

Çocuklarda tüberküloz tanı yöntemleri

Seçil GUNHER ARICA¹, Vefik ARICA², Cahit ÖZER¹

ÖZET

Tüberküloz bilinen çok eski bir hastalık olmasına kar ın morbidite, mortalite ve ekonomik etkileri nedeniyle hem geli mi hem de geli mekte olan ülkelerde halen önemli bir sa ık problemi olmaya devam etmektedir. Tüberkülozun patofizyolojisi komplikedir. Enfeksiyon ve hastalık arasında gecikme olması da olayları daha belirsiz hale getirir. Aktif akci er tüberkülozu olan hastalar asemptomatik olabilir hafif orta düzeyde kuru öksürü ü olabilir veya ate , halsizlik, gö üs a rısı, nefes darlı ı, kilo kaybı, gece terlemeleri ve kanlı balgam çıkarılan öksürük gibi bir semptomla kar ımıza çıkabilir. Tüberküloz için tam bir de erlendirme öykü, gö üs filmi, fizik muayene, tüberkülin cilt testi, mikrobiyolojik yaymalar ve kültürleri içermelidir. Bir serolojik test de dâhil olabilir. Erken tanı ve tedavi mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu yava üreyen mikroorganizmanın kısıtlı sayıda hastada balgamda saptanabilmesi ve kültüründeki zorluklar nedeniyle tanısı zor bir hastalıktır.

Anahtar Kelimeler: tüberküloz, tanı yöntemleri, enfekte

Diagnosis methods of tuberculosis in children

ABSTRACT

Although tuberculosis is a known very old disease, still continues to be an important health issue in both developed and developing countries because of its morbidity, mortality and economical effects. Pathophysiology of tuberculosis is complicated. Existence of a delay between the infection and disease also makes events more uncertain. Patients with active pulmonary tuberculosis may be asymptomatic, may have slight mild-level of dry cough or may present a symptom such as fever, asthenia, chest pain, dyspnea, weight loss, night sweating and cough excreting bloody pituitary.

A complete evaluation for tuberculosis should include the story, chest x-ray, physical examination, tuberculin skin test, microbiological smears and cultures. A serological test may be included. Early diagnosis and treatment significantly decrease mortality and morbidity. It is a disease difficult to diagnose since this slowly reproducing microorganism can be determined in pituitary of the patient in a limited number and due to difficulties in the culture.

Key words: tuberculosis, diagnosis methods, infected

G R

Tüberküloz dünya genelinde yaygın bir enfeksiyondur ve özellikle geli mekte olan ülkelerde mortalite ve morbiditeye neden olur, geli mi ülkelerde ise A DS (Acquired mmune Deficiency Syndrome) hastalı ı yaygınla tıktan sonra önemini geri kazanmı tır. Dünya nüfusunun üçte biri tüberküloz basili ile enfektedir. Her yıl dünya nüfusunun yüzde biri tüberküloz basili ile enfekte olmaktadır. Enfekte nüfustan sürekli yeni hastalar çıkaca ı için tüberküloz sorununun uzun yıllar sürece i açıktır. Ülkemizdeki Tbc (tüberküloz) hastalık insidansı 2007 yılında Verem Sava Dispanserlerine kayıtlı hastalara göre hesaplandı ında yüzbinde 25,2'dir (1). 2005'te dünyada 8.8 milyon insanda aktif tüberküloz geli mi ve 1.6 milyonu hastalık nedeniyle ölmü tür (2). Ço u olgu Güneydo u Asya ve Afrikada görülmü tür.

GENEL B LG LER

Mycobacterium Yunanca fungus 'fungus' (myces) ve 'küçük çubuk' (bakterion) kelimelerinden türemi tir. smin fungus kısmı bu mikroorganizmanın sıvı besi yerlerinde büyüme paterninin küf benzeri olmasından kaynaklanmaktadır (3).

Tüberküloz insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır. Eski Mısır uygarlı ına ait iskeletlerde ve nka dönemi insanların Pott hastalı ına ba lı kesin bulgular saptanmı tır (4). Tüberküloz basilinin insanlarla

¹ Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği AD

² Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağ lığı ve Hastalıkları AD

Correspondence: Dr. Vefik ARICA e-posta: vefikarica@hotmail.com

büyükbaş hayvanları evcille tirdi inde kar ıla tı 1, Mycobacterium bovis'ten Mycobacterium tuberculosis'in evrimle ti i dü ünülmektedir (5).

Mycobacterium genusu içinde yer alan Mycobacterium tuberculosis complex

be bakteri türü içerir. Bunlar; M. tuberculosis, M. bovis, M. microti, M. africanum, M. canetti'dir. nşan M. tuberculosis için tek kaynaktır ve bu mikroorganizma insanlar arasında hastalık yapar.

M. tuberculosis 0,2–0,6 mikron kalınlı nda, 1,0–10 mikron uzunlu unda, aerobik, sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz hafif kıvrık veya düzgün çomak ekinde bir basildir (6).

