

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Başkanı:
Prof. Dr. Eralp Arıkan

**LATENT TÜBERKÜLOZ İNFEKSİYONUNUN TANISINDA TÜBERKÜLİN DERİ
TESTİ İLE SPESİFİK T HÜCRE TEMELLİ BİR TEST OLAN T-SPOT™.TB
YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Tuncer Özekinci

Dr. Erdal Özbek

Diyarbakır 2007

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	21
BULGULAR	25
TARTIŞMA	32
ÖZET	38
SUMMARY	39
KAYNAKLAR	40

GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri tüberküloz basili ile infektidir ve tüberküloz nedeniyle yılda yaklaşık 2 milyon insan ölmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2006 yılı raporunda; 2004 yılında, 8,9 milyon yeni olgu olduğu, bunlardan 3,9 milyonunun çevredeki insanları infekte etme riski yüksek olan yayma pozitif hastalar olduğu ve 1,7 milyon insanın hastalık nedeniyle öldüğü belirtilmektedir (1).

Ülkemizde nüfusun dörtte birinin tüberkülozla infekte olduğu tahmin edilirken, 2004 yılında 8.974' ü yayma pozitif olmak üzere 19.944 yeni olgunun tespit edildiği ve enfeksiyona bağlı 3.815 kişinin bu nedenle hayatını kaybettiği saptanmıştır (2).

M. tuberculosis solunum yoluyla bulaşmaktadır. Hasta ile yakın ve uzun süreli temasta bulunanlarda daha yüksek bulaş görülmektedir. Yine aynı şekilde tüberküloz kliniği ve laboratuvarı çalışanları da enfeksiyon için yüksek bulaş riski taşırlar.

M. tuberculosis ile infekte bireylerin %10' unda hayatlarının bir döneminde aktif enfeksiyonun geliştiği bilinmektedir. Dünya nüfusunun üçte birinin infekte olduğu düşünülürse; bu durumun yeni olgular için ne denli büyük risk olduğu açıktır(3).

Tüberküloz tanısında en hızlı ve en ucuz yöntem basilin direk mikroskopi ile saptanması, altın standart yöntem ise kültürdür. Ancak İngiltere' deki veriler göstermektedir ki, kültür ile akciğer tüberkülozlu hastaların %68' i, akciğer dışı tüberkülozlu olguların ise ancak %49' u gösterilebilmektedir. Bu oranlar çocuklarda daha da düşüktür (3,4).

Robert Koch'un, 19. yüzyılda *M. tuberculosis* kültür filtratlarını ısı ile inaktive ederek elde ettiği tüberkülini deri içine uygulayarak geliştirdiği, Purified Protein Derivative (PPD) deri testi halen Latent Tüberküloz Enfeksiyonu (LTBİ) saptanmasında kullanılan tek testtir (3). Testin değerlendirilmesi *M. tuberculosis*' e karşı gelişen gecikmiş tipte kutanöz aşırı duyarlılık reaksiyonun ölçülmesi esasına dayanır. Test sonucu olarak pozitiflik *M. tuberculosis*' e bağlı olabileceği gibi, BCG (Bacille-Calmete-Guérin) aşılmasına veya çevresel mikobakteri enfeksiyonuna bağlı olabilir. Bununla birlikte immun yetmezlik gibi pek çok durumda yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. LTBİ olan bireylerin saptanması bu kişilerin %10' da aktif tüberküloz gelişmesi riski nedeniyle önemlidir.

Ancak yüzyıl boyunca LTBI tanısı için yen bir yöntem geliştirilememiştir. LTBI' na humoral immun cevap genellikle yetersiz olduğundan, hücresel immun cevap oluşturacak antijenler araştırılmıştır. *M. tuberculosis* H37RV, *M. bovis* ve BCG suşlarının genomlarının kıyaslanması ile Region of Difference (RD) adı verilen 16 farklı bölge tanımlanmıştır. *M. bovis* 'de RD1 bölgesi 1921 yılında invitro kültürlerde kaybolmuştur. Bu bölge BCG aşısı ve çevresel mikobakterilerde bulunmamaktadır (5). RD1 bölgesinden kodlanan Early Secretory Antigenic Target (ESAT) 6 ve Culture Filtrate Protein (CFP) 10 proteinleri saptanmış (6), olup bu proteinler çevresel mikobakterilerin çoğunda ve BCG suşlarında bulunmaz. Bu proteinlerin, uyarması ile Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinde (PKMH), saptanabilir interferon yanıtına neden oldukları için kültür negatif aktif tüberküloz infeksiyonları ile LTBI' larının saptanmasında umut ışığı olmuştur.

T-SPOT™.TB adı verilen ticari yöntemde hasta kanında uygun yöntemle elde edilen PKMH' lerinin mikro kuyucuklarda ESAT-6 ve CFP-10 proteinleriyle 37° C' de % 5 CO₂ ' li ortamda 24 saat uyarılması ve yanıtın Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) yöntemiyle oluşan interferon (INF) yanıtının saptanması esasına dayanır.

Çalışmamızda amaç T-SPOT™.TB testinin Tüberküloz Deri Testiyle (TDT) karşılaştırılarak bu testin LTBI' lular, kültür negatif aktif tüberkülozlular, ev içi temaslı ve tüberküloz klinik ve laboratuvarı çalışanlarında kullanılabilirliğini saptamaktır.

GENEL BİLGİLER

Mikobakteriler, Mycobacteriaceae familyasına bağlı tek genus olan Mycobacteriumlar içinde yer almaktadır. Yüksek oranda G+C (% 62–70) içermeleri ile mikolik asit içeren diğer bakterilere, Nocardia (%60–69), Rhodococcus (%59–69), ve Corynebacterium'lara (%51–59) benzerler (7).

1959'da Runyon, M.tuberculosis ve M.bovis dışında, klinik örneklerden izole edilen diğer mikobakteriler için bir gruplama yapmıştır. Bu sınıflamada her grup değişik türleri içermektedir.

Grup I: Sadece ışıktaki sarı - portakal rengi pigment oluşturan fotokromojenik mikobakteriler (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*),

Grup II: Karanlıkta portakal rengi veya kırmızı pigment oluşturan skotokromojenik mikobakteriler (*M. scrofoleum*, *M. xenopi*, *M. gordonae*),

Grup III: Nonfotokromojenik, yavaş üreyen, S tipi ve krem rengi kolonileri olan mikobakteriler (*M. avium-intracellulare*),

Grup IV: 25 ve 37 °C'de üremeleri için bir haftadan daha az bir süreye gereksinim duyan çabuk üreyen mikobakteriler (*M. fortuitum-chelonae* kompleks) içermektedir.

Runyon gruplandırmasında; pigmentasyon, koloni morfolojisi ve üreme hızı temel alınmıştır (8).

Yıllar sonra bütün mikobakteri türlerinin Runyon gruplamasına uymadığının farkına varılmış ve bunların dışında birçok yeni tür tanımlanmıştır. Örneğin *M. avium-intracellulare* (MAI)'nin bazı izolatları yüksek oranda pigment oluşturdıkları ve *M. szulgai*'nin 25 °C'de fotokromojenik, 37 °C' skotokromojenik oldukları farkedilmiştir. Bu farklılıklar nedeniyle artık bütün mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmaları tavsiye edilmektedir ve Runyon gruplandırılması laboratuvarlarda kullanılmıştır.

Runyon gruplandırmasındaki mikobakteriler 'atipik mikobakteriler' olarak adlandırılmışsa da son yıllarda bu türlerin atipik olmadıkları kabul edilmiş ve bu grup için 'Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT)' veya 'non-tuberculosis mycobacteria' terimleri kullanılmıştır. Ancak bu terimlerin de mikobakteri türlerini tanımlamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Klinik açıdan önemli çeşitli mikobakteri türlerinin oluşturduğu infeksiyonların tedavileri farklı olduğu için tüm mikobakterilerin tür adları ile belirtilmeleri gerekmektedir. Klinik mikrobiyoloji yönünden mikobakterilerin daha uygun

sınıflandırılması Wollinski tarafından 1979 yılında yapılmış, Woods ve Washington tarafından yeniden düzenlenmiştir. Tablo 1’de, *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterileri göstermektedir (7,9).

Tablo 1: M.tuberculosis kompleks dışındaki mikobakteriler (9)

Grup	Tür
İnsanlarda patojen olan türler	<i>M. leprae</i>
İnsanlarda potansiyel patojen olan türler	<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i>
İnsanlarda nadiren hastalık oluşturan saprofit mikobakteriler	<i>M. fortuitum-chelonae</i> kompleks, <i>M. xenopi</i>
Yavaş üreyenler (>7 gün)	<i>M. gordonae</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. terrae-triviale</i> kompleks, <i>M. gastri</i> , <i>M. nonchromogenicum</i>
Orta sürede üreyenler (7–10 gün)	<i>M. paratuberculosis</i>
Çabuk üreyenler (<7 gün)	<i>M. flavescens</i>
	<i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. paraafortuitum</i> kompleks, <i>M. phlei</i>

Mikobakterilerin genel özellikleri:

Mikobakteriler silindir şeklinde, uçları yuvarlak, 0.3-0.6 µm en ve 1-4 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık, ince basillerdir. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Hücre duvar yapısının büyük bölümünü oluşturan lipidlerin hidrofobik özelliklerinden dolayı bakteriyolojik boyalarla zor boyanırlar. Mikobakteriler aside - alkole dirençli boyanma özelliği gösterirler. Bakterinin aside dirençli boyanma özelliği, fiziki bütünlüğü yanında hücre duvarındaki mikolik asit ve lipid bariyer sisteme bağlıdır. (7, 10, 11).

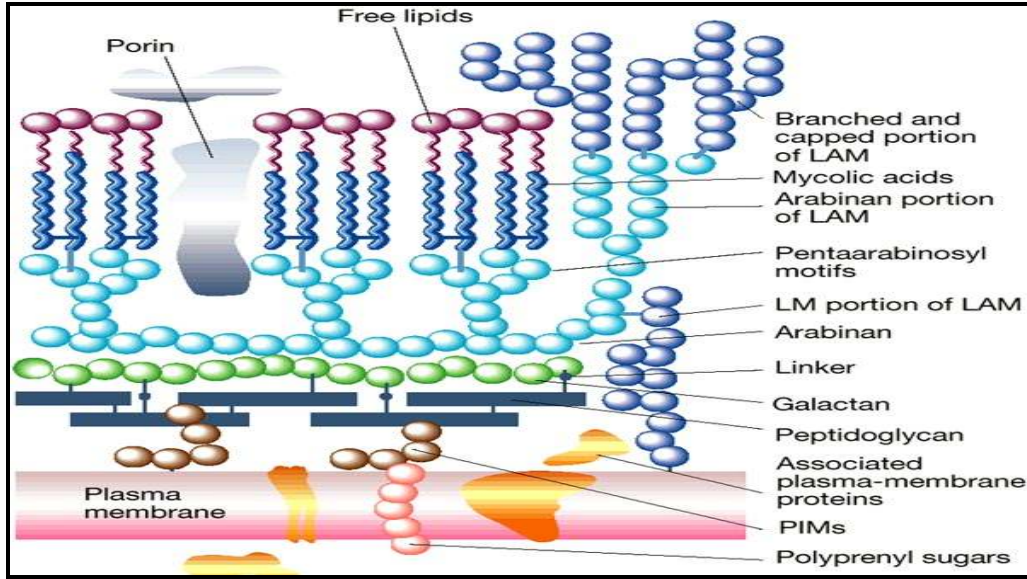
Mikobakterilerin hücre yapısı: Mikobakteriler sitoplazma, sitoplazmik zar ve bunları çevreleyen lipidlerce zengin bir hücre duvarından oluşmuşlardır.

