

Klinik Örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* Saptanmasında İki Gerçek Zamanlı PCR Sisteminin Tanısal Performansının Karşılaştırılması[§]

Olkar ABDULMAJED, A. Nedret KOÇ, Aslıhan GÜLTEKİN, M. Altay ATALAY

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na kabul edilen klinik örneklerde *Mycobacterium tuberculosis* suşlarını belirlemek için iki gerçek zamanlı PCR sistemlerinin tanısal performansının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na tüberküloz tanısı amacıyla gönderilen toplam 50 klinik örnek çalışmaya alındı. Kültür pozitif örneklerin 25'i *M. tuberculosis* kompleks (MTBC) grubu ve 7'si tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) olarak tanımlandı. BACTEC MGIT 960 sistem ile duyarlılık testleri çalışıldı. Toplam 50 klinik örneğin moleküler tanısı ise, *Mycobacterium tuberculosis*'i belirleyen gerçek zamanlı PCR; artus® *M. tuberculosis* RG PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) (artus® MTB-PCR) ve GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, ABD) sistemleri ile yapıldı.

Bulgular: Her iki sistemde de klinik örneğin; %58'inde MTBC pozitif ve %42'sinde negatif olarak bulundu. Kültür yönteminin altın standart kabul edildiği bu çalışmada, artus® MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF testlerinin sırasıyla duyarlılığı %72 ve %96, özgüllüğü %56 ve %80, pozitif prediktif değeri (PPD) %62 ve %82 ve negatif prediktif değeri (NPD) %66 ve %95 olarak saptandı. Artus® MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF testi bulgularının karşılaştırılmasında da istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0.05$). Kabul edilebilir düzeyde belirlendi ($\kappa=0.507$; $p<0.05$). Bu çalışmada, 20 solunum sistemi ve 30 solunum sistemi dışı örneklerde; artus® MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF sistemlerinin uyumu sırasıyla, %75 ve %95 ve %56.6 ve %83.3 olarak bulundu. BACTEC MGIT 960 SIRE testi ile rifampisin duyarlılık testine göre duyarlı olarak belirlenen bir klinik örnek GeneXpert MTB/RIF testi ile belirlenemedi.

Sonuç: GeneXpert MTB/RIF testi MTB'nin klinik örnekte belirlenmede, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek düzeyde olması ve kısa sürede sonuç verilebilmesinden dolayı rutin laboratuvarlarda çalışılabilir. Ancak daha fazla klinik örnek içeren çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: *Mycobacterium tuberculosis*, GeneXpert MTB/RIF sistem, gerçek zamanlı PCR, artus®, Real-time PCR

SUMMARY

Comparison of the Diagnostic Performance of Two Real-Time PCR Systems for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples

Objective: This study is aimed to compare the diagnostic performance of two real-time polymerase chain reaction (PCR) systems for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples.

Materials and Methods: Total of 50 clinical specimens sent for the diagnosis of tuberculosis to Mycobacteriology Laboratory of Erciyes University, Medical Faculty, were included in the study. Twenty-five of the culture positive samples were defined as *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and 7 as non-tuberculous mycobacteria (TDM). Susceptibility tests were performed with BACTEC MGIT 960 system. *Mycobacterium tuberculosis* real-time PCR; artus® *M. tuberculosis* RG PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (artus® RTUS MTB-PCR and GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) assay systems were used for the molecular diagnosis of the 50 clinical samples.

Results: The results of the both of the molecular diagnostic systems tested revealed that 58% of the clinical samples were MTBC positive, and 42% were negative. When culture was considered as the gold standard; sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of artus® MTB-PCR and GeneXpert MTB/RIF were found to be 72% vs 96%, 56% vs 80%, 62% vs 82%, 66% vs 95%, respectively. There was no significant statistical difference between the results of GeneXpert MTB/RIF and artus® MTB-PCR ($p>0.05$). The compliance of the two systems was acceptable ($\kappa=0.507$; $p<0.05$). In this study for the 20 pulmonary and 30 non-pulmonary specimens, the compatibility between culture and artus® MTB-PCR, and GeneXpert MTB/RIF was found to be 75% and 95%, 56.6% and 83.3%, respectively. One clinical sample which was found to be sensitive to rifampicin by BACTEC MGIT 960 SIRE tests, could not be detected by GeneXpert MTB/RIF test.