En önemli biyolojik özelliklerinden birisi zorunlu aerob olu udur. Bu nedenle oksijen konsantrasyonunun yüksek oldu u dokularda yerle meye e ilimlidir ve akci erlerde de oksijen konsantrasyonunun yüksek oldu u apikal bölgede daha sık tutulum vardır. Hücre duvarındaki lipid düzeyi yüksektir ve karbolfuksin ile boyandıktan sonra asit ve alkolle dekolorize edilemez. Bu özellik aside dirençli bakteri (ARB) tanımını ortaya çıkarmı tır. Uygun besiyerinde 3-8 hafta içinde üreme saptanabilir. Hücre duvarı ve sitoplazmada de i ik yapıda antijenler bulunur (3). Bu antijenler nedeniyle basilin endotoksini veya eksotoksini olmamasına ra men basil hücrelerinin parçalanması ile aç ı a çıkan komponentler toksiktirler ve konakçının yanıtını etkilerler. Konakçı immun sisteminin gösterdi i cevap tüberküloz patogenezinde önemli rol oynamaktadır (7).

Tüberkülozun klinik bulgularının ve epidemiyolojik özelliklerinin ilk sistematik tanımlanması M.Ö. 400–350 civarında derlenen Hipokrat koleksiyonunda kayıtlıdır. İlk olarak Aristo (M.Ö. 354–322) bu hastalı ın bula ıcı oldu unu dü ündüren bir patenin farkına varmı tır. Aretaeus (yakla ık M.S. 150), ince hastalı ın son döneminin ayrıntılarını dikkatle tanımlamı tır. Galen'in (bula ıcı saydı ı tüberkülozda) bakım yakla ımı; erken tanıma, dinlenme, zengin bir diyet ve nazik bir öksürük baskılama idi. Altıncı yüzyılda Roma imparatorlu unun çökmesi ile tıp bilimi 1000 yıllık bir güne tutulmasına u radı. Pierre Desault (1675–1737) hastalı ın bula ıcı oldu unu, temel bula tırıcı unsurun ise balgam oldu unu belirtmi tir. Pierre Charles Alexander Louis, di er nedenlerle ölen hastaların akci erlerinde latent TB delillerini bulmu tur (8). Robert Koch 1882 yılında tüberkülozdan ölen bir hastanın akci erindeki lezyonlarda basili göstermi , bunu kültürde üretmi ve üretilen basil ile deney hayvanlarında verem olu turmu tur (9). Koch, TB tedavisinin de a ı ile yapılabilece ini dü ünmü ; basilin ısıtılarak öldürülen

atıklarının hastaların ba ı klık sistemini güçlendirece ine inanmı ve Old tüberkülinin (tüberküloz basilinin bir gliserin ekstresi) tedavi amacı ile kullanılmasını Clemence Von Pirquet ile birlikte yapmı tır. Kullanılan tüberkülin dozu bugün uyguladı ımız dozun 12000 katıdır. Bu tür tedavi, sadece hafif vakalarda etkili olmasına ra men, ileri vakalarda fayda yerine zarar vermi tir. Fransa'da, 1908-1919 yılları arasında “Albert Calmette “(1863-1933) ve “Camille Guerin “(1872-1961) tarafından M.bovis'in patolojik su unun 230 defa seri pasajı yapılmı ve BCG diye bilinen attenuue su elde edilmi tir. BCG a ısı insanlarda ilk kez 1921 yılında uygulanmı tır (10).

Dünya Sa lık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre Dünya nüfusunun 1/3'ü hasta olmaksızın tüberküloz basilini almı durumdadır. Tüberküloz hastalarının büyük bir kısmı enfeksiyon havuzu dedi imiz bu gruptan çıkmaktadır.

Verem Sava Daire Ba kanlı ı 2009 verilerine göre; kayıtlı tüberküloz hastalarının toplam sayısı 2006 yılında 20.526 iken 2007 yılında 19.694 olmu tur ve bir yılda %4 dü ü görülmü tür. Kayıtlı 19.694 hastanın 17.781'i (%90,3) yeni olgu, 1.913'ü (%9,7) tedavi görmü olgudur. Hastaların 12.381'i (%62,9) erkek, 7.313'ü (%27,1) kadın hastadır (1). 2007 yılında 117.455 temaslı muayenesi yapılmı tır. Bulunan toplam olgu sayısının 19.694 oldu u göz önünde bulundurulursa, bulunan her hasta için ortalama 6 temaslı taranmı tır. laçla korumaya alınan ki i sayısı 2007 yılında 23.529'dur.

TÜBERKÜLOZ TANI YÖNTEMLER

I- BAKTER YOLOJ K TANI YÖNTEMLER

a-Direk mikroskopik inceleme

M. tuberculosis aranması için alınan materyaller balgam, açlık mide suyu, solunum sistemine ait di er örnekler (bron lavajı, bronkoalveolar lavaj, transbron ial biyopsi gibi), idrar, beyin omurilik sıvısı, gaita, doku ve di er vücut sıvılarıdır. Akci er tüberkülozu tanısı için en sık balgam örne ine ba vurulur. Balgam ard arda 3 gün, sabah erken saatlerde, steril, geni a ızlı, kapa ı sıkı kapatılabilen plastik kutulara alınmalıdır ve alınan tüm örnekler hızla laboratuara ula tırılmalıdır (11).