Elektron mikroskop çalışmaları sitoplazmik zarın iki elektron yoğun tabaka ve arada transparan bir bölge görüntüsü ile klasik iki tabakalı sitoplazmik zar görünümüne benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elektron mikroskop görüntülerinde iki tabakanın simetrik olmadığı, dıştaki tabakanın daha kalın olduğu gözlenmiştir. Elektron sitokimyasal çalışmalara göre; bu kalınlığın karbonhidratlar, fosfatidil inazitol, mannozidler ve lipoarabinomannan moleküllerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sitoplazmik zarın lipid yapısında; kardiolipin, fosfatidiletanolamin ve monofosfoinositollerin bulunduğu gösterilmiştir (11, 12).

Hücre duvar yapısının ana iskeletini peptidoglikan oluşturmaktadır (Şekil 1). Bu yapıya arabinogalakattan molekülleri fosfodiester bağları ile bağlanmakta, ucunda da mikolik

asitler yer almaktadır. Mikolik asitler ise değişik lipid, glikolipit ve bazı proteinler ile sonlanmaktadır.

Şekil 1: Mikobakterilerin hücre duvar yapısının şematik görünümü.



(www.nature.com/nature/journal/v406/n6797/fig_tab/406788a0_F2.html’ den alınmıştır)

Peptidoglikan tabakaya bitişik olan tabaka, arabinogalaktan tabakasıdır. Kuvvetli immunojendir. Hücre duvar kitlesinin %35’ini oluşturur. Arabinogalaktan, arabinoz ve galaktozdan oluşan dallı bir polisakkarittir, koruyucu bariyer görevi görür, güçlü hidrofobiktir ve bu özelliği nedeniyle suda eriyen boyalar bakteriye penetre olamaz. Arabinogalaktanların yan zincirlerindeki uç arabinoz birimlerine mikolik asit diye adlandırılan bir grup zincirli yağ asitleri kovalent bağlarla bağlanırlar. Bu asitler hücre duvarının kalınlığından ve büyük oranda hücrenin aside dirençli oluşundan sorumludur.

En dış tabaka bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolik glikolipitlerden oluşmuştur ve “mikozidler” olarak adlandırılır (11,12).

A-Lipidler: Mikobakterilerin pek çok özellikli komponentleri arasında, lipidlerin diğer bakteriler ile kıyaslandığında ayrı bir yeri olduğu görülür. Başlıca lipidleri; mikolik asit, balmumu (Waxes D), fosfolipidler, trehalozlar (kord faktörü, sülfolipidler, mikolipenik asit), glikolipidler, lipoglikan ve lipoproteinlerdir.

Balmumu (WaxesD): Mikobakteri hücre duvarında bulunan bir peptido-gliko-lipiddir, mikolik asit moleküllerinin ucunda yer alır. Wax D, muramil dipeptid bileşikler içinde adjuvan etki göstermektedir. Aynı zamanda interferon yapımını da indüklediği gösterilmiştir. BCG aşısının, belli tümörlerde gerileme gösteren immünoterapotik etkisinde rolü vardır (7,12).

Kord faktörü (6,6'-dimikolat- α -D-trehaloz): Middlebrook (1947), virulan tuberküloz basillerinin kord oluşturduğunu gözlemiş ve bunun virulansla ilişkili olduğunu düşünmüştür. Adjuvan aktiviteyi de içeren, çok sayıda özelliğe sahiptir. Alternatif kompleman yolunu aktive eder, polimorfonükleer lökosit göçünü önler, granulom oluşumunda rol oynar, antitümör özelliği vardır. Konak hücre mitokondri membranına tutunarak solunum ve oksidatif fosforilasyonda hasara yol açar. Farelerde karakteristik bir toksisiteye sahiptir. Bu bilgilere rağmen, kord faktörünün tüberküloz patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (7, 11, 12).

Fosfolipidler: Fosfatidik asid temel yapısındaki fosfodiasilgliserollerdir. Sitoplazmik membrana bağlıdır. Peptidoglikan ve hücre duvar polisakkaridinin sentezinde rol oynar (7).

Sülfatidler: Basilin virulansından esas sorumlu neden olarak değerlendirilmiştir. Fagosom aktivasyonunu inhibe ederek, bakterinin intrasellüler yaşamını sürdürmesini sağlar. Ayrıca kord faktör toksisitesini de artırmaktadır (13, 14).

Mikolipenik asit: Sadece virulan suşlar tarafından oluşturulur. Lökosit göçünü önemli oranda azaltır (11).

Lipoglikanlar: Lipid taşıyıcısı olarak işlev görerek uzun zincirli yağ asitlerinin sentezine olanak sağlarlar. Lipooligosakkaritler serovarların dominant epitoplarını oluşturur ve önemli yüzey antijenleridir. Fenoglikolipidler tür ve antijenik özelliğini verir (11).

B-Proteinler: Mikobakterilerde hücre duvarında proteinlerde yer almaktadır. Bunların başlıca işlevleri; hücre bölünmesinde rol alan enzimler ve duvar polimerlerinin sentezinde yer almak, atıkların hücre duvarından geçmesinde rol oynamak, porları oluşturmak ve antijenik özellik sağlamaktır. *M.tuberculosis*'de bulunan proteinler fiziksel, kimyasal özellikleri, fonksiyonları ve lokalizasyonlarına göre gruplandırılabilirler. Isı şoku proteinleri, lipoproteinler, sitoplazmik membrana bağlı ve salgılanan proteinler başlıcalarıdır (11).

C-Polisakkaritler (arabinogalaktan ve arabinomannan): Duyarlı deney hayvanlarında anafilaktik tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olurlar. Gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rolleri yoktur. Konak hücre makrofajlarından TNF- α salınımını arttırırlar. Nötrofillerin damardan dokuya geçmesini ve yangısal tepkimenin oluşmasını sağlarlar (7).

ANTİJENİK YAPI

M. tuberculosis'in antijenik yapısı, bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapısında yer alan protein, lipid ve polisakkaridlerin tümü immunojeniktir. Bu komponentlerin, immünosupresyon, makrofaj aktivasyonu, granülom oluşturma, toksisite, alternatif yoldan kompleman aktivasyonu gibi birçok değişik etkileri vardır. Proteinler, anahtar immunojen olarak kabul edilirler.

Old tüberkülin (OT): İlk kez Koch tarafından elde edilen OT'nin infekte bireylerde, basille karşılaşmamış olanlara nazaran daha çabuk ve daha belirgin reaksiyon oluşturduğu görülmüş ve tüberküloz infeksiyonunun tanısında, intradermal cilt testi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bileşimindeki proteinler, karbonhidratlar ve besiyerine ait maddeler nedeniyle özgül olmayan reaksiyonlara neden olur.

Saflaştırılmış protein derivesi (Purified Protein Derivative: PPD): OT'nin kollodyen membranlardan süzülmesi ve amonyum sülfatla çöktürülmesi sonucu elde edilmiş, kısmen daha saf bir üründür. Bileşimindeki proteinler daha küçük olduğundan ve daha az karbonhidrat içerdiğinden özgül olmayan reaksiyonlara daha az rastlanır. Dünya sağlık örgütü; 0,1 ml solüsyonda 5 tüberkülin ünitesi (TU) dozunda PPD veya 0,0001 mgr standart tüberkülin (PPD-S) bulunmasını önermektedir. Tam olarak saflaştırılmamış olması ve diğer mikobakteri türleri ile oluşan infeksiyonlarda çapraz reaksiyonlara sık rastlanması gibi olumsuzluklara rağmen PPD, immünodiyagnostik önemini hala korumaktadır.

Saflaştırılmış antijenler: Son yıllarda daha saf antijenlerin elde edilebilmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucu, sitoplazmik orjinli olduğu sanılan antijen 5 ve antijen 6 elde edilmiştir. Saflaştırılmış mikobakteriyel antijenler içinde en ilgi çeken 65 kD antijendir. Isı şok proteinlerine çok benzer ve yüksek oranda immünojeniktir. Konak dokularda salındığı zaman otoimmün reaksiyonlara ve kazeifikasyon nekrozuna yolaçtığı gösterilmiştir. Bu antijene karşı oluşmuş antikorlar ile duyarlı T hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (7).

Tüberkülin deri testi:

M.tuberculosis'e karşı oluşmuş geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun göstermek için yapılan intradermal bir testtir. Testin pozitif olması infeksiyonu gösterir, ancak tüberküloz tanısını koydurmaz. Hastalığın kontrolünde, ayırıcı tanısında, olguların ortaya çıkarılmasında ve hücresel immünitenin değerlendirilmesinde kullanılır. Daha önce basille karşılaşmış kişilere intradermal olarak tüberkülin verilmesi, enjeksiyon yerinde, eritemli veya eritemsiz bir endurasyon oluşmasına neden olur. Duyarlılığın derecesi, reaksiyon alanının çapı

ölçülerek tayin edilebilir. Ancak ciltte meydana gelen reaksiyonun büyüklüğü ile hastalık derecesi arasında bir korelasyon yoktur (7).

Tüberkülin duyarlılığın araştırılmasında çeşitli deri testleri kullanılmıştır. Bugün en çok kullanılan standart PPD ile uygulanan Mantoux testidir. Ön kolun ön yüzünün temizlenmiş derisi içine özel tüberkülin enjektörü kullanılarak 0,1 cc 5 TU tüberkülin enjeksiyonu ile yapılır. Doğru olarak uygulanmış bir enjeksiyonda, deride 6–10 mm çapında soluk renkte, bir kabarcık oluşur. Test 48-72 saat sonra okunmalıdır. Eritem önemli olmayıp, asıl ölçülmesi gereken endürasyonun çapıdır (7,10).

10 mm veya daha fazla endürasyon pozitif, 5 mm'den büyük, fakat 10 mm'den küçük endürasyon şüpheli, endürasyon olmadan sadece eritem veya 5 mm'den küçük endürasyon negatif olarak kabul edilir.

Tüberküloz bakterileri ile hiç temas etmemiş kişilerde tüberkülin deneyleri negatif sonuç verir. Deneyin pozitif çıkması, kişinin daha önce bir tüberküloz enfeksiyonu geçirdiğini veya halen tüberkülozlu olduğunu veya aşılanmış olduğunu gösterir.

