

TÜBERKÜLOZUN MOLEKÜLER TANISINDA GÜNCEL DURUM

Doç. Dr. Alpaslan Alp

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Dünya Sağlık Örgütü 2009 Yılı Raporu

- **Aktif tüberkülozlu hasta sayısı: 13.7 milyon**
- **Yeni hasta sayısı: 9.27 milyon**
- **Tüberküloz nedeniyle hayatını kaybeden hasta sayısı: 1.76 milyon**

A decorative border of a DNA double helix structure runs vertically along the left and right edges of the slide. The helix is composed of two strands, one colored in shades of blue and green, and the other in shades of red and orange, connected by horizontal rungs representing base pairs.

Tüm uğraşlara rağmen, yıllardan beri bu sayılar düşme eğilimine girmiyor !

NEDEN?

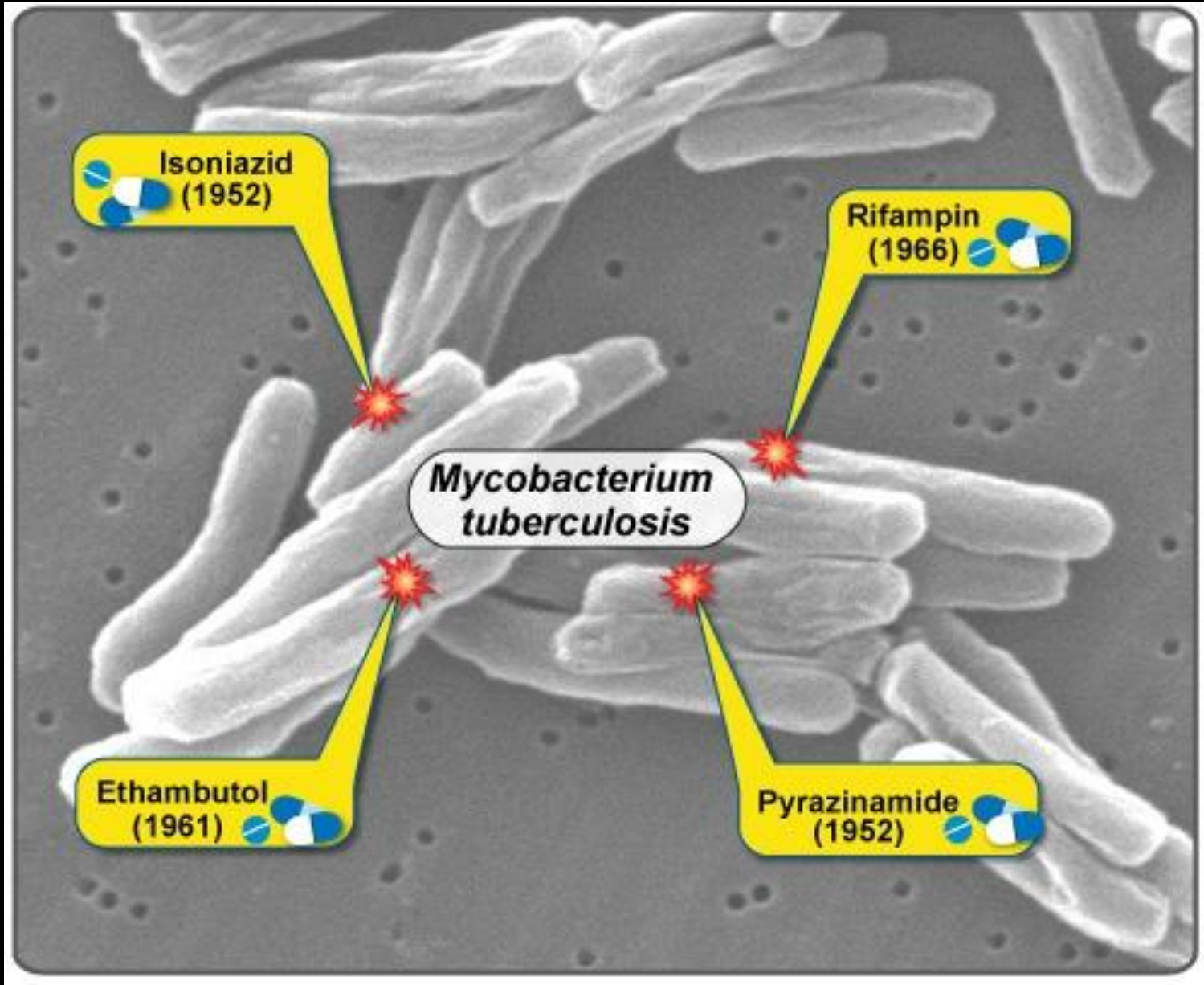
Tüberkülozun Rutin Laboratuvar Tanısı

- **Mikroskopik inceleme**
- **Kültür yöntemleri**
 - **Sıvı**
 - **Katı**



Tüberkülozun Rutin Laboratuvar Tanısı

- **Mikroskopik inceleme**
- **Kültür yöntemleri**
 - **Sıvı**
 - **Katı**
- **Moleküler yöntemler ???**



Isoniazid
(1952)

Rifampin
(1966)

*Mycobacterium
tuberculosis*

Ethambutol
(1961)

Pyrazinamide
(1952)

Tüberküloz ve Moleküler Yöntemler

- **Tüberküloz tanısı**
- **Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması**
- ***M. tuberculosis*'e karşı ilaç direncinin saptanması**
- ***M. tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi**

Soru(n)...?