Yaymalar direk materyalden hazırlanabilece i gibi, dekontaminasyon i lemi sonrası örnek santrifüj edildikten sonra (homojenizasyon) teksif hazırlanabilir. Steril bölgelerden alınan materyallere dekontaminasyon i lemi uygulamaya gerek yoktur. Mikobakteriler kimyasal ajanlara daha dayanıklı olduklarından, bu özellikleri kullanılarak dekontaminasyon i lemi gerçekleştirilir. En sık kullanılan yöntem, N-asetil- L-

sistein %2 NaOH (NALC-NaOH) yöntemidir. NALC disulfid ba larını kopararak mukolitik etki, NaOH ise dekontaminasyon yapar (11, 12). Hazırlanan yaymalar boyanır. Boyama metodları karbolfuksin ve florokrom metodları olarak ikiye ayrılır. Karbolfuksin metodları; Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve Kinyoun metodudur. Florokrom metodunda ise preparat Auramin-0 ile boyanır ve floresan mikroskopta incelenir.

Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) metodunda; üzerine materyal alınan lam alevde tespit edilir, üstüne tam örtecek ekilde karbolfuksin boyası konur. Kaynatmadan 3–4 dakika ısıtılır, sonra boya dökülür, %5 asit-alkol ile dekolorize edilir. Distile su ile yıkanır. Metilen mavisi ile 20–30 sn boyanır, distile su ile tekrar yıkanır ve kurutulur. Preparatlar 100X imersiyon objektifinde incelenir. Bu i lemler sonunda mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar halinde görülür (11, 13).

Direk balgam mikroskopisinde en önemli sorunlar yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar ile farklı okuyucuların aynı örnekte farklı sonuçlar bildirmesidir (14).

Yanlış pozitif sonuçlar: Balgamdaki yemek artıkları, boya parçacıkları, saprofit aside dirençli bakteriler, atipik mikobakteriler, nokardia, çam poleni, iplikçik, lamdaki çizikler, baka balgamdan bula ma, imersiyon ya ılı bula ma, aynı lamın tekrar kullanımı.

Yanlış negatif sonuçlar: Balgam toplanmasındaki yetersizlikler, balgam örneklerinin ve boyanmış preparatların uygunsuz korunmaları, homojenize edilmeyen balgamda uygun yerden örnek alınmaması, tekni e uygunsuz boyama, okuma hataları.

b-Kültür

Direk incelemede ARB görülmesi tanıyı kesinle tirmez. Kesin tanı M. tuberculosis'in kültür ortamında üretilmesi ile konur. Tanımlama parametrelerini uygulamak, ilaç duyarlılık testlerini yapabilmek ve epidemiyolojik çalı malarda kullanılan genotipleme için kültür gereklidir (11, 15).

Kültür yöntemleri tüberküloz tanısında halen altın standart olmaya devam etmektedir. Mikobakteri kültür yöntemlerini klasik katı besiyerleri ve hızlı kültür yöntemleri olarak ikiye ayırmak olasıdır.

Katı besiyerlerinden yumurtalı besiyerlerinin görünümü opaktır. Patates unu, gliserol, tuz, tam yumurta veya patases sarısı içermektedir. Bugün en yaygın kullanılan, Lövenstein-Jensen (LJ) besiyeridir. Ayrıca bu grupta Petragani ve American Trudeau Society gibi besiyerleri de bulunmaktadır. Agar bazlı besiyerleri; Middlebrook 7H10 ve Middlebrook 7H11

agar en çok tercih edilenlerdir. Kimyasal içerikleri daha iyi bilinmektedir.

Hızlı kültür yöntemlerinin esasları sıvı besiyerleridir. Sıvı kültürler ile mikobakterilerin saptanması katı besiyerlerinden yapılan klasik kültür yöntemlerine göre daha kısa sürede daha yüksek duyarlılıkta olmaktadır.

Otomatize hızlı kültür yöntemleri: MGIT (Mycobacterium Growth ndicator Tube) 960 Sistemi (BD Biosciences, MD, ABD): çlerinde modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besi yeri bulunan tüpler kullanılır. Sistemin esasları, tüpün dibindeki silikona gömülü oksijenle bile ik halde bulunan fenetrolin rutenyum klorid pentahidrat adındaki florasan veren bir indikatörün mikobakteri tarafından tüpteki oksijen tüketmesine ba lı olarak serbest kalması sonucu flüoresansın açılı çıkması ve açılı çıkan flüoresansın cihaz tarafından otomatik olarak her 60 dakikada bir sürekli okunmasıdır.