PATOGENEZ

Tüberkülozda en önemli bulaş yolu inhalasyondur. Bulaş sonrası enfeksiyon oluşup oluşmaması veya hastalık meydana gelip gelmemesi konağın direnci ile bakteriyel virulans arasındaki dengeye bağlıdır. Aktif tüberkülozlu kişiler çevreye, içinde değişik sayılarda basil bulunan damlacık saçarlar. Sağlıklı kişiler tarafından solunan bu damlacıkların büyük olanları burun ve bronş yüzeyindeki silialar tarafından tutulurken, içinde 1–3 basil bulunan küçük partiküller kolaylıkla alveollere ulaşır ve alveoler makrofajlarca fagosit edilirler.

Mikobakteri taşıyan fagozum çoğunlukla lizozom ile birleşmez ve fagozomun pH'sı, proton-ATPaz veziküllerinin dışlanması nedeni ile daha fazla asidifiye olmaksızın 6.5 dolayında kalır. Bu mikobakterinin yaşaması için uygun pH'dır. Ayrıca mikobakterinin duvar yapısında yer alan komponentler, bakterinin, kendisini konağın immün saldırısına karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır (15). Makrofaj aktivitesi yetersiz kalırsa basil, hücre içinde çoğalmaya başlar. İkiye bölünme süresi uzun olduğundan makrofaj içinde yavaş bir şekilde çoğalan M.tuberculosis, akciğerde vazodilatasyon, ödem, polimorfnüveli lökosit ve fibrinöz eksuda ile karakterize erken konak cevabına neden olur.

Konakta, basillerin belli bir sayıya ulaşması ve hücrel immün cevabın ortaya çıkmasına kadar 3 – 8 haftalık bir süre geçer. Hücrel immün cevap ile birlikte aktive olan T-lenfositler ve makrofajlar basilleri çevreleyerek, nonspesifik konak cevabının bir

göstergesi olan granülatöz inflamasyon gelişimine yol açarlar. CD4 T hücrelerinden salınan IFN γ ile lenfokinler, makrofaj ve monositleri aktive eder. Monositlerden köken alan doku makrofajları epiteloid hücrelere, bunlarda birleşerek çok nukleuslu dev hücrelere dönüşür. Aktive makrofajlar fagozom içindeki basilleri superoksit anyon, radikal hidroksil ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller ile öldürür. Bakteri fagolizozomda işlenerek, MHC klas II molekülleri ile birleştikten sonra makrofajın yüzeyine yapışır (16). Mikobakteriyel hücresel cevapta dominant olan T lenfositlerinin %90'ı α ve β zincirinden oluşan reseptörleri ile antijeni tanıyarak aktif hale geçer. Makrofajlar tarafından fagosite edilen, ancak öldürülemeyen bakteriler MHC klas I molekülleri ile birleşip CD8 T lenfositlerine sunulur. Ancak tüberküloz basilleri ile meydana gelen infeksiyonlarda aktivite CD8 T hücrelerinin rolü kesin olarak anlaşılamamıştır (7, 15).

Hücre sel immünite ve gecikmiş tip hipersensitivite T hücreleri ile oluşur. Her ikisinde de aynı immünolojik mekanizma söz konusudur. Hücre sel immünite infeksiyon ajanının yok edilmesiyle ilgilidir. Gecikmiş tip hipersensitivite, konak organizmanın infeksiyona verdiği immünolojik bir cevaptır. Gecikmiş tip hipersensitivite oluştuğunda lenfositlerden açığa çıkan lenfokinler sadece basilleri öldürmekle kalmaz granülomun merkezinde bulunan nekrotik dokularda pıhtılaşma mekanizmasını harekete geçirip, iskemi ve tromboza neden olur. Sonuçta doku yıkımı meydana gelir. Lezyon bölgesindeki aktive makrofajlara ait proteinaz, lipaz, endonükleaz gibi enzimler granülomun ortasında bulunan kazeomu eritir ve likefaksiyona yol açar. Likefiye kazeomun bronşa açılması ile kavitasyon oluşur (7).

Tüberküloz primer veya sekonder olarak iki şekilde ortaya çıkar:

Primer tüberküloz, bireyin tüberküloz bakterileriyle ilk defa infekte olmasıdır. Solunum yoluyla alınan tüberküloz basilleri genellikle alt loblarda ve plevra altında yerleşirler. İlk yerleşim yerinde toplanmakta olan makrofajlar epiteloid hücrelere dönüşür. Bunlar birleşerek langhans tipi dev hücreleri oluştururlar, etrafları lenfositlerle çevrilir ve granülom meydana gelir. Bu yapıya 'Ghon' odağı denir. Bölgesel lenf bezlerine yayılan basiller burada da aynı granülatöz olaya neden olur. Akciğerdeki primer periferik lezyon ve beraberinde büyümüş lenf bezlerine "Ghon kompleksi veya primer kompleks" denir. Genellikle asemptomatiktir. Bölgesel lenf bezlerindeki basiller kan yoluyla vücuda yayılabilir ve menenjit, miliyer tüberküloz gibi hastalığın ağır şekilleri ortaya çıkabilir (17, 18).

Sekonder tüberküloz (reinfeksiyon tüberkülozu, erişkin tüberkülozu), önceden primer infeksiyon geçirmiş bir kişide tüberkülozun reaktive olmasıyla oluşur. Çoğunlukla erişkinde görülmesi, başlangıç lezyonlarının üst zonlara yerleşmesi, bronş yolu ile yayılması, hiler lenfadenopatinin ve spontan iyileşmenin nadir olmasıyla primer tüberkülozdan ayrılır.

Sekonder tüberküloz 3 şekilde ortaya çıkar:

1. Endojen reinfeksiyon: Primer infeksiyon sırasında lenfohematojen yolla akciğerin apikal-subapikal bölgelerine yerleşen (Simon odağı) ve çoğalmadan burada canlılığını sürdüren basillerin (dorman halde) hayatın herhangi bir döneminde hücrel immün yanıtta meydana gelen baskılanma nedeniyle aktif hale geçmesi ile meydana gelir.

2. Primer infeksiyonun ilerlemesi: Primer tüberküloz iyileşmez ve ilerlemeye devam ederse erişkin tipi tüberküloza dönüşebilir. Nadir bir durumdur. Özellikle ergenlik çağından sonra primer tüberküloz olanlarda görülür.

3. Eksojen reinfeksiyon: Primer infeksiyon geçirmiş bir kişinin dışarıdan tekrar tüberküloz bakterilerini almasıyla oluşur (7, 17, 19).

Tüberküloz hastalığında başlıca iki tipte lezyon oluşur:

1. Eksüdatif tip: Ödem sıvısı, polimorf nüveli lökositler ve daha sonra bakterilerin çevresinde monositlerle karakterize akut iltihabi reaksiyonu içerir. Bu tip özellikle akciğer dokusunda görülür. Tüm eksüda emildiğinde iyileşebilir, doku nekrozu oluşabilir veya prodüktif lezyon gelişebilir. Eksüdatif faz boyunca tüberkülin deri deneyi pozitifdir.

2. Prodüktif tip: Geliştiğinde tüberküloz basillerini içeren multinükleer dev hücreler veya Langhans hücrelerinden oluşan geniş bir merkez bölge, genellikle radyal olarak yerleşmiş epitelooid hücrelerden oluşmuş bir bölge, fibroblastlar, lenfositler ve monositlerden oluşmuş periferik bölgeden meydana gelen granüloma oluşur.

Lezyonun bulunduğu yerde periferik fibröz doku gelişir ve merkez bölgesinde kazeöz nekroz oluşur. Bu lezyonlara tüberkül denir. Kazeöz tüberkül bir bronş içine doğru gelişirse, içeriğini buraya boşaltır ve kavite oluşur, buna kavern adı verilir. Daha sonra kalsifikasyon ve fibrinleşme ile iyileşebilir (19, 20).

***M. Tuberculosis*’ e Spesifik Antijenlerin Patogenezdeki Roller:**

M. tuberculosis kompleksine karşı özgül antijen ilk kez Harboe ve arkadaşları tarafından gösterilen 24 kDa ağırlığındaki MPT64 antijeni olup *M. bovis* ve *M. tuberculosis* kültür filtratlarında gösterilmiş fakat BCG örneklerinde gösterilememiştir (21).

Bu gözlem daha sonra PCR hibridizasyon yöntemiyle MPT64'ü kodlayan genin bulunmasını sağlamış ve bu genin bazı BCG alt suşlarında olmadığı bulunmuştur. İnsanlarda yapılan çalışmalarda MPT64 antijeninin orta derecede lenfosit yanıtına yol açtığı ve TB hastalarında düşük oranda cevap alındığı gözlenmiştir (22).

Bir çalışmada PPD reaktif TB hastalarının sadece %6'sında MPT64'e karşı gecikmiş tip hipersensitivite yanıtı saptanırken, ortak antijen Ag85B'a (MPT59) karşı %50 yanıt bildirilmiştir (23).

Bunun yanında, yapılan çalışmalarda yüksek doz MPT64 patch testinin hasta ile sağlıklı birey ayırımında %100 spesifite ve %98,1 sensitiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (24).

Fakat bu antijenin bazı BCG suşlarında da mevcut olması tanısal değeri açısından sorun yaratmaktadır. Son yıllarda ise daha düşük moleküler ağırlıklı bir antijen olan ESAT-6 kültür filtratlarında izole edilmiştir (25,26). Bu antijeni kodlayan genin *M. Tuberculosis complex*' te bulunduğu, BCG suşlarında bulunmadığı ve *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai* ve *M. flavescens* haricindeki diğer mikobakteri türlerinde bulunmadığı gösterilmiştir (27, 28).

Bu çalışmaların devamında ESAT-6 geninin promotor bölgesi belirlenmiş ve diğer bir antijenin (culture filtrate protein 10 kDa, CFP-10) aynı gen ile kodlandığı tespit edilmiştir. Bu antijenlerin TB tanısında kullanılması söz konusu olduğunda, bu geni taşıyan diğer mikobakteri türleri içinde sadece *M. kansasii*'nin TB benzeri hastalığa neden olduğu da bilinmektedir. Ancak bu da çok nadir olarak enfeksiyona neden olmaktadır. Danimarka'da yapılan bir çalışmada MOTT basilleri ile enfekte olan hastalardan elde edilen izolatların %0,5'inde *M. kansasii* bulunmuştur (28).

İnvitro pasajlar sırasında BCG suşunda bazı bölgelerin delesyona uğradığı gözlemlenmiştir (regions of differences (RD)). Bu bölgeler RD1, RD2 ve RD3 olarak adlandırılmış ve ESAT-6, CFP-10 ve MPT64 (yeni antijenler eklenmeye devam etmektedir) için genlerin bu delesyona uğrayan bölgelerde olduğu gözlenmiştir (29). RD1 immunolojik olan Early Secreted Antigenic Target 6-kDa protein (ESAT-6) ve Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10) proteinlerini kodlamaktadır.

ESAT-6/CFP-10 (Rv3875/Rv3874): Bu proteinler ESAT-6 ailesine bağlı proteinlerdir ve *M. tuberculosis* kültür filtratları içinde sekrete edilen küçük moleküllerdir.