Conclusion: The results of this study revealed that GeneXpert MTB/RIF can be reliably used in routine laboratories due to its high susceptibility, specificity and ability to give results in a short time. However, more research with high number of clinical samples are required for the validation of the system in routine use.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, GeneXpert MTB/RIF system, artus®, Real-time PCR

Alındığı tarih: 23.07.2014

Kabul tarihi: 11.12.2014

Yazışma adresi: A. Nedret Koç, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

e-posta: anedret@erciyes.edu.tr

[§] Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TSY-11-3433 no'lu projeye ile desteklenmiştir.

GİRİŞ

Tüberkülozun dünya çapında kontrolü, tanı yöntemlerinin yavaş olması nedeniyle zordur. Ölüm oranının ve bulaşın azaltılması için erken tanı şarttır^(1,2). Tüberküloz tanısında mikroskopta aside dirençli basil (ARB) aranması ilk yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir. Ucuz ve kısmen kolay olsa da ARB aranması düşük duyarlılığa (%35-80) sahiptir⁽³⁾. ARB aranması özellikle human immunodeficiency virus (HIV)'li bireylerde ve çocuklarda duyarlılığı azdır⁽⁴⁾. Tüberküloz tanısı için kültür sistemleri, şu an altın standart olarak kabul edilmektedir. Sıvı kültür yöntemleri, özellikle BACTEC MGIT 960 sistemi geliştirilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından onaylanmıştır⁽⁵⁾. Kültürlerin sonuçlanma zamanı 2-6 hafta olması en önemli dezavantajdır. Ayrıca kültür sistemleri altyapı gerektirdiğinden (biogüvenlik seviyesi 2-3) her yerde uygulanması zordur. Son zamanlarda tanıda nükleik asit çoğaltma teknikleri geliştirilmiştir. Fakat bu tekniklerin çoğu solunum sistemi örneklerinde *M. tuberculosis* çalışmak için tasarlanmıştır. Bu yöntemlerin bakteriyel yükün zayıf olduğu solunum sistemi dışı örneklerde kullanımı tartışmalıdır⁽⁶⁾. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı teknikler daha hızlıdır, fakat işlemleri zaman alır ve eğitimli personel gerektirir. PCR inhibitörlerle engellenebilir, çapraz kontaminasyon riski vardır ve örnekleri konsantre etme kapasitesi sınırlıdır⁽⁷⁾. Gerçek zamanlı PCR kısa döngü zamanı, çapraz kontaminasyon riskinde azalma ve otomasyon olanağı nedeniyle tercih edilmektedir⁽²⁾. Son yıllarda da özellikle gerçek zamanlı PCR yöntemlerinde önemli araştırmalar yapılmıştır. GeneXpert MTB/RIF sistemi erken tedaviye katkısı olan bir test olması nedeniyle umut verici olarak bildirilmektedir. Aynı anda hem MTB varlığını hem de rifampin (RIF) duyarlılığını 2 saatten az sürede belirlemektedir^(8,9). GeneXpert MTB/RIF sisteminin, hem solunum hem de solunum sistem dışı örneklerde ayrı ayrı kullanılabileceği

bildirilmektedir⁽⁶⁾.

Bu çalışmada, klinik örneklerde MTB suşlarının varlığının belirlenmesinde iki gerçek zamanlı PCR sistemlerinin tanısal performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda Löwenstein-Jensen (L-J) ve BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company Sparks, ABD) (MGIT) yöntemleriyle çalışılan 32 kültür pozitif, 18 kültür negatif toplam 50 klinik örnek çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan klinik örneklerin 13'ü bronkoalveoler lavaj sıvısı (BAL), 10'nu doku, 8'i idrar, 5'i plevral mayi, 5'i apse, 4'ü balgam, 2'si BOS ve 2'si periton mayi, 1'i de mide açlık sıvısı (MAS) olarak belirlendi.

Örneklerin dekontaminasyon-homojenizasyon ve nötralizasyon (DHN) için hazırlanması: BAL, idrar, apse, balgam ve MAS örnekleri için DHN prosedürü (NALC-NaOH) (Becton, Dickinson and Company Sparks, ABD) uygulandı. Bütün steril sıvı örnekler (BOS, vücut sıvıları) 10 mL'den fazla ise; 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Doku örnekleri, steril cam havanlarda serum fizyolojik içinde parçalandıktan sonra DHN prosedürü (NaOH-NALC) uygulandı. Tüm örnekler daha sonradan moleküler yöntemler ile çalışmak için ependorf tüplere ayrıldı ve çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

Çalışmaya alınan 50 klinik örneğin Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile 33'ü ARB negatif, 17'si ARB pozitif olarak bulundu. Klinik örneklerden izole edilen mikobakteri suşları, TBc ID Test (Becton, Dickinson and Company Sparks, ABD) ve NAP testi (BACTEC 460) ile 25'i MTBC ve 7'si *M. tuberculosis* dışı mikobakteri (TDM) olarak tanımlandı.

