</li><li>• Kimyasal denatürasyon</li><li>• Kontaminasyon</li><li>• Yapışma (adsorpsiyon) (Tween 80 eklemekle kısmen kontrol edilir)</li></ul>
Uygulama yöntemine ilişkin faktörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Çok az antijen enjekte etmek</li><li>• Deri altına enjeksiyon</li><li>• Enjektöre çektikten sonra geç uygulama</li><li>• Diğer deri testlerine çok yakın enjeksiyon</li></ul>
Okuma ve kayıt ile ilgili faktörler	<ul style="list-style-type: none"><li>• Deneyimsiz okuyucu</li><li>• Bilinçli ya da bilinçsiz hatalar</li><li>• Kayıt hataları</li></ul>



# İNTERFERON GAMA SALINIM TESTLERİ (İGST)

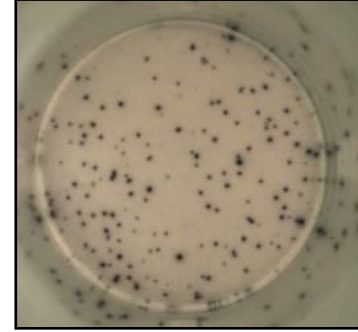
## QFT-GIT



MTBC ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine karşı T-hücrelerden salınan özgül T hücreleri tarafından salgılanan IFN- $\gamma$  saptanır  
ELISA temelli test

- **Basit/Rutinde uygulaması kolay**

## T-SPOT



Periferik mononükleer hücreler *in vitro* koşullarda MTBC'ye özgül ESAT-6 ve CFP-10 ile uyarıldığında IFN- $\gamma$  salgılayan özgül T lenfositleri saptanır

- **Zahmetli/Rutinde uygulaması zor**

- **BCG aşısından ve TDM enfeksiyonlarından (*M.kansasii*, *M.marinum*, *M.szulgai* hariç) etkilenmezler**

- **Değerlendirmeye bağlı değişken sonuç ve *Booster* etkisi görülmez**

# QFT-GIT

TB Ag ile N tüpü farkı hesaplanır. M ve N tüpleri farkı  $\geq 0,5$  çıkarsa başlanır

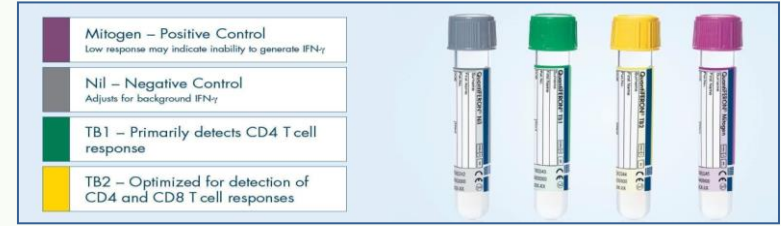
**Pozitif:** TB Ag ve N tüpü fark  $\geq 0,35$

- *M.tuberculosis* ile enfekte

• **Negatif:** fark  $< 0,35$

- *M.tuberculosis* ile enfekte değil

**Belirsiz (indeterminate):** 0,5'ten küçük çıkarsa, hastanın immun yanıtının yetersiz



- Kanın önerilen sıcaklık aralığının (17-27°C) dışında bekletilmesi
- Kan örneklerinin bekletilme süresinin 16 saatten uzun olması
- Kan tüplerinin yeterli karıştırılmaması

- Dolaşımdaki IFN- $\gamma$  düzeyinin aşırı yüksek olması veya heterofil antikorların varlığı
- Yetersiz lenfosit sayısı veya aktivitesi
- $< 5$  yaş çocuklar

# İGST (Ne zaman kullanalım)

TDT'nin kullanılmasının önerildiği tüm durumlarda kullanılabilir.

- Aktif TB gelişme riski yüksek olan LTBE'lilerin saptanmasında
  - İmmünsüpresyon
    - anti-TNF- $\alpha$ , steroid tedavisi
    - HIV/AIDS, solid organ transplantasyonu v.b.
  - Temaslı taramasında
- Sağlık çalışanlarında



- Sistematik LTBE taramasında
- Aktif tüberküloz tanısında WHO kullanımını önermemektedir.



# Biyobelirteçler

Normal biyolojik süreçlerin, patolojik süreçlerin veya terapötik bir işleme karşı farmakolojik yanıtın bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülüp değerlendirilebilen özelliklere biyobelirteç denir.

## •Kan

- İGST
- Neopterin, Prokalsitonin
- TB antikorları
- microRNA

## •Nefes biyobelirteçleri

- Uçucu organik bileşikler

## •Balgam biyobelirteçleri

- TB antijenleri (MPT64, Ag85 v.b.)
- TB-spesifik beta-laktamaz
- Adenozin deaminaz, alkalın fosfataz
- İFN $\gamma$

## •İdrar

- Lipoarabinomannan (LAM)
- Transrenal DNA

Alere Determine™ TB LAM Ag



TEŞEKKÜR EDERİM...