

T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK GÖĞÜS HASTALIKLARI VE GÖĞÜS CERRAHİSİ
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

HIV SERONEGATİF YENİ VAKA YAYMA POZİTİF
AKCİĞER TÜBERKÜLOZU OLAN HASTALARDA KANDA
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS DNA'SININ ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. NEVİN TACİ

ANKARA, 2001

GİRİŞ ve AMAÇ

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
- Tüberküloz Basilinin Genel Özellikleri	3
- Tüberküloz Patogenezi	4
- Tüberküloz İmmünolojisi	8
- Tüberkülozda Tanı Yöntemleri	10
III. GEREÇ VE YÖNTEM	25
III. BULGULAR	29
IV. TARTIŞMA	38
V. ÖZET	46
VI. KAYNAKLAR	48

GİRİŞ ve AMAÇ

Tüberküloz, gelişmekte olan ülkelerde hala önemli mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde özellikle 1980'li yıllardan sonra dünyada giderek yayılmaya başlayan human immunodeficiency virus (HIV) enfeksiyonu ile tüberküloz sorunu dramatik bir boyut kazanmıştır (1,2).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre, yeni tüberküloz vakalarının, 1997 yılında yaklaşık 8 milyon olduğu, 1999 yılında ise 8.4 milyona vardığı tahmin edilmektedir. Bu artışın, akkiz immün yetmezlik sendromunun (Acquired Immunodeficiency Syndrome= AIDS) endemik olduğu Afrika ülkelerinde, tüberküloz insidansının artmasına bağlı olduğu belirtilmektedir. Eğer bu artış böyle devam ederse, 2005 yılında 10.2 milyon yeni tüberküloz vakası olacağı tahmin edilmektedir (3).

Tüberküloz hastalığından korunmanın en etkin yolu, erken tanı ve uygun tedavinin verilmesidir. Bu nedenle, hastalığın hızlı ve güvenilir bir şekilde tanısının konulması gerekmektedir (4).

Akciğer tüberkülozu en sık görülen tüberküloz formu olup, tüberküloza bağlı mortalite ve morbiditenin en sık sebebidir. Yayma pozitif akciğer tüberkülozu, bulaşıcı bir hastalık olduğu için, epidemiyolojik olarak çok büyük önem taşıyan ve diğer formlarda bulunmayan bir yayılım potansiyeli taşımaktadır (5).

Tüberküloz hastalığının tanısında altın standart, elde edilebilen materyalden, mikroorganizmanın tespit edilmesidir. Direkt mikroskopik incelemede, klinik numunedeki mikobakteriyal popülasyon 10^4 \ ml'den az olduğu zaman *M.tuberculosis* tespit edilemediği gibi, diğer mikobakterilerden de ayırt edilememektedir. *M.tuberculosis*'in, Löwenstein-Jensen besi yerinde üremesi ise 4-8 hafta gibi bir süre gerektirmektedir (6,7).

Akciğer tüberkülozunda, balgam ile yapılan mikroskopik incelemede bakterinin görülme oranı %40-60, kültürde üreme ihtimali ise %62-90'dır (8,9).

Bununla birlikte tanıda diğ er bir önemli problem, akciğ er tüberkülozu olduğu d    n len ancak balgam ya da açlık mide suyunda basil gösterilemeyen ya da inceleme için yeterli örnek alınamayan olgularda çıkmaktadır. Bu nedenle tüberküloz basilinin tespitinde hızlı, sensitivite ve spesifitesi yüksek metodlar ara tırılmı  ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin iki önemli avantajı vardır; birincisi PCR yöntemi ile *M.tuberculosis* DNA'sını göstermek, tüberküloz tanısındaki klasik prosedürlere alternatif olabilecek hızlı bir tanı yöntemidir (10), ikincisi periferel kan  rneği PCR tekniğinde kullanılabilen materyallerden biridir ve kolay elde edilebilmesi önemli bir avantajdır (11).

Daha önce yapılan çalışmalarda, kan incelemesine dayanan PCR tekniği ile özellikle HIV(+) olan akciğ er tüberkülozlu hastalarda; periferel kan mononükleer hücrelerinde *M.tuberculosis* DNA'sını tespit etmenin, tüberküloz tanısında yararlı olabileceği gösterilmiştir (12). Ancak immünkompetan hastalarda bu yöntemin tanıdaki etkinliği ile ilgili yapılan araştırmalar kısıtlıdır.

Bu çalışmanın amacı; yeni vaka yayma pozitif akciğ er tüberkülozu olan HIV-seronegatif erişkin hastalarda, periferel kanda, *M.tuberculosis* basilini PCR tekniği ile araştırmak; PCR'ın duyarlılık ve özgüllüğünü belirlemek ve PCR pozitifliği ile hastalığın radyolojik olarak yaygınlığı, kavite varlığı, vücut kitle indeksi (body-mass indeksi), albümin değeri, semptom süresi, ek hastalık varlığı ve hastaların karakteristik özellikleri ile arasındaki ilişkiyi inceleyerek klinik önemini değerlendirmektir.

GENEL BİLGİLER

Tüberküloz, 1882 yılında Robert Koch tarafından keşfedilen Actinomycetales soyundan gelen *Mycobacterium tuberculosis*' in neden olduğu, kronik, nekrotizan bir bakteriyel enfeksiyondur (13).

Tüberküloz Basilinin Genel Özellikleri

Mycobacterium tuberculosis, çomak şeklinde olup, 2-4µm uzunluğunda ve 0.2-0.5µm genişliğindedir. Hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz ve gerçek dallanmalar yapmayan, aerob veya mikroaerofil bir mikroorganizmadır. Kuvvetli asit ve alkole dayanıklıdır (14).

Mikobakteriler, alıılmış gram boyama ve diğer basit boya ile kolay boyanmazlar. Çünkü hücre duvarındaki yüksek lipid içeriği boyanın penetrasyonunu önlemektedir. Ziehl Neelsen ve Fluorochrome yöntemleri ile boyanarak gösterilir. Basil düz veya biraz eğridir, tek veya birkaç tanesi bir arada bulunur (13,15).

Solid veya likid özel besi yerinde çoğalır. Çoğalması çok yavaştır. Uygun koşullar altında her 24-48 saatte bir bölünerek çoğalır. Middlebrook Chon, 7H10-7H11 gibi besi yerlerinde 2 haftada, Lowenstein-Jensen gibi yumurtalı besi yerinde 3-6 haftada koloniler oluşturur. Kültür ortamında birbirine paralel veya kordlar oluşturacak şekilde dizilir. Üremesi için; optimal ısının 35-37°C, pH'nın 6.5-6.8 olması gerekir. Üremeleri %5-10 karbondioksitli ortamda hızlandırılabilir. Mikobakterilerin çoğu karbon kaynağı olarak gliserol kullanır. Mikobakterilerin üremesi için gerekli nitrojen, inorganik kaynaklardan elde edilir. Asparagin en iyi nitrojen kaynağıdır. Mikobakterilerin üremesi için az miktarda demir, çinko ve magnezyum metalleri de gereklidir (14,16,17).

Mikobakteriler ısıya duyarlıdır. Pastörizasyonla 20 dakikada tahrip olurlar. Kimyasal dezenfektanlara dirençlidirler. Kuruluğa haftalar, aylarca dayanırlar. Kültür besi yerlerinde 2-8 ay canlı kalabilirler. Kültürler direkt güneş ışığına maruz

bırakıldığında 2 saatte ölürlür. Havadaki toz partiküllerinde 8-10 gün bulaştırıcılıklarını koruyabilirler (16,18).

Mikobakteriler, bir plazma membranı ile sınırlanan sitoplazmadan ve bunları çevreleyen lipidden zengin bir hücre duvarından oluşmuştur. Sitoplazmada, bir nükleer cisim içinde sıkıca katlanmış fakat bir nükleer membran ile çevrili olmayan tek bir kromozom vardır (19). Mikobakterilerin DNA molekülü, uzun zincirli şeker-deoksiriboz iskeletinden oluşmuştur. Bu iskelete dört çeşit pürin veya pirimidin bazları yapışıktır. Bu bazlar adenin (A), sitozin (C), guanin(G) ve timin (T) dir. Üç baz bir triplet oluşturur ve her bir triplet bir aminoasidi şifreler, bu da bir geni oluşturur. Bir dizi gen ise bir kromozomu oluşturur. DNA genellikle iki zincirlidir (çift sarmal) ve baz çiftleri birbirini tamamlar. C ile G ve A ile T çiftlenir. Hücre bölünmesi esnasında kromozom iki sarmala ayrılır ve tamamlayıcı iplikçik sonradan DNA polimeraz enzimi yardımıyla sentezlenir ve iki çift sarmal oluşur. Çift sarmal vücut sıcaklığında çok stabildir, ama ısıtılınca iki zincire ayrılır. Soğutulunca rehibridizasyon görülür; her baz tamamlayıcı baza bağlanır, böylece çift sarmal tekrar oluşur (20).

Tüberküloz Patogenezi

Tüberküloz basili, aktif akciğer tüberkülozlu hastalardan, damlacık enfeksiyonu ile bulaşır. Damlacık çekirdekleri 0.5-5µm çapındadır ve 1-3 adet basil taşıyabilirler. Bunların inhalasyonu ile alveollere ulaşması enfeksiyonu başlatır (14,21).

Tüberküloz patogenezinde 5 evre vardır:

1. Evre:Basilin organizmaya girerek yerleşmesi ve enfeksiyonu başlatması
2. Evre: Basilin logaritmik çoğalması ve tüberküloz lezyonunun gelişmesi
3. Evre: Hücresel immünite ve geç tip hipersensitivite gelişmesi
4. Evre:Basilin kazeöz odağın kenarından kaçarak yeniden makrofaj içine geçmesi
5. Evre: Likefaksiyon ve kavite oluşumu (22).

Alveollere kadar ulaşabilen mikobakteriler, alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Alveolar makrofajların basili öldürme yetenekleri değişkendir. Aktif olan alveolar makrofajlar tüberküloz basilini parçalayarak onun çoğalma ve inflamasyona yol açmasını engellerler. Alveol makrofajlarının basili parçalaması onun mikrobisidal gücüne ve basilin genetik ve fenotipik virülansına bağlıdır. Akciğerdeki enfeksiyon virülan bir basilin, zayıf bir alveolar makrofaj tarafından fagosite edilmesi ile başlar (22).

Alveolar makrofajın fagozomal vakuolü içinde çoğalan basil, konakçı hücrelerini parçalar. Mikobakteri ve makrofaj etkileşimi sonucu sitokinler ve kemokinler salınır. Bu ürünler aktive olmamış makrofajları, dentritik hücreleri, periferik kan monositlerini, lenfositleri ve nötrofilleri lezyon bölgesine çeker; daha sonra basil ile alveolar makrofaj arasında simbiotik bir dönem başlar (14). Yeni gelen makrofajlar aktive olmadıklarından basili öldürme ya da inhibe etme yeteneğine sahip değildirler. Sonuçta daha çok basil ve alveolar makrofaj lezyon bölgesinde yer alır. Enfeksiyondan sonraki 7-21. günler arasındaki simbiotik devrede, basil logaritmik olarak çoğalmaya devam eder. Basilin nasıl hematojen yayılım gösterdiği tam olarak tarif edilememiştir. Bazı olasılıklar üzerinde durulmaktadır. Bunlar;

(a) Primer enfeksiyon bölgesinden lenfatikler yolu ile basilin hiler lenf nodlarına taşınip, mediastinal lenfatiklerle, ductus torasikusa ve sol subklavian ven yolu ile sağ kalbe ve akciğerlere gitmesi.

(b) Direkt kapillerlere veya primer lezyona komşu küçük damarlara basilin invazyonuyla vücudun değişik bölgelerine yayılım olması .

(c) İnflamatuar bölgeye göç eden monosit-makrofaj veya polimorf nüveli fagositlerin, mikobakteriyi fagosite ederek tekrar kan dolaşımına dönmeleri sonucu hematojen yayılım olabilir (23).

Basil çoğalmasının kontrolünde hücresel immünite ve geç tipte hipersensitivite önemli rol oynar. Lurie'nin tavşan modelinde, deneysel olarak duyarlı ve dirençli tavşanlar mikobakteri ile enfekte edilmiş, hastalık devresinde

akciğer kültürü ile canlı basil sayımı yapılmıştır. Enfeksiyondan bir hafta sonra dirençli tavşanda, duyarlı tavşana nazaran akciğerlerde 25 kez daha az sayıda basil içeren makrofaj ve granülomatöz lezyonlarda daha çok sayıda lenfosit saptanmıştır. Buna karşın enfeksiyondan 3 hafta sonra, duyarlı ve dirençli tavşanlarda basil sayısı stabil hale gelmiştir. Duyarlı olan tavşanlar da basil çoğalmasını sınırlayabilmişlerdir. Bunu içlerinde basil çoğalması devam eden makrofajları öldürerek, yani doku harabiyeti ile sağlamışlardır. Dirençli tavşanlar ise basil çoğalmasını intrasellüler öldürme yöntemiyle engellemişlerdir(24).

Alveolar makrofajlar ve T lenfositleri arasındaki etkileşim hücresel immünite ve geç tip hipersensitivite ile ilgilidir. Hücresel immünite ile aktif makrofajlar içindeki basilin çoğalması inhibe edilir veya basil öldürülür. Geç tip hipersensitivite ile makrofajların ürettikleri IL_{12} ve NK hücreleri stimüle edilir, onlar da içlerinde tüberküloz basili bulunan makrofajları öldürürler. Böylece basil çoğalması durur, ortama dökülen basiller solid kazeöz dokuya geçerler. Ekstrasellüler solid kazeöz dokuda tüberküloz basili canlılığını korur ancak; anoksik ortam, düşük PH ve inhibitör yağ asitlerinin varlığı nedeniyle çoğalamazlar. Solid kazeöz dokuda bazı basiller uzun yıllar hatta ömür boyunca dormant olarak kalabilmektedir (24). Duyarlı tavşanlarda olduğu gibi zayıf bir hücresel immünite varsa, basil kazeöz nekrozun merkezinden kaçır ve etrafındaki aktive olmamış alveolar makrofajlar içinde çoğalmaya devam eder. Bu enfekte makrofajlar sitotoksik geç tip hipersensitivite reaksiyonu ile öldürülür ve kazeöz nekroz giderek genişler. Dirençli tavşanlarda olduğu gibi kazeöz nekroza kaçır basiller aktif makrofajlar tarafından fagosite edilirse, basil öldürülür ve lezyon stabil hale gelir. Dirençli tavşanlarda lezyonda daha az nekroz ve daha çok sayıda aktif makrofaj ve T lenfosit vardır. Duyarlı tavşanlarda ise daha fazla nekroz oluşur (24).