BACTEC 460TB Sistemi (BD Biosciences) BACTEC 460 TB sistemi, Middlebrook7H12 (BACTEC 12B) veya Middlebrook 7H13 (BACTEC 13A) sıvı besi yeri ile karbon kaynağı olarak C14 i aretli palmitik asit içeren radyometrik bir sistemdir (16). M. tüberküloz basiliini nontüberküloz mikobakterilerden (NTM) ayırmak için besi yerine p-nitro-0-asetil-amino-3-hidroksipropifenon (NAP) eklenir. NAP varlığında üreme olmaması M. tüberküloz lehinedir (17-19).

II. SEROLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

mmunolojik tanı için hem klinik örneklerde mikobakteriyel antijenlerin gösterilmesi, hem de bu antijenlere karşı oluşturan antikorların saptanmasına çalışılmaktadır. Geliştirilen yöntemler arasında immunodiffüzyon, pasif hemaglutinasyon, ELISA (Enzym-Linked ImmunoSorbant Assay), floresan antikor, solid faz radyoimmunoassay bulunmaktadır (12, 20, 21). Serolojinin yüksek tanı değerine sahip olduğu diğer hastalıklardan farklı olarak tüberkülozda, klinik kullanım için duyarlı, özgül ve pratik bir yöntem geliştirme çabaları başarısız kalmıştır. Özgüllük konusunda temel sorun, enfekte olmak ile hastalık varlığını ayırmanın yapılamamasıdır. Daha önce yapılmış olan BCG a ısına ba lı olarak serolojik reaksiyon da sorun olmaktadır. Bu durum, serolojik inceleme gibi basit bir testin yarar sağlayacağı geliştirilmekte olan ülkelerde özellikle anlamlıdır. Bu gibi ülkelerde nüfusun yaklaşık %40'ında LTBI (Latent tüberküloz enfeksiyonu) vardır ve önemli sayıda insan M. Bovis BCG'si ile enfektelidir. Diğer önemli bir konu da NTM'lere ba lı enfeksiyondan M. tuberculosis enfeksiyonunun ayırımıdır.

Tüberkülozun serolojik tanısında hangi antijenin kullanılması gerektiği, sadece antijen tanınması ile sınırlı değildir. Antijen tanınması ile aynı öneme sahip 3 konu daha vardır:

1-Antijen kokteylleri: TB sırasında serumda ortaya çıkan antikorlar tarafından tanınan tek bir antijen veya sık rastlanan bir antijen kombinasyonu olmaması nedeniyle, serolojik tanı testlerinde antijen kokteylleri kullanılmalıdır. Farklı hastalarda, çok az miktarda antikor üretilen immunsupresyonlu hastalar dahil, çeşitli antikor yanıtları olur. Antijen kombinasyonları, bu TB olgularının yakalanma oranını arttırmaktadır.

2- Katı faz: Kokteyl esasına dayanan testlerde solid faz kullanılarak, kokteylde bulunan her antijenin serolojik aktivitesinin tespiti sağlanır. Bu amaca ulaşabilmek için, nitrosellüloz temelli metodlar geliştirilmiştir.

3- Özgül antijen: Çapraz reaksiyon veren epitoplara bağlı yanlı pozitif test sonuçlarından kaçabilmek için, antijenler *M. tuberculosis*'e (veya *M. tuberculosis complexi*) özgül olmalıdır. Ayrıca, tüberkülozun karakteristik özelliği olan heterojen antikor repertuarını karşılayacak şekilde birden fazla antijen seçilmelidir. Panellerdeki antijenlerin seroaktivitesi incelenmiştir; 38kd PhoS ve 14 kd alfa kristalinin en fazla bulunmuştu. Bu iki antijene eklenen diğer antijenler (ESAT-6: Early Secreted Antigenic Target 6 kDa protein, MPT 64, MPT 63, 19 kd lipoprotein, MTSA-10) duyarlılığının artmasını sağlar (22).

İmmunolojik tanıda kullanılan testler;

a-Antijen tespitine dayanan testler: Lipoarabinomannan (LAM), mikobakterinin hücre duvarında bulunan bir lipopolisakarittir ve doğal mikobakteri enfeksiyonu sırasında antikor yanıtını indüklediği bilinmektedir.

b-Antikor tespitine dayanan testler: Tüberkülozlu hastaların serumunda mikobakteri

antijenlerine karşı oluşan antikorlar monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılarak tespit edilebilir. Çevredeki mikobakterilere çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlı pozitif test sonuçları alınabilmektedir. Ayrıca mikobakteri hastalıklarında ortaya çıkan bazı yanıtlar; HLA sınıf II allotipleri ile ilişkili olup farklı hastalarda aynı antijenler tanınmayabilir.