***Mycobacterium tuberculosis*-kompleks gerçek zamanlı PCR sisteminin çalışması:**

DHN prosedürü uygulanan klinik örneklerden 500 µL alınarak 'QIAGEN QIAamp DNA mini kit' (QIAGEN Almanya) ile DNA izolasyonu yapıldı. PCR reaksiyonu; artus® *M. tuberculosis* RG PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kiti ile amplifiye edilen mikobakteri genomun 159 bp'lik bölgesine bağlanan floresan rezonans transfer hibridizasyon probolar ile ve "Rotor-Gene Q gerçek zamanlı DNA analysis system" (QIAGEN, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PCR testi; 15 µL *M. tuberculosis* RG PCR mikse 10µL örnek DNA'sı ilave edilerek toplam 25 µL reaksiyon miski elde edildi. artus® MTB-PCR döngüsü [95°C'de 2 dakika (1 döngü)] ve [95°C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C de 20 saniye (45 döngü)] olarak gerçekleşti.

artus® MTB-PCR testinin sonuçlarının değerlendirilmesi

Sonuçlar otomatik olarak Rotor-Gene Q MDx/ Rotor-Gene Q software version 1.7.94 göre değerlendirildi. Klinik örnekteki MTB DNA yükleri, pozitif ve negatif kontrollerin logaritmik olarak eğrilerinin grafiklerine göre hesaplandı. Logaritmik eğriler oluşturmak için internal kontroller (*M. tuberculosis* RG/TM QS 1-4) kullanıldı. Klinik örnekte aynı internal kontrollere benzer logaritmik eğrilerin görülmesi MTB türleri açısından pozitif, logaritmik eğri görülmemesi ise negatif olarak kabul edildi⁽¹⁰⁾.

GeneXPERT / MTB/RIF sistemi çalışması

Testin çalışılması: DHN prosedürü uygulanan ve uygulanmayan klinik örneklerinden 1 mL alınarak üzerine 1-2 mL GeneXpert MTB/RIF sample reagent eklendi (balgam, periton sıvısı, plevra sıvısı gibi viskozitesi daha yüksek sıvılarda ise bu oran 1:2 oldu) ve kapağı sıkıca kapatıl-

dı. Fazla çalkalamadan 4 yöne doğru birkaç defa hafifçe karıştırıldı, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan klinik örnekler 1 mL kartuşa konuldu ve kartuş GeneXpert MTB/RIF cihazına yüklendi. Cihazın çalışma prosedürü uygulanarak çalışma başlatıldı⁽¹¹⁾. GeneXpert MTB/RIF cihazında aynı anda MTB varlığı ve rifampisin direncine ait sonuçlar otomatik olarak alındı⁽⁷⁾. GeneXpert MTB/RIF sistemi, yüksek düzey pozitif, orta düzey pozitif, düşük düzey pozitif, çok düşük düzey pozitif ve negatif olarak 5 farklı düzeyde sonuç belirleyerek tanımladı.

Rifampisin duyarlılığının değerlendirilmesi: Rifampin direncini saptamak için; BACTEC MGIT 960 SIRE testi (Becton, Dickinson and Company Sparks, ABD) ve GeneXpert MTB/RIF sistemi kullanıldı.

İstatistiksel analiz: MTB tanısında "gold standart" olarak kültür kabul edildi. Sonuçlar duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) olarak değerlendirildi. Testler arasındaki istatistiksel farklılığa McNemar testi kullanılarak bakıldı. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı. Testler arasındaki uyuma ise kappa katsayısı hesaplanarak bakıldı.

BULGULAR

***Mycobacterium tuberculosis* gerçek zamanlı PCR bulguları**

artus® MTB-PCR yöntemi uygulanan 50 klinik örneğin, 29'unda MTB pozitif olarak bulundu. artus® MTB-PCR pozitif örnekler Tablo 1'de gösterilmektedir. Kültür bulguları ile artus® MTB-PCR bulguları karşılaştırıldığında 19 örnekte hem kültür hem artus® MTB-PCR pozitif bulundu. Sekiz örnekte ise her 2 yöntemle de negatif sonuçlar elde edildi. On örnekte artus® MTB-PCR pozitifken, kültürü negatif bulundu. On üç örnekte kültür pozitif iken artus® MTB-PCR negatif bulundu. Kültür bulguları ile artus®

Tablo 1. Klinik örneklerin ARB, kültür, artus® MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF sonuçlarının gösterilmesi.