Makrofajlardan çıkan proteinaz, lipaz, nükleaz gibi hidrolitik enzimler ve tüberkülin benzeri basil ürünleri, kazeöz odağın erimesine (likefiye olmasına) neden olur. Erime alanı basiller için iyi bir besiyeri oluşturur (25).

Basilin intrasellüler ortamda çoğalması hücresel immünite tarafından kontrol altına alınırken, likefiye alanda ekstrasellüler ortamda olduğu halde sınırsız olarak

çoğalır. Böylece doku destrüksiyonu artar (24,25). Basiller tarafından üretilen tüberkülin benzeri ürünlerle gelişen geç tip hipersensitivite reaksiyonu sonucunda bronş duvarında nekroz gelişir ve nekrotik duvarın rüptürü sonucunda kavite oluşur (22,24). Basil likefiye materyalle birlikte bronkojen yolla akciğerin diğer bölümlerine yayılır ve bronkopnömoni gelişir. Bu likefiye materyalin ekspektorasyonu ile yeni kişiler enfekte olur (22,24-26).

Kazeöz lezyonların genişlemesi, perifokal aktif makrofajlar tarafından önlenir. Geniş lezyonlar makrofaj kaynaklı hidrolitik enzimlerle sindirilir ve yerini fibröz doku alır. İyileşen tüberküloz lezyonlarında bir ya da daha çok sayıda küçük ankapsüle solid veya yarı solid kazeöz odak bulunabilir. Böyle odaklarda tüberküloz basili dormant veya metabolizması durmuş olarak hayat boyu canlı kalabilir ve konağın direncini kıran durumlarda aktif hastalığa neden olabilir (24).

Kişi tüberküloz basili ile ilk karşılaştığı zaman primer enfeksiyon olmakta ve mikobakteri yaygın bulunduğu bölgeden, tüm vücuda dağılarak basillemiye sebep olmaktadır. Etkili hücresel immünite sonucunda, tipik olarak lokal enfeksiyon alanında gerileme görülür, ancak her zaman immün cevap bu odağı sterilize etmede yeterli olmayabilir. Bu durumda az sayıda canlı basil bu dokuda kalır ve makrofajlar ve T lenfositleri tarafından enfeksiyon kontrol edilir (27). Bebeklerde, çocuklarda ve adölesanlarda ekstrapulmoner tüberküloz formları genellikle primer progresif hastalık şeklinde, primer enfeksiyondan sonra görülmektedir. Erişkinlerde ise AIDS hariç geç reaktivasyon şeklinde görülmektedir.

Eskiden ekstrapulmoner tüberküloz bölgesinde yüksek arteriyel kan akımının olduğu, dolayısıyla yüksek oksijen içeriği nedeniyle mikobakteriyal çoğalmanın kolay olduğu düşünülürdü. Son zamanlarda oksijenden zengin bölgede, makrofajların tüberküloz basilinin intrasellüler proliferasyonunu engellemede başarısız olması nedeniyle mikobakteriyal çoğalmanın olduğu ileri sürülmektedir (27).

Dissemine tüberküloz, multiple organın eş zamanlı tutulumu anlamındadır. Patogenetik olarak dissemine tüberküloz gelişimi ile ilgili birçok görüşler mevcuttur.

Primer pulmoner enfeksiyonu takiben meydana gelen basilleme sonucunda, multiple organlarda progresif hastalık gelişimine sebep olabilir. Bu durum özellikle bebeklerde, AIDS veya organ transplant alıcısı gibi immüno-kompremize erişkin hastalarda olur. Diğer taraftan dissemine hastalık primer enfeksiyondan yıllar sonra reaktivasyon tüberkülozu formunda da gelişebilir. Bu durum tutulan lenf nodlarından, akciğerden, kemikten veya diğer lezyonlardan kan dolaşımına çok miktarda basil geçişi ile olabilir. Diğer bir potansiyel sebep ise; bir çok bölgede eş zamanlı reaktivasyon olmasıdır. Bu durum immünitedeki ani düşme sonucunda primer basilleme sırasında nadiren görülebilir. Dissemine hastalık için risk faktörleri; AIDS, alkol alımı, steroid kullanımı, gebelik veya postpartum dönem, kanser, böbrek yetmezliği, organ transplantasyonudur (27).

Miliyer tüberküloz, tüberküloz basilinin yaygın hematojen yayılımı sonucu gelişir ve vücutta yaygın olarak milimetrik boyutta çok sayıda lezyon oluşur. Miliyer tüberküloz sıklıkla primer enfeksiyonu takiben, bebeklerde ve çocuklarda görülür, ancak yaşamın herhangi bir döneminde, vücudun herhangi bir yerindeki lezyondan, tüberküloz basilinin hematojen yayılım göstermesi ile de olabilir. Bu durumda, eski kazeöz lezyonlarda reaktivasyon olmakta ve kan dolaşımına çok miktarda basil geçişi olmaktadır (28).

Tüberküloz İmmünolojisi

Tüberkülozda immün yanıt, başlıca iki hücre olan makrofajlar ve lenfositlere bağlı olarak, zincirleme seyreden bir seri etkileşimler sonucu gelişir (14,29).

Mikobakteri alveole ilk ulaştığı zaman, her yabancı partikül gibi derhal makrofajlar tarafından fagosite edilir. *M.tuberculosis* antijenleri, makrofajlarda küçük parçalara ayrılırlar. Bu parçalar, enfekte makrofajların yüzeyine nakledilerek T hücrelerine sunulur. MHC klas II molekülü ile CD₄ hücrelere, MHC klas I molekülü ile CD₈ hücrelere tanıtılır (23,29).

Aktif makrofajlar lizozim ve mitokondriden zengindir, fagositoz yeteneği artmıştır. Aktif makrofajların metabolizması yüksektir ve normal makrofajlara göre daha büyüktür. Aktif makrofajların oksijen ve nitrojen radikal üretimi artar, basilleri

fazla miktarda çoğalmadan harap ederler (14,25). Makrofajlardan salınan IL-1, T lenfosit aktivasyonunu artırır (29,30).

Aktive lenfositler salgıladıkları sitokinlerle, makrofajların lezyon bölgesinde toplanmasını ve aktivasyonunu sağlarlar. Özellikle interferon gamma (IFN γ), tümör nekrotizan faktör alfa (TNF α), IL-4 ve IL-5 ; makrofajların antimikobakteriyel etkilerini artırır. T lenfositler; CD₄ ve CD₈ lenfositler olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. CD₄ T hücrelerinden salınan IL-2; T hücrelerinin klonal genişlemesini sağlar. Makrofajlar ve monositler tarafından üretilen IL₁₂ , CD₄ T lenfositlerinin genişlemesini sağlar, Böylece IL₁₂, hücrel immünite ve geç tip hipersensitivite reaksiyonlarında önemli rol oynar ve tüberküloz patogenezi kontrol eder (23).

IFN γ , primer olarak CD₄ hücrelerinden daha az oranda da NK hücreler, CD₈ hücreler ve B lenfositleri tarafından salınır. Başlıca;

- Makrofaj aktivasyonu, IL-1, TNF α üretimini ve MHC reseptör sayısını artırır,
- T lenfositlerinin, CD₄ lenfositler yönünde proliferasyonunu artırır,
- CD₈ lenfositlerin sitotoksik fonksiyonunu artırır,
- NK hücrelerini aktive eder ve sitotoksik fonksiyonunu artırır (23).

Bazı hücelere karşı spontan olarak sitotoksik fonksiyon gösteren lenfositler naturel killer (NK) hücre olarak adlandırılır. NK hücreleri; enfeksiyonun erken devresinde spesifik immün yanıt oluşmadan önce içinde basil çoğalan makrofajları öldürerek etkili olurlar. Özellikle tüberkülin deri testi negatif olan kişilerde, primer enfeksiyonun erken fazında etkilidirler (23).

HIV enfeksiyonunun, spesifik olarak CD₄ hücreleri ve makrofajları enfekte etmesi; hücrel immün fonksiyonlarda bozulma ve CD₄ hücrelerinin ve makrofajların azalmasıyla sonuçlanır. CD₄ hücrelerinin azalması ile makrofajları aktive eden faktörde azalmış olacağından, makrofajların fonksiyonları daha da çok bozulur (28). Tüberküloz basilinin sebep olduğu enfeksiyon da başlıca bu iki hücre tarafından kontrol altına alındığından, HIV pozitif kişilerde azalan konak direnci; progresif primer tüberküloz gelişimine, tüberkülozun akciğer dışı organlara

hematojen yayılmasına ve önceki enfeksiyonun reaktivasyonuna neden olur. HIV ile enfekte kişilerde primer ya da sekonder eksojen enfeksiyon (reenfeksiyon) da olabilir (31). HIV pozitif tüberküloz hastalarında, özellikle CD4 sayısının azalmasıyla paralel olarak, akciğerde daha az granülom oluşumu ve daha çok basil yükü olduğu görülmüştür (28).

Tüberkülozda Tanı Yöntemleri

Tüberkülozun erken tanısı için en önemli nokta klinik kuşkudur. Öksürük, ateş, gece terlemesi, kilo kaybı, halsizlik ve hemoptizi tüberkülozu düşündüren belirtiler olmakla birlikte hiçbir tüberküloza özgü değildir. Ancak 3 haftadan uzun süren öksürük dikkat çekici bir semptomdur. Tanı yaklaşımı iyi bir öykü ve fizik muayene ile başlamalı ve ardından ilk değerlendirmenin yönlendirdiği çeşitli testler uygulanmalıdır. Tüberkülozda en önemli tanı yöntemi bakteriyolojik konfirmasyondur(6).

Akciğer filmi, tüberküloz tanısı düşünülmesinde yarar sağlayan rutin bir tetkiktir. Ancak hiçbir radyolojik görünüm tüberküloza özgü değildir.

a- Tüberküloz Basilinin Bakteriyolojik Tanısı:

Tüberküloz tanısı koymada en önemli yöntem, bakteriyolojik olarak basilin varlığının gösterilmesidir. Bunun için uygun örneklerin alınması ve tanısal işlemlerin yapılması gerekmektedir (32).

Direkt tanı yöntemlerinin başında aside dirençli basilin gösterilmesi ve kültürde üretilmesi gelmektedir (13).

İncelenecek olan materyal tutulan organa göre alınmalıdır. Akciğer tüberkülozlu olgularda sabahları çıkarılan 5-10 cc'lik balgam örneği, birbirini izleyen üç gün üst üste alınmalıdır. Balgam çıkaramayan hastalarda, laringeal sürüntü alınması diğer bir yöntem olup, tanısal değeri ortalama %25'dir. Sabah açken alınan mide suyu incelemesi bebeklerde, küçük çocuklarda, akıl hastalarında, komada ve uyum bozukluğu olan hastalarda kullanılan bir metottur

ve tanısal değeri %10-30 kadardır (13,32,33). Bu yöntemlerle tanı konulamadığında fiberoptik bronkoskopi, bronş lavajı, bronkoalveolar lavaj veya transbronşial biopsiler alınarak bunlarda bakteriyolojik inceleme yapılabilir. Bronkoskopi sonrası balgam incelemeleri de oldukça yarar sağlamaktadır (33). Ayrıca transtorasik ince iğne aspirasyon yöntemiyle de materyal elde edilebilir(34).

Tüberküloz basilinin mikroskopta yayma preperatlarda incelenmesi için iki yöntem vardır; direkt yayma yöntemi ve dekontaminasyon konsantrasyon yöntemidir (32).

- Direkt Yayma Yöntemi:

Balgamın ya da patolojik materyalin hiçbir işleme tabi tutulmadan lama yayılması ve doğrudan boyanarak basil araştırılması yöntemidir. Preperatın boyanmasında Ziehl-Neelsen veya Fluorochrome teknikleri uygulanmaktadır.

Fluorochrome tekniğinde, auramin boyası kullanılmakta ve materyal flüoresan mikroskopi ile incelenmektedir (13,32,33).

Dünyada birçok ülkede ve Türkiye'de boyama için Ziehl-Neelsen tekniği kullanılmaktadır. Ziehl-Neelsen tekniği ile boyama işlemi şu basamaklarla yapılır:

- 1- Yayma preperat üç kez alevden geçirilerek tespit edilir,
- 2- Preperatın üstü karbolfuksinle örtülür ve altından ısıtılır. Hafif bir buhar çıkmalı, kaynama olmamalıdır. Kaynama olursa yeniden boya eklenmesi gereklidir. Boya lamın üzerinde 3-10 dakika süreyle kalmalıdır,
- 3- Soğuyuncaya kadar bekletilir,
- 4- Akar suda yıkanır,
- 5- Asit-alkolle boyası gidinceye kadar, diğer bir deyişle; lam kırmızı renk alana kadar dekolore edilir ve sonra tekrar yıkanır,
- 6- Metilen mavisi solüsyonu ile 30-60 saniye boyanır,
- 7- Akar su ile tekrar yıkanır ve kurulur,
- 8- Işık mikroskopunda immersiyon objektifi (100x) ile incelenir(13,32).

Mikobakteriler, mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde, uzun, granüllü bazen de kok ya da çatallı şekilde görülürler. Preperatın alışkın bir göz tarafından en az 10 dakikalık bir sürede ve en az 300 alan incelenerek değerlendirilmesi gereklidir(32).

Bu yöntemle incelenen preperatların değerlendirilmesinde Amerikan Toraks Derneği'nin önerdiği skalaya göre, basil varlığı sayısal olarak belirtilir. Bu hem tanı sırasındaki hastalığın ağırlığını göstermede, hem de tedaviye yanıtı takip etmede önemlidir(13,17). Yayma sonuçlarının raporlanması Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Yayma sonuçlarının raporlanması.

Görülen basil sayısı	Rapor
Yaymanın tümünde hiç basil yok	ARB negatif
Yaymanın tümünde 1-2 basil	Saptanan basil sayısı raporlanır
Yaymanın tümünde 3-9 basil	Seyrek ya da (+)
Yaymanın tümünde 10'dan fazla basil	Birkaç tane ya da (++)
Her immersiyon alanında bir veya birden fazla basil	Çok ya da (+++)

- Dekontaminasyon ve Konsantrasyon Yöntemi:

Balgamın ya da patolojik materyalin işlendikten sonra konsantre edilmiş sedimentlerinin boyanarak basil araştırılması yöntemidir.