- Tüberküloz tanısında nükleik asit tabanlı testlerin yeri nedir?

Kanıt...

- Bilimsel literatürün taranması ve incelenmesi
- Deneyimler

Kanit...

Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression

Daphne I. Ling¹, Laura L. Flores², Lee W. Riley^{1,3}, Madhukar Pai^{4*}

1 Division of Epidemiology, School of Public Health, University of California, Berkeley, California, United States of America, 2 Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, San Francisco General Hospital, San Francisco, California, United States of America, 3 Division of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California, Berkeley, California, United States of America, 4 Department of Epidemiology, Biostatistics and Occupational Health, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

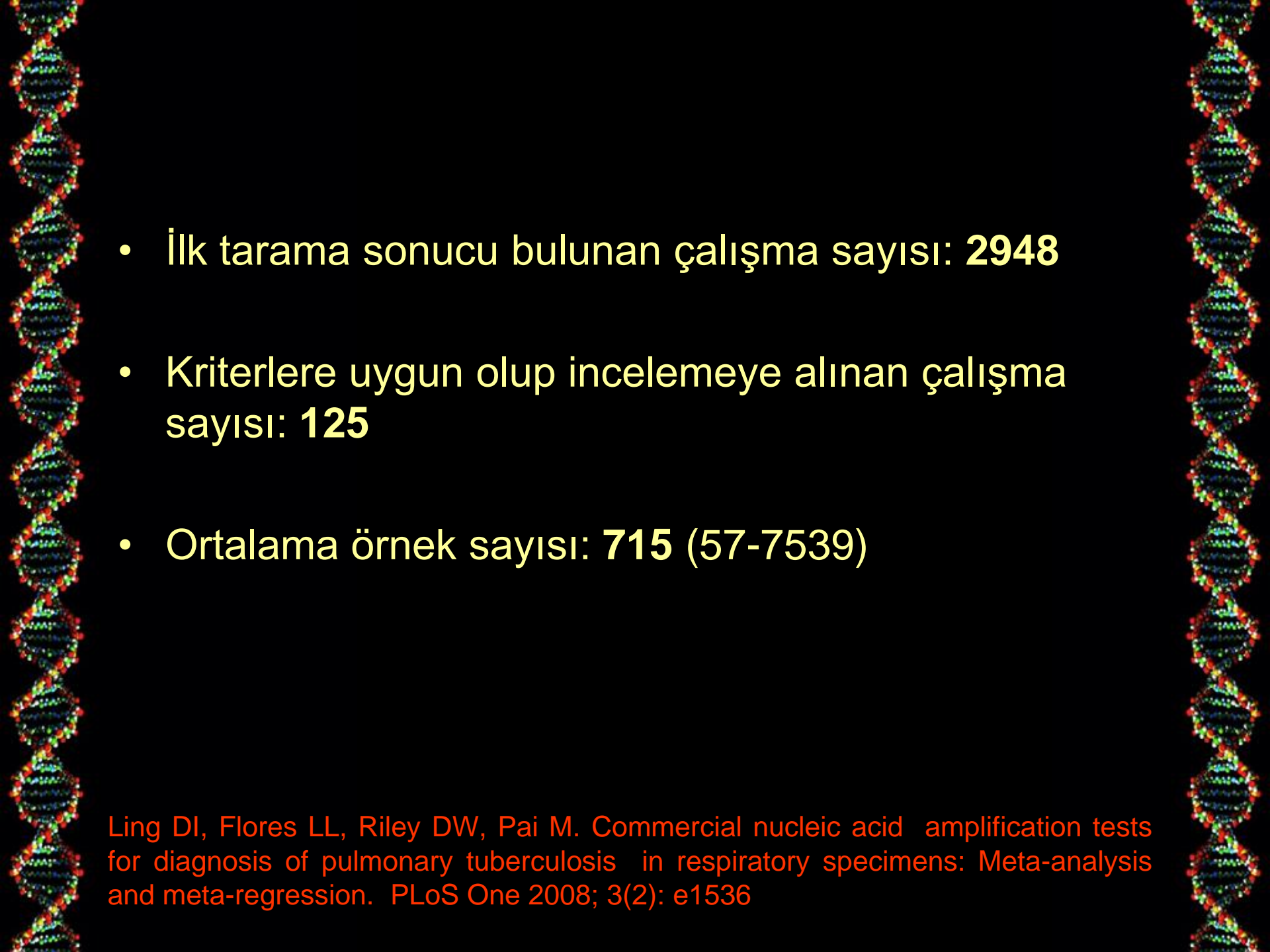
Citation: Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M (2008) Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. PLoS ONE 3(2): e1536. doi:10.1371/journal.pone.0001536

