

# Klinik Örneklerden Tüberküloz Tanısı ve Hızlı Rifampisin Direnci Saptanmasında GeneXpert MTB/RIF Testinin Performansının Değerlendirilmesi

Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Mehmet SOYLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

**Amaç:** GeneXpert MTB/RIF testi (Cepheid, Sunnyvale, Kaliforniya, ABD) tek bir işlem döngüsünde örneğin işlenmesi ve semi-nested gerçek zamanlı PCR işlemi kullanıcının müdahalesine gerek kalmadan kapalı sistem içinde gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada, yayma-negatif, yayma-pozitif solunum ve solunum dışı örneklerden tüberküloz tanısı ve hızlı rifampisin (RIF) direncini saptamada GeneXpert MTB/RIF testinin performansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'na rutin inceleme için yollanan 633 solunum ve 608 solunum dışı örnek çalışmaya alındı. Örnekler Löwenstein-Jensen katı besiyerine ve MGIT 960 sıvı besiyerine (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, NV, ABD) inoküle edildi. Tanımlama GenoType MTBDR plus (Hain Lifescience GmbH) ile yapıldı. "Mycobacterium tuberculosis complex" olarak tanımlanan suşların ilaç duyarlılık testleri MGIT960 yöntemi ile çalışıldı. GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Kaliforniya, ABD) testi üretici önerisine göre çalışıldı.

**Bulgular:** GeneXpert MTB/RIF testinin RIF direnci ve tüberküloz tanısı için performansı 633 solunum ve 608 solunum dışı örnekte değerlendirildi. Değerlendirilen 633 solunum örneğinin 48'inde Mycobacterium tuberculosis üremesi saptandı. Tüm solunum örnekleri değerlendirildiğinde testin duyarlılığı % 93.8 özgülüğü % 98.8 olarak bulundu. Duyarlılık yayma pozitif 30 örnekte %100 iken, yayma negatif 18 örnekte % 83.3 olarak saptandı. Değerlendirilen 608 solunum dışı örneğin 32'sinde M. tuberculosis üremesi saptandı. Tüm solunum dışı örnekler değerlendirildiğinde testin duyarlılığı ve özgülüğü sırasıyla % 71.9 ve % 99.3 olarak bulundu. Duyarlılık yayma pozitif 12 örnekte %100 iken, yayma negatif 20 örnekte % 55 olarak bulundu. Solunum dışı örneklerde MTB/RIF testi RIF dirençli dört ve RIF duyarlı 76 örneği saptadı ve sonuçlar ilaç duyarlılık testi (İDT) ile doğrulandı.

**Sonuç:** MTB/RIF testi özellikle yayma pozitif klinik örneklerden ve yayma negatif solunum örneklerinden RIF dirençli M. tuberculosis'in hızlı tanısında yararlıdır. Buna karşın, test sonuçları daima kültür ve İDT sonuçlarıyla doğrulanmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** GeneXpert MTB/RIF, hızlı tanı, Mycobacterium tuberculosis, rifampisin direnci

## SUMMARY

**Evaluation of GeneXpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Tuberculosis and Rapid Detection of Rifampicin Resistance in Clinical Specimens**

**Objective:** The Gene Xpert MTB/RIF assay (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) is a novel integrated diagnostic device that performs sample processing and semi-nested real-time PCR analysis in a single hands-free step for the diagnosis of tuberculosis and rapid detection of rifampicin (RIF) resistance in clinical specimens. The aim of this study was to determine the sensitivity and specificity of the GeneXpert MTB/RIF assay for the diagnosis of tuberculosis and rapid detection of RIF resistance in smear-positive and smear-negative respiratory and non-respiratory clinical specimens.

**Materials and Methods:** In this study, 633 respiratory and 608 non-respiratory specimens analyzed in the Mycobacteriology laboratory of Medical Microbiology Department, Ege University Medical Faculty, Izmir, Turkey, were evaluated. All samples were inoculated onto Löwenstein-Jensen medium and MGIT 960 (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, NV, USA). GenoType MTBDR plus (Hain Lifescience GmbH) was used for identification of isolates. Antimicrobial susceptibilities of "Mycobacterium tuberculosis complex" were tested using MGIT960. Manufacturer recommendations were used for GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA) test.

**Results:** The GeneXpert MTB/RIF was evaluated for the diagnosis of tuberculosis and rapid detection of RIF resistance in 633 respiratory specimens and 608 non-respiratory specimens. Of the 633 respiratory specimens examined, 48 were culture positive for M. tuberculosis. When all the respiratory samples were evaluated the sensitivity and specificity of the test were 93.8 and 98.8, respectively. For 30 specimens with smear-positive results and 18 specimens with smear-negative results, the sensitivity of the test was 100 and 83.3%, respectively. Of the 608 non-respiratory specimens examined, 32 were culture positive for M. tuberculosis. The sensitivity and specificity of the test were 71.9 and 99.3, respectively. For 12 specimens with smear-positive results and 20 specimens with smear-negative results, the sensitivities were 100 and 55%, respectively. The GeneXpert MTB/RIF assay detected four RIF-resistant specimens and 76 RIF-susceptible specimens, and the results were confirmed by drug susceptibility tests (DST).

**Conclusion:** The GeneXpert MTB/RIF test could be a useful tool for the rapid identification of RIF-resistant M. tuberculosis, especially in smear-positive clinical samples and smear-negative respiratory samples. However the test results must always be confirmed by culture and DST.

**Key words:** Gene Xpert MTB/RIF, rapid diagnosis, Mycobacterium tuberculosis, rifampicin resistance

**Alındığı tarih:** 15.10.2014

**Kabul tarihi:** 01.04.2015

**Yazışma adresi:** Cengiz Çavuşoğlu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**e-posta:** cengizc2003@yahoo.com

## GİRİŞ

*Mycobacterium tuberculosis* ölüme neden olan en önemli enfeksiyöz ajanlardan birisidir. Türkiye’de 2010 yılında tüberküloz (TB) olgu hızı 22.5/100.000, çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) olgularının oranı ise yeni olgularda %2.5, daha önce tedavi almış olgularda %22.8 ve tüm TB olgularında ise %5 olarak bildirilmiştir<sup>(1)</sup>. Bulaşmayı ve ÇİD-TB gelişimini önlemek, doğru tedavi rejimini belirlemek için hastalarda *M. tuberculosis*’in ve rifampisin (RİF) direncinin hızla saptanması çok önemlidir. TB tanısında altın standart kültür olmasına karşın, kültür geç (2-8 hafta) sonuçlanmaktadır. Yayma mikroskopisi hızlı ve ucuz olmasına karşın, duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri düşüktür. Bu nedenle nükleik asit amplifikasyonu temeline dayanan hızlı tanı testleri; erken tedavi şansı sunduğu ve daha etkin toplum sağlığı önlemleri alınmasını sağladığı için önemlidir<sup>(2)</sup>.

RİF-dirençli *M. tuberculosis* suşlarının %95’inde *rpoB* geninin 81-bp’lik bölgesinde mutasyon bulunmaktadır<sup>(3,4)</sup>. GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Kaliforniya, ABD) testi klinik örneklerden tüberküloz tanısı ve RİF direncinin birlikte saptanması için kullanılan örnek işlenmesi, semi-nested PCR ve saptama işlemlerinin kapalı sistem içinde bir arada yapıldığı entegre bir gerçek zamanlı PCR sistemidir. Test iki saat içerisinde sonuçlanmaktadır<sup>(5-7)</sup>. Bu çalışmada, kültür ve fenotipik duyarlılık testi sonuçları ile karşılaştırıldığında yayma pozitif ve yayma negatif solunum ve solunum dışı klinik örneklerde MTB/RIF testinin tüberküloz tanısı ve RİF direnci saptanmasında duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik örnekler: Çalışmada Mayıs 2012 ve Aralık 2013 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim

Dalı, Mikobakteriyoloji Laboratuvarı’na rutin inceleme için yollanan solunum ve solunum dışı örnekler incelendi. Toplam 633 solunum örneği ve 608 solunum dışı örnek çalışmaya alındı.

Kültür, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBK) suşlarının tanımlanması, ilaç duyarlılık testleri (İDT) ve MTB/RIF testi: Steril olmayan klinik örnekler N-asetil-L-sistein-NaOH yöntemi ile dekontamine edildi<sup>(8)</sup>. Dekontaminasyon basamağından sonra, yayma preparatlar auramine-rhodamine ile boyandı. Dekontamine edilen örnekler Löwenstein-Jensen (LJ) katı besiyerine ve MGIT 960 sıvı besiyerine (Becton Dickinson Microbiology System, Sparks, NV, ABD) inoküle edildi. Kültürlerden izole edilen suşlar GenoType MTBDR plus (Hain Lifescience GmbH) ile tanımlandı. MTBK olarak tanımlanan suşların ilaç duyarlılık testleri (İDT) MGIT960 yöntemi ile yapıldı<sup>(9)</sup>. MTB/RIF testi üreticinin tanımladığı şekilde çalışıldı<sup>(6)</sup>.