Tüberküloz basillerinin hücre duvarlarında yüksek derecede lipidlerin bulunması, bunları dekontaminan maddelere ve alkalilere karşı daha dirençli kılmaktadır (32).

İncelenecek materyalde tüberküloz basillerini saran, doku, serum ve diğer proteinoz materyal gibi organik artıkların eritilmesi ve mikobakterilerden daha hızlı üreyen mikroorganizmaların yok edilmesi için dekontaminasyon ve konsantrasyon

yöntemi uygulanır (13,32,33). Bunun için N- acetyl L- Cystein, düşük alkali ile karıştırılarak kullanılır. Solüsyonun dekontaminasyon özelliği içerdiği NaOH'den gelmektedir. NaOH içeriği yüksek ya da işlem süresi uzun olursa mikobakteriler de ölebilir. Bu nedenle işlemin uygulanışı sırasında bunlara dikkat edilmesi önemlidir. Bu karışım 24 saat içinde kullanılmalıdır, aksi takdirde mukolitik etkisi kaybolur, bu yüzden %4'lük NaOH ile yapılan Petroff yöntemi olarak isimlendirilen dekontaminasyon yöntemi tercih edilmektedir (32).

Petroff Yöntemi şu basamaklara uyularak yapılır:

- 1- Örneğe eşit miktarda %4'lük NaOH eklenir. Çalkalama ile veya bir çubukla karıştırılarak homojen hale getirilir. 37 °C 'de 15-20 dakika bekletilir.
- 2- 3000 devirde 20 dakika santrifüj edilir ve üstte kalan kısım dezenfektan bir madde içine atılır.
- 3- Dipte kalan kısım steril serum fizyolojikle sulandırılıp bir endikatör yardımı ile pH'sına bakılır; pH 7-7.2 olmalıdır. Asit veya alkali ise 2N HCl ya da NaOH eklenerek istenen pH'ya getirilir.
- 4- Sedimentin bir kısmı kültür yerlerine ekilir, bir kısmı ise lama yayılarak boyanır ve mikroskopik incelemesi yapılır (32).

Bu yöntemle basilin gösterilebilmesi için alınan materyalin mililitresinde en az 10000 basil bulunması gerekir. Bu yöntemle atipik mikobakteriler ve nokardia gibi mikroorganizmalar da pozitif sonuç verebilir (6).

-Konvansiyonel Kültür Teknikleri

M.tuberculosis'i üretmek için üç grup besi yeri kullanılmaktadır:

- Genel besi yerleri: Löwenstein- Jensen, Petragnani ve Amerikan Trudeau Society'nin (ATS) yumurtalı besi yeri, Midleebrook'un 7H10 ve 7H11 gibi agarlı besi yerleridir. Bu besi yerlerinde kontaminasyonu önlemek için malaşit yeşili kullanılmaktadır.

- Sıvı besi yerleri: Dekontaminan olarak Tween 80 deterjanı içerirler, daha çok BCG için ve uzmanlaşmış laboratuarlarda kullanılırlar.

-Seçici besi yerleri: Genel ya da sıvı besi yerlerine gereğine göre antibiyotik, vitamin ya da diğer bazı kimyasal maddeler eklenerek hazırlanırlar (32).

Türkiye'de pek çok ülke gibi en çok kullanılan besi yeri Löwenstein- Jensen besi yeridir (32,33).

Kültürler ekildikten sonra bir gün yatık olarak 37 C'de bekletilir. Ertesi gün ağzı parafin kağıtla iyice kapatıldıktan sonra 37 C'de enkbasyona devam edilir. Bütün kültürler haftada bir kontrol edilmek kaydı ile 6-8 hafta bekletilir (32).

Direkt muayenede basilin görüldüğü fakat kültürde üremenin olmadığı durumlarda ağağıdaki nedenler söz konusu olabilir;

- Numune kültüre hazırlanırken basiller ölebilir. %4'lk NaOH basillerin büyük bir kısmını öldürebilir. Bu yüzden dekontaminasyon şartlarına ve zamana uyulmalıdır.

- Santrifüj hızı da önemlidir. Yüksek frekansta basiller daha çok ölmektedir (32). *Mycobacterium tuberculosis*; kültürde beyaz ya da sarıya yakın renkli, pürtüklü, kabarık ve düzensiz kenarlı koloniler yapar. Niacin testi pozitifdir. redikten sonra sodyum nitratı, nitrite redükte ederler. Oda ısısında katalaz aktiviteleri vardır ve bu özellikleri diğer türlerden ayrılmasında yardımcıdır (13,32).

Kültür sonuçlarının raporlanmasında uygulanan teknik Tablo 2'de gösterilmiştir (13,35).

Tablo 2. Kültür sonuçlarının raporlanması.

Koloni Sayısı	Rapor
Koloni yok	üreme olmadı (-)
50 koloniden az	Koloni sayısı bildirilir
50-100 koloni	+ (1+)
100-200 koloni	++ (2+)
200- 500 koloni (bol üreme)	+++ (3+)
500'den fazla koloni (silme üreme)	++++ (4+)

b- Histopatolojik İnceleme:

Diğer bir tanı yöntemi, tüberkülozun anatomik tutulumuna göre dokulardan alınan biyopsilerin histopatolojik olarak incelenmesi ve kazeifikasyon nekrozu içeren granülomların saptanmasıdır (6,36).

c- Serolojik Testler:

Çeşitli mikobakteriyel antijenlere karşı gelişen antikorların ölçümüne yönelik testlerdir(33).

Serolojik testlerde önceleri antijen olarak kültür filtratları, pürifiye protein deriveleri veya bütünlüğü bozulmamış hücreler kullanılmıştır. Bu preparatlar pek çok antijenik belirleyiciler içermektedirler. Tüberküloz basili çapraz reaksiyon veren çok sayıda antijene sahiptir ve bu antijenlerin büyük bir kısmı diğer mikobakterilerde, nokardialarda, korinobakterilerde ve rhodokoklarda da bulunmaktadır. Bu nedenle yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca ağır enfeksiyonlarda, salınan mikobakteriyel antijenlerin, serumdaki antikorları kullanarak immün kompleks oluşturmaya bağlı olarak, düşük antikor düzeyleri meydana gelebilir bu durum yanlış negatifliğe yol açabilir(33).

Geliştirilen yöntemler arasında immünodifüzyon, pasif hemaglütinasyon, tüm hücre aglütinasyonu, enzime bağlı immünoassay (ELISA), floresan antikor ve solid faz radyoimmünoassay bulunmaktadır (17).

ELISA ; basit, hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlayan bir tekniktir. Değişik antijenler kullanılarak, mikobakterilere karşı IgG antikorları ölçmeye dayanan bu testte, tüberküloz prevalansı düşük ülkelerde %50-60, prevalansın yüksek olduğu ülkelerde ise %70-85'lik bir duyarlılık saptanmıştır. Testin özgüllüğü ise %97'nin üzerindedir (33).

ELISA ile IgM antikorlarını saptamaya yönelik çalışmalar yapılmış, ancak başarılı sonuçlar elde edilememiştir (6,33). ELISA ile IgA ölçümü nispeten daha

spesifik olmakla beraber, bu antikorun serum düzeylerinin çok düşük olması nedeniyle testin duyarlılığı düşük bulunmuştur (33).

Tüberkülozun serolojik tanısında da kullanılan antijenler şunlardır:

- Antijen 38 kilodalton (kd) : Yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan hastalarda %80 duyarlılık ve % 100 özgüllüğe sahip olduğu görülerek iyi sonuçlar alınmıştır. Ancak serolojik testlerin tanıda kullanılarak asıl yarar sağlaması gereken grup olan yayma negatif akciğer tüberkülozlu hastalarda duyarlılık sadece %15 oranında bulunmuştur (37).

- Antijen 5: Erişkin yayma pozitif tüberküloz olgularında antijen 5 pozitifliği %30-52, yayma negatif tüberküloz olgularında %16-22 oranındadır (38).

- Antijen A60: Tüberkülinin başlıca ısıya dayanıklı komponentidir. Nokardia, Corynebakteri ve diğer mikobakteri türleri arasında da bulunur.ELISA ile antijen A60'a karşı olan IgG ve IgM düzeyleri çalışılmıştır. IgM düzeyinin çok daha yakın zamanda olan immünolojik olayı yansıtmaması nedeniyle, geçirilmiş enfeksiyonu gösteren IgG'ye göre daha yararlıdır (39).

- Antijen 88 kd: HIV ile enfekte ve ileride tüberküloz gelişme şüphesi olduğu düşünülen hastalardan, klinik olarak tüberküloz görünümü olmadan 1.5-6 yıl önce alınan serumda 88kd antijenine karşı antikor düzeyi bakılmış ve %74 oranında antikor görülmüştür. Ancak tüberküloz tanısı konulduğu zaman tekrar 88kd antijenine karşı antikor düzeyi bakıldığında %66 oranında antikor tespit edilmiştir. Böylece aktif tüberküloz varlığında antikor oluşturma kapasitesinin azaldığı ve serodiagnostik kullanımdaki yerinin kısıtlı olduğu görülmüştür (40).

- Lipoarabinomannan (LAM): Mikobakterinin hücre duvarında bulunan, muhtemelen virölansı ile ilgili bir antijendir. Tüberküloz hastalarında LAM'a karşı oluşan IgG antikor düzeyine bakıldığında %73 duyarlılık ve %92 özgüllük saptanmıştır (41).

d- Moleküler Tanı Yöntemleri

- Radyometrik Kültür Yöntemleri (BACTEC):

Klinik örneklerde, mikobakterilerin çoğalmasını hızlı bir şekilde saptamak için otomatik bir teknik geliştirilmiştir(17).

İlk kez 1969'da Delad ve Wagner, kültür ortamında bulunan ve ^{14}C (karbon) ile işaretli maddelerin karboksilasyonu ile ortaya çıkan $^{14}\text{CO}_2$ 'i ölçen, böylece bakteri metabolizmasını saptayan bir teknik geliştirdiler. 1975'de Cuming ve arkadaşları bu tekniğin, tüberküloz basili üremesinde de kullanılabileceğini ileri sürdüler. 1977'de Middlebrook ve arkadaşları özel bir ortamda tüberküloz basilinin üremesini saptayabilen otomatize radyometrik bir yöntem buldular. Daha sonraları bu yöntem, ticari olarak geliştirilmiş bir cihaza uyarlanmıştır (33).

Bu yöntemde; eritme, dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinden geçirilen klinik örnekler ^{14}C ile işaretlenmiş palmitik asit içeren kültür ortamına yani Middlebrook 7H12 besi yerine ekilir (33). Mikobakteriler üremeleri sırasında, besi yerinde bulunan yağ asitlerini metabolize ederler ve bu sırada $^{14}\text{CO}_2$ oluşur. Ortaya çıkan $^{14}\text{CO}_2$ kültür kabının üzerinde toplanır. Bactec aleti, içinde bulunan her bir kültür kabındaki $^{14}\text{CO}_2$ 'i belirli aralarla çeker ve radyoaktivitesini ölçer (6,33).

Mikobakterilerin çoğalması, üretilen $^{14}\text{CO}_2$ miktarına göre önceden belirlenmiş olan 10 endeksli çoğalma düzeyine ulaştığında, bactec sistemi pozitif sonuç verir (17).

Bactec yöntemiyle, klinik örnekte mikobakterilerin varlığı, geleneksel kültür yöntemlerine göre çok daha erken sürede saptanır. *M.tuberculosis*'in özgün adlandırımı ortalama 5 günde, ilaç duyarlılık testleri ise ortalama 6 günde sonuçlanır (33). Bir diğer önemli avantajı da tüberküloz tedavisinde kullanılan majör bir ajan olan Pirazinamid'e karşı invitro duyarlılık testinin yapılabilmesidir (42).

Bactec kültüründe radyoaktivite kullanımı nedeniyle çalışanlar için risk oluşturmaları, radyoaktif atık sorunu, sıvı ortamında kontaminasyon saptamanın zorluğu ve maliyetinin yüksek olması kullanımını kısıtlayan dezavantajlarıdır. Radyoaktif atık sorununu gidermek amacıyla Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) adı verilen flöresan indikatörlü bir besi yeri geliştirilmiştir. Modifiye Middlebrook 7H9 sıvı besi yeri içeren tüplerdir. Her bir tüpün dibinde flöresan indikatör fikse edilmiştir. MGIT besiyeri mikobakterilerin hızlı üremesi için esansiyel maddeler ve kontaminasyonu engellemek için antimikrobiyal ajanlar içerir (43,44).

Pfiffer ve ark. BACTEC ve MGIT besi yerlerini *M.tuberculosis* izolasyon oranı ve süresi açısından karşılaştırmışlardır. Yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan olgulardan alınan örneklerde, *M.tuberculosis* izolasyon oranı MGIT için %87, BACTEC için %96.3 olarak tespit edilmiş ve yayma negatif akciğer tüberkülozu olan olgulardan aldıkları örneklerde bu değerleri her iki besi yeri için sırasıyla %76.3 ve %83.1 olarak bulmuşlardır. Mikobakteri izolasyon sürelerini yayma pozitif örneklerde MGIT ve BACTEC'de sırasıyla 9.9 gün ve 9.7 gün; yayma negatif örneklerde ise sırasıyla 20.3 gün ve 18 gün olarak bulmuşlardır (43).

- Gaz Kromatografisi ve Kitle Spektrometrisi:

Mikobakteriler, hücre duvarlarında pek çok lipit bulundurmaktadırlar. Bazı lipit formlarının kromatografik yöntemlerle belirlenmesi, hızlı tanıda yararlı olabilir (6). Bu amaçla tüberkülostearik asit ve mikolik asit tayinleri kullanılmaktadır (6,33).

Tüberkülostearik asit, sadece *M.tuberculosis*'in yapısında değil, tüberküloz dışı diğer mikobakterilerin ve actinomycetales üyelerinin yapısında da bulunur (6,33). Bundan dolayı, bu yöntem, tüberkülozun yüksek prevalansta olduğu ülkelerde olası tanı yöntemi olarak yararlı olacaktır fakat tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarının yaygın olduğu gelişmiş ülkelerde tanısal değeri düşük olacaktır (33).

Mikobakteriye spesifik olan mikolik asitin saptanması da tanı yöntemi olarak tartışılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile mikobakteriyel

kültürlerde bu madde belirlenebilmektedir. Bu yöntem için 10^{7-8} mikobakteri gereklidir (6).

- Genetik ve İmmünolojik Problar:

Birbirlerini tamamlayıcı nükleik asit zincirlerinin bir araya gelerek, kalıcı çift zincir kompleksleri oluşturması esasına dayanır. Mikobakteriye spesifik DNA ve RNA probları kullanılmaktadır (6,33).

- DNA Probları: Çift sarmallı DNA, sıcaklık veya tuz konsantrasyonunun değiştirilmesiyle, iki tek sarmal haline disosiye olur. DNA disosiye olduktan sonra yeniden birleşebilir. Bu özellik DNA problemlerinin oluşumuna olanak sağlamıştır. Problemler, ilgilenilen genetik diziyi yansıtan tek sarmal nükleik asit parçalarıdır. Problemlerin belirlenmesine olanak sağlamak için radyoaktif veya nonradyoaktif işaret eklenir. Problem klinik örnekteki DNA ile hibridize olursa, bağlı işaret ölçülerek organizmanın bulunduğu sonucuna varılır (6).

Mikobakteri türlerinin saptanması için ilk kullanılan problemlerde işaret, iyot 125 idi. Sonra radyoaktif olmayan işaretler geliştirildi (6).

Bu problemlerle tanı konulabilmesi için 10^{5-8} basil gereklidir. Klinik örneklerden yeterli sonuç alınamaz Bu nedenle çoğalmakta olan kültürlerde uygulanması anlamlıdır (6).

- RNA Problemleri: DNA problemlerine alternatiftir. Organizma içinde multiple kopyaları bulunan bir nükleik asit dizisi arama esasına dayanır. Büyük veya küçük ribozomal RNA (rRNA) problemleri geliştirilmiştir. rRNA problemlerinin avantajı; bir mikroorganizma içinde binlerce hedef bulunmasıdır. Problem için bir çok hedef bulunacağından yöntemin sensitivitesi artar (6).

- DNA Parmak İzi (Restriction Fragment Length Polymorphysym: RFLP)

Restriction endonükleazlar, DNA'yı belirli noktalardan kesen enzimlerdir. Enzimin tanıma bölgesi klasik olarak 4-8 nükleotid arasında değişir. Enzim ile

kesim sonucunda oluşan fragmanlar elektroforez ile ayrılabilir. Bu yöntem özellikle epidemiyolojik çalışmalar için önemlidir (6).

- Ligaz Zincir Reaksiyonu:

Bu moleküler biyolojik yöntemde enzim olarak DNA ligaz kullanılır. DNA ligaz, iki DNA parçasını çift sarmal oluşturacak şekilde birleştirir. Bir nükleotidin bile yapısında mutasyon olsa bu yöntemle saptanabilecektir. Bu yöntem özellikle ilaç rezistansı çalışmaları için umut vermektedir (6).

- Luciferase Reporter Assay:

Bu yöntem, ilaç direncinin hızlı belirlenebilmesi için geliştirilmiştir. Ateş böceklerinin ışık üretme sistemi olarak tanınan luciferase, ATP varlığında luciferinle etkileşir ve ışık yayar. Bir mikobakteriyofaj içine, luciferase geni yerleştirilir. Mikobakteriyofaj, mikobakteriye bağlanınca faj DNA'sı bakteriye injekte olur. Basil içinde luciferase üretilir. Ortama antimikobakteriyel ajan konunca, basil ilaca duyarlı ise ATP üretemez ve ışık oluşmaz (6).

- Polimeraz Zincir Reaksiyonu :

İlk kez 1985'de Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (45). Spesifik DNA veya RNA dizilerinin, bir primer aracılığıyla, invitro enzimatik amplifikasyonu esasına dayanan bir yöntemdir (6,45).

PCR teknolojisinin sağlık sektörüne sağladığı başlıca iki büyük imkan vardır. Bunlardan biri doğum öncesi kalıtsal hastalıkların, diğeri de bulaşıcı hastalıklar olarak tanıdığımız viral ve bakteriyel hastalıkların tanısıdır. Her ikisini de büyük bir hassasiyet ve çabuklukla yapması ve kesin sonuca ulaşması PCR'ın en gözde teknoloji olmasının nedenidir (46,47).

PCR uygulamasına geçilmeden önce; kalıp DNA, komplementer zinciri sentezlemek için primerler , ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz, deoxynucleoside triphosphate (dNTP), Mg⁺⁺iyonları, tampon ve bidistile su gereklidir (48). Isıya

dayanıklı polimerase enzimi, genellikle termofil mikroorganizma olan *Thermus aquaticus* veya *Thermus thermophilus* bakterisinden elde edilir. Bu enzimler 95-100°C sıcaklığa dayanabilmekte ve enzim aktivitesi 70-72°C'de optimum olmaktadır. Test ortamına yeterli miktarda bir kez ilave edildiklerinde 25-30 siklus boyunca aktivite gösterebilmektedirler (49).

Hedef DNA parçasının amplifikasyonu, thermocycler adı verilen, ısıyı süratle yükseltip alçaltabilen ve istenen sayıda döngüye programlanabilen bir araç tarafından sağlanır. Materyaldeki çoğaltılması istenen DNA parçası tutulur ve üç değişik ısıya belli süreler otomatik olarak ayarlanır (6,50).

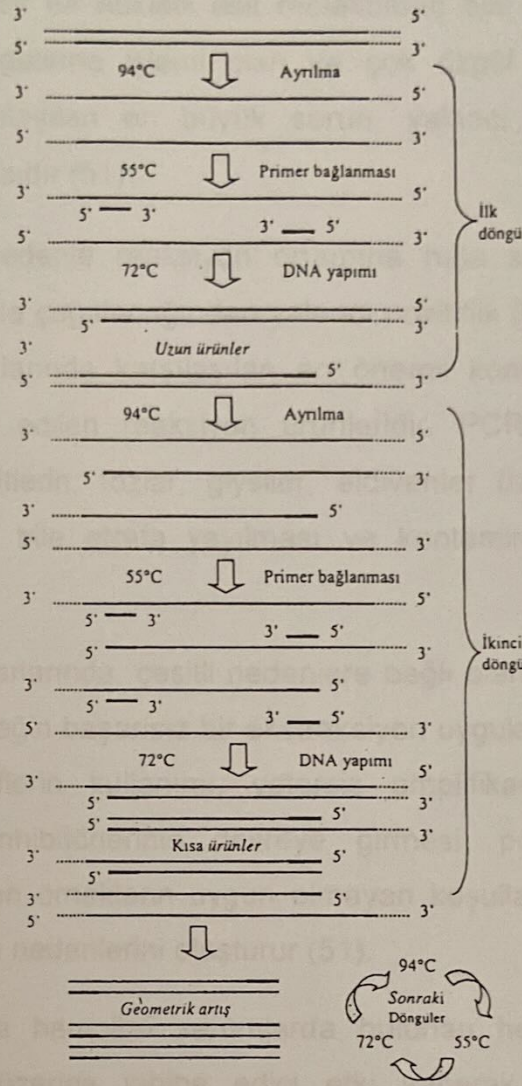
Thermocycler cihazında PCR üç aşamada gerçekleştirilir;

- Denatürasyon Aşaması: DNA molekülünün her iki iplikçigi birbirlerine hidrojen bağları ile tutunmuşlardır. Isının 94°C'ye kadar getirilmesi ile iki iplikçigin birbirinden ayrılması sağlanır.

- Birleşme Aşaması: Ortamdaki DNA polimerazın DNA'ya bağlanıp replikasyonu başlatabilmesi için primer adı verilen bir oligonükleotide gereksinim duyar. Ortama konulmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA dizisini özgül olarak tanıyan iki primer, sıcaklığın 55-70°C'ye düşürülmesiyle, birbirinden ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA tek zincirine bağlanır.

- Zincirin Uzatılması Aşaması: Isının 72°C'ye yükseltilmesi ile ortamdaki Taq polimeraz enzimi, uygun bölgelere bağlı primerden hareketle ve yine ortama ilave edilmiş dNTP kullanarak, yeni ve komplementer zincir sentezini gerçekleştirir. Bu sentez 5' uçtan 3' uca doğru ve kalıp görevi yapan ana zincirin her bir bazının karşısına komplementeri olan baz gelerek devam eder. Yeni sentezlenen DNA bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır (6,48,50).

Şekil 1'de polimeraz zincir reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 1: Polimeraz zincir reaksiyonu (50).

PCR'ın "bir siklusu" denilen ve yukarıda özetlenen üç aşamada oluşan bu reaksiyonlar dizisi bir tüp içinde gerçekleşir. Ortalama 30-40 siklus (2-3 saat) sonunda, başlangıçtaki DNA molekülünün sayısını 10^6 kez çoğaltmak mümkün olur. Sonuçta; başlangıçta tek bir adet olan DNA molekülünün sayısı, artık milyonlarla ifade edilen düzeye gelmiş olur (48,50). Çoğaltma işleminden sonra, reaksiyon ürünlerinin incelenmesi aşamasına geçilir. PCR ürünleri agaroz-jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrılarak, DNA'nın varlığı gösterilebilir. Oluşan bantların özgülüğü UV altında değerlendirilir. Bantların özgülüklerini incelemek amacıyla Southern-Blot tekniği kullanılır. Bu tekniğe göre, nitrosellüloz tabakalara aktarılan bantlar, hibridizasyon yöntemiyle incelenir (48).

Teorik olarak tek bir nükleik asit molekülünü bile çoğaltarak, milyonlarla ifade edilen düzeye getirme işlemi olan ve çok özgül olması gereken PCR uygulamalarında karşılaşılan en büyük sorun, yalancı pozitiflik ve negatiflik olasılıklarının bulunmasıdır (51).

Herhangi bir nedenle reaksiyon ortamına hata sonucu girecek tek bir molekül nükleik asit bile çoğalacağından yalancı pozitiflik (kontaminasyon) nedeni olabilir. PCR çalışmalarında karşılaşılan en önemli kontaminasyon nedeni bir önceki işlemde elde edilen reaksiyon ürünleridir. PCR ile sayıları bu denli çoğaltılan nükleik asitlerin; tozlar, giysiler, eldivenler üzerinden hatta aerosol damlacıkları şeklinde bile etrafa yayılması ve kontaminasyona sebep olması mümkündür (51).

PCR laboratuvarlarında, çeşitli nedenlere bağlı olarak, yalancı negatiflik ile de karşılaşılabilir; örneğin başarısız bir ekstraksiyon uygulanması, uygun olmayan tampon veya reaktiflerin kullanımı, yetersiz amplifikasyon, reaksiyonun bir aşamasında PCR inhibitörlerinin devreye girmesi, primer seçicinin uygun olmaması, RNA içeren örneklerin uygun olmayan koşullarda saklanması belli başlı yalancı negatiflik nedenlerini oluşturur (51).

Tam kan veya hemolizli serumlarda bulunan heme, amplifikasyonda kullanılan enzimler üzerine inhibe edici etki yaparak, hatalı negatif sonuç alınmasına yol açmaktadır. Plazma ile çalışılacak ise antikoagülan olarak, heparin yerine EDTA veya asit sitrat dekstroz tercih edilmelidir (51).

Yöntemin güvenilirliğinin sağlanabilmesi için örneklerle birlikte mutlaka bir negatif ve bir pozitif kontrol de çalışılmalıdır (50).

Çoğaltma işlemi her ne kadar siklus sayısı ile doğru orantılı ise de, bazı durumlarda siklus sayısını bir yerden sonra arttırmak, duyarlılığı aynı oranda arttırmamakta ve hatalı sonuçlar elde edilmektedir. Bu tip durumlarda nested PCR (nPCR) şeklinde tanımlanan ve kısaca iki aşamalı PCR dediğimiz yöntem uygulanır. Bu yöntemde ilk olarak daha uzun olan outer primerler ile amplifikasyon yapılmaktadır (30 döngü). Daha sonra ise ilk amplifikasyon tüpünden alınan örnek

GEREÇ VE YÖNTEM

Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahi Merkezine Şubat 2001- Eylül 2001 tarihleri arasında başvuran, daha önceden hiç antitüberküloz tedavi almamış, yeni vaka, yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan ve çalışmaya dahil edilmek için sözlü onayı alınan 40 hasta ile hiçbir hastalığı olmayan ve daha önceden tüberküloz geçirmeyen 20 vakadan oluşan kontrol grubu alındı.

Çalışmaya alınma kriterleri;

- En az iki balgam ARB teksifinin pozitif olması
- HIV –seronegatif olma
- Daha önceden hiç tüberküloz tedavisi almamış olma
- Plevra, mediastinal veya ekstra pulmoner tutulumun olmaması
- Olguların sözlü onayının olması

Kanser ve böbrek yetmezliği olan hastalar, 18 yaşından küçükler, gebeler, ekstrapulmoner tüberkülozu olanlar, steroid veya immünsupresif herhangi bir tedavi alan hastalar çalışmaya alınmadı.

Tüm olgulardan 5ml'lik periferik kan örneği EDTA'lı tüpe alınarak, aynı gün içerisinde Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Araştırma ve Referans Laboratuvarına gönderilerek, PCR yöntemiyle *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sı araştırıldı.

Hastaların; yaş, cinsiyet, semptom süresi, beyaz küre, sedimantasyon ve albümin değerleri ile balgam ARB teksif sonuçları kaydedildi. Alkol alımı, ek hastalık ve ilaç kullanımı sorgulandı. PA akciğer grafisi, hastalığın radyolojik olarak yaygınlığını değerlendirmek amacıyla incelendi. Akciğer grafisinde, total kavite çapı ≥ 15 cm ise ve / veya akciğer sahasının ≥ 75 'ini kapsayan infiltrasyonu varsa yaygın; değilse sınırlı olarak değerlendirildi (54).

Hastaların boy ve kiloları ölçülüp, ağırlık(kg) / boy(metre)² formülünden, body-mass indeksi (BMI) bulundu ve yaşa göre uygun BMI değerleriyle karşılaştırılarak düşük, normal ve yüksek olarak değerlendirildi (55).

PCR yönteminin duyarlılığı, seçiciliği ve doğruluk oranı hesaplandı. Kandaki PCR sonuçları ile hastaların yaş ve cinsiyeti, hastalığın radyolojik olarak yaygınlığı, kavite varlığı, balgam ARB teksif pozitifliğinin derecesi (en yüksek ARB teksif pozitif değeri), BMI, semptom süresi, albümin değeri, alkol kullanımı ve ek hastalık varlığı arasındaki ilişki değerlendirildi.