Background. Hundreds of studies have evaluated the diagnostic accuracy of nucleic-acid amplification tests (NAATs) for tuberculosis (TB). Commercial tests have been shown to give more consistent results than in-house assays. Previous meta-analyses have found high specificity but low and highly variable estimates of sensitivity. However, reasons for variability in study results have not been adequately explored. We performed a meta-analysis on the accuracy of commercial NAATs to diagnose pulmonary TB and meta-regression to identify factors that are associated with higher accuracy. **Methodology/Principal Findings.** We identified 2948 citations from searching the literature. We found 402 articles that met our eligibility criteria. In the final analysis, 125 separate studies from 105 articles that reported NAAT results from respiratory specimens were included. The pooled sensitivity was 0.85 (range 0.36–1.00) and the pooled specificity was 0.97 (range 0.54–1.00). However, both measures were significantly heterogeneous ($p < .001$). We performed subgroup and meta-regression analyses to identify sources of heterogeneity. Even after stratifying by type of commercial test, we could not account for the variability. In the meta-regression, the threshold effect was significant ($p = .01$) and the use of other respiratory specimens besides sputum was associated with higher accuracy. **Conclusions/Significance.** The sensitivity and specificity estimates for commercial NAATs in respiratory specimens were highly variable, with sensitivity lower and more inconsistent than specificity. Thus, summary measures of diagnostic accuracy are not clinically meaningful. The use of different cut-off values and the use of specimens other than sputum could explain some of the observed heterogeneity. Based on these observations, commercial NAATs alone cannot be recommended to replace conventional tests for diagnosing pulmonary TB. Improvements in diagnostic accuracy, particularly sensitivity, need to be made in order for this expensive technology to be worthwhile and beneficial in low-resource countries.

Yayın tarama kriterleri:

- Pulmoner tüberküloz tanısı için NAAT kullanılmış olması;
- Altın standart kültür yöntemiyle karşılaştırma yapılmış olması;
- Duyarlılık ve özgüllük değerlerinin verilmiş olması;
- En az 50 örnekle çalışılmış olması.

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536

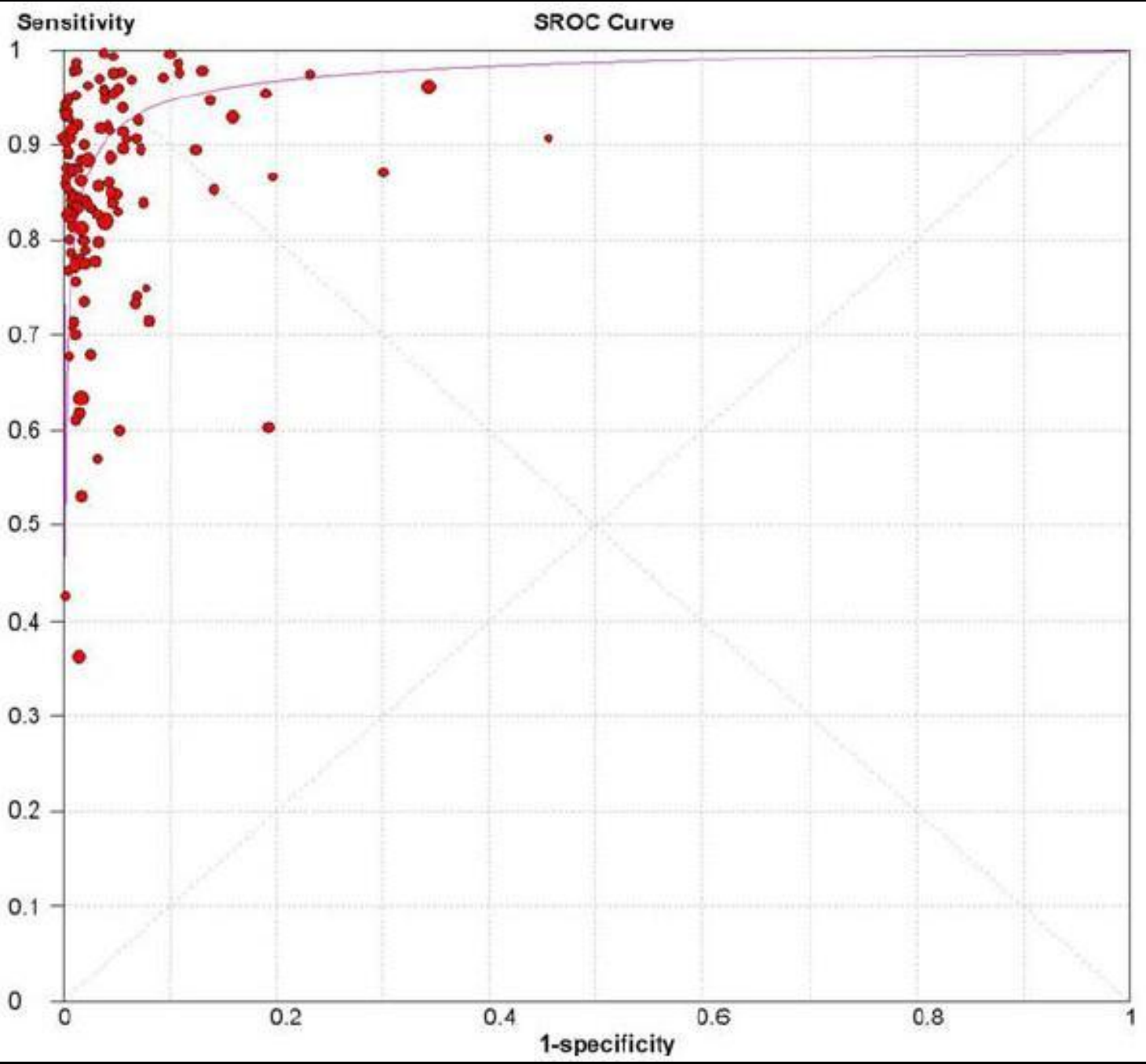
- 
- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **2948**
 - Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **125**
 - Ortalama örnek sayısı: **715 (57-7539)**