Örnek	Sayı	ARB		Kültür			artus® PCR*****		XPERT*****	
		Pozitif	Negatif	MTB* Pozitif	TDM** Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Apse	5		5	2		3	4	1	3	2
BAL***	13	6	7	7	4	2	6	7	6	7
Balgam	4	2	2	4			4		4	
BOS	2		2	2			1	1	2	
Doku	10	1	9	4	1	5	8	2	6	4
Plevral sıvı	5	1	4	4		1	3	2	4	1
Preriton	2		2	1		1	1	1	1	1
İdrar	8	7	1	1	2	5	2	6	3	5
MAS*****	1		1			1		1		1
Toplam	50	17	33	25	7	18	29	21	29	21

*MTB M. tuberculosis; **TDM: M. tuberculosis dışı mikobakteri; ***BAL: Bronkoalveolar lavaj; ****MAS: Mide açlık sıvısı; ***** artus® PCR: artus® artus MTB-PCR; *****XPERT: GeneXPert / MTB/RIF

MTB-PCR bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ($p>0.05$). Uyum düşük düzeyde ama anlamlı bulundu ($kappa=0.28$; $p>0.05$). artus® MTB-PCR bulgularını kültür bulguları ile karşılaştırıldığında; duyarlılık %72, özgüllük %56, PPD %62 ve NPD %66 olarak belirlendi (Tablo 2).

GeneXpert MTB/RIF Bulguları

GeneXpert MTB/RIF sistemi ile 50 klinik örneğin; 9'u yüksek düzey pozitif, 8'i orta düzey pozitif, 8'i düşük düzey pozitif, 4'ü çok düşük düzeyde pozitif bulundu. Rifampisin direnci belirlenemedi. GeneXpert MTB/RIF sistemi pozitif saptanan örnekler Tablo 1'de gösterilmektedir. Klinik örneklerde kültür bulguları ile GeneXpert MTB/RIF bulguları karşılaştırıldığında 24 örnekte hem kültür hem de GeneXpert MTB/RIF yönteminde pozitiflik saptandı. On üç örnekte ise her iki yöntemle de negatif sonuçlar elde edildi. Beş örnekte GeneXpert MTB/RIF yöntemiyle pozitiflik saptanırken iken, kültürde

üreme olmadı. Bir örnekte ise kültürde üreme saptanırken, GeneXpert MTB/RIF yöntemiyle negatif olarak bulundu. Kültür bulguları ile GeneXpert MTB/RIF bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ($p>0.05$). Kabul edilebilir düzeyde uyum bulundu ($kappa=0.76$; $p<0.05$). Kültür bulguları ile GeneXpert MTB/RIF bulguları karşılaştırıldığında duyarlılık %96, özgüllük %80, PPD %82 ve NPD %95 olarak belirlendi (Tablo 2).

artus® MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF Bulgularının Karşılaştırılması

artus® MTB-PCR ile GeneXpert MTB/RIF bulguları karşılaştırıldığında farklı hastalardan elde edilen 50 klinik örneğin 23 (%46)'ünde hem artus® MTB-PCR hem de GeneXpert MTB/RIF yöntemi ile pozitiflik saptandı. On beş (%30) örnekte ise her iki yöntemle de negatif sonuçlar (%30) elde edildi. Altı (%12) örnek GeneXpert MTB/RIF yöntemi ile pozitif bulunurken, artus® MTB-PCR yöntemiyle negatif olarak bulundu.

Tablo 2. Kültür altın standart olarak alındığında moleküler yöntemlerin istatistiksel değerleri.

Testler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD* (%)	NPD** (%)	DSO*** (%)	Kappa	p
artus® PCR*****	72	56	62	66	54	0.28	>0.05
XPert*****	96	80	82	95	74	0.76	<0.05

*PPD: Pozitif prediktif değer **NPD: Negatif prediktif değer, ***DSO: Doğru saptama oranı. **** artus® PCR: artus® MTB-PCR; *****XPert: GeneXPert / MTB/RIF

Altı (%12) örnek ise *artus*[®] MTB-PCR ile pozitiflik saptanırken, GeneXpert MTB/RIF yöntemi ile negatif olarak bulundu. *artus*[®] MTB-PCR bulguları ile Xpert bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ($p>0.05$). Kabul edilebilir düzeyde uyum bulundu ($kappa=0.507$; $p<0.05$).

Solunum sistemi ve solunum sistemi dışındaki örneklerin değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan 50 klinik örnekten 20 (%40)'si solunum sistemi örnekleri, 30 (%60)'u da solunum sistemi dışı örneklerdi. Kültür altın standart yöntem olarak kabul edildiğinde; solunum sistemi örneklerinde *artus*[®] MTB-PCR'in uyumu %75, GeneXpert MTB/RIF sisteminin uyumu %95 olarak bulundu. TDM'i saptanan 4 solunum sistemi örneğinde hem *artus*[®] MTB-PCR hem de GeneXpert MTB/RIF sisteminde negatif olarak bulundu. Bir klinik örnek *artus*[®] MTB-PCR testi ile pozitif, ancak GeneXpert MTB/RIF yöntemi ile negatif olarak bulundu. Bundan dolayı GeneXpert MTB/RIF sisteminin duyarlılığı %100, *artus*[®] MTB-PCR'in duyarlılığı %80 olarak bulundu.

Çalışmaya alınan 30 solunum sistem dışı örnekte; *artus*[®] MTB-PCR yönteminin kültür ile uyumu %56.6, GeneXpert MTB/RIF testinin uyumu ise %83.3 olarak bulundu. Kültürde TDM basili olarak belirlenen iki klinik örnek hem *artus*[®] MTB-PCR hem de GeneXpert MTB/RIF yöntemi ile negatif olarak bulundu. Her iki yöntemin de uyumu %100 olarak bulundu.

TDM üreme sonuçları

Kültürlerinde TDM üreyen 6 klinik örnek *artus*[®] MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF sistemi ile uyumlu sonuç verdi. Ancak kültür de üreyip TDM olarak tanımlanan ARB negatif olan bir doku örneği *artus*[®] MTB-PCR yöntemi ile pozitif, GeneXpert MTB/RIF yöntemi ile negatif olarak bulundu (Tablo 1).

TARTIŞMA

Tüberküloz tedavi ve tanı yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen, hâlen çözülmesi gereken bir halk sağlığı sorunudur. Hastalarda, tanının hızlı ve doğru konması tedaviye erken başlanmasını sağlamaktadır⁽¹²⁾. Tüberkülozun tanısında kültür altın standart olmasına rağmen, geç sonuç vermesi nedeniyle hızlı ve duyarlı bir yöntem arayışları sürmektedir⁽¹³⁾. Son yıllarda mikobakterilerin saptanması ve tanımlanması için hızlı, kolay uygulanan, güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi yönündeki çalışmalar hız kazanmış ve özellikle moleküler biyolojik yöntemler uygulamaya başlanmıştır⁽²⁾.

Tüberküloz basilinin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan PCR maliyet açısından ucuz ve hızlı tanımlama sağladığı bildirilmektedir⁽⁷⁾. Mikobakterilerin tanımlanmasında nükleik asit çoğaltma testlerinde de önemli gelişmeler olmuş ve gerçek zamanlı PCR yöntemi önerilmiştir⁽¹⁴⁾. Gerçek zamanlı PCR, kısa döngü zamanı, düşük kontaminasyon oranı ve mikroorganizma yükünün sayılabilmesi gibi avantajlara sahiptir^(14,15).

Floresan enerji transfer problemleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR işleminin, gastrointestinal sistemden alınmış formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku örneklerinde MTB DNA'sının tespit edilmesinde oldukça duyarlı olduğu; PPD'nin %100, NPD'nin %96.9 olarak bulunduğu bildirilmiştir⁽¹⁶⁾. Hur ve ark.⁽¹⁷⁾ yaptıkları çalışmada, kültür altın standart olarak kabul ederek, PCR sisteminde *artus*[®] *M. tuberculosis* RG kiti kullanarak klinik örnekte MTB suşlarının moleküler olarak saptanmasında, duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %97.8 ve %85.1 olduğunu rapor etmişlerdir. Bu kiti güvenle kullanılabileceğini önermişlerdir. Benzer bir çalışmada da klinik örnekte MTB suşlarının moleküler olarak tespit edilmesinde kültür göre *artus*[®] *M. tuberculosis* PCR Kit kullanılmasının doğru ve hızlı bir yön-

tem olarak rapor edilmiştir⁽¹⁸⁾. Bu çalışmada klinik örneklerde kültür bulguları ile *artus*[®] MTB-PCR bulguları karşılaştırıldığında; duyarlılık %72, özgüllük %56, PPN %62, NPN %66 olarak belirlendi ve istatistiksel açıdan fark yoktu ($p>0.05$). Düşük düzeyde uyum bulundu ($kappa=0.28$).

Son yıllarda tüberküloz basiline tanınmasında kullanılan gerçek zamanlı PCR tekniğinde de yeni gelişmeler olmuştur. Bunlardan biri klinik örneklerde MTB tanımlanmasında GeneXpert MTB/RIF sistemidir⁽¹⁹⁾. GeneXpert MTB/RIF sistemini, klinik örnekler de kültür ve ARB sonuçlarına göre karşılaştırıldığı çalışmalarda, duyarlılık ve özgürlüğünün sırasıyla, %72.5-77.3 ve %98.2-100 olduğu bildirilmiştir. Klinik örnekler göre değerlendirildiğinde en düşük duyarlılığın doku örneklerinde, en düşük özgüllüğünde dışkı örneklerinde olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında TDM basillerinde yanlış pozitiflik saptanmamıştır^(10,20,21). Başka bir çalışmada ise tüberküloz düşünülen erişkinlerde, GeneXpert MTB/RIF testi ARB pozitif örneklerde ARB negatif örnekler göre duyarlılığı yüksek ve özgül bir test olarak kabul edilmektedir⁽²²⁾. Ayrıca GeneXpert MTB/RIF testinde TDM türleri ile MTB'nin çapraz reaksiyon göstermediğini belirlenmiştir. Bu durum testin yüksek özgürlüğünü ortaya koymaktadır^(20, 23). Bu çalışmada, toplam 50 klinik örnekte kültür bulguları ile GeneXpert MTB/RIF sistemi bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ($p>0.05$). Kabul edilebilir düzeyde uyum belirlendi ($kappa:0.76$; $p<0.05$). GeneXpert MTB/RIF yönteminin kültüre göre duyarlılık, özgüllük, PPN, NPN sırasıyla; %96, %80, %82, %95 olarak bulundu. Ayrıca kültürde TDM olarak belirlenenlerde de, GeneXpert MTB/RIF sisteminin duyarlılığı %100, *artus*[®] MTB-PCR duyarlılığı %80 olarak bulundu.

GeneXpert MTB/RIF sistemi tüberküloz tanısı için gereken zaman ciddi oranda azalttığı ve

tedaviye daha erken başlanmasını sağladığı tespit edilmiştir. Yalancı pozitif sonuçlar teknisyen hataları, üretim kusurları, sıvılar ile ilgili sorunlar ve örnekte inhibitör varlığından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir⁽²⁴⁾. Taylor ve ark.⁽²⁵⁾ solunum sistem dışı örneklerde de GeneXpert MTB/RIF sisteminin başarılı olduğunu bildirmiştir. Benzer olarak, solunum sistem dışı örneklerde de GeneXpert MTB/RIF testinin çalışıldığı bir çalışmada kültüre göre uyumsuzluğunun %3.8 olduğu ve duyarlılığının %77.3, özgüllüğünün %98.2 olduğunu rapor edilmektedir⁽¹⁰⁾. Teo ve ark.⁽¹³⁾ yaptıkları çalışmada, GeneXpert MTB/RIF testinin solunum ve solunum sistem dışı örneklerde de duyarlılığının % 90.3, özgüllüğünün %91.6 ve solunum sistem dışı örneklerde duyarlılığının %93.3, özgüllüğünün %81.2 olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, 50 klinik örnekte 20'si solunum sistemi örnekleri, 30'u da solunum sistemi dışı örneklerdi. Solunum sistemi örneklerinde kültür üremeleriyle *artus*[®] MTB-PCR'ın uyumu %75, GeneXpert MTB/RIF testinin uyumu %95 olarak; solunum sistem dışı örnekte ise sırasıyla %56.6 ve %83.3 olarak bulundu.

GeneXpert MTB/RIF testi ile farklı prop (IS6110 TaqMan) kullanılarak çalışılan gerçek zamanlı PCR testinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, solunum sistemi örneklerinde GeneXpert MTB/RIF ve gerçek zamanlı PCR testinin duyarlılığının sırasıyla %79, %84 ve solunum sistem dışı örneklerde ise %53-78 olduğu bildirilmektedir. GeneXpert MTB/RIF sisteminin rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılabilir basit ve hızlı bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir⁽²⁶⁾.

Klinik örneklerde MTB varlığını "GenoType MTBDRplus (v2.0)" ve GeneXpert MTB/RIF testleri ile değerlendirildiği bir çalışmada da; kültür pozitif örneklerde, duyarlılığın sırasıyla %73.1 ve %71.2, özgüllüğün ise her ikisinde %100 olduğu; ARB negatif örneklerde duyarlılığın sırasıyla %57 ve %58 olduğu rapor edilmek-

tedir⁽²⁷⁾. Bu çalışmada, klinik örneklerde *artus*[®] MTB-PCR bulguları ile GeneXpert MTB/RIF bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark yoktu ($p>0.05$). Kabul edilebilir düzeyde uyum bulundu (kappa: 0.507). Kültür üremelerinin altın standart olarak kabul edildiği bu çalışmada, solunum sistemi ve solunum sistemi dışı örneklerde *artus*[®] MTB-PCR ve GeneXpert MTB/RIF sonuçları karşılaştırıldığında; ARB negatif örneklerde *artus*[®] MTB-PCR'ın duyarlılığı %66.6, GeneXpert MTB/RIF sisteminin duyarlılığı %88.8 olarak bulundu. ARB pozitif kültür pozitif olarak bulunan 5 klinik örnek hem *artus*[®] MTB-PCR hem de GeneXpert MTB/RIF sisteminde pozitif olarak bulundu. Her iki sistemde duyarlılık %100 olarak bulundu. ARB pozitif kültür negatif olarak bulunan bir klinik örnek hem *artus*[®] MTB-PCR hem de GeneXpert MTB/RIF sisteminde negatif olarak bulundu. Her iki sistemin uyumu %100 olarak bulundu.

Uygun olmayan ilaç tedavisi, ilaca dirençli suşlar yanında çoklu ilaca dirençli MTB suşlarının da giderek artması tüberkülozun kontrolünü daha da sorunlu hâle getirmektedir. Uygun antibiyotik seçiminde önemli aşama ilaç direncinin doğru ve kısa sürede saptanmasıdır. Tüberküloz insidansının yüksek olduğu ülkelerdeki önemli sorunlardan biri direnç belirleme testlerinin düzenli olarak yapılamaması veya test sonuçlarının uzun süre almasıdır⁽²¹⁾.

MTB için klasik antitüberkülotik duyarlılık yöntemleri uzun zaman alır. Bunun yanında genotipik yöntemler direncin erken belirlenmesini sağlar^(20,21,27). Gerçek zamanlı PCR yöntemleri geliştirilerek, tek bir reaksiyon tüpünde hem MTB tanımı hem de rifampisin direncinin belirlenmesi sağlanmıştır. Bu amaçla GeneXpert MTB/RIF sistemi geliştirilmiştir^(10,13). Klinik örneklerde GeneXpert MTB/RIF testi ve kültürden proporsiyon yöntemiyle rifampisin direncinin değerlendirildiği bir çalışmada, uyumun %100 olduğu rapor edilmektedir⁽²⁸⁾. Benzer bir

çalışmada, GeneXpert MTB/RIF testinin; rifampisin direnci belirlenen suşların olduğu örneklerde duyarlılığı %97.6, rifampisin duyarlı suşların olduğu örneklerde ise %98.1 olduğu bildirilmiştir⁽²⁰⁾. Bu çalışmada; MTB suşları izole edilen 25 klinik örneğin 24'ünde sonuçlar uyumlu bulundu. BACTEC MGIT 960 SIRE testi ile rifampin direnci belirlenen bir klinik örnek GeneXpert MTB/RIF testi ile negatif olarak belirlendi.

Sonuç olarak, kültür altın standart olarak alındığında GeneXpert MTB/RIF sisteminin hem solunum yolu hem de solunum dışı klinik örneklerde *artus*[®] MTB-PCR'a göre daha duyarlı ve özgül olduğu belirlendi. GeneXpert MTB/RIF sisteminin; basit ve hızlı bir test olduğu gözlemlendi. Bu sistemin tüberkülozun tanısı ve rifampisin direncinin belirlenmesinde önemli katkılar sağlayabileceği belirlenmiştir. Bütün bu olumlu yönlerine karşın, daha fazla sayıda klinik örneklerle diğer moleküler yöntemlerle karşılaştırmalı çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, Pai M.** Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: current standards and challenges. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2008; 19:169-72.
2. **Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM.** New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22:174-82. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283262fe9>
3. **Mathew P, Kuo YH, Vazirani B, Eng RH, Weinstein MP.** Are three sputum acid-fast bacillus smears necessary for discontinuing tuberculosis isolation? *J Clin Microbiol* 2002; 40:3482-4.
4. **Mugusi F, Villamor E, Urassa W, Saathoff E, Bosch RJ, Fawzi WW.** HIV co-infection, CD4 cell counts and clinical correlates of bacillary density in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10:663-9.
5. **van Kampen SC, Anthony RM, Klatser PR.** The realistic performance achievable with mycobacterial automated culture systems in high and low prevalence settings. *BMC Infect Dis* 2010; 10:93. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-93>
6. **Teo J, Jureen R, Chiang D, Chan D, Lin R.** Comparison of two nucleic acid amplification assays, the Xpert MTB/RIF assay and the amplified

- Mycobacterium tuberculosis* direct assay, for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3659-62.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00211-11>
7. **Helb D, Jones M, Story E, et al.** Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010; 48:229-37.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01463-09>
 8. **Ocheretina O, Escuyer VE, Mabou MM, et al.** Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Haiti: Investigation of cases with discrepant susceptibility results. *PLoS One* 2014; 9:e90569.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090569>
 9. **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; 57:1094-8.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001339-0>
 10. **Mackay IM.** Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:190-212.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>
 11. **Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Boehme C, Richter E.** Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1202-5.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02268-10>
 12. **Bantubani N, Kabera G, Connolly C, et al.** High rates of potentially infectious tuberculosis and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) among hospital inpatients in KwaZulu Natal, South Africa indicate risk of nosocomial transmission. *PLoS One* 2014; 9:e90868.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090868>
 13. **Arıkan S.** Tüberküloz tanısında direkt mikroskopik inceleme ve kültür. *İnfeksiyon Bülteni* 1996; 1:9-12.
 14. **Pan S, Gu B, Wang H, et al.** Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis. *J Thorac Dis* 2013; 5:251-7.
 15. **Lee MF, Chen YH, Peng CF.** Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods* 2009; 76:174-80.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.005>
 16. **Mishra PK, Gorantla VR, Bhargava A, Varshney S, Vashistha P, Maudar KK.** Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and biopsies of gastrointestinal specimens using real-time polymerase chain reaction system. *J Turk Gastroenterol* 2010; 21:139-34.
 17. **Hur M, Moon HW, Yun YM, et al.** Detection of tuberculosis using artus *M. tuberculosis* PCR Kit and COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15:795-8.
<http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.10.0367>
 18. **El-Sharif A, Affi S, El-Dahshan R, Rafeh N, Eissa S.** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from cancer patients with suspected tuberculosis infection in Egypt: identification, prevalence, risk factors and resistance pattern. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:E438-45.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03974.x>
 19. **Piatek AS, Tyagi S, Pol AC, et al.** Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol* 1998; 16:359-63.
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt0498-359>
 20. **Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al.** Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363:1005-15.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>
 21. **Moure R, Mu-oz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F.** Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complexes and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1137-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01831-10>
 22. **Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N.** Xpert MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 1: CD009593.
<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD009593.pub3>
 23. **Friedrich SO, Rachow A, Saathoff E, et al.** Pan African Consortium for the Evaluation of Anti-tuberculosis Antibiotics (PanACEA). Assessment of the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF assay as an early sputum biomarker of response to tuberculosis treatment. *Lancet Respir Med* 2013; 1:462-70.
[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70119-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70119-X)
 24. **Campos M, Quartin A, Mendes E, et al.** Feasibility of shortening respiratory isolation with a single sputum nucleic acid amplification test. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:300-5.
<http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200803-381OC>
 25. **Taylor N, Gaur RL, Baron EJ, Banaei N.** Can a simple flotation method lower the limit of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in extrapulmonary samples analyzed by the GeneXpert MTB/RIF assay? *J Clin Microbiol* 2012; 50:2272-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01012-12>
 26. **Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N.** Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1772-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02157-10>
 27. **Barnard M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Bosman M, Coetzee G, Warren RM.** The diagnostic performance of the GenoType MTBDRplus version 2 line probe assay is equivalent to that of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3712-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01958-12>
 28. **Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C.** Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49:4138-41.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05434-11>