Kandan DNA'nın İzolasyonu:

5 mililitre (mlt) EDTA'lı kan üzerine 35 mlt steril bidistile su ilave edildi. 10 saniye alt üst yaparak karıştırıldı. Ardından 2mlt 3.08M NaCl (17.99gr NaCl, 82.01mlt distile suda eritilip 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlanır) katılıp karıştırıldı. 10 dakika boyunca 1200 devir/dakika (rpm) sentrifüj edildi ve süpernatant (üstteki sıvı) atıldı. Pelet (dipteki sediment) üzerine 50mlt'ye kadar fosfat buffer salin (PBS) ilave edildi; sonra 2000 rpm'de 12 dakika sentrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra tekrar 50mlt'ye kadar PBS ilave edildi ve 12 dakika 2000 rpm'de sentrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 0.5mlt 1xTris EDTA sediment ile karıştırıldı. Sonra toplam hacim 1.5mlt olacak şekilde Triton tris buffer ilave edildi ve eppendorf tüpe aktarıldı. Ardından 5 dakika 13000 rpm'de sentrifüj edildi. Üstte kalan kısım atılıp, pelet tekrar triton tris buffer ile yıkandı. Sonra pelet steril bidistile su içerisinde 20-50 µlt olacak şekilde çözüldü ve 15 dakika 100°C'de kaynatıldı (56).

PCR amplifikasyonu:

Reaksiyon bileşenleri:

- 10 µlt kalıp DNA
- 2 µlt 5mM INS1 primeri (5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3') (57)
- 2 µlt 5mM INS2 primeri (5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3') (57)
- 4 µlt 25mM MgCl₂
- 15 µlt 10 x Master Amp. Enhancer[®] (Epicentre Technologies Corporation, Wisconsin)
- 4 µlt dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dUTP herbiri 20mM)
- 0.5 µlt Tfl DNA polimeraz[®] [final konsantrasyon 0.5Ü] (Epicentre Technologies Corporation, Wisconsin)
- 12.5 µlt steril bidistile saf su

olacak şekilde PCR tüpüne konuldu ve termocycler (57) (Mastercycler gradient®, eppendorf AG 22331, Hamburg) cihazına yerleştirildi. Cihaz üstten ısıtmalı ve kapaklı olduğundan buharlaşmayı engellemektedir. Bu nedenle tüplere buharlaşmayı önleyen mineral yağ konulmadı. Böylece mineral yağ ile kontaminasyon riski de azalmış oldu. Tüpler termocycler cihazına yerleştirildikten sonra çoğaltım işlemine geçildi.

DNA çoğaltımı;

- Denatürasyon için 94°C'de 1.5 dakika,
- Hibridizasyon için 65°C'de 2 dakika
- Sentez için 72°C'de 3 dakika olmak üzere; 30 döngü halinde gerçekleştirildi (57).

Tüpler oda ısısına getirildikten sonra çoğaltım işlemi ürünleri agaroz jel elektroforeze tabi tutuldu.

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde değerlendirilmesi:

4gr agaroz, 200mlt 1xTBE ile 500mlt'lik erlen mayer içerisinde karıştırıldı. Su banyosu içine konup, 100°C'de 20-30 dakika kaynatıldı; sonra 60°C'lik su banyosu içine bırakılıp soğutuldu. Final konsantrasyon 0.5µgr/mlt olacak şekilde etidyum bromid ilave edildi ve kasetler içine dökülüp, taraklar yerleştirildi. 30-60 dakika sonra taraklar çıkarıldı. 0.5xTBE içinde elektroforez cihazına yerleştirildi. 30µlt PCR son ürünü ile 6µlt blue/orange 6x loading dye® (Promega, USA) karıştırılıp, agaroz jel üzerindeki godelere yerleştirildi. 110 volt'luk sabit akım altında 45-60 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Sonra UV translüminatör altında, özel poloroid kamera ile fotoğraf çekilerek demonstre edildi (57).

PCR çalışmasında negatif kontrol için steril bidistile su; pozitif kontrol için M.Tuberculosis H37Ra kökeni kullanıldı.

Kullanılan Tamponlar:

Tris borat tampon (5x TBE): 54 gr Tris baz

27.5gr borik asit

20mlt 0.5M EDTA(pH:8.0)

Tris EDTA (pH:8.0) : 10mM tris hidroklorür (pH:8.0)

1mM EDTA (pH:8.0)

Triton tris buffer: 99mlt 20mM tris-HCL (pH:8.3)

1mlt tritonx100

Fosfat buffer salin (PBS): 8gr NaCl + 0.2gr KCl + 1.44gr Na₂HPO₄ + 0.24gr KH₂PO₄ karışımı 800mlt distile su içinde çözülür ve pH:7.4 olacak şekilde HCl ile muamele edilir. 1lt'ye kadar H₂O ilave edilir. 121°C'de 20 dakika otoklavlanır.

İstatistiksel Yöntem:

İstatistiksel değerlendirmeler Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc.) yazılımı ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için $p < 0,05$ (çift yönlü) alınmıştır.

PCR'ın tanı testi olarak başarısının değerlendirilmesinde İşlem Karakteristiği Eğrisi (Receiver operating characteristics curve ROC) yöntemi ve çapraz tablolara ait standart formüller kullanılmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmalarında Ki-kare ve Mann Whitney U testleri, PCR sonuçları ile çeşitli faktörler arasında korelasyon araştırılmasında Spearman korelasyon testi kullanılmıştır.

Grafiksel gösterimlerde Box-Whisker plot ve ROC kullanılmıştır.

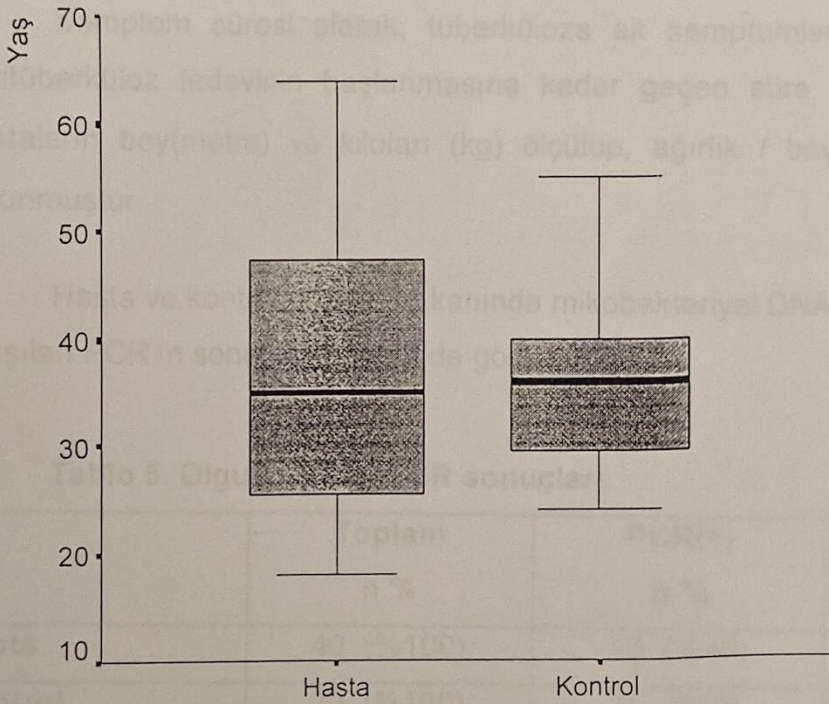
BULGULAR

Bu çalışmaya; balgam ARB teksifi pozitif olan 40 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Tüm olguların yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımları.

Olgular	n	Yaş (yıl)	Cinsiyet
		Ort $\pm$ Std.Sapma (Min-Max)	Erkek/Kadın n (%)
Hasta	40	37.78 $\pm$ 14.11(18-64)	33 / 7 (82.5 / 17.5)
Kontrol	20	35.60 $\pm$ 7.27 (24-55)	13 / 7 (65 / 35)

Olguların yaş dağılımları Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. Olguların yaş dağılımları.

Yaş ve cinsiyet dağılımı açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Akciğer tüberkülozu olan olgularımızın semptom süresi, BMI ve laboratuvar özellikleri tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Akciğer tüberkülozu olan olguların semptom süresi, BMI ve laboratuvar özellikleri.

	Ortalama	Std. Sapma	Minimum	Maksimum
Semptom süresi (gün)	91,87	75,50	10	360
BMI	20,0865	2,6623	16,35	29,75
Beyaz küre sayısı	10610,00	4376,38	4800	28200
Sedimentasyon hızı (mm/saat)	63.35	26.88	10	110
Albumin (gr/dl)	3.577	0.484	2.4	4.7

Semptom süresi olarak, tüberküloza ait semptomlarının başlamasından antitüberküloz tedavinin başlanmasına kadar geçen süre alınmıştır. BMI için; hastaların boy(metre) ve kiloları (kg) ölçülüp, $\text{ağırlık} / \text{boy}^2$ formülünden BMI bulunmuştur.

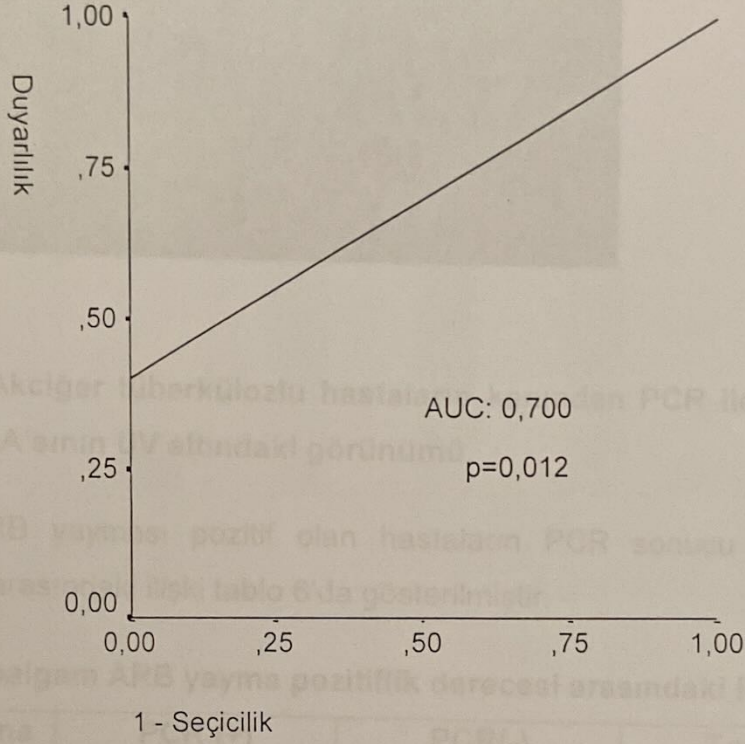
Hasta ve kontrol grubunun kanında mikobakteriyal DNA'yı araştırmak üzere çalışılan PCR'ın sonuçları tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Olguların kan PCR sonuçları.

	Toplam n %	PCR(+) n %	PCR(-) n %
Hasta	40 (%100)	16 (%40)	24 (%60)
Kontrol	20 (%100)	0 (%0)	20 (%100)
Toplam	60 (%100)	16 (%26.7)	44 (%73.3)

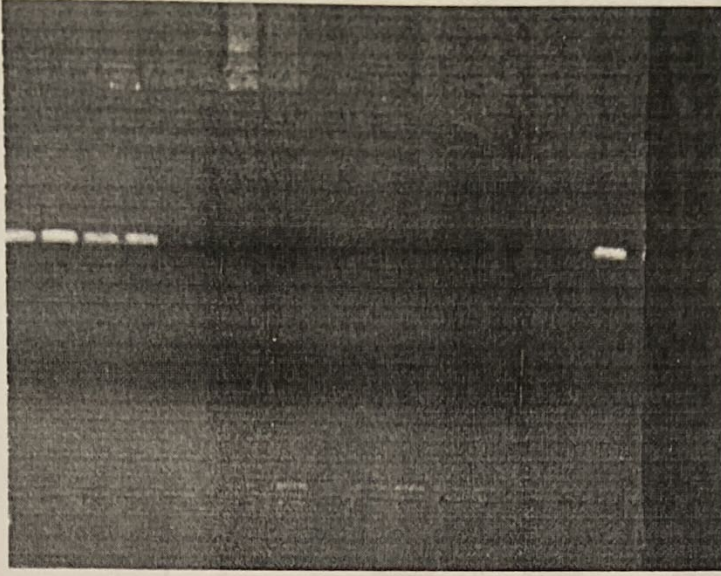
Buna göre; kanda, PCR'ın, balgam ARB yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan hastalarda duyarlılığı $16/40=\%40$ ve seçiciliği $20/20=\%100$ dür. Doğruluk oranı (accuracy, agreement) $=16+20/60=\%60$ dir.

PCR'in tanı testi olarak başarısının değerlendirilmesinde İşlem karakteristiği eğrisi (Receiver operating characteristics curve ROC) yöntemi kullanılmıştır. ROC eğrisi aynı konuyu araştıran farklı testlerin tanı başarılarının birbirleriyle karşılaştırılmasını sağlar. Eğrinin altındaki alan ne kadar büyükse tanı testi olarak o kadar başarılı olduğunu gösterir. ROC eğrisi Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. PCR'in tanı testi olarak başarısını gösteren işlem karakteristiği eğrisi.

Amplifiye edilen basil DNA'sının agaroz-jel elektroforezindeki görünümü Resim 1'de gösterilmiştir. Basil DNA'ları 1,2,3 ve 4. kuyularda görülmektedir. Negatif pozitif ve kontroller 15. ve 16. kuyudadır. Aradaki kuyularda ise PCR negatiftir.



Resim 1: Akciğer tüberkülozlu hastaların kanından PCR ile amplifiye edilen bakteri DNA'sının UV altındaki görünümü.

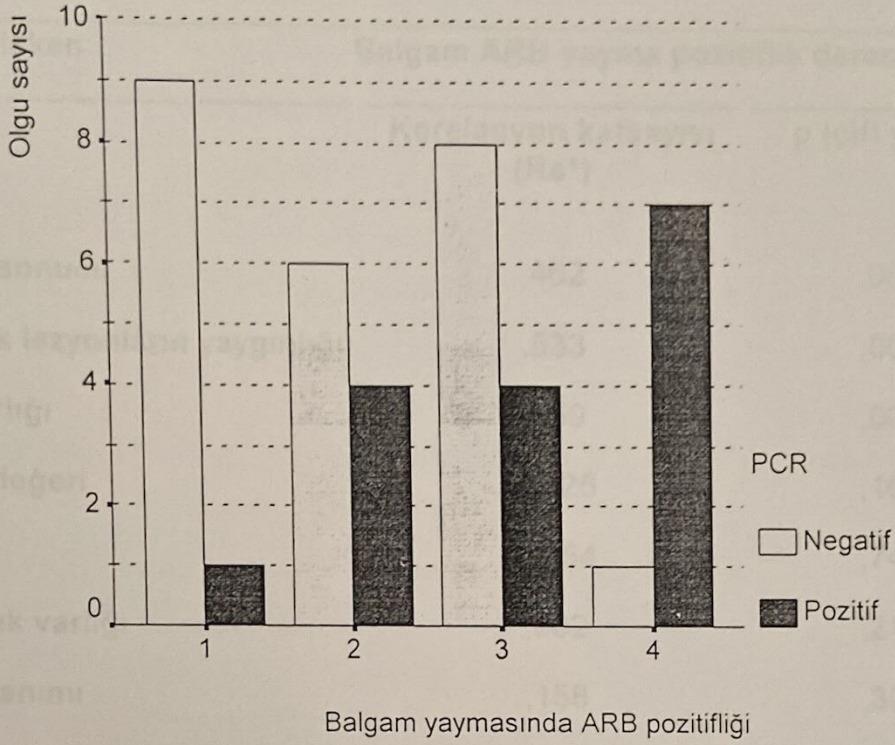
Balgam ARB yayması pozitif olan hastaların PCR sonucu ile yayma pozitiflik derecesi arasındaki ilişki tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. PCR ile balgam ARB yayma pozitiflik derecesi arasındaki ilişki.

Balgam ARB yayma pozitiflik derecesi	PCR (+) n(%)	PCR(-) n(%)	Toplam n%
4+ (++++)	7 (%87,5)	1 (%12,5)	8 (%100)
3+ (+++)	4 (%33,3)	8 (%66,7)	12 (%100)
2+ (++)	4 (%40,0)	6 (%60,0)	10 (%100)
1+ (+)	1 (%10,0)	9 (%90,0)	10 (%100)
Toplam	16 (%40,0)	24 (%60,0)	40 (%100)

Akciğer tüberkülozu olan hastalarda, balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile kan PCR pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0,003).

Hastaların balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile PCR sonucu arasındaki ilişki şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile kan PCR sonucu arasındaki ilişki.

Hastaların balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile PCR sonucu, radyolojik olarak lezyonların yaygınlığı, kavite varlığı, albumin değeri, BMI, ek hastalık varlığı, alkol kullanımı, semptom süresi, cinsiyet ve yaş gibi değişkenler arasındaki ilişki tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile diğer değişkenler arasındaki ilişki.

Değişken	Balgam ARB yayma pozitiflik derecesi	
	Korelasyon katsayısı (Rs*)	p (çift yönlü)
Kan PCR sonucu	,462	,003
Radyolojik lezyonların yaygınlığı	,533	,001
Kavite varlığı	,559	,003
Albumin değeri	-,226	,161
BMI	-,054	,741
Ek hastalık varlığı	,202	,212
Alkol kullanımı	,158	,331
Semptom süresi	,382	,015
Cinsiyet	-,077	,638
Yaş	,128	,431

* Spearman Rho **6 hastada DM, 1 hastada Epilepsi, 1 hastada ASKH

Balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile kan PCR sonucu, radyolojik olarak lezyonların yaygınlığı, kavite varlığı ve semptom süresi arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ancak balgam ARB pozitifliği ile diğer değişkenler arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Hastaların kan PCR sonucu ile ek hastalık varlığı arasındaki ilişki tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Kan PCR sonucu ile ek hastalık varlığı arasındaki ilişki.

Ek hastalık	Toplam n(%)	PCR (+) n(%)	PCR(-) n(%)
Var	8 (%100)	5 (%62,5)	3 (%37,5)
Yok	32 (%100)	11 (%34,4)	21 (%65,6)
Toplam	40 (%100)	16 (%40,0)	24 (%60,0)

Kan PCR sonucu ile ek hastalık varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p: 0,154).

Hastaların kan PCR sonucu ile alkol kullanımı arasındaki ilişki tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Kan PCR sonucu ile alkol kullanımı arasındaki ilişki.

Alkol kullanımı	Toplam n(%)	PCR (+) n(%)	PCR(-) n(%)
Var	13 (%100)	8 (%61,5)	5 (%38,5)
Yok	27 (%100)	8 (%29,6)	19 (%70,4)
Toplam	40 (%100)	16 (%40,0)	24 (%60,0)

Kan PCR sonucu ile alkol kullanımı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,56).

Kan PCR sonucu ile BMI arasındaki ilişki tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Kan PCR sonucu ile BMI arasındaki ilişki.

BMI	Toplam n(%)	PCR (+) n(%)	PCR(-) n(%)
Normal	14 (%100)	5 (%35,7)	9 (%64,3)
Düşük	26 (%100)	11 (%42,3)	15(%57,7)

Kan PCR sonucu ile BMI arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p:0,882).

Kan PCR sonucu ile radyolojik olarak lezyonların yaygınlığı arasındaki ilişki tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Kan PCR sonucu ile radyolojik lezyonların yaygınlığı arasındaki ilişki.

Radyolojik lezyonların yaygınlığı	Toplam n(%)	PCR (+) n(%)	PCR(-) n(%)
Yaygın	12 (%100)	11 (%91,7)	1 (%8,3)
Sınırlı	28 (%100)	5 (%17,9)	23 (%82,1)
Toplam	40 (%100)	16 (%40,0)	24 (%60,0)

Radyolojik olarak yaygın lezyonu olan akciğer tüberkülozlu hastalarda, kan PCR pozitifliği, istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p:0,001).

Hastaların kan PCR sonucu ile akciğer grafisinde kavite varlığı arasındaki ilişki tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. PCR ile kavite varlığı arasındaki ilişki.

Kavite	Toplam n(%)	PCR (+) n(%)	PCR(-) n(%)
Var	18 (%100)	16 (%88,9)	2 (%11,1)
Yok	22 (%100)	0 (%0)	22 (%100)
Toplam	40 (%100)	16 (%40,0)	24 (%60,0)

Akciğer grafisinde kavite varlığı olan hastalarda kan PCR pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p: 0,001).

Yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan hastaların PCR sonucu ile balgam ARB teksif sonucu, radyolojik olarak lezyonların yaygınlığı, kavite varlığı, albumin değeri, BMI, ek hastalık varlığı, alkol kullanımı, semptom süresi, cinsiyet ve yaş gibi değişkenler arasındaki ilişki tablo 13'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Tablo 13. PCR sonucu ile diğer değişkenler arasındaki ilişkiler.

Değişken	PCR	
	Korelasyon katsayısı (Rs*)	p (çift yönlü)
Balgam ARB teksif pozitiflik derecesi	,462	,003
Radyolojik lezyonların yaygınlığı	,690	,001
Kavite varlığı	,903	,001
Albumin değeri	-,261	,104
BMI	-,024	,882
Ek hastalık varlığı**	,230	,154
Alkol kullanımı	,305	,056
Semptom süresi	,270	,092
Cinsiyet	,024	,857
Yaş	,179	,172

* Spearman Rho **6hastada DM,1 hastada Epilepsi, 1 hastada ASKH

Akciğer tüberkülozu olan hastalarda, kan PCR sonucu ile balgam ARB teksif pozitiflik derecesi, radyolojik olarak lezyonların yaygınlığı ve kavite varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak kan PCR sonucu ile diğer değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

TARTIŞMA

Artmış olan tanısal yöntemler ve etkili antibiyotiklerin bulunmasına rağmen; AIDS hastalarının sayısının artması ve tüberküloz ile enfekte bireylerin göç etmesi sonucu, tüberküloz, tüm dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (58). Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda yüz binde 20'den az iken, Hindistan, Bangladeş, Çin gibi ülkelerde yüz binde 100'ün üstünde, hatta 200'ün üstündedir (3). Ülkemizde tüberküloz hastalık insidansı, 1997 yılında Verem Savaş Dispanserlerine kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüz binde 33'tür. Türkiye'nin 1997 yılı nüfusu 62.774.000, yıl içinde yeni tanı konan tüberküloz hastalarının sayısı 20.778'dir (59).

Tüberküloz tedavisine başlamadaki gecikme, *M.tuberculosis*'in başkalarına bulaşmasına neden olduğu gibi, hastalığın ilerlemesine de neden olmaktadır. Bu nedenle erken tanı ve tedavi önemlidir.

Balgamın bakteriyolojik olarak incelenmesi; hem balgamı toplayan, hem de inceleyen personele bulaşma riskinin varlığı ve bazı hastalardan balgam elde edilememesi gibi nedenler, akciğer tüberkülozunun tanısında farklı materyallerin araştırılması gereğini doğurmuştur. Bu nedenle; *M.tuberculosis*'in PCR yöntemiyle hızlı tespit edilmesi, antitüberküloz tedavinin erkenden başlamasına ve temaslıların araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Kocagöz ve ark. balgam örneğinde, kültür ve PCR yöntemini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; mikroskopi, kültür ve PCR yöntemlerindeki duyarlılığı sırasıyla %68, %76 ve %87; özgüllüğü ise %100, %100 ve %96 oranında tespit etmişlerdir (56).

Tüberküloz tanısında kullanılan geleneksel yöntemlerden olan direkt yayma ile asido-rezistan basilin (ARB) saptanmasında, sensitivite düşük olduğu gibi, *M.tuberculosis*'i diğer mikobakterilerden de ayıramaz. Balgamdaki yemek artıkları boya parçacıkları, saprofit aside dirençli bakterilerin kontaminasyonu, bir balgamdan diğerine nakil esnasında bulaşma gibi nedenlerle yanlış pozitif sonuç

alınabilir. Balgam toplanmasında yetersizlikler, balgam örneklerinin ve boyanmış preperatların uygunsuz korunmaları, preperatin veya boyanın uygun olmayışı, muayene ve okuma hataları gibi nedenlerle yanlış negatif sonuçlar da görülebilir (60). Löwenstein- Jensen kültür tekniği ise 8 haftaya kadar varan uzun sürede organizmayı izole etmekte ve tip tayini için daha da uzun zaman gerekmektedir (32).

PCR yönteminin farklı klinik örneklerden *M.tuberculosis* DNA'sını başarıyla tespit ettiğine dair bir çok yayın vardır (61-65). Doku ve vücut sıvılarında düşük yoğunlukta mikroorganizma olsa bile; PCR yöntemiyle, patojenin belirli bir DNA bölgesine uyan bir çift oligonükleotid primerleri kullanılarak amplifikasyon yapılabilir (66).

Geçmişte yapılan hayvan inokülasyon ve kültürleri sonucunda, periferik kanda *M.tuberculosis* varlığı gösterilmiştir. Bu bulgu; yaygın enfeksiyonlarda, bakteriyeminin, tüberkülozun yayılmasında doğal bir yol olduğunu göstermesi açısından önemlidir (12). Ancak; HIV epidemisi yapana kadar, kan kültürleri mikobakteriyal enfeksiyon tanısında, önemli bir tanısal yöntem olarak kabul edilmiyordu. HIV ile enfekte olan tüberkülozlu hastalarda, kan kültürlerinde *M.tuberculosis*'si tespit etme oranının %42'nin üzerinde olduğu raporlanmıştır (67). Kan kültürü sonuçlarının, özellikle immünsüpresyonun derecesi ve tüberkülozun yaygınlığı ile doğru korrelasyon gösterdiği belirtilmektedir (68).

HIV enfeksiyonunun, spesifik olarak CD₄ hücreleri ve makrofajları enfekte etmesi; hücresel immün fonksiyonlarda bozulma ve CD₄ hücrelerinin ve makrofajların azalmasıyla sonuçlanır (28). HIV pozitif tüberküloz hastalarında, özellikle CD4 sayısının azalması sonucunda, akciğerde daha az granülom oluşumu ve daha çok basil yükü olduğu görülmüştür (28). Tüberküloz basilinin sebep olduğu enfeksiyon da başlıca bu iki hücre tarafından kontrol altına alındığından, HIV pozitif kişilerde azalan konak direnci; progresif primer tüberküloz gelişimine, tüberkülozun akciğer dışı organlara hematogen yayılmasına ve önceki enfeksiyonun reaktivasyonuna neden olur (31).

Jones ve ark. yapmış oldukları çalışmada, kan kültürlerinin sadece HIV-pozitif ve CD4 T-lenfosit sayısının $<100/\mu\text{lt}$ olan hastalarda yeteri kadar sensitif olduğunu ve CD4 lenfosit sayısının hematolojik yayımda kritik rol oynadığını belirtmektedirler (69).

HIV-negatif hastalarda ise, kan kültüründe, tüberküloz basilini tespit etme konusundaki bilgiler kısıtlıdır. Bazı çalışmalarda oldukça düşük pozitiflik oranı elde edilmişken, bazı çalışmalarda yüksek pozitiflik oranı raporlanmıştır (11,12,68,70,71).

Kan, balgama göre daha az PCR inhibitör madde içerdiğinden, periferik kan mononükleer hücrelerinden *M.Tuberculosis* DNA'sını tespit etmek, balgama göre daha kolay işlemler gerektirmektedir (10,11). Aynı zamanda kan örneği elde etmek kolaydır.

Bizim çalışmamızda; HIV seronegatif hastalarda, kanda *M.tuberculosis* DNA'sı, PCR yöntemiyle %40 oranında bulunmuştur. Niyaz Ahmed ve ark. akciğer tüberkülozu olan HIV seronegatif immünkompetan 16 hastada, PCR ile kanda 7 hastadan (%43.75), *M.tuberculosis* DNA'sını izole etmişler. Çalışmaya aldıkları hastalar 2 hafta boyunca antitüberküloz tedavi almış olan hastalardır. Tedavi başlanmadan kan örneği alınarak basil DNA'sı araştırılmış olsaydı, çalışmanın sensitivitesinin daha da yüksek olabileceğini belirtmektedirler. Bizim çalışmamız daha geniş bir hasta popülasyonundan oluşmaktadır ve tüm hastalardan tedavi başlanmadan önce kan alınarak PCR tekniği ile basil DNA'sı araştırılmıştır. Buna rağmen bizim çalışmamızda sensitivite benzer oranda bulunmuştur (70). Condos ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada kan PCR sonucu pozitif olan 15 hastanın, tedaviden 1 ay sonra bakılan kan PCR sonuçları da pozitif iken, 4. ayda bu 15 hastanın 13'ünün kan PCR sonucunun negatifleştiği görülmüştür (11). Bu bize antitüberküloz tedavinin erken dönemde PCR'ın sensitivitesini çok fazla etkilemeyeceğini düşündürmektedir.

Folgueira ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada ise; HIV pozitif hastaların %82'sinde, HIV negatif hastaların ise %33'ünde PCR'ı pozitif bulmuşlardır

($p<0.01$). Dissemine tüberküloz tespit ettikleri hastaların tümünde PCR pozitif iken, ekstrapulmoner tüberkülozu olan hastalardan, HIV pozitif olanların %100'ünde (3 hastada), HIV negatif olanların %27'sinde (11 hastanın 3'ünde) PCR pozitif bulunmuştur. Özellikle HIV ile enfekte hastalarda, kandan direkt *M.tuberculosis* amplifikasyonunun hızlı tanı koymada önemli olduğunu ve HIV negatif hastalarda da eskiden düşünüldüğünden daha fazla hematogen yayılım varlığını gösterdiğini belirtmektedirler. Periferik kan mononükleer hücrelerinde *M.tuberculosis* DNA'sının özellikle HIV pozitif olan hastalarda, dissemine ve ekstrapulmoner tüberküloz formunda, hızlı tanıda yararlı bir yöntem olabileceği sonucuna varmışlardır (12). Çünkü dissemine tüberküloz gelişimi, primer pulmoner enfeksiyonu takiben meydana gelen basilemi sonucunda, multiple organda progresif hastalık gelişimine sebep olabilir. Primer enfeksiyondan yıllar sonra reaktivasyon tüberkülozu formunda da gelişebilir. Bu durum ateğe olan akciğerden veya diğer lezyonlardan kan dolaşımına çok miktarda basil geçişi ile olabilir. Diğer bir olasılık, bir çok bölgede eş zamanlı reaktivasyon olmasıdır. Bu durum immünitedeki ani düşme sonucunda primer basilemi sırasında nadiren görülebilir. Dissemine hastalık için risk faktörleri; AIDS, alkol alımı, steroid kullanımı, gebelik veya postpartum dönem, kanser, böbrek yetmezliği, organ transplantasyonudur (27). Çalışmamıza, ekstrapulmoner, miliyer veya dissemine tüberküloz formu olan hastalar dahil edilmemiştir. Kanda, PCR ile %40 oranında *M.tuberculosis* DNA'sını saptadığımız çalışmamızda, hastalığı akciğerde sınırlı kalan, HIV negatif tüberküloz hastalarında kana basil geçişinin olduğunu gösterdik.

Schluger ve ark. ise akciğer tüberkülozu olan 8 hastada yapmış oldukları çalışmada; tüm hastalarda, kanda, PCR ile tüberküloz basil DNA'sını pozitif bulmuşlardır. Çalışmadaki hasta sayısı azdır ve hastaların 6'sı HIV-pozitiftir (72). Condos ve ark.'nın çalışmasında; 41 aktif akciğer tüberkülozlu hastanın, 39'unda (%95) PCR pozitif sonuç vermiştir. Hastaların %43'ü HIV pozitifken, %40'ı negatif ve %17'sininki bilinmemektedir. Çalışmalarında pozitif PCR sonuçlarının, hastalarının HIV durumundan etkilenmediğini belirtmektedirler (11). Bizim çalışmamızda tüm hastalar HIV negatiftir; ancak Condos ve ark. ile Schluger ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmalarda kadar yüksek oranda kan PCR pozitifliği bulamadık. Bu durum, Figueira ve ark.'nın da belirttiği gibi özellikle HIV ile enfekte

tüberküloz hastalarında hematojen yayılımın daha fazla olduğunu desteklemekte ve CD4 lenfosit sayısının hematolojik yayılımda önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Del Prete ve ark. akciğer tüberkülozu olan hastalarda, kanda PCR ve non-izotopik hibridizasyon yöntemiyle *M.tuberculosis* DNA'sını tespit etmek amacıyla çalışma yapmışlar ve 30 hastanın 26'sında (%87) kanda dolaşan mikobakteriyal DNA, PCR'ı takiben hibridizasyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların 10'unda immünsüpresif hastalık varken, 20'si immünkompetandır. Sonuçta hastalar immünsüprese olsun ya da olmasın basillerin alveoler boşluktan kana geçtiğini belirtmektedirler (10).

Tüberküloz basilinin immünkompetan hastalarda kana nasıl geçtiği ya da akciğer tüberkülozu olan tüm hastalarda neden kanda basil DNA'sının gösterilemediği henüz tartışma konusudur. Bazı olasılıklar üzerinde durulmaktadır. Bunlar; basilin, primer enfeksiyon bölgesinden lenfatikler yolu ile hiler lenf nodlarına taşınıp, mediastinal lenfatiklerle, ductus torasikusa ve sol subklavian ven yolu ile sağ kalbe ve akciğerlere gitmesi veya primer lezyona komşu küçük damarlara basilin invazyonuyla vücudun değişik bölgelerine yayılım olmasıdır. Bir diğer olasılık ise inflamatuvar bölgeye göç eden monosit-makrofaj veya polimorf nüveli fagositlerin, mikobakteriyi fagosit ederek tekrar kan dolaşımına dönmeleri sonucu hematojen yayılımın olabileceğidir (23).

Biz çalışmamızda özellikle balgam ARB teksif pozitiflik derecesi yüksek olan hastalarda, kan PCR sonucunu pozitif bulduk ($p<0.05$). Hastaların basil yükü ne kadar çok fazla ise, alveolar boşluktan kana basilin geçişinin de o kadar çok olabileceğini düşündürmektedir.

Hastaların akciğer lezyonlarını radyolojik olarak değerlendirdiğimizde, lezyonları yaygın olan tüberküloz hastalarında, kan PCR pozitifliğini daha yüksek oranda saptadık. Hastalarımızın hiçbirisinde ekstrapulmoner tüberküloz yoktu. Ancak hastalık daha yaygın olduğunda, yani radyolojik olarak daha geniş akciğer sahası tutulduğunda, basilin kana geçişinin daha kolay olabileceğini

düşündürmektedir. Bunun sebebi belki de yaygın hastalık ile beraber, basil yükünün de daha fazla olması ve alveollerde hücresel immün mekanizma tarafından enfeksiyon yayılımının kontrol altına alınamaması ile basillerin hematojen yayılım göstermesidir.

Biz kaviteli lezyonu olan hastalarda, kan PCR sonucunu daha yüksek oranda pozitif bulduk. Kavite oluşumunun; organizmanın enfeksiyonu sınırlandırma çabası sonucu olduğunu düşünürsek, basillerin kaviteli hastalarda, kana daha az oranda geçmiş olmasını beklerdik. Ancak bizim çalışmamızda kaviteli lezyonu olan hastaların çoğunda aynı zamanda akciğer grafisinde yaygın parankimal infiltrasyonun da olduğunu gördük. Bu durum daha önce de belirttiğimiz gibi yaygın hastalığa bağlı olarak, immün mekanizma tarafından enfeksiyonun kontrol altına alınamaması ve basillerin daha çok hematojan yayılım göstermiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda yaş ve cinsiyet ile kan PCR pozitiflik oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Diabetes mellitus ve alkol kullanımı gibi immün sistemi dolaylı olarak etkileyebilecek durumlar ile kan PCR pozitifliği karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Çalışmaya aldığımız hastalarda body-mass indekslerine baktığımızda, %65 hastanın yaşlarına göre olması gereken body-mass indeksinden daha düşük değere sahip olduğu saptandı. Düşük body-mass indeksine sahip malnütrisyonlu hastalarda, immünolojik fonksiyonlarda meydana gelen değişiklik sonucunda, tüberküloz riskinde artış olabileceği belirtilmektedir (73). Malnütrisyonunda hücresel immünite, fagosit fonksiyonu, kompleman sistemi, sekretuar IgA, antikor ve sitokin üretimi belirgin olarak bozulur. Kan lenfosit sayısı düşer, T helper/ T supresör hücre oranı azalır (74). Karaciğer ve böbrek hastalığı olmayan hastalarda albümin değeri beslenme durumunu yansıtabilir. Kötü nütrisyonel durumu yansıtan düşük body-mass indeksi ve hipoalbüminemi varlığı HIV seronegatif hastalarda CD₄ T lenfosit azalmasına yol açarak, tüberküloz gelişimine ve basilin hematojen yayılımına neden olabilir (75). Ancak BMI ve albümin değerleri ile kan PCR sonuçlarını karşılaştırdık ve arada istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamadık.

Çalışmamızda, hastaların akciğer tüberkülozuna ait semptomlarının başlaması ile tedavi başlangıcı arasında geçen süreye baktığımızda, ortalama semptom süresinin 91.87gün (10-360) gibi yüksek değerde olduğunu gördük. Semptom süresinin uzun olması, hastalığın daha da yaygınlaşarak, hem immünite hem de nütrisyonel durumda bozulma yaparak kana daha yüksek oranda basil geçmesine sebep olabilir. Ancak karşılaştırma yaptığımızda semptom süresi ile kan PCR sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık.

Biz çalışmamızda, amplifiye ettiğimiz basil DNA'sını, agaroz-jel elektroforez yöntemini kullanarak gösterdik. Nolte ve ark. yaptıkları çalışmada sadece jel analizi ile PCR'da %85 duyarlılık ve %97 özgüllük saptamışlardır. Bu aşamadan sonra hibridizasyon yaptıkları zaman duyarlılık %91, özgüllükte ise %100'e ulaşmışlardır (76). Kolorimetrik hibridizasyon yönteminin sensitivitesi, agaroz-jel elektroforezine göre 5-10 kat daha yüksektir (10).

Bazı çalışmalarda farklı primerler kullanılarak, farklı moleküler ağırlıktaki bantlar elde edilmiştir (10,12,70). Kullanılan primerlerin hedef DNA ile her zaman homolog olmaması yalancı negatifliğe neden olabilir. Biz çalışmamızda;

INS1 5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'

INS2 5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'

primerlerini (57) kullandık. Amacımız *M.tuberculosis*'in ortaya çıkarılması için IS986 dizgesinde 245 baz çiftlik DNA'nın amplifiye edilmesi idi. Çalışmamızda duyarlılığı % 40 , seçiciliği%100 bulduk. İki primer yerine dört primer (nested PCR) kullanıldığında testin duyarlılığı daha da artmaktadır (65). Schluger ve ark. çalışmalarında dört primer kullanmışlar ve çalışmaya aldıkları 8 hastanın tümünde de kanda, basil DNA'sını amplifiye etmişlerdir (72). Miyazaki ve ark çalışmalarında değişik klinik örneklerde, yine nested PCR yöntemini kullanarak %97 duyarlılık ve %92 özgüllük ile *M.tuberculosis* DNA'sını amplifiye etmişler (65). Bu sonuçlar bize nested PCR'ın kullanılmasının duyarlılığı arttırdığını göstermektedir.

PCR çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, bir önceki işlemde elde edilen reaksiyon ürünlerinden kontaminasyondur. PCR ile sayıları bu

denli çoğaltılan nükleik asitlerin; tozlar, giysiler, eldivenler üzerinden hatta aerosol damlacıkları şeklinde bile etrafa yayılması ve kontaminasyona sebep olması mümkündür (51). Biz çalışmamızda kontaminasyonu engellemek amacıyla, örneklerin kabul edildiği ve işlendiği, çözeltilerin hazırlandığı, amplifikasyon ve sonuç gözleme odası şeklinde dört ayrı odada çalıştık. Her çalışma serisi için pozitif ve negatif kontroller kullandık. Pipet uçları, distile su ve tamponları otoklavda steril ederek kullandık ve her işlem için ayrı pipet, eldiven v.b. kullandık. Negatif kontrollerimiz, negatif sonuç verdi. Ayrıca sağlıklı kontrol grubumuzda da tüm sonuçlar negatif bulundu. Bu örneklerin hazırlanması sırasında kros-kontaminasyon olmadığını desteklemektedir.

PCR laboratuvarlarında, çeşitli nedenlere bağlı olarak, yalancı negatiflik ile de karşılaşılabilir. Örneğin başarısız bir ekstraksiyon uygulanması, uygun olmayan tampon veya reaktiflerin kullanımı, yetersiz amplifikasyon, reaksiyonun bir aşamasında PCR inhibitörlerinin devreye girmesi, primer seçicinin uygun olmaması belli başlı yalancı negatiflik nedenlerini oluşturur (51). Yöntemin güvenilirliğinin sağlanabilmesi için örneklerle birlikte mutlaka bir negatif ve bir pozitif kontrol de çalışılmalıdır (50).

Sonuçta; HIV seronegatif pulmoner tüberkülozu olan hastalarda, PCR ile kanda, *M.tuberculosis* DNA'sının saptanabildiğini gösteren bu çalışma, daha önceden bu hastalarda gözardı edilen hematogen yayılımın önemli olduğu gerçeğini ve bu hastalarda tüberküloz tanısında kanın, uygun bir materyal olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak PCR çalışmalarında henüz evrensel bir standardizasyon sağlanamamış olması sorun yaratmaktadır. Devam eden çalışmalar sonucunda, bu testin rutin kullanımdaki yeri daha iyi tayin edilecektir

ÖZET

HIV ile enfekte ve dissemine veya ekstrapulmoner tüberkülozu olan hastalarda hematojen yayılım olduğu ve kandan, direkt *M.tuberculosis* amplifikasyonunun hızlı tanı koymada önemli olduğu bilinmektedir. HIV seronegatif ve akciğerde sınırlı tüberkülozu olan hastalarda ise eskiden düşünüldüğünden daha fazla hematojen yayılım olduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda yeni vaka yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan HIV-seronegatif erişkin hastalarda, periferik kanda, *M.tuberculosis* basilini PCR tekniği ile araştırarak; PCR'in duyarlılık ve özgüllüğünü belirledik. PCR pozitifliği ile hastalığın radyolojik olarak yaygınlığı, kavite varlığı, body-mass indeksi, albümin değeri, semptom süresi, ek hastalık varlığı ve hastaların karakteristik özellikleri ile arasındaki ilişkiyi inceledik.

Bu amaçla Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahi Merkezine Şubat 2001- Eylül 2001 tarihleri arasında başvuran, daha önceden hiç antitüberküloz tedavi almamış, yeni vaka, yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan 40 hasta ile hiçbir hastalığı olmayan ve daha önceden tüberküloz geçirmeyen 20 vakadan oluşan kontrol grubu alındı. Tüm olgulardan periferik kan örneği alınarak, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Araştırma ve Referans Laboratuvarında PCR yöntemiyle *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sı araştırıldı.

Balgam ARB yayma pozitif akciğer tüberkülozu olan hastalarda, kanda, PCR yönteminin duyarlılığı %40, seçiciliği %100 ve doğruluk oranı %60 bulundu.

Balgam ARB yayma pozitiflik derecesi ile kan PCR pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p:0,003$). Akciğer grafisinde yaygın lezyonu olan veya kavitesi olan hastalarda kan PCR pozitifliğinin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p: 0,001$). Ancak kan PCR sonucu ile albümin değeri, body-mass indeksi, ek hastalık varlığı, alkol kullanımı, semptom süresi, yaş ve cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Sonuçta; HIV-seronegatif pulmoner tüberkülozu olan hastaların %40'ında PCR ile kanda, *M.tuberculosis* DNA'sını saptayarak bu hastalarda gözardı edilen hematogen yayılımın önemli olduğunu ve akciğer tüberkülozu tanısında kanın, uygun bir materyal olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Devam eden çalışmalar sonucunda PCR yöntemiyle ilgili bir standardizasyon sağlanması ile bu testin rutin kullanımdaki yerinin daha iyi tayin edileceğine inanıyoruz.

- 2- Ciftci S, Nispet M, Miler E (Çevreler Kopyası E. Çağ 2) Tüberküloz, HIV ve AIDS in Klinik Tüberküloz, İstanbul: Yedigöller Yayınları 2005: 137-40.
- 3- World Health Organization, 7th Annual Report on Global Tuberculosis Control, Geneva, 2006.
- 4- Maher D, Chuang P, Sotgiu S et al. Treatment of Tuberculosis. Guidelines for National Programmes, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 1997: 15-7.
- 5- Çelikk M. Tüberküloz epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 1994; 14(5): 391-403.
- 6- Özdemir G. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 1994; 14(5): 420-4.
- 7- Anderson AB, Thilo S, Faussett PG et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 12: 922-7.
- 8- Kim TCH, Blackman R3, Kim T et al. Acid-fast bacilli in sputum smears of patient with pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1994; 129: 204-5.
- 9- Medical Research Council Tuberculosis and Chest Disease Unit. Treatment of pulmonary tuberculosis in patients notified in England and Wales in 1975-8: chemotherapy and hospital admission. Thorax 1985; 40: 113-20.
- 10- Del Prete R, Macci A, Delaghi M et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in blood of patients with active pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction and non-isotopic hybridization assay. J Med Microbiol 1997; 45: 405-9.
- 11- Gordin R, McCune A, Ross JN et al. Peripheral blood-based PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with active pulmonary tuberculosis. Lancet 1995; 347: 1562-5.

KAYNAKLAR

- 1-Styblo K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. Rev Infect Dis 1989; 11 (Supl 2): 339-46.
- 2- Crafton SJ, Horne N, Miller I. (Çevirenler: Koçyiğit E, Dağlı E). Tüberküloz, HIV ve AIDS. İn: Klinik Tüberküloz. İstanbul, Yüce Yayınları AŞ. 1995;137-40.
- 3- World Health Organisation: Fifth Annual Report on Global Tuberculosis Control, Geneva. 2000.
- 4- Maher D, Chaulet P, Spinaci S et al. Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes. 2nd ed. World Health Organisation, Geneva. 1997: 15-7.
- 5-Çelenk M. Tüberküloz epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 1994; 14(6): 391-403.
- 6- Özdemir Ö. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 1994;14(6):420-4.
- 7- Andersen AB, Thybo S, Faussett PG et al. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12: 922-7.
- 8- Kim TCH, Blackman RS, Kim T et al. Acid-fast bacilli in sputum smears of patient with pulmonary tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1984;129:264-8.
- 9- Medical Research Council Tuberculosis and Chest Disease Unit. Treatment of pulmonary tuberculosis in patients notified in England and Wales in 1978-9: chemotherapy and hospital admission. Thorax 1985;40:113-20.
- 10- Del Prete R, Mosca A, Dalagni M et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in blood of patients with active pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction and non-isotopic hybridisation assay. J Med Microbiol 1997;46:495-500.
- 11- Condos R, McClune A, Rom WN et al. Peripheral blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. Lancet 1996; 347:1082-5.

- 12- Folgueira L., Delgado R, Palenque E et al. Rapid Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Bacteremia by PCR. J Clin Microbiol 1996;34:512-5.
- 13- Akkaynak S. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri İn: Tüberküloz. Ankara, Ayyıldız Matbaası. 1986;13-7.
- 14- Çobanlı B. Akciğer tüberkülozu. İn: Numanoğlu N(ed). Klinik Solunum Sistemi ve Hastalıkları. Ankara, ANTIP A.Ş. Basımevi. 1997;306-32.
- 15- Özşahin S. Tüberküloz Bakteriyolojisi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 1994, 14(6):404-8.
- 16- Saygun N. Mikobakteriler İn: Kocabaş A(ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü .Adana, Emel Matbaası. 1991;41-5.
- 17- Glenn D, Roberts V, Gregory P .Bakteriyoloji ve Tüberkülozun Bakteriyolojik Tanısı. İn: Schlossberg D(ed) Tüberküloz, Çeviri; Tetikkurt C(ed). İstanbul, Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı. 1995;39-46.
- 18- Vidinel İ. Akciğer Hastalıkları. Bornova- İzmir. Ege Üniversitesi Basımevi. 1989;203-6.
- 19- Kocabaş A. Mikobakterilerin Yapısal ve Antijenik Özellikleri. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana, Emel Matbaası. 1991;47-55.
- 20- Aksu H.S.Z. Mikobakteriyel Moleküler Biyoloji, İn: Kocabaş A(ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü .Adana, Emel Matbaası. 1991;57-62.
- 21- Kalaycıoğlu O. Akciğer Tüberkülozu Patogenezi ve Kliniği. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 1994, 14(6):416-9.
- 22- Dannenberg AM, Collins FM. Progressive pulmonary tuberculosis is not due to increasing numbers of viable bacilli in rabbits, mice and guinea pigs, but is due to a continuous host response to mycobacterial products. Tuberculosis 2001; 81(3):229-42.
- 23- Iseman MD. Immunity and Pathogenesis. İn: A Clinician's Guide to Tuberculosis. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. First edition. 2000;63-96.
- 24- Dannenberg AM. Immunopathogenesis of Pulmonary Tuberculosis. Hospital Practice 1993;15:51-8.
- 25- Dannenberg AM. Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis. Rev of Infect Dis 1989;11(2):369-78.

- 26-Çobanlı B. Akciğer tüberkülozunun patogenezi. In: Kocabaş A (ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana, Emel Matbaası. 1991; 69-71.
- 27- Iseman MD. Extrapulmonary Tuberculosis in Adults. In: A Clinician's Guide to Tuberculosis. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. First edition. 2000;145-97.
- 28-Moulding T. Pathogenesis, Pathophysiology and Immunology: Clinical Orientations. In:Schlossberg D(ed). Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. Philadelphia, W.B Saunders Company. Fourth edition. 1999;48-56.
- 29- Mısırlıgil Z. Tüberküloz İmmünolojisi. In: Kocabaş A (ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Adana, Emel Matbaası. 1991; 73-8.
- 30- Hopewell PC, Bloom BR. In: Murray JF, Nadel JA eds. Textbook of Respiratory Medicine. Philadelphia, W.B Saunders Company, Second edition. 1994; 1094-161.
- 31-Çelik G, Gönüllü U. AIDS ve Akciğerler. In: Numanoğlu N (ed). Solunum Sistemi ve Hastalıkları. Ankara ANTİP A.Ş. Basımevi. 1997;339-64.
- 32-Keleşoğlu N. Tüberküloz tanısında bakteriyolojik yöntemler In:Kocabaş A(ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü .Adana, Emel Matbaası. 1991:211-7.
- 33- Kocabaş A. Günümüzde ve gelecekte tüberküloz tanısı. In:Kocabaş A(ed). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü .Adana, Emel Matbaası. 1991: 243-62.
- 34- Sinner WN. Fine needle biopsy of tuberculomas. Chest 1984; 85:836.
- 35- Bass JB (American Thoracic Society). Diagnostic standarts and classification of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1990;142:725-35.
- 36- Memiş L. Solunum sistemi In:Uluoğlu Ö (ed). Patoloji. Ankara, Güneş Kitapevi. 1990;525-92.
- 37- Bothamley GH,Rudd R, Fentenstein F et al. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody and pulmonary tuberculosis. Thorax 1992;47:270-5.
- 38- Chan SL, Reggiardo Z, Daniel TM et al. Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigens. Am Rev Respir Dis 1990;142:385-90.

- 39- Charpin D, Herbault H, Gevaudan J, et al. Value of ELISA using A60 antigen in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:380-4.
- 40- Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG et al. Surrogate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: antibodies to an 88-kDa secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1997;176:133-43.
- 41- Sada E, Brennan PJ, Herrera T et al. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2587-90.
- 42- Iseman MD. Biology and Laboratory Diagnosis of Tuberculosis.. In: A Clinician's Guide to Tuberculosis. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2000;21-49.
- 43- Pfyffer GE, Welscher NM, Kissling P et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with Radiometric and Solid Culture for Recovery of Acid-Fast Bacilli. *J Clin Microbiol* 1997;35:364-8.
- 44- Badak FZ, Kiska DL, Setterguist S et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for Detection of Mycobacteria from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:2236-9.
- 45- Persing DH. In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology- Principles and Applications*. Washington: American Society for Microbiology. Rochester, Mayo Foundation. 1993: 51-88.
- 46- Lynch J, Brown J. The polymerase chain reaction, Current and future clinical applications. *J Med Genet* 1990;27:2-9.
- 47- Akdağ R, Taşyaran MA, Ceviz N et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction in various body fluids from children and adults. *New Eng J Med* 1995;12:16-20.
- 48- Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology- Principles and Applications*. Washington: American Society for Microbiology. Rochester, Mayo Foundation. 1993: 191-6.

- 49- Mullis K, Falona F. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro, The polymerase chain reaction. *Methods in enzymology* 1987;155:335.
- 50- Kocagöz T. Tüberküloz tanısında Yenilikler. In:Eraksoy H, Yenen ŞO (eds) *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2000; 25-33.
- 51-Durmaz R. Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde sorunlar ve standardizasyon. In: *Mikrobiyoloji Bülteni*. Ankara, Meteksan AŞ. 2000;34(1-2):157-64.
- 52- Stuart MW, Ruth MN, Nye P, et al. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1993;31:776-82.
- 53- Chia CP, Benedict Y, Jinn-Bang Y et al. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28:1877-80.
- 54- Tahaoğlu K, Ataç G, Sevim T et al. The management of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:65-9.
- 55- Baysal A. Beden Ağırlığının Denetimi. In: *Diyet El Kitabı*. 3.Baskı, Ankara, 1999;39-60.
- 56- Kocagöz T, Yılmaz E, Özkara Ş et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microbiol* 1993;31(6): 1435-8.
- 57- Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S et al. Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Clinical Samples by Using Polymerase Chain Reaction and a Nonradioactive Detection System. *J Clin Microbiol* 1992;30(10):2567-75.
- 58- Çelenk M. Tüberküloz epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1994, 14(6):391-404.
- 59- Verem Savaş Daire Başkanlığı. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Klavuz (Tartışma İçin Taslak) Ankara, 1999.
- 60- Tahaoğlu K. Tanı. In: *Toraks Derneği İkinci Yıllık Kongresi, Tüberküloz Kursu Notları*. 1998; 13-9.

- 61- Shibuya Y, Shiozaki T, Hayashi M et al. Efficacy of amplicor PCR for the diagnosis of tuberculosis in respiratory specimens other than sputum. *Tubercle and Lung Disease* 2000; 80(4/5) 209-15.
- 62- Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM et al. Large-Scale Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a Routine Mycobacteriology Laboratory. *J Clin Microbiol* 1993;31(8): 2049-56.
- 63- Ahmad RB, Valery VB, Mehrdad HB. Use of Polymerase Chain Reaction for Primary Diagnosis of Tuberculosis in the Clinical Laboratory. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 469-72.
- 64- Ceyhan M, Kanra G, Seçmeer G et al. Diagnosis of Childhood Tuberculosis by Polymerase Chain Reaction. In: *Turkish J Pediatrics* 1996;38: 399-405.
- 65- Miyazaki Y, Koga H, Kohno S et al. Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 1993;31(8):2228-32.
- 66- Savic B, Sjobring L, Shoemaker S et al. Evaluation of Polymerase Chain Reaction, Tuberculostearic Acid Analysis and Direct Microscopy for the Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Sputum. *J Infect Dis* 1992; 166:1177-80.
- 67- Modilevsky T, Sattler FR, Barnes PF. Mycobacterial disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1989;149:2201-5.
- 68- Shafer RW, Goldberg R, Sierra M et al. Frequency of *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in patients with tuberculosis in an area endemic for AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989;140: 1611-3.
- 69- Jones EB, Young SM, Antoniskis D et al. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1292-7.
- 70- Ahmed N, Mohanty AK et al. PCR-based Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Blood from Immunocompetent Patients with Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 3094-5.
- 71- Kolk AHJ, Koxlff, Kuijper S et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in peripheral blood. *Lancet* 1994 Sep 3;344 (8923): 694.

- 72- Schluger NW, Condos R, Stuart L et al. Amplification of DNA of Mycobacterium tuberculosis from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. Lancet 1994;344:232-3.
- 73-Buskin SE, Gale JL, Weis NS. Tuberculosis risk factors in adults in King Country, Washington, 1988 through 1990. Am j Public Health 1994;84:1750-6.
- 74- Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. Am J Clin Nutr 1997;66:460-3.
- 75- Turett GS, Telzak E. Normalization of CD4+ T-lymphocyte depletion in patients without HIV infection treated for tuberculosis. Chest 1994;105(5):1335-7.
- 76- Nolte SF, Metchock B, McGowan EJ et al. Direct detection of Mycobacterium Tuberculosis in sputum by polymerase chain reaction & DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993;31:1777-82.