Tüberkülozlu hastalarda özgül antikorları tespit etmek için birçok serolojik test incelenmiştir. Bu tür serolojik testlerde, antijenik proteinler (A65, A60, A38, A14, A19, A90, A34, A55 kd'luk antijenler) ve polisakaritler dışında birçok proteinler, diaçil trehaloz gibi ELISA tekniğine uygun birçok antijen denenmiştir (Tablo 1).

c- İnterferon gamma (INF- γ) üretiminin ölçülmesi

TB enfeksiyonunu doğrudan bir şekilde tespit edebilmek için *M. tuberculosis*'e karşı duyarlılığı T lenfositlerinin, in vitro kan testleri ve in vivo deri testleri ile tespit edilmesine dayalı testler geliştirilmiştir. Periferik kandan elde edilen mononükleer hücreler, in vitro şartlarda uyarılır ve duyarlılığı T lenfositlerinden salınan interferon gamma (INF- γ) üretimi ELISA ile ölçülür. PPD yanıtından sonra, kanda INF- γ tespiti yapan testler (CSL/QUANTIFERON Tbc testi) geliştirilmiştir. Bu testte; *M. tuberculosis*, *M. avium* ve *M. bovis*'den elde edilen PPD'lerle stimülasyondan sonra, tam kandaki T lenfositleri tarafından üretilen INF- γ ölçülür. INF- γ ELISA sonuçları ile hasta ve kontrol grubundan elde edilen tüberkülin deri testi sonuçları arasında iyi bir korelasyon vardır.

QUANTIFERON-TB testinin duyarlılığı %90 ve özgüllüğü %95-98 bulunmuştur (20). Plevra tüberkülozunda, INF- γ duyarlılığının %85,7 ve özgüllüğünün %97,1 olduğu kültür ve plevra biyopsisi ile doğrulanmıştır. HIV pozitif ve negatif hasta sonuçları da benzerdir. Rekombinant antijenler kullanılarak BCG aşılarında etkileşim engellenmiştir.

Tablo 1: Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan antikor tespit temeline dayanan ticari testler (22).

Kullanılan antijen	Testin adı	Metodu	Duyarlılık	Özgüllük
Lipoarabinomannan (LAM)	MycDot™	Dot-blot	%70-75	%96.7
Rekombinant protein peptit	Detect -TB	ELISA	%75	%97
38 kDa (rekombinant antijen) ve LAM	Pathozyme Myco	ELISA	%57-89	%92-100
38 kDa ve 16 kDa (rekombinant antijen)	Pathozyme TB plus	ELISA	%71-89 %71-100	%98-100 %71-95
Antijen - 60	Antigen A60	Membran	%49-89	%98-100
38 kDa (rekombinant)	ICT tuberculosis	bazı		

n vivo deri testlerinden PPD'ye alternatif olarak kullanılan ESAT-6 (erken salınan tüberküloz antijeni, early secretory antigen target) ve CFP-10 (koloni oluşturan protein, kültürü filtrate protein) gibi antijenler de, INF- γ indüksiyonu amacıyla kullanılmıdır. ESAT-6, özgül bir antijen ve tüberkülozlu hastalarda T lenfositleri tarafından üretilen I INF- γ 'nın güçlü bir indükleyicisidir. M. tuberculosis genomunda RD (region difference) ile gösterilen farklı bölgeler bulunur, M. bovis genomundaki RD bölgeleri silinmiştir. RD1 bölgesi, tüberküloza bağımlı ıkkık yanıtı sırasında ortaya çıkan ESAT-6 salınımını sağlar. ESAT-6 antijeni TB hastalarının T lenfositleri tarafından tanınırken, BCG ile ağılı veya ağısız salımlı ki ilerin T lenfositlerince tanınmamaktadır (ekil 1). Tedavi edilmeyen hastalara göre tedavi edilen tüberkülozlu hastalarda INF- γ düzeyi artar ve bu durum tüberküloza bağımlı ıkkık yanıtını gösterir (23).

Seroloji, özellikle klinik ve radyolojik TB bulguları olmayan hastaların hızlı tanısını sağlar. Röntgen bulguları doku hasarından sonra ortaya çıkarken hastalığın başında üretilen antikorlar serolojik olarak erkenden tespit edilebilir. Ayrıca çocuklarda serumun elde edilmesi balgamdan daha kolay olduğu için daha çok tercih edilebilir.

Seroloji akciğerdeki Tbc tanısına da yardım eder. BCG ile ağılılarda gelişen hücresel yanıtlardan da etkilenmemesi önemli bir avantajdır. Serolojik kitler, humoral yanıt sonunda üretilen antikorları tespit ettikenden BCG'den etkilenmez. Bazı serolojik tanı kitleri kantitatif sonuçlar vermektedir. Tedavi sırasındaki titre değişimleri hastaların izlenmesinde kullanılabilir (22).

Bu testlerin dezavantajlarından biri; yüksek infeksiyon hızı olan ülkelerde, AIDS'li ve yayma

negatif hastalarda duyarlılığının düşük olmasıdır. Ayrıca pahalı, deneyimli personel gerektiren ve M. tuberculosis ile NTM'leri her zaman birbirinden ayırt edilemeyen testlerdir.

III. MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER

a-Nükleik asit çoğaltma yöntemleri

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri iki prensip üzerine oturtulmuştur. Bunlar; nükleik asit prob hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon (NAA) yöntemleridir. Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri: Örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan in vitro üretilmiş bir prob ile hibritlenmekte ve tanı konmaktadır.

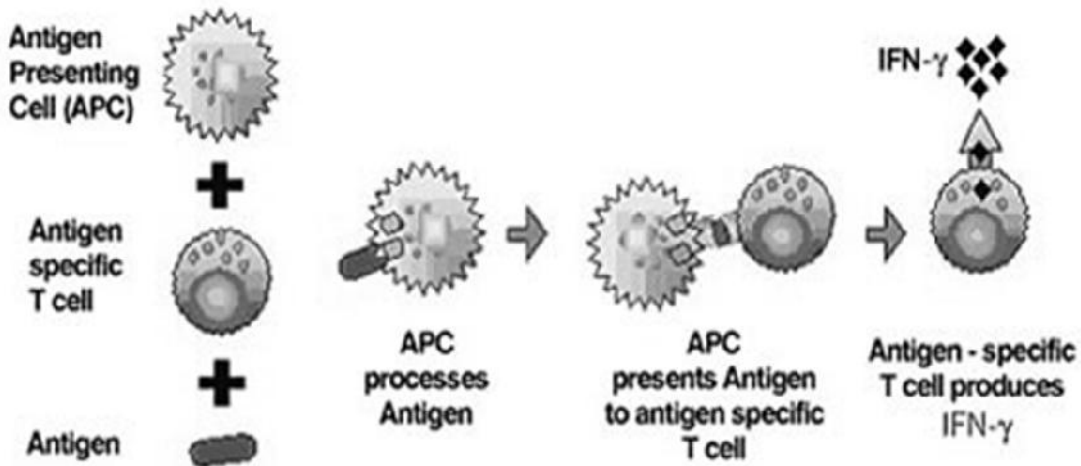
Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri: Nükleik asit teknolojisinin en kompleks ve duyarlı olanıdır. Hedef DNA'yı çoğaltmak için enzim kullanılır. Ortaya çıkarılan ampliconu tespit için nükleik asit problemleri kullanılması ve agaroz jelde ampliconların boyanarak gösterilmesi yoluna gidilir. Üç modifikasyonu bulunur (24).

- Hedef amplifikasyon yöntemleri: Polimeraz zincir reaksiyonu
- Ligaz zincir reaksiyonu

- Sinyal amplifikasyona dayalı yöntemler
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Nükleik asitlerin in vitro ortamlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. TB laboratuvarlarında klinik örneklerde bulunabilecek etkenin kısa sürede gösterilmesi, erken identifikasyonu, moleküler tiplendirilmesi ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılmaktadır (24).

c-Restriction fragment length polimorfizm (RFLP)

Restriksiyon enzimleri; DNA'yı çok özgül olarak belli bölgelerden keserek genellikle 1000-20000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. DNA'nın bu



ekil 1: Antijen tanıma ve gamma IFN salınımı

enzimlerin bir ya da birkaçı ile kesime u ratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabii tutulması ve sonra etidyum bromür ile boyanan jelde olu an DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çe itlili e RFLP adı verilir. Epidemiyolojik çalı malarda kullanılır.

Dört temel adım vardır: DNA izolasyonu, DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesi (25). Bu yöntemle M. tuberculosis complex içinde tip tayini ve M. Tuberculosis su larında nokta mutasyonları saptanarak ilaç direncini saptamak mümkündür.

LATENT TÜBERKÜLOZ ENFEKS YON TANISINDA KULLANILAN TESTLER

1-TÜBERKÜL N C LT TEST

TCT Tüberkülin cilt testi (TCT), ki inin tüberküloz basili ile enfekte olup olmadı mını gösterir, hastalık hakkında bilgi vermez. Hastalık tanısında dolaylı olarak yardımcı olabilir.

TCT yapılmaması gereken ki iler unlardır: Ki inin Tbc geçirdi i biliniyorsa ya da Tbc tedavisi aldı ı biliniyorsa, geçmi te TCT büllü reaksiyonu olmu sa, a ırı yanıkları ya da ekzeması varsa, son bir ayda kızamık, kabakulak gibi önemli virus enfeksiyonu geçirmi ya da canlı virus a ısı olmu sa TCT yapılmamalıdır.

2-RD1 – FN BAZLI TESTLER

1- IFN düzeyini EL SA yöntemi ile ölçen Quanti FERON –TB GOLD (Celletis Limited, Carnegie, Victoria, Austaria) testi. Mycobacterium Tüberkülosise spesifik antijenlere cevap olarak (ESAT-6, CFT-10 gibi) periferik kanda olu an IFN düzeyini ölçen bir testtir. NTM ve BCG ile çapraz reaksiyon vermemesi, booster etkisinin görülmemesi, tekrarlanabilir olması, hastaya tek ziyaret gerektirmesi, daha kısa sürede cevap alınabilmesi gibi TCT kar ı avantajları nedeniyle LTBI'de alternatif olarak önerilebilir.

2- - FN üreten hücreleri saptayan EL SPOT (enzyme linked immunospot assay) test, son yıllarda spesifik mikobakteriyel antijenler ile stimüle edilen T hücrelerinin salgıladıkları INF- yanıtının belirlenmesi ilkesi ile çalı an bazı deneysel tanı yöntemleri kullanılmaya ba lanmı tır. Bunlardan biri olan EL SPOT testi, ki inin periferik mononükleer hücrelerinin in vitro artlarda bu antijenlerle uyarılıp daha sonra olu an -INF yanıtının çift sandviç EL SA yöntemi ile belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır.