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536

SONUÇLAR:

- Duyarlılık ve özgüllük sonuçları çok değişken.
- Duyarlılık: %85
- Özgüllük: %96
- Klinik olarak anlamlı bir tanısal doğruluk derecesi yok.

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536



YORUM:

- Bu duyarlılık seviyelerindeki bir test grubuna rutin uygulamada tek başına güvenilemez.
- Bu test grubu, ancak altın standart yöntemi destekleyen bir yöntem olarak kullanılabilir.

Ling DI, Flores LL, Riley DW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536

Hangi tür PCR Yöntemi?

- **Laboratuvar yapımı (in house) yöntemler**
 - **Optimizasyona açık**
 - **Ucuz**
- **Hazır ticari kitler**
 - **Standardizasyon imkanı**
 - **Solunum yolu örnekleri için optimize edilmiş**

Hangi tür PCR Yöntemi?

- Laboratuvar yapımı yöntemlerle hazır ticari kitlerin duyarlılık ve özgüllükleri arasında önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir:

Huang TS et al: Comparison of the Amplicor assay and Digene system with in house PCR... J Clin Microbiol 1996, 34:3092-3096.

Yuen KY et al: Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR... J Clin Microbiol 1997, 35:1385-1389.

Cohen RA et al: Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum... Am J Respir Crit Care Med 1998, 157:156-161.

Research article

Open Access

In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression

Laura L Flores^{1,2,3}, Madhukar Pai^{1,3}, John M Colford Jr¹ and Lee W Riley^{*1}

Address: ¹Divisions of Infectious Diseases and Epidemiology, School of Public Health, University of California, Berkeley, CA 94720, USA, ²Division of Molecular Biomedicine, CINVESTAV-IPN, Mexico DF, Mexico and ³Division of Pulmonary & Critical Care Medicine, San Francisco General Hospital, San Francisco, CA 94110, USA

Email: Laura L Flores - lflores@medsfgh.ucsf.edu; Madhukar Pai - madhupai@berkeley.com; John M Colford - jcolford@socrates.berkeley.edu; Lee W Riley* - lrwiley@berkeley.edu

* Corresponding author

Published: 03 October 2005

Received: 10 May 2005

BMC Microbiology 2005, 5:55 doi:10.1186/1471-2180-5-55

Accepted: 03 October 2005

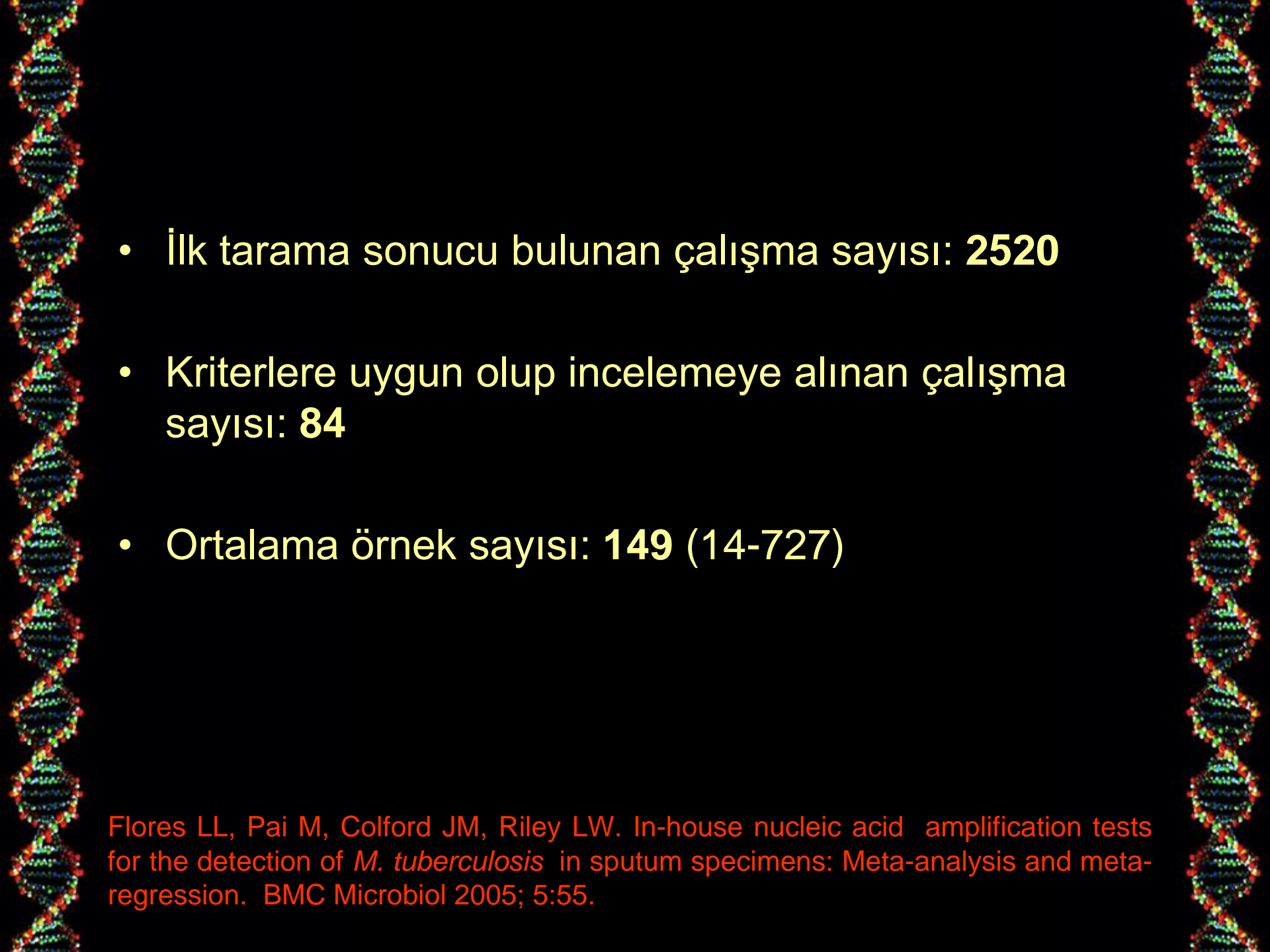
This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/55>

© 2005 Flores et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: More than 200 studies related to nucleic acid amplification (NAA) tests to detect *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical specimens have appeared in the world literature since this technology was first introduced. NAA tests come as either commercial kits or as tests designed by the reporting investigators themselves (in-house tests). In-house tests vary widely in their accuracy, and factors that contribute to heterogeneity in test accuracy are not well characterized. Here, we used meta-analytical methods, including meta-regression, to identify factors related to study design and assay protocols that affect test accuracy in order to identify those factors associated with high estimates of accuracy.

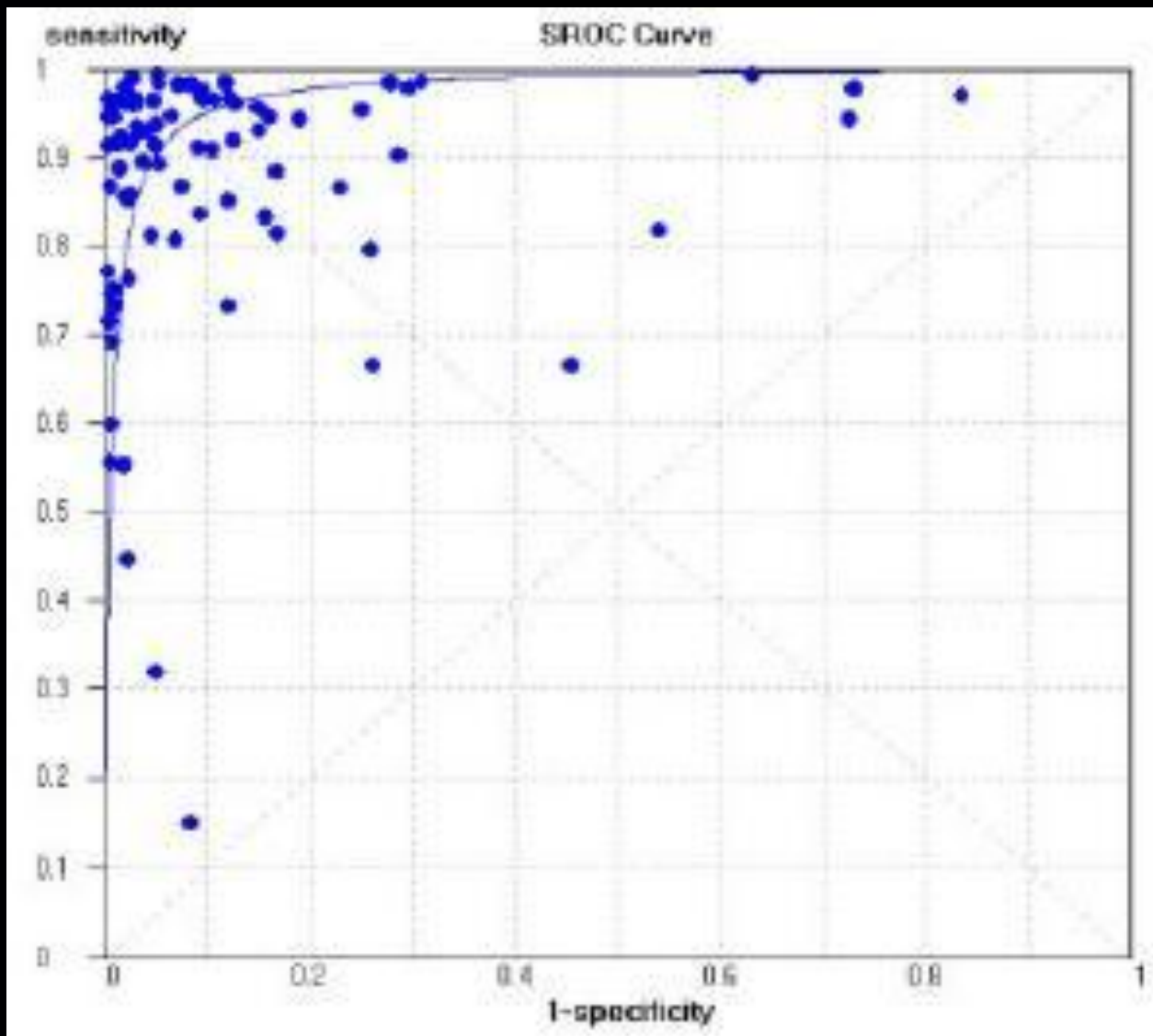
- 
- İlk tarama sonucu bulunan çalışma sayısı: **2520**
 - Kriterlere uygun olup incelemeye alınan çalışma sayısı: **84**
 - Ortalama örnek sayısı: **149 (14-727)**