Bu iki molekül TB hastalarının çoğunluğunda tespit edilen immünodominant proteinlerdir (30).

Guinea domuzlarda yapılan bir çalışmada *M. bovis*'in bu proteinlerini kodlayan genlerin tahrip edilmesiyle infeksiyonun daha ağırlaştığı gözlenmiştir (29). Bu hayvan modelinde bu proteinlerden hangisinin bakteri virülansı ile ilişkili olduğu ayırt edilememiştir. Rv3874 ve Rv3875, RD1 gen delesyon bölgesinde yer almaktadır. RD1, *M. bovis* BCG ile *M. bovis* vahşi-tip arasında belirlenen ilk farklı delesyon bölgesidir. RD1 yapısal 9 proteini kodlayan genleri içeren bölgedir. Bu proteinler Rv3971 ile Rv3979 arasında adlandırılmıştır (30, 31).

RD1 bölgesi patojenik tüm *M. tuberculosis* ve *M. bovis* suşlarında bulunmasına karşın *M. bovis* BCG suşlarının hiçbirinde bulunmamaktadır (32). Bu nedenle bu gen bölgesinin virülansla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmaların birinde RD1 gen bölgesi kaldırılmış olan *M. tuberculosis* H37Rv'nin *M. bovis* BCG ile aynı derecede virülansa sahip olduğu gözlenirken diğer bir çalışmada ise *M. bovis* BCG suşuna RD1 geni yerleştirilerek daha virülan hale geldiği görülmüştür (33).

Bununla birlikte bu gen bölgesinin gerçekten virülans ile ilişkili olup olmadığı yönünde kesin bir sonuç elde edilebilmiş değildir.

İNTERFERONLAR:

1957 yılında inaktif virüse maruz kalan hücreler tarafından üretilen çözünebilir bir faktörün, viral replikasyonu engellediği ve bunu yeni hücrelere taşıyabildiği keşfedilmiştir. Bu nedenle bu faktöre interferon denilmiştir(34).

O tarihten beri interferonların antiviral aktiviteye sahip, geniş bir protein ailesi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca interferonlar, güçlü antiproliferatif ve immün düzenleyici aktivitelere de sahiptirler.

İnferferon Tipleri:

İnferferonlar antijenik açıdan farklı tiplere ayrılırlar (Tablo 3):

Tablo 3: İnferferon tipleri ve özellikleri

İnferferon	Ana hücre	Salgılanmasını sağlayan	Molekül ağırlığı (Dalton)
Tip 1 (a. IFN α , b. IFN β)	Lökosit Fibroblast	Virüs veya çift sarmal RNA	18.000-20.000-23000
Tip 2 (IFN γ)	Uyanılmış T Lenfosit	Antijen	20.000-25.000

A) Tip 1 interferonlar [alfa interferon (IFN α) ve beta interferon (IFN β)]

Bunlar viral infeksiyonlarda veya yapay olarak çift sarmal RNA tarafından indüklenirler. α -IFN, temel olarak lökositler tarafından üretilir ve antijenik açıdan birbirleriyle ilişkili birçok alt grup içerir. Tip 1 interferonların çoğu pH=2'de stabilize olmasıyla karakterizedirler.

β -IFN, antijenik açıdan daha farklıdır. Lökositler tarafından da üretilmesine rağmen, fibroblastlar dahil olmak üzere lökosit dışı hücreler tarafından da sentezlenen majör interferondur (35).

B) Tip 2 İnterferon (IFN γ veya immün interferon):

İmmün reaksiyonlar esnasında antijen veya mitojen tarafından uyarılan T lenfositlerince üretilen 166 aminoasitten oluşan bir polipeptittir. Molekül ağırlığı 20.000 ve 25.000 dalton olan iki formu vardır. 12. kromozomda lokalize tek bir genle kodlanır (36, 37, 38, 39, 40).

IFN γ , genellikle T4 hücreleri, nadiren de T8 hücreleri tarafından salgılanan bir sitokindir. T lenfositlerin uyarılmasına IFN- γ salınımı eşlik etmektedir (41).

İmmün interferon yapımının düzenlenmesi, IL-2 aracılığı ile T lenfositlerinin birbirleriyle olan ilişkisine dayanır. T lenfosit kaynaklı IL-2, immün interferon yapımında rolü olan fizyolojik bir sinyal olarak düşünülebilir (42).

Gamma İnterferonun İmmün Sistemdeki Rolü:

IFN γ 'nın immün sistem üzerindeki etkileri, T ve B lenfositleri ve NK aktivitesine sahip büyük granüler lenfositler gibi konak savunmasından sorumlu hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır (35).

A- Makrofajlar üzerindeki etkileri: IFN- γ makrofajların güçlü bir aktivatörüdür. Makrofajların bakterisidal ve tümörosidal kapasitelerini artırır. Makrofajları, fagosite olmuş mikroorganizmaları öldürmek üzere tam olarak aktive ederken, tümör hücrelerini yoketmek için sadece kısmen aktive eder. IFN γ 'nın tüberkülostatik makrofaj kapasitesini aktive etme yeteneği, 1,25 (OH) $_2$ vitamin D $_3$ yapımını sağlayarak gerçekleşmektedir. Ortamda oluşan bu madde, lokal olarak makrofajların tüberkülostatik fonksiyonlarını aktive etmektedir. IFN γ , makrofaj üzerindeki sınıf II MHC-antijen kompleksinin oluşumunu ve devamlılığını da sağlamaktadır. Böylece antijen, T4 lenfositlerine sunulmakta ve T hücre reseptörlerine bağlanarak, T lenfosit fonksiyonları aktive olmaktadır (43).

B- Lenfositler üzerindeki etkileri: İnterferonlar, hücrel ve humoral immüniteyi miktarına, verilme zamanına ve alıcının genetik yapısına bağılı olarak ya güçlendirir, ya da baskılar. Genel olarak, antijenik duyarlılaştırmadan önce veya beraber verilirse baskılayıcı bir etki yapar. Buna karşın sonra verilirse hem hücrel, hem de humoral immün yanıtları güçlendirir. İn vivo olarak, IFN- γ immün cevabın geç döneminde üretilir ve sitotoksik T lenfositlerin olgunlaşmasını sağlar ve antikör üretimini artırır (35).

C- NK hücresi üzerindeki etkileri: IFN- γ , NK hücrelerin güçlü bir aktivatörü olarak kabul edilmektedir (44).

Tüm bu etkilerinden başka IFN- γ , vasküler endotel hücrelerinin bir aktivatörüdür. T4 hücrelerinin adhezyonunu ve lenfositlerin damar dışına çıkmasını kolaylaştıran değişiklikleri artırır. Ayrıca tümör nekroze edici faktörün endotel hücreleri üzerindeki birçok etkisini de güçlendirir.

İnterferon Reseptörleri:

İnterferonların işlevleri esnasında ilk olay, hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmalarıdır. Tüm Tip 1 interferonlar aynı interferon reseptörüne bağlanırken, Tip 2 interferon (IFN- γ) farklı bir reseptöre bağlanır. Bu reseptöre 10^{10} - 10^{11} mol/1 kDa ile yani yüksek affinite ile bağlanır. Bu bağlanmadan sonra interferon - reseptör kompleksleri, kaplanmış çekirdekler halinde kümeleşir ve reseptör tarafından yönlendirilen endositoz ile hücre içine alınır. İnterferon reseptöründen, hücrenin geri kalan kısımlarına sinyali ileten biyokimyasal mekanizmalar ise belirlenememiştir.

TANI

Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinimdir (45). Dünya sağlık örgütünün kararına göre bir hastaya kesin tüberküloz tanısı konabilmesi için uygun şekilde alınan klinik örneğin laboratuvara gönderilmesi, hazırlanan preparatlarda mikobakterilerin görülmesi ve ekim yapılan besiyerlerinde üretilmesi ile mümkün olur (46).

Mikobakterilerin boyanma özellikleri ve boyama yöntemleri:

Aside dirençli bakteriler hücre duvarlarında yer alan yüksek miktardaki lipidler nedeniyle zor boyanırlar. Aside dirençli bakterilerde hücre duvarı bir kez boyayı aldıktan

sonra, asit-alkolle dekolorize edilse bile bırakmaz. Klinik örnekteki diğer bakteriler boyayı geri verirler. Bu nedenle aside dirençli olarak adlandırılırlar. Boyama yöntemlerinde aside dirençli bakteriler ilk uygulanan boyanın rengini alırken, diğer bakteriler dekolarizasyondan sonra uygulanan zıt boyanın rengini alırlar. Örnekte basilin gösterilebilmesi için mililitrede 5000–50000 bakteri bulunmalıdır.

Hazırlanmış preparatlarda mikobakterileri görmek için iki tür boyama yöntemi kullanılır. Bazik fuksin (karbol fuksin) boyasının kullanıldığı Ziehl-Neelsen ve Kinyoun boyama yöntemlerinde mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı çomaklar şeklinde görülürken, fluorokrom yönteminde (Auromine O-Rhodamine B) kullanılan filtre sistemine göre sarı - portakal rengi fluoesans verirler. (7, 9, 47, 48, 49, 50).

Mikroskobik inceleme, yeni olguların tesbiti, tedaviye cevabın izlenmesi, ilaca dirençli vakaların ortaya konması ve hastaneden çıkarma gibi birçok konuda değerli ipuçları verir. Tedavi ile önce kültür, sonra yayma negatifleşir. Tedaviye rağmen preparattaki bakteri sayısında azalma olmaması, ilaç direncini düşündürür (7).

KÜLTÜR

Ertesi gün ağzı iyice kapatıldıktan sonra enkübasyona devam edilir. Mikobakteriler zorunlu aerop bir bakteridir. %5–10 CO₂ üremeyi artırır. Optimal ısı 37 °C ve pH 7'dir. Ancak pH 6.0-7.6 arasındada çoğalabilir. Yumurtalı besiyerinde kolonileri 2–3 hafta sonra görülmeye başlar ve ilk görünüşleri küçük, kuru, girintili - çıkıntılı, granüler ve kirli beyaz renktedir. Birkaç hafta sonra koloniler büyür basık, çevreleri düzensiz ve karnıbahara benzeyen merkezleri olan tipik koloniler oluşmaya başlar. Klinik örneklerden izole edilen mikobakterilerin tür tanımları yapılırken üreme ısısı, koloni morfolojisi, pigmentasyon özellikleri incelenir ve çeşitli biyokimyasal deneyler uygulanır. Bunlar niasin, nitrat redüksiyonu, TCH (Thiophene–2 carboxylic acid hydrazide), demir alımı, 68°C'de katalaz, Tween–80 hidrolizi, tellurit redüksiyonu, %5 NaCl toleransı bağlama, arilsülfataz, üreaz, MacConkey agarda üreme ve pirazinamidazdır (7, 9, 47, 51, 52, 53).