Tüberkülozda BT

Gö üs radyografisi Tbc'li hastaların taranması, tanısı ve tedaviye yanıtında majör bir rol oynar. Ancak

radyogramlar aktif hastalı ı olan hastalarda normal olabilir veya sadece hafif veya özgün olmayan bulgular gösterebilir (26). TB tanısının atlanmasında sık nedenler eri kinlerde primer hastalı ın manifestasyonu olan hiler ve mediastinel lenfadenopatinin tanınmasındaki yetersizlik, reaktivasyon hastalarında hafif düzeyli parankimal anormallikleri görmezden gelmek ve üst lob nodülü veya küçük nodüler opasiteler tarafından sarmalanmı olan kitleyi veya tüberkülozu gösterebilen nedbele meyi tanımaktaki yetersizliktir (26).

Hem zor lokalizasyondaki hem de yayılmı parankimal hastalık veya lenfadenopatiyi ayırmada BT, akci er radyogramından daha duyarlıdır (27-30). Tbc'un radyolojik tanısı tüm vakaların sadece %49'unda (%34 primer Tbc tanısı ve %59 reaktivasyon Tbc) ba langıçta do ru konabilmektedir (26). BT ile akci er TB tanısı %91 hastada do rudur ve %76 hastada do ru bir ekilde Tbc dı lanır (31). HRCT pnömoni ile karı an alanlarda küçük kavitasyon odaklarının ve dens nodülarite ve nedbele me tespitinde özellikle yardımcıdır (27). Aktif Tbc olan 41 hastada yapılan bir çalı mada (27), HRCT ile %58 oranında kavite tespit edilirken akci er radyogafileri ile sadece %22 oranında gösterilmi tir. laveten Tbc tanısı için HRCT, hastalık aktivitesini göstermede de faydalıdır. CT ile aktif Tbc'un tanısı sentrilobüler nodüller veya tomurcuklanmı a aç görünümü gibi parankimal anomali paternine ve endobron iyal yayılmı gösteren kavitasyon mevcudiyetine göre konulabilir. Lee ve arkadaş larının serisinde (31) aktif hastalı ı olan hastaların %80'i ve inaktif hastalı ı olanların %89'u HRCT ile do ru bir ekilde ayrılmı tır. BT tüberküloz effüzyon, ampiyem ve bronkoplevral fistül gibi plevral komplikasyonların de erlendirilmesinde de yardımcıdır ve akci er grafisinde a ıkar olmayan plevral hastalı ı da gösterebilir (32).

Tbc tanısındaki majör rolüne ek olarak BT; Tbc özellikle komplike veya MDR Tbc'un yönetiminde önemli bir rol oynar. MDR Tbc sıklıkla çok sayıda basil ekspektorasyonuna yol açan ve daha önce tutulmamı akci er alanlarına yayılmı sa layan multiple kavitelerle birlikte dir. Çok sayıda basil barındıran kavitelere sınırlı ilaç geçi inin ilaç direncine katkıda bulundu una inanılmaktadır. Bu nedenle MDR Tbc'de cerrahi adjuvan tedavi olabilir ancak günümüzde TB tedavisi kemoterapiye dayanmaktadır (33). BT kavitasyon yerle imi ve aktif hastalı ın yaygınlı mını gösterebilir ve bu nedenle cerrahi tedavi planlaması için yol haritası olabilir.

SONUÇ

Tüberkülozun patofizyolojisi komplikedir. Enfeksiyon ve hastalık arasında gecikme olması da

olayları daha belirsiz hale getirir. Halen günümüzde tüberküloz enfeksiyonunu gösteren en yaygın test tüberkülin cilt testidir (TCT). TCT hastalık hakkında bilgi vermez, sadece ki inin basil ile enfekte olup olmadığını gösterir. Çocuklarda ve eri kinlerde tüberküloz tanısı için aynı yol izlenebilir. Tanı koyma yöntemleri açısından bir fark yoktur. Tüberkülozdan üphelenilen ki iler, yakın temastaki ki iler TCT, akci er grafisi, fizik muayene ve toraks bilgisayarlı tomografisi ile ara tırılır.

KAYNAKLAR

- 1- Türkiye'de verem sava ı 2009 raporu, TC Sa lık Bakanlı ı Verem Sava Daire Ba kanlı ı, 2009; s: 7-72.
- 2- World Health Organization. Fact sheet no: 104. Tuberculosis. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104. WHO website. Revised March 2007. Accessed May 21, 2008.
- 3- Iseman MD. Klinisyenler cin Tüberküloz Klavuzu. Ceviren: . Ozkara. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. ti. 2002; Bölüm 2: 21-49.
- 4- Kılıçarslan Z. Dünyada ve Türkiye'de tüberküloz epidemiyolojisi ve kontrolü. nfeksiyon hastalıkları serisi, 2001; 4(1) p: 5-13.
- 5- Clark GA, Kelley MA, Grange JM, Hill MC.: the evolution of mycobacterial disease in human populations. A reaevaluation. Current Anthropology 1987; 28:1,45-62.
- 6- Parker T, Deverden B (ed):Topley Wilson's principles of Bacteriology, Virology and mmunity. Vol II. 1990; 74-97.
- 7- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Özet Bakteriyojisi ve Bakteri nfeksiyonları 1986; 407-437.
- 8- Webb, GB: Tuberculosis: Clio Medica, Paul. B. Hoeber, New York; 1936.
- 9- Koch R. Die aetiologie der tuberculose. Berl Klinische Wochenschr 1882; 19. s: 221-230.
- 10- Palomino Jc, Leão Sc, Ritacco V. Tuberculosis 2007 From Basic Science To Patient Care. 1st Ed. Eri im: tuberculosistextbook.com.8.
- 11- Coplu N. Tüberkülozda Mikrobiyolojik Tanı. Enfeksiyon Hastalıkları serisi 1996; 4 (1): 30-40.
- 12- Schlossberg D. Tüberküloz. Bilimsel ve Teknik Yazı Ceviri Vakfı 1995; 39-47.
- 13- Sa lık Bakanlı ı Verem Sava Daire Ba kanlı ı: Tüberküloz hastalarının tanı, tedavi, izlenmesi, 1998.
- 14- ATS: Diagnostic Standarts and classification of Tuberculosis and other Mycobacterial diseases. Am Rev Resp Dis, 1981; 123: 343- 58.
- 15- Güleç Balbay E, Balbay Ö, Kara H. Tüberküloz, Tanı ve Tedavide Son Durum Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2010;1(4):63-74.
- 16- V Ulusal Mikobakteri Sempozyumu Kitabı. zmir. 2004; 65-71.
- 17- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger CP, Winn CW (ed): Color Atlasand Textbook of Diagnostic Microbiology 5th ed, New York: Lippincott Philadelphia, 1997; 893-952.
- 18- Heifets LB, Good RC, Current laboratory methods for diagnosis of tuberculosis. In Bloom RB(ed): Tuberculosis: Pathogensesi, protection, control. Washington DC, ASM press, 1994; 85-110.
- 19- Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combiningradiometric and nucleic acid probe methods. J Clin Microbiol. 1988 Jul; 26(7): 1349-52.
- 20- Khomenko AG, Bayensky AV, Chernousova LN, Kulikovskaya NV, Demianenko NV,Litvinov VI. Serodiagnosis of tuberculosis: detection of mycobacterial antibodies and antigens. Tuber Lung Dis. 1996 Dec; 77(6): 510-5.
- 21- Özdemir Ö. Tüberküloz tanı yöntemleri. Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri dergisi, Tüberküloz özel sayısı 1994; 420-4.
- 22- 21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Samsun 2003; 411-427.
- 23- Charpin D, Herbault H. Value of ELISA using A60 antigen in diagnosis of active pulmonary tuberculosis. Am Rev Resp Dis 1990; 142: 380-4.
- 24- Durmaz R. Uygulamalı Molekuler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitapevleri 2001; 15-35.
- 25- Imboden P, Cole S, Bodmer T, Telenti A. Detection of rifampin resistance mutation in Mycobacterium tuberculosis and M. Leprae. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC (eds): Diagnostic molecular Microbiology: Principles and Applications. ASM Press, WashingtonDC 1993; 519-26.
- 26- Woodring JH, Vandiviere HM, Fried AM, Dillon ML, Williams TD, Melvin IG. Update: the radiographic features of pulmonary tuberculosis. AJR 1986; 146:497-506.
- 27- Im JG, Itoh H, Shim YS. Pulmonary tuberculosis: CT findings—early active disease and sequential change with antituberculous therapy. Radiology 1993; 186:653-660.
- 28- McGuinness G, Naidich DP, Jagirdar J, Leitman B, McCauley DI. High-resolution CT findings in miliary lung disease. J Comput Assist Tomogr 1992; 16: 384-390.
- 29- Kim WS, Moon WK, Kim IO, et al. Pulmonary tuberculosis in children: evaluation with CT. AJR 1997; 168:1005-1009.
- 30- Pastores SM, Naidich DP, Aranda CP, McGuinness G, Rom WN. Intrathoracic adenopathy associated with pulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Chest 1993; 103:1433-1437.
- 31- Lee KS, Hwang JW, Chung MP, Kim H, Kwon OJ. Utility of CT in the evaluation of pulmonary tuberculosis in patients without AIDS. Chest 1996; 110:977-984.
- 32- Hulnick DH, Naidich DP, McCauley DI. Pleural tuberculosis evaluated by computed tomography. Radiology 1983; 149: 759-765.
- 33- Takeda S, Maeda H, Hayakawa M, Sawabata N, Maekura R. Current surgical intervention for pulmonary tuberculosis. Ann Thorac Surg 2005; 79: 959-963.