Flores LL, Pai M, Colford JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *M. tuberculosis* in sputum specimens: Meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiol 2005; 5:55.

SONUÇLAR:

- Duyarlılık ve özgüllük sonuçları çok değişken.
- Duyarlılık: %9.4 - %100
- Özgüllük: %5.6 - %100
- Klinik olarak anlamlı bir tanısal doğruluk derecesi yok.
- Hedef bölge olarak IS6110 bölgesinin kullanıldığı çalışmalarda tanısal doğruluk derecesi daha yüksek.

Flores LL, Pai M, Colford JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *M. tuberculosis* in sputum specimens: Meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiol 2005; 5:55.



YORUM:

- Bu duyarlılık seviyelerindeki bir test grubuna rutin uygulamada tek başına güvenilemez.
- Bu test grubu, ancak altın standart yöntemi destekleyen bir yöntem olarak kullanılabilir.

Flores LL, Pai M, Colford JM, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *M. tuberculosis* in sputum specimens: Meta-analysis and meta-regression. BMC Microbiol 2005; 5:55.



HIV Viral Yük Tayininin nemi

- Tedaviye bařlandıktan sonraki süreç:
 - 1-4 hafta: HIV RNA seviyesinde hızlı düşüş.
 - Daha uzun süreli (birkaç ay), fakat daha yavař bir düřüř.
 - Maksimum antiviral etki 4-6 ayda saęlanır.

Tedavi etkinliğinin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılan en önemli parametre:

Kantitatif HIV RNA lçm = Viral Yük Tayini

Tedavi Etkinliđinin HIV Viral Y¼k ölç¼m¼ ile İzlenmesi

- HIV RNA;
 - Tedaviye başlarken,
 - 3-4 aylık aralıklarla, bakılmalı.
 - Anlamlı değişim: Viral yükte en az %50 azalma.
- Tedavi başarısı:
 - 24-48 haftada viral yük¼n 50 kopya/ml'nin altına d¼ş¼r¼lmesi.

Tedavi Etkinliđinin HIV Viral Y¼k ölç¼m¼ ile İzlenmesi

- *Lancet 2003; 362:679*
 - Altı ay süreyle HAART uygulanan 9323 hastada,
 - Klinik düzelmenin en önemli göstergeleri, CD4 sayısı ve viral yük.

HIV ile Enfekte Hastaların Deęerlendirilmesi

- Avrupa AIDS Klinik Birlięi (EACS) Kılavuzu:
 - HIV viral y¼k¼ne ne zaman bakılmalı?
 - ✓ İlk vizitte,
 - ✓ Tedavi almayan asemptomatik hastalarda 6 ayda bir,
 - ✓ Tedaviye başlarken,
 - ✓ Tedavi s¼rerken 3 ayda bir.

“Evaluation of the value of PCR method in diagnosis of tuberculosis”

Alp A, Hasçelik G, Özkara Ş

40th Union World Conference on Lung Health, 2009

- İki yıllık süreçte laboratuvara gönderilen örneklerle, mikroskopik inceleme, kültür ve PCR yöntemleri uygulandı.
- PCR duyarlılığı: %80.7 (46/57)
- Sadece PCR ile pozitif bulunan 13 örneğe, klinik açıdan nasıl bakıldığı araştırıldı.

“Evaluation of the value of PCR method in diagnosis of tuberculosis”

Alp A, Hasçelik G, Özkara Ş

40th Union World Conference on Lung Health, 2009

- Bu hastalardan 7'sine, sadece PCR pozitifliği ile tüberküloz tedavisi başlandığı saptandı.
- Yedi örnek de akciğer-dışı örnekler idi.
- Sonuç:
 - Solunum yolu örneklerinde PCR ancak kültürü destekleyici bir tanı aracı olabilir.
 - Solunum yolu dışındaki örnekler için PCR kullanımı daha yararlı sonuçlar doğurabilir.

“Is PCR an essential method for the diagnosis of tuberculosis
in a routine laboratory”

Alp A, Hasçelik G,

ASM 110th General Meeting, 2010

- Üç yıllık süreçte izole edilmiş 170 *M. tuberculosis* izolatının mikroskopik inceleme, kültür ve PCR sonuçları incelendi.
- Solunum yolu örneklerinde PCR duyarlılığı: %72
- Solunum yolu-dışı örneklerde PCR duyarlılığı: %76
- Yorum: PCR, mevcut duyarlılık oranı ile, rutin laboratuvara önemli bir katkı sağlamaktan uzaktır.

Tüberküloz tanısında kullanılacak moleküler yöntemlerin duyarlılığını etkileyen faktörler

- **Nükleik asit izolasyon yöntemi**
- **İnhibitör maddeler**
- **Basil atılımının az olması**
- **Kullanılan örnek hacmi**

Teknik olarak umut veren yeni test yok mu?

- Xpert MTB/RIF Testi
- LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification Test)
- Mikroçip çalışmaları
- Düzenleyici RNA'ların (sRNA) keşfi

Xpert MTB/RIF Testi

- Ortak bir çalışmanın ürünü:
 - FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics)
 - Cepheid (A.B.D.)
 - University of Medicine and Dentistry of New Jersey
- İki saat içerisinde *M. tuberculosis* varlığının ve rifampin direncinin saptanması
-  primer ve beř prob kullanılarak uygulanan “hemi-nested real-time PCR”

1

Sputum liquefaction and inactivation with 2:1 sample reagent



2

Transfer of 2 ml material into test cartridge



3

Cartridge inserted into MTB-RIF test platform (end of hands-on work)

4

Sample automatically filtered and washed

5

Ultrasonic lysis of filter-captured organisms to release DNA

6

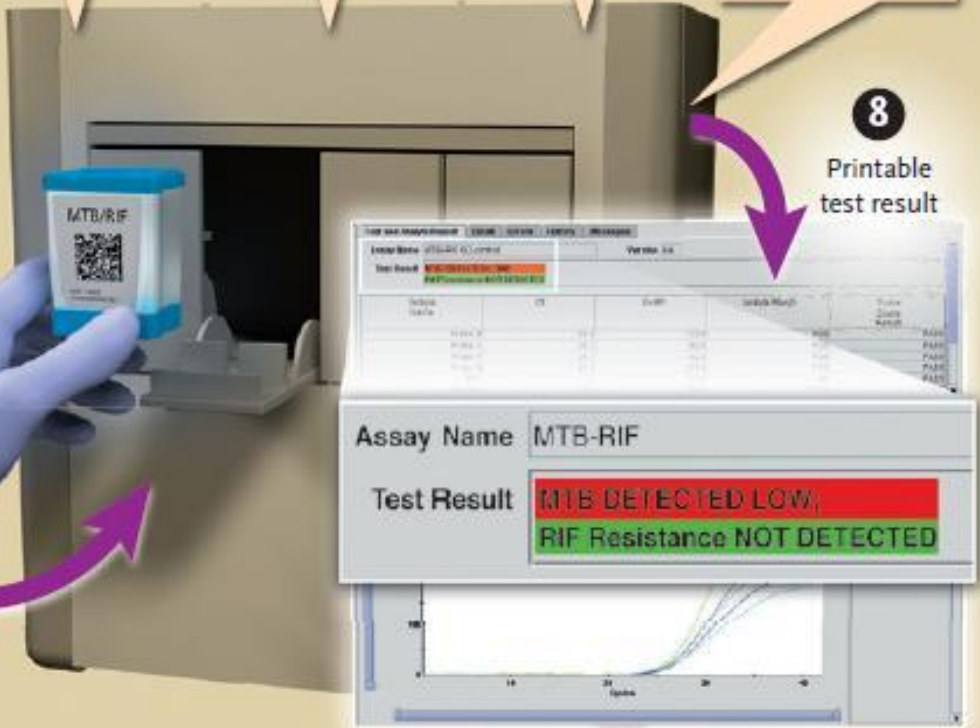
DNA molecules mixed with dry PCR reagents

7

Seminested real-time amplification and detection in integrated reaction tube

8

Printable test result



Assay Name MTB-RIF

Test Result **MTB DETECTED LOW;**
RIF Resistance NOT DETECTED

Time to result, 1 hour 45 minutes

Xpert MTB/RIF Testi

2010 yılında yayınlanan ilk çalışmalarda tatmin edici sonuçlar alınmış:

- Yayma-pozitif kültür-pozitif örneklerde duyarlılık :%99
- Yayma-negatif kltrpozitif örneklerde duyarlılık: %90

Xpert MTB/RIF Testi

- DSÖ tarafından istenen standartlar ile kıyaslandığında, dezavantajları:
 - Kitlerin raf ömrü en fazla 14 ay
 - Cihaz yıllık bakım gerektiriyor
 - Cihaz pille çalışmıyor
 - Basit bir test ortaya çıkarılmış ancak çok karmaşık bir teknoloji kullanılıyor
 - Ucuz değil





Tüm Akciğer TB Şüpheliler^a

Balgam ARB Mikroskopisi

İki veya üç
vayma pozitif

Sadece bir
vayma pozitif

Üç yayma
negatif

TB dışı antibiyotik
tedavisi

Film ve doktorun
kanaati

ARB
tekrarı

İyileşme yok

İyileşti

Evet TB

Bir veya fazla
vayma pozitif

Bütün yaymalar
negatif

Film ve doktorun
kanaati

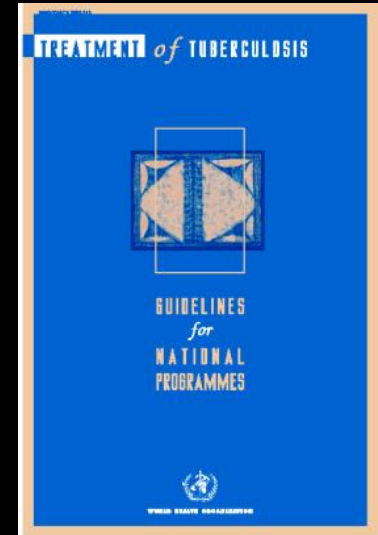
Hayır TB
Değil^b

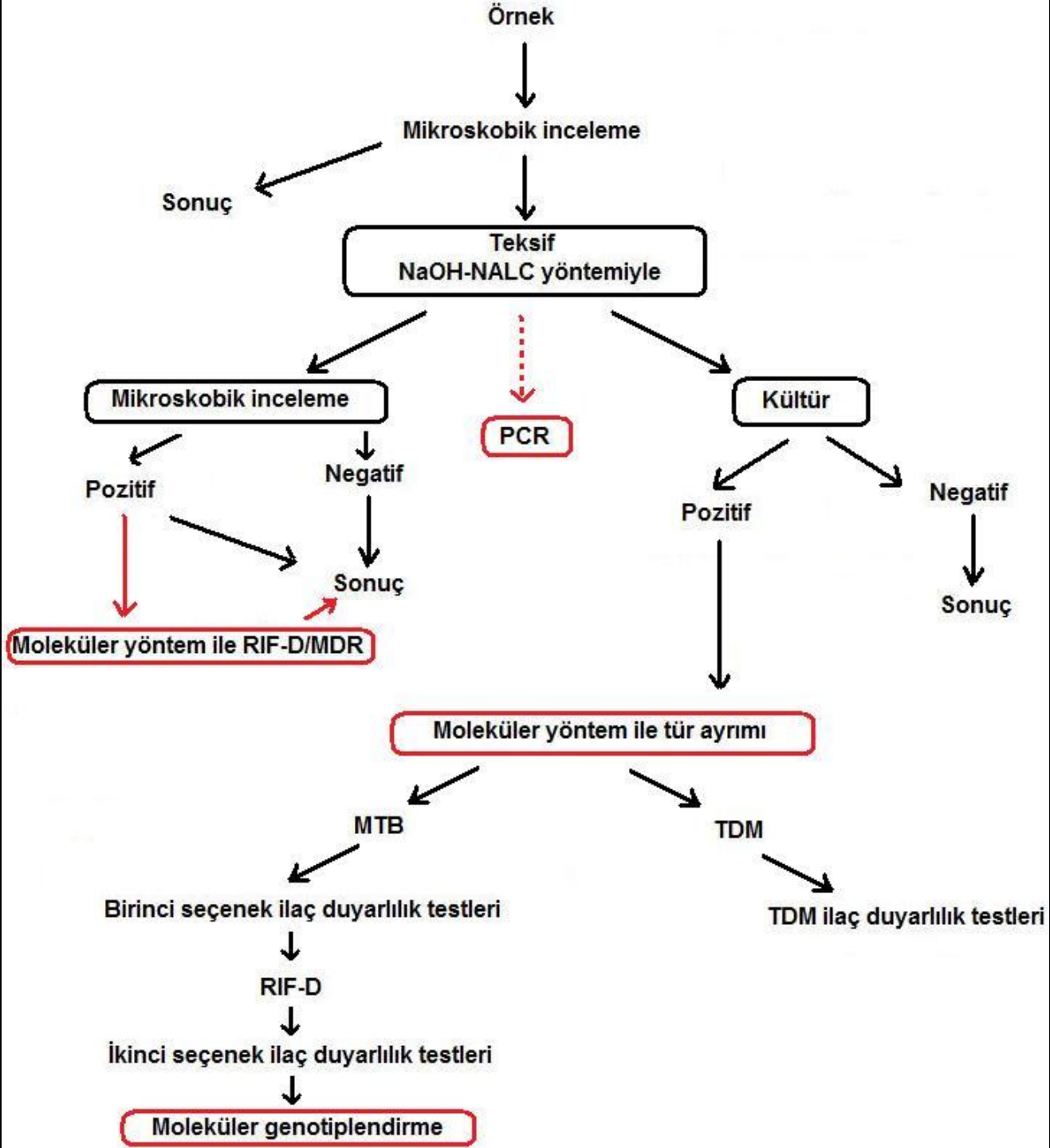
^a Tarama: 2-3 haftadan uzun süren öksürük. Tanı: klinik bulgular, semptomlar, normal akciğer filmi

^b Diğer bir tanı düşünün

“Kültür ile ilgili not”

“Kültür, TB tanısında yararlı olmakla birlikte, TB kontrolü için yayma mikroskopisi kadar önemli değildir. Kültür olanağı her yerde yoktur ve sonuçların alınması birkaç hafta ya da ay sürebilir; bu süre, değişimi izlemek açısından çok geçtir.”





mücadele bitmez !...