Radyometrik yöntem (Bactec): Bu yöntemde kültür şişeleri içerisindeki sıvı besiyerinde, karbon kaynağı olarak ¹⁴C içeren palmitik asit bulunur. Mikobakteriler bu ortamda ürerken palmitik asidi kullanırlar ve bundan radyoaktif CO₂ oluştururlar. Şişedeki radyoaktif gazı saptayan okuyucu üremenin belirlenmesini sağlar. Bu yöntem ile M.tuberculosis'in klinik örneklerde varlığının gösterilmesi ortalama bir haftaya indirilmiştir. Yöntemin önemli bir olumlu yanı, hızlı ve kolay tiplendirme sağlamasıdır. NAP (p-nitro-α-

asetil amino- β hidroksipropiofenon) testi, *M.tuberculosis* complex ve MOTT suşlarının ayırımında kullanılan 2–5 günde sonuç veren biyokimyasal bir deneydir. *M.tuberculosis* complex suşları NAP varlığında üreme göstermezken, MOTT suşları üreme gösterir ve $^{14}\text{CO}_2$ çıkarırlar $^{14}\text{CO}_2$,’ün üreme indeksi (GI) sayısal olarak belirlenir. Bu yöntemle kısa sürede antibakteriyel duyarlılık incelemesi de yapılabilir (47, 49, 51, 54, 55).

Floresan yöntem: Mikobakteri üremesi, ortamdaki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak floresans veren bir madde içeren tüpte (Mycobacteria Growth Indicator Tube, MGIT), kültür yapılarak gösterilir. Tüp dibinde silikona gömülü floresan bir madde bulunur. Besiyerindeki oksijen floresanı engeller. Bakteri tarafından tüketilince floresans oluşur. Üremeye bağlı floresans 365 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı ile görülür. Üreme ortalama 10 günde saptanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda duyarlılığı %76-95, özgüllüğü ise %76.9-100 olarak bildirilmiştir. Kontaminasyon oranı Bactec sistemine göre yüksektir (45, 56, 57, 58).

Haberci mikobakteriyofaj: Haberci mikobakteriyofaj, mikobakterileri infekte edebilen ve basil içerisinde kolayca saptanabilen bir ürün oluşturan virüstür. Tüm mikobakterilerde ya da sadece *M.tuberculosis*’te çoğalabilen fajlar vardır. Ateş böceğinin ışık üretmesinden sorumlu lusiferaz enzim geninin bu fajlara klonlanması ile haberci fajlar elde edilmiştir. Bu enzim ATP varlığında luseferini oksitler ve bu sırada ışık oluşmasına yol açar. Klinik örneklerde bu faj ile infekte edilen basiller lusiferin eklendiğinde ışık oluşturarak karanlık alanda kolayca görünür duruma gelirler. Bu yöntem dört saat gibi kısa bir sürede tamamlanabilir (45).

Serolojik yöntemler: İmmünolojik tanı için hem klinik örneklerde mikobakteriyel antijenlerin gösterilmesi, hem de bu antijenlere karşı oluşan antikorların saptanmasına çalışılmaktadır. Geliştirilen yöntemler arasında immunodiffüzyon, pasif hemaglutinasyon, ELİSA floresan antikor, solid faz radyoimmünoassay bulunmaktadır (59, 60, 61).

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, infekte olmak ile hastalık varlığı ayırımının yapılamamasıdır. Daha önce yapılmış olan BCG aşısına bağlı olarak serolojik reaksiyon da sorun oluşturmaktadır. Bu durum, serolojik inceleme gibi basit bir testin yarar sağlayacağı gelişmekte olan ülkelerde özellikle anlamlıdır. Bu gibi ülkelere nüfusun yaklaşık %40’ında LTBI vardır ve önemli sayıda insan *M. Bovis* BCG’si ile aşılanmıştır.

Diğer önemli bir konu da MOTT' lara bağlı infeksiyondan *M. tuberculosis* infeksiyonunun 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 kokteyleri: Tüberküloz sırasında serumda ortaya çıkan antikorlar tarafından tanınan tek bir antijen veya sık rastlanan bir antijen kombinasyonu olmaması nedeniyle, serolojik tanı testlerinde antijen kokteyleri kullanılmalıdır. Farklı hastalarda, çok az miktarda antikor üretilen immünsüpresyonlu hastalar dahil, çeşitli antikor yanıtları oluşur. Antijen kombinasyonları, bu TB olgularının yakalanma şansını 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 yanlış 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 incelenmiş; 38kd hoS ve 14 kd alfa kristali' ninki en fazla bulunmuştur. Bu iki antijene eklenen diğer antijenler (ESAT-6, MPT64, MPT63, 19 kd lipoprotein, MTSA-10) duyarlılığın artmasını sağlar (62).

İmmünolojik tanıda kullanılan testler;

a-Antijen tespitine dayanan testler: Lipoarabinomannan, mikobakterinin hücre duvarında bulunan bir lipopolisakkarittir ve doğal mikobakteri infeksiyonu sırasında antikor yanıtını indüklediği bilinmektedir.

Antijen olarak kord faktörü kullanan ELİSA testinin, akciğer tüberkülozu tanısında duyarlılığı %66,6–74,1 ve özgüllüğü %95,2–99,0 olarak bulunmuştur (60).

b-Antikor tespitine dayanan testler: Tüberkülozlu hastaların serumunda mikobakteri antijenlerine karşı oluşan antikorlar monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılarak tespit edilebilir. Çevresel mikobakteriler ile çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlış pozitif test sonuçları alınabilmektedir.

Ayrıca mikobakteri hastalıklarında ortaya çıkan bağışık yanıtlar; HLA klas 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 polisakkaritler dışında ısı şok proteinleri, diaçil trehaloz gibi ELİSA tekniğine uygun birçok antijen denenmiştir.

c-İnterferon gamma (IFN- γ) üretiminin saptanması: Tüberküloz infeksiyonunu doğru bir şekilde tespit edebilmek için *M. tuberculosis*'e karşı duyarlılaşmış T lenfositlerinin, invitro kan testleri ve invivo deri testleri ile tespit edilmesine dayalı testler geliştirilmiştir. Periferik kandan elde edilen mononükleer hücreler, invitro şartlarda uyarılır ve duyarlılaşan T lenfositlerinden salınan interferon gama (IFN- γ) üretimi ELİSA veya ELİSPOT ile ölçülür. PPD yanıtından sonra, kanda IFN- γ tespiti yapan testler (QUANTİFERON™ TB/ T-SPOT™.TB testleri) geliştirilmiş ve bunların tüberküloz tanısında yayma ve kültür yerine kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu testlerde; *M. tuberculosis*, *M. avium* ve *M. bovis*'den elde edilen PPD'lerle stimülasyondan sonra, tam kandaki T lenfositleri tarafından üretilen IFN- γ saptanır.

Plevra tüberkülozunda, IFN- γ duyarlılığının %85,7 ve özgülüğünün %97,1 olduğu kültür ve plevra biyopsisi ile doğrulanmıştır. HIV pozitif ve negatif hasta sonuçları da benzerdir. Rekombinant antijenler kullanılarak BCG aşılılarda etkileşim engellenmiştir. İn vivo deri testlerinden PPD'ye alternatif olarak kullanılan ESAT-6 (erken salınan tüberküloz antijeni, early secretory antigen target) ve CFP-10 (koloni oluşturan protein, culture filtrate protein) gibi antijenler de, IFN- γ indüksiyonu amacıyla kullanılmıştır. ESAT-6, özgül bir antijen ve tüberkülozlu hastalarda T lenfositleri tarafından üretilen IFN- γ 'nın güçlü bir indükleyicisidir. *M. tuberculosis* genomunda RD ile gösterilen farklı bölgeler bulunur, *M. bovis* genomundaki RD bölgeleri silinmiştir.

RD1 bölgesi, tüberküloza bağışıklık yanıtı sırasında ortaya çıkan ESAT-6 salınımını sağlar. ESAT-6 antijeni tüberküloz hastalarının T lenfositleri tarafından tanınırken, BCG ile aşıli veya aşısız sağlıklı kişilerin T lenfositlerince tanınmamaktadır. Tedavi edilmeyen hastalara göre tedavi edilen tüberkülozlu hastalarda IFN- γ düzeyi artar ve bu durum tüberküloza bağışıklık yanıtını gösterir (63).

Adenozin deaminaz (ADA): Pürin metabolizmasında işlevi olan bir enzimdir. Plevra, periton, perikard ve beyin-omurilik sıvılarında, bu boşluklarda tüberküloz bulunduğu zaman ADA düzeyinin yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Tüberküloz menenjit olgularında,

ADA anlamlı ölçüde artmış bulunurken, plevral sıvı örneklerinde tüm olgularda böyle kesin ayırım yapılabilmesini sağlayacak yeterli farklılık gösterilememiştir (7, 45).

Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri: Mikobakterilerin kromozomal DNA veya ribozomal RNA'larının, bunlara özgül olarak bağlanabilen DNA veya RNA probları yardımı ile tür düzeyinde belirlenmesi günümüzde mümkün hale gelmiştir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin çok yüksek olmasına karşın duyarlılıkları için aynı şey söylenemez. Prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanabilmesi için örnekte önemli miktarda nükleik asit bulunması gerekir. DNA hibridizasyon tekniğinde klinik örneklerdeki 10^3 - 10^4 /ml gibi az miktardaki mikobakteri DNA'sını araştırmak mümkündür (45, 52).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR): Klinik örneklerde proba bağlanamayacak kadar az hedef DNA bulunabilir. Prob tarafından tanınabilen küçük DNA'nın özgül nükleotid sıraları polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılır. Polimeraz enzimi uygun DNA zincirinin sentezlenmesi için ortamda bulunan nükleotidleri polimere eder. Ortamda bulunan hedef DNA parçaları üzerine tamamlayıcı zincir yapımında kullanılacak nükleotid ve araştırılacak her biri 20 nükleotidden oluşan mikobakteri türüne özgül oligonükleotid primeri koyulur. Hedef DNA'nın tek zinciri ile ilişkili olan primerler polimeraz reaksiyonun başlama noktasını oluştururlar. Bu karışım ısıtılarak önce hedef DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Sonra ısı 50°C 'ye düşürülerek primerlerin her birinin zincirde bulunan özgül sıralara tutunmaları gerçekleştirilir, ısı 75°C 'ye yükseltilerek iki primerin özgül sıralarda tutunduğu noktalar arasında kalan hedef DNA zincirinin polimeraz enzimle birleşmesi sağlanır. Bu işlem 40 kere kadar tekrarlanarak kısa sürede 100 bine yakın DNA parçasının elde edilmesi gerçekleştirilir. Bazı çalışmalarda PCR'in duyarlılığı %94, özgüllüğü %99 olarak, Bazılarında ise duyarlılık %60, özgüllük ise %80'in altında bildirilmektedir. (45, 52, 64, 65).

Zincir ayırma çoğaltması (strand displacement amplification, SDA): PCR'a benzeyen bu yöntem Escherichia coli DNA polimerazı Klenow parçasının çift zincirli DNA üzerinde kesilmiş tek zincir varlığında, bu noktadan başlayarak, bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme yeteneğine dayanır. Yöntemin özgüllüğü, aranan etkene özgül DNA dizilerini tanıyacak primerlerin kullanılmasına bağlıdır (45).