## BULGULAR

MTB/RIF testinin RİF direnci ve tüberküloz tanısı için performansı 633 solunum ve 608 solunum dışı örnekte değerlendirildi. Değerlendirilen 633 solunum örneğinin 48’inde *M. tuberculosis* üremesi saptandı. Üreme saptanan 48 solunum örneğinin 32 (%62.5)’si yayma pozitif. Tüm solunum örnekleri değerlendirildiğinde duyarlılık %93.8, özgüllük %98.8, pozitif prediktif değer (PPD) %86.5 ve negatif prediktif değer (NPD) %99.5 olarak bulundu. Duyarlılık yayma-pozitif 30 örnekte %100 iken, yayma-negatif 18 örnekte % 83.3 olarak saptandı. Solunum örneklerinde GeneXpert’in duyarlılık, özgüllük ve pozitif ve negatif prediktif değerleri Tablo 1’de özetlenmiştir.

Değerlendirilen 608 solunum dışı örneğin 32’sinde *M. tuberculosis* üremesi saptandı. Üreme saptanan 32 solunum dışı örneğin 12 (%37.5)’si yayma pozitif. Tüm solunum dışı

**Tablo 1. Solunum örneklerinde GeneXpert MTB/IF testinin kültüre göre duyarlılık, özgüllük ve pozitif ve negatif prediktif değerleri (n=633).**

Yöntemler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	NPD (%)	PPD (%)
Yayma	62.5	99.6	97.8	93.8
GeneXpert (Tüm örnekler)	93.8	98.8	99.5	86.5
Yayma-pozitif örnekler	100.0	-	-	100.0
Yayma-negatif örnekler	83.3	98.8	99.5	68.2

NPD: Negatif prediktif değer PPD: Pozitif prediktif değer

örnekler değerlendirildiğinde duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD sırasıyla %71.9, %99.3, %85.2 ve %98.5 olarak bulundu. Duyarlılık yayma-pozitif 12 örnekte %100 iken, yayma-negatif 20 örnekte %55 olarak bulundu. Solunum dışı örneklerde GeneXpert MTB/RIF testinin duyarlılık, özgüllük ve pozitif ve negatif prediktif değerleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

**Tablo 2. Solunum dışı örneklerde GeneXpert MTB/IF testinin kültüre göre duyarlılık, özgüllük ve pozitif ve negatif prediktif değerleri (n=608).**

Yöntemler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	NPD (%)	PPD (%)
Yayma	37.5	100	96.6	100
GeneXpert (Tüm örnekler)	71.9	99.3	98.5	85.2
Yayma-pozitif örnekler	100.0	-	-	100.0
Yayma-negatif örnekler	55	99.3	98.5	73.3

Bu çalışmada, MTB/RIF testi ile MTBK saptanan 80 klinik örneğin 76 (%95)’sı RİF duyarlı, dört (%5) örnek ise RİF dirençli olarak belirlendi. MTB/RIF testi ile elde edilen sonuçlar İDT ile doğrulandı ve MTB/RIF testiyle RİF direnci saptanan dört örnek İDT ile RİF dirençli, MTB/RIF testi ile RİF duyarlı olarak saptanan 76 örnek İDT ile RİF duyarlı olarak bulundu. Çalışmada MTB/RIF testi ile İDT arasında %100 uyum saptandı.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada rutin inceleme için yollanan solunum ve solunum dışı örneklerde MTB/RIF testinin performansı araştırıldı. Yapılan çalışmalarda MTB/RIF testinin duyarlılığı yayma-pozitif, kültür-pozitif solunum örneklerinde ise %98-100,

özgüllüğü ise %99-100 olarak bildirilmiştir<sup>(6,7,10-15)</sup>. Çalışmamızda, daha önceki yapılan çalışmalarla uyumlu olarak yayma ve kültür-pozitif solunum örneklerinde duyarlılık %100, özgüllük ise %98.8 olarak saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarda yayma-negatif, kültür-pozitif solunum örneklerinde %47.8 ile %76.9 arasında değişen duyarlılıklar bildirilmiştir<sup>(7,10,14,15)</sup>. Sunulan çalışmada, yayma-negatif, kültür-pozitif solunum örneklerinde saptanan %83.3 duyarlılığın daha önce yapılan çalışmalarda bulunan değerlerden yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni çalışmamızda testin geliştirilmiş yeni versiyonunun kullanılması olabilir.

Yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı yayma-pozitif solunum dışı örneklerde %100, yayma-negatif solunum dışı örneklerde ise %28.2-67 olarak bulunmuştur<sup>(7,10,14,15)</sup>. Sunulan çalışmada testin duyarlılığı yayma-pozitif solunum dışı örneklerde %100 olarak bulunurken, yayma negatif solunum dışı örneklerde %55 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ve yapılan diğer çalışmalarda yayma-negatif kültür-pozitif örneklerde MTB/RIF testinin duyarlılığının solunum örneklerinde, solunum dışı örneklerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun solunum dışı örneklerde basil sayısının çok az olmasına ve/veya bu örneklerde testteki internal kontrolü etkilemeden örnek içindeki basilin genomunun amplifiye olmasını engelleyen inhibitör maddelerin varlığına bağlı olabileceği ileri sürülmektedir<sup>(7)</sup>.

MTB/RIF testinin duyarlılığı otomatize sıvı kültürden daha düşük olmasına karşın, rutin uygulamada yaklaşık 3-24 saat içinde sonuç alınması nedeniyle, ortalama 19 günde sonuçlanan kültürden daha hızlı sonuçlanmaktadır<sup>(7)</sup>. Ayrıca yayma ile karşılaştırıldığında MTB/RIF testi en az yayma kadar hızlı olmasının yanı sıra duyarlılığı yaymadan daha yüksektir.

Yapılan çalışmalarda MTB/RIF testinin RIF

direncini saptamada duyarlılığı %94.4-100, özgülüğü ise %98.3-100 olarak bulunmuştur<sup>(11,12,16)</sup>. Sunulan çalışmada, MTB/RIF testi ile RIF dirençli dört ve RIF duyarlı 76 örnek saptanmış ve sonuçlar İDT ile doğrulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, MTB/RIF testinin özgülüğü yüksek olmasına karşın, yanlış RIF direnci sonuçları görülebildiği bildirilmektedir. RIF direncinin düşük olduğu koşullarda testin PPD'si yeterli değildir<sup>(12)</sup>. Bu nedenle RIF direncinin düşük oranlarda görüldüğü bölgelerde direnç sonuçları bildirilirken dikkatli olunmalıdır.

Sonuç olarak, MTB/RIF testi rutin uygulamada minimal eğitimli personel tarafından kullanılabilir. Test kısa sürede sonuçlanır ve üç saatten daha kısa bir süre içinde *M. tuberculosis* ve RIF direncini birlikte saptayabilir. MTB/RIF testi özellikle yayma pozitif klinik örneklerden ve yayma negatif solunum örneklerinden RIF dirençli *M. tuberculosis*'in saptanmasında yararlıdır. Buna karşın, test sonuçları daima kültür ve İDT sonuçlarıyla doğrulanmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı. Türkiye'de Verem Savaşı 2012 Raporu. Anıl Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara, 2013.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:7-10.
3. **Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.** Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341:647-50. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90417-F](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)90417-F)
4. **Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A.** Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4435-8. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4435-4438.2002>
5. **Blakemore R, Story E, Helb D, et al.** Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2495-501. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00128-10>
6. **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>
7. **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>
8. **Kent PT, Kubica GP.** Public health mycobacteriology. A guide for a level III laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta, GA, 1985.
9. CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; approved standard. CLSI/NCCLS Document M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2003.
10. **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>
11. **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>
12. **Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al.** Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet* 2011; 377:1495-505. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60438-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60438-8)
13. **Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, et al.** Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1621-3. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02214-10>
14. **Lawn SD, Mwaba P, Bates M, et al.** Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:349-61. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70008-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70008-2)
15. **Özkütük N, Sürücüoğlu S.** Orta prevalanslı bölgede akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısında Xpert MTB/RIF testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:223-32. <http://dx.doi.org/10.5578/mb.7456>
16. **Moure R, Mu-oz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F.** Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex 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>