Transkripsiyona bağlı çoğaltma (transcription mediated amplification): Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA'dır. Önce ribozomal RNA'nın "reverse transcriptase" ile DNA kopyası çıkarılır, sonra bundan RNA polimeraz ile yeniden birçok RNA kopyası yapılır. Tepkimelerin kendi kendini tekrarlaması ile ürün çoğaltılmış

olur. *M.tuberculosis*'e özgül bir işaretli prob ile çoğaltılan ürünün varlığı belirlenir. Bin kopya RNA bu iş için yeterli olmaktadır. Bu da bir basilde bulunan ribozomal RNA'nın yarı miktarına eşdeğerdir (66).

Tüberküloz epidemiyolojisi

Dünyada durum: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2006 Küresel Tüberküloz Kontrolü Sürveyans, Planlama, Bütçeleme Raporuna göre toplam 199 ülkede Sürveyans ve tarama sonuçlarını kullanarak yapılan hesaplama göre güncelleştirilen insidans tahminleri şöyledir. 2004 yılında 8,9 milyon yeni olgu olduğunu (100.000 nüfusta 140), bunlardan 3,9 milyonunun (100.000' de 62) yayma pozitif olduğu tahmin ediliyor. Olguların prevalans rakamları ise, 14,6 milyon (229/100.000), bunlardan 6,1 milyonu yayma pozitifdir (100.000' de 95). 2004 yılında 1,7 milyon insan (100.000' de 27) tüberkülozdan ölmüştür (1).

Türkiye'de durum: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2006 Küresel Tüberküloz Kontrolü Sürveyans, Planlama, Bütçeleme Raporuna göre ülkemizde tüberküloz'un güncelleştirilen insidansı şöyledir: 19.944 olgu (100.000' de 28), bunlardan 8.974' ünün (100.000'de 12) yayma pozitif olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde 2004 yılında 3.815 kişinin (100.000'de 5) bu nedenle hayatını kaybettiği saptanmıştır (2).

GEREÇ ve YÖNTEM

GEREÇLER:

PPD İÇİN:

1. Tuberculin PPD RT 23 SSI (Statemens Serum Institute, Denmark),
2. İnsulin enjektörü,
3. Milimetrik cetvel.

T-SPOT™ .TB İÇİN:

1. TİCARİ KİTİN SAĞLADIKLARI:

- a. İFN γ ' ya karşı fare monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuktan oluşan mikrotiter tabak,
- b. *M.tuberculosis* ' e spesifik antijen, Panel A (CFP-10),
- c. *M.tuberculosis* ' e spesifik antijen, Panel B (ESAT-6),
- d. Pozitif kontrol için Phitohemaglotunin (PHA),
- e. Alkaline-phosphatase (ALP) ile konjuge edilmiş ve konsantre edilmiş karışım, (İFN γ ' ya karşı fare monoklonal antikor ve antimikrobiyal ajanlar içerir.),
- f. Substrat solüsyonu (BCIP/NBT plus).

2. DİĞER GEREÇLER:

- a) BD Vacutainer, CPT™ Tüpler,
- b) Santrifüj,
- c) PMNL sayabilmek için otomatize sistem,
- d) %5 CO₂' li ortam sağlayacak inkubator (NAPCO™ 5400),
- e) Plağı elle yıkamak için gerekli gereç, (8 kanallı otomatik pipet),
- f) Otomatik pipetler ve pipet uçları,
- g) Phosphate buffered saline (PBS),
- h) Distile ya da deiyonize su,
- i) Okuma işlemi için mikroskop,
- j) Hücre kültür vasatı GIBCO AIM-V™.

YÖNTEM:

Bu çalışma, 2006 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz (GTBC) anabilim dalı ve Diyarbakır Göğüs Hastalıkları Hastanesinin (DGHH) katkılarıyla Dicle Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyonu (DÜAPK) proje araştırma fonları desteği yapılmıştır.

Çalışma Grupların Oluşturulması:

Çalışmaya DÜTF GTBC kliniği ve DGHH Tüberküloz kliniğinde yatan yayma pozitif aktif akciğer tüberkülozlu hastalar ile buların ev içi temaslıları ve her iki hastanenin Tüberküloz kliniği ve laboratuvarı çalışanları alındı.

Grupların oluşturulma kriterleri:

1. Hasta Grubu için (Grup 1): Son dört hafta içinde yayma ve/veya kültür pozitif olarak saptanan hastalardan tedavi almayan ve/veya iki haftadan kısa süre tedavi alanlar,
2. Ev içi temaslılar için (Grup 2): Hasta grubunda bulunanlarla son bir yıl içerisinde aynı evde yaşıyor olmak,
3. Klinik ve Laboratuvar Personeli için (Grup 3): Altı aydan uzun süre Tüberküloz kliniği veya laboratuvarında çalışıyor olmak,
4. Kontrol Grubu için (Grup 4): Herhangi bir şekilde tüberküloz ile temas öyküsü olmamak.

TDT' nin Uygulanması:

Tüberkülin deri testi için 5 IU PPD (Tuberculin PPD RT 23 SSI, Statens Serum Institute, Denmark, 5 PPD- S tüberkülin aktivitesinde) kullanıldı. PPD çalışmaya alınan herkesin kollarının volar yüzeyine intradermal olarak yapıldı ve test 48–72 saat sonra değerlendirildi. Sonuçlar Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın önerdiği şekilde yorumlandı:

BCG ile aşılanmışlarda:

0-5 mm negatif kabul edildi,

6-14 mm BCG' ye atfedildi,

15 mm ve üzeri pozitif kabul edilip, infeksiyon olarak değerlendirildi.

BCG ile aşılanmamışlarda:

0-5 mm negatif kabul edildi,

6-10 mm arasındaki değerlerden, 6-9 mm şüpheli kabul edilerek, 1 hafta sonra test tekrarlandı, tekrar sonuçları 6-9 mm arasındaki değerlerde ise negatif, 10 mm ve üzerindeki değerlerse pozitif kabul edilerek infeksiyon olarak değerlendirildi,

10 mm ve üzeri pozitif kabul edildi ve infeksiyon olarak değerlendirildi.

T-SPOT™ .TB' nin Uygulanması:

1. 50 µl negatif kontrol (Hücre kültür vasatı GIBCO AIM-V™) kuyucuklarına yerleştirildi,
2. 50 µl pozitif kontrol (PHA) kuyucuklarına yerleştirildi,
3. 50 µl Panel A (CFP-10 proteini) test kuyucuğuna yerleştirildi,
4. 50 µl Panel B (ESAT-6 proteini) test kuyucuğuna yerleştirildi,
5. Olgulardan alınan kandan kitin önerdiği şekilde hazırlanan, 100µl de 250.000 PKMH' si içeren karışımdan negatif ve pozitif kontrol kuyucukları ile her iki test kuyucuğuna (Panel A ve Panel B) eklendi,
6. 37 (±1) °C ve %5 CO₂' li ortamda 16-20 saat inkube edildi,
7. İnkubasyondan sonra mikrotiter tabaktaki kuyucuklar 4 kez 200µl PBS ile yıkandı,
8. 50 µl miktarında çalışma konjugatları (Alkaline-phosphatase (ALP) ile konjuge edilmiş ve konsantre edilmiş karışım) tüm kuyucuklara eklendi,
9. 4 °C de 60 dakika inkube edildi,
10. Mikrotiter tabaktaki kuyucuklar 4 kez 200µl PBS ile yıkandı,
11. 50 µl BCIP/NBT substrat solüsyonu tüm kuyulara eklendi,
12. 7 dakika oda ısısında inkube edildi,
13. Kuyucuklar distile suyla yıkandı,
14. Mikrotiter tabak, karanlık ve iyi havalandan bir yerde ya da 37 °C üzerinde bir ortamda kurumaya bırakıldı,
15. Kuyucuklar içindeki renkli noktalar, mikroskop ile sayıldı.

SONUÇLAR DEĞERLENDİRİLMESİ

1. Negatif kontrolde nokta sayısı 5 veya daha az ise;
 - a. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontrolden 6 fazla ise test pozitif kabul edildi,
 - b. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontrolden ≤ 5 daha fazla ise test negatif kabul edildi, değilse pozitif kontrole bakıldı, 20 veya üzerinde nokta varsa test negatif kabul edildi. Pozitif kontroldeki nokta sayısı 20’ den az ise test anlamsız olarak değerlendirildi.
2. Negatif kontrolde nokta sayısı 6-10 ise;
 - a. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontrolün iki katı veya iki katının üzerindeyse test pozitif kabul edildi,
 - b. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontrolün iki katı veya iki katının üzerinde değil ve pozitif kontrol kuyucuğunda 20 ve üzerinde nokta varsa test negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontroldeki nokta sayısı 20’ den az ise test belirsiz (arada) olarak değerlendirildi ve test tekrar edildi.
3. Negatif kontrolde nokta sayısı 11-20 ise;
 - a. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontrolün üç katı veya üç katının üzerindeyse test pozitif kabul edildi,
 - b. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontrolün iki katının altında ve pozitif kontrol kuyucuğunda 20 ve üzerinde nokta varsa test negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontroldeki nokta sayısı 20’ den az ise test belirsiz (arada) olarak değerlendirildi ve test tekrar edildi,
 - c. Panel A veya Panel B’ deki nokta sayısı negatif kontroldeki nokta sayısında fazla değilse negatif olarak değerlendirildi,
4. Negatif kontrolde nokta sayısı 20 ve üzerinde ise sonuç negatif olarak değerlendirildi.

İSTATİKSEL ANALİZ:

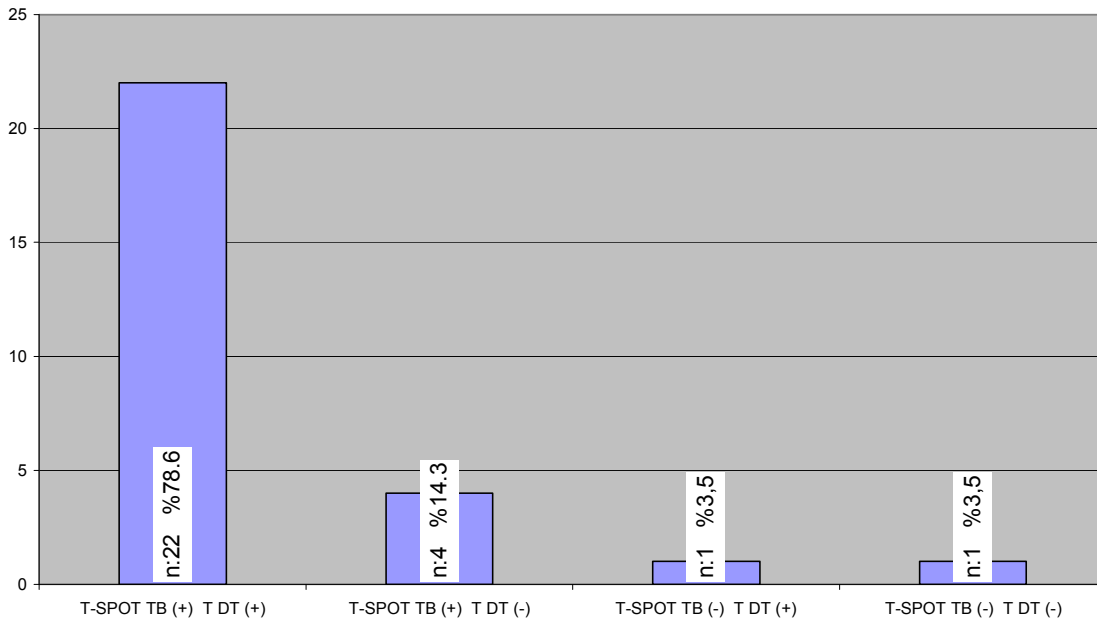
Çalışmamızdaki veriler değerlendirilirken olguların, BCG aşılama durumu, TDT sonuçları ve tam T-SPOT™ .TB’ i sonuçları Microsoft Excel 2003 programına girilmiştir. Daha sonra veriler SPSS 15.0 (SPSS INC, Chicago, IL, USA) programına aktararak istatistiksel analiz yapılmıştır. İstatistiksel analizde gruplar arasındaki farklar ki-kare testi ile belirlenmiştir.

BULGULAR

Çalışma, 01.01.2006 ile 30.06.2006 tarihleri arasında DÜTF Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji araştırma laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya yaşları 18 ile 63 yaş arasında (ortalama 41) 28 hasta, yaşları 17 ile 61 arasında değişen tüberküloz temas öyküsü olmayan 28 sağlıklı birey, yaşları 18 ile 58 arasında (ortalama 37) değişen 56 ev içi temaslı ve yaşları 22 ile 63 arasında (ortalama 39) değişen 66 tüberküloz kliniği ve laboratuvarı çalışanı, olmak üzere toplam 178 (120' u BCG ile aşıllı 58'i aşısız), kişi dahil edildi.

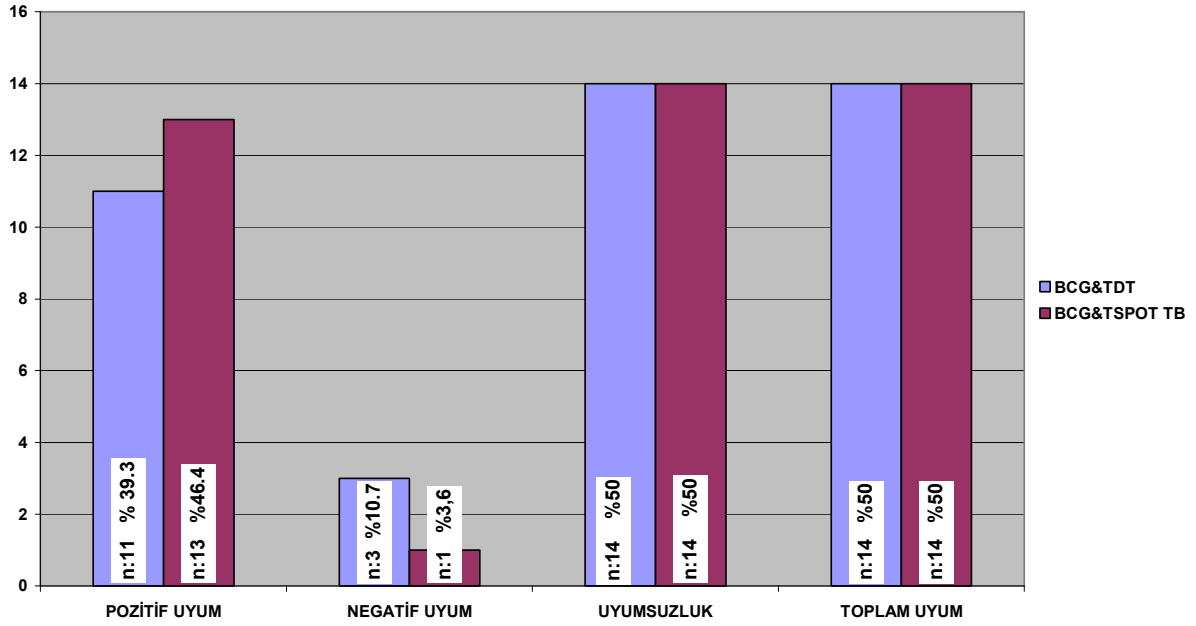
Grup 1(n=28): Yayma ve kültür pozitif aktif hastalardan oluşan bu grupta; T-SPOT™ .TB testi 26(%93) olguda pozitif iken 2 (%7) olguda ise negatifti. Negatif olguların birinde TDT de negatifti. TDT testi 22(%78) olguda pozitif iken, 6 (%22) olguda negatif sonuç bulunmuştur (Grafik 1).

Grafik 1: T-SPOT. TB, TDT Uyum Grafiği (GRUP 1 n:28)



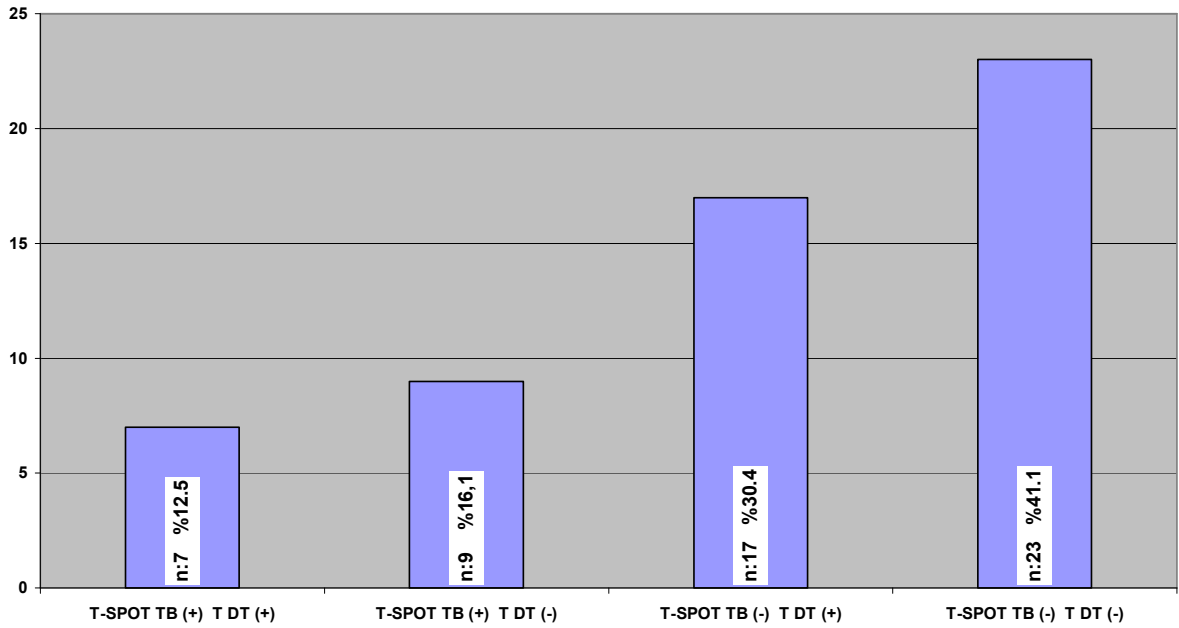
Olgulardan BCG ile aşılanmış olanların sayısı 14 idi, bunların 11'inde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken 2'sinde yalnızca T-SPOT™ .TB pozitif, 1'inde her iki test birlikte negatifti. Olgulardan BCG ile aşılanmamış olanların sayısı da 14 idi. Bunların da 11'inde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken 2'sinde yalnızca T-SPOT™ .TB pozitif, 1'inde her iki test birlikte negatif olarak saptandı(Grafik 2).

GRAFİK 2: BCG ile TDT, T-SPOT TB Uyum Grafiği (Grup 1 n:28)



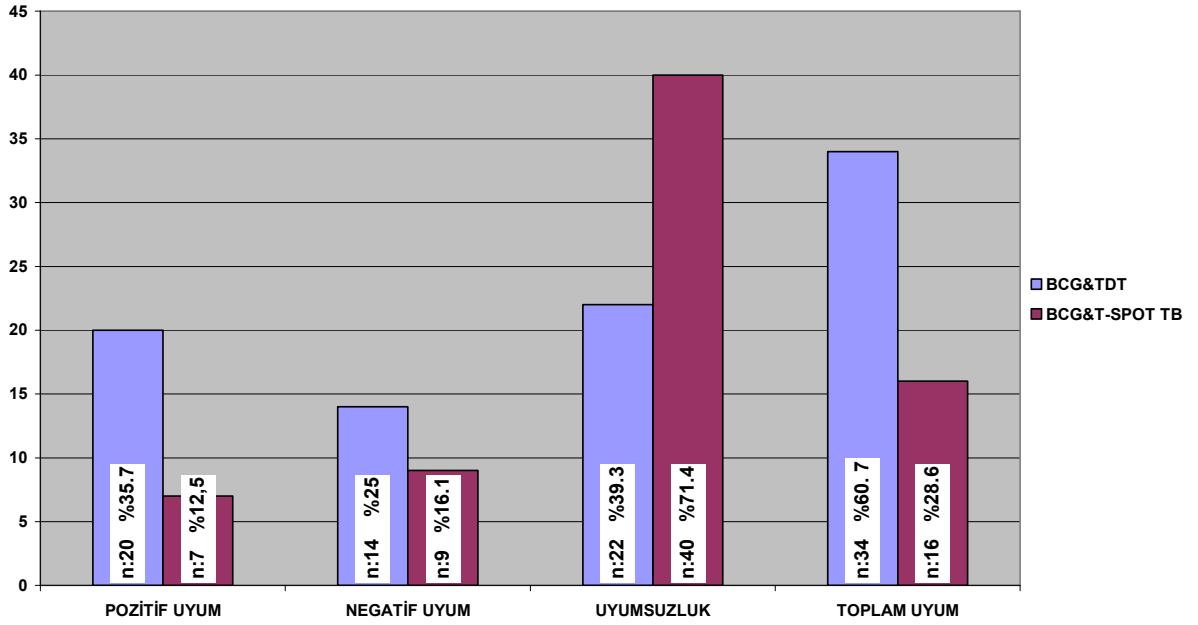
Grup 2 (n:56): Ev içi temashların yer aldığı bu grupta; T-SPOT™ .TB 16 (%28,6) olguda pozitifken, bunların 7'sinde (%43,75) TDT pozitif olarak bulundu, geri kalan 40 (%71,4) olgudaysa negatif, bunlardan 17 (%30,4) olguda TDT pozitif. TDT testi toplam 24 (%42,9) olguda pozitif, negatif TDT sayısı ise 32 (%57,1) idi (Grafik 3).

GRAFİK 3: T-SPOT TB & TDT Uyum Grafiği (Grup 2 n:56)



Olgulardan BCG ile aşılanmış olanların sayısı 38 idi, bunların 5'inde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken 2'sinde yalnızca T-SPOT™ .TB pozitif, 15'inde yalnızca TDT pozitif, 16'sında her iki test birlikte negatif bulundu. Olgulardan BCG ile aşılanmamış olanların sayısı 18 idi, bunların 2'sinde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken 7'sinde yalnızca T-SPOT™ .TB pozitif, 2'sinde yalnızca TDT pozitif, 7'sinde her iki test birlikte negatif olarak bulundu (Grafik 4).

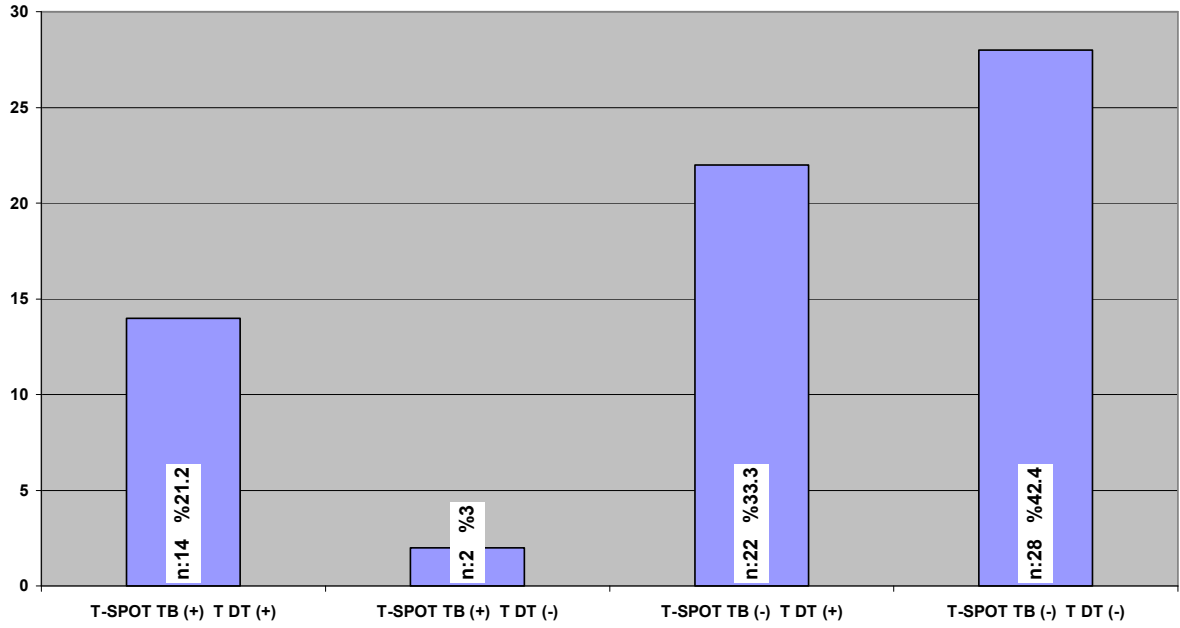
GRAFİK 4:BCG ile TDT, T-SPOT TB Uyum Grafiği (Grup 2 n:56)



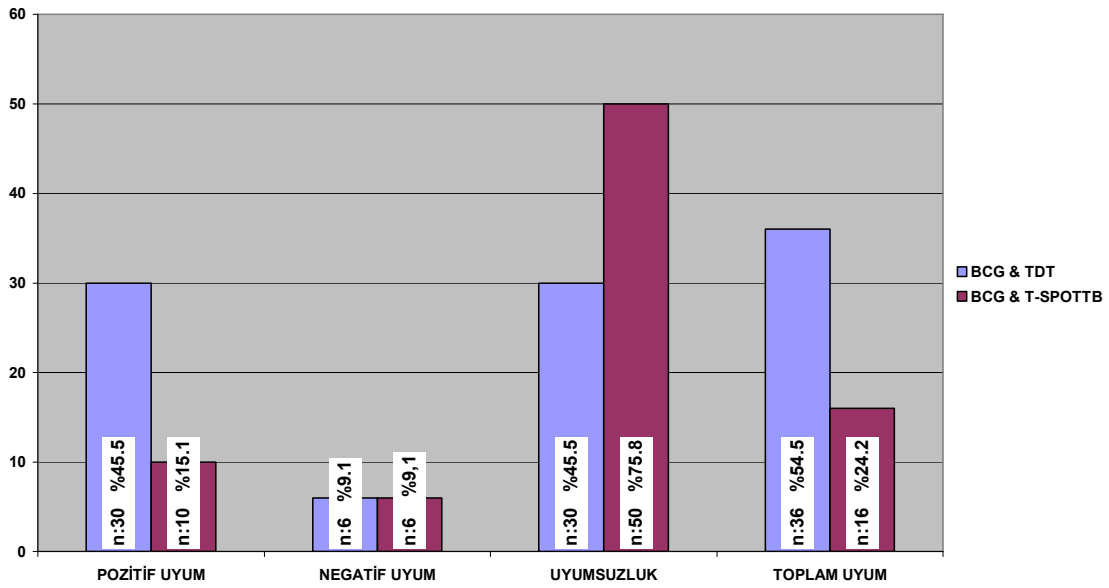
Grup 3 (n:66): Tüberküloz kliniği ve laboratuvarı personelinin yer aldığı bu grupta; T-SPOT™ .TB 16 (%24,2) olguda pozitif olarak saptandı. Bunların 14'ünde (%87.5) TDT pozitif, geri kalan 50 olguda (%75.8) ise negatifti. Bunlardan 22'si (%33.3) TDT pozitif. TDT testi toplam 36 (%54,5) olguda pozitifken, 30 (%45.4) olguda negatif olarak bulundu (Grafik 5).

Olgulardan BCG ile aşılanmış olanların sayısı 54 idi, bunların 10'unda TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken; T-SPOT™ .TB pozitif hiçbir olguda yalnız başına pozitif bulunmadı. Bunun aksine olguların 20'sinde (%37.0) yalnızca TDT pozitif, 24'ünde (%44.4) ise her iki test birlikte negatif olarak bulundu. Olgulardan BCG ile aşılanmamış olanların sayısı 12 idi, bunların 4'ünde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken (%33.3), 2'sinde (%16.7) yalnızca T-SPOT™ .TB pozitif, 2'sinde (%16.7) yalnızca TDT pozitif, 4'ünde (%33.3) ise her iki test birlikte negatif olarak bulundu.

GRAFİK 5: TDT & T-SPOT TB Uyum Grafiği (Grup 3 n:66)

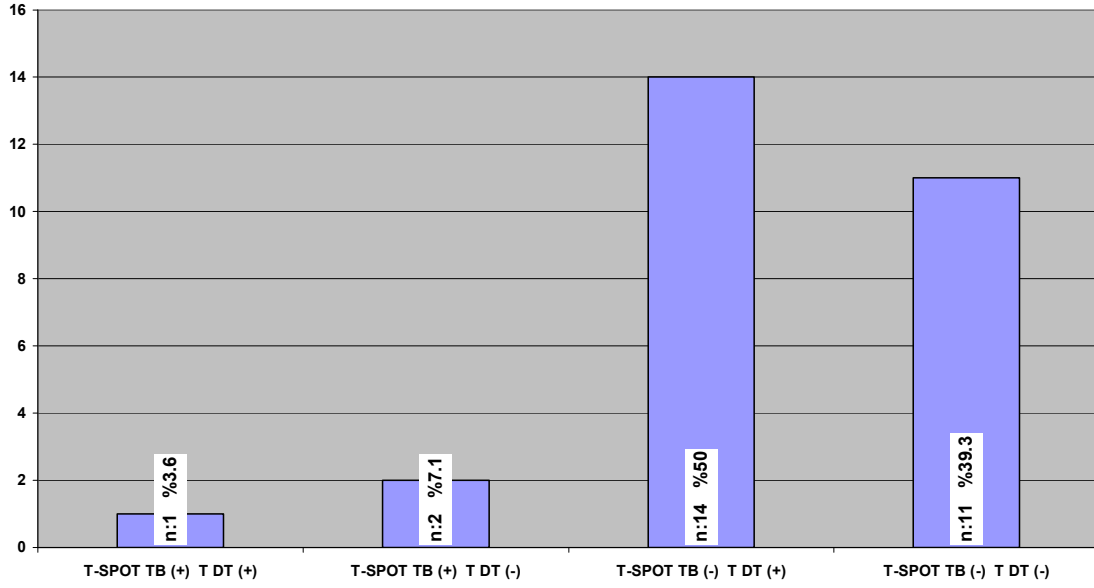


GRAFİK 6: BCG ile TDT, T-SPOT TB Uyum Grafiği (Grup 3 n:66)



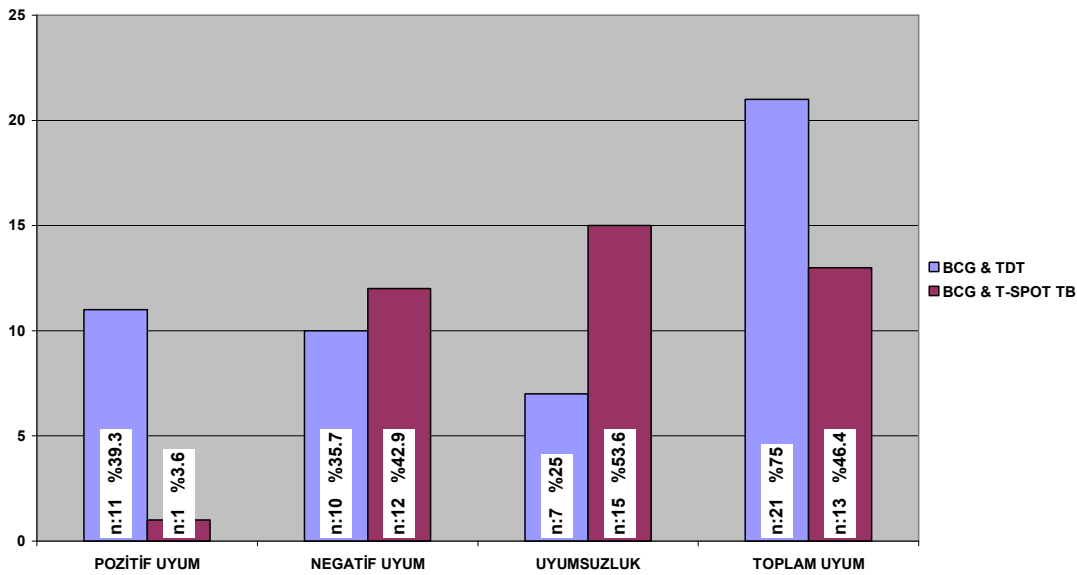
Grup 4 (n:28): Tüberküloz temas öyküsü olmayan sağlıklı bireylerin yer aldığı bu grupta; T-SPOT™ .TB 3 olguda (%10.7) pozitif. Bunların yalnızca 1'inde TDT pozitif olarak bulundu. TDT ise 15 olguda (%53.6) pozitif olarak değerlendirildi (Grafik 7).

GRAFİK 7: TDT & T-SPOT TB Uyum Grafiği (Grup 4 n:28)



Olgulardan BCG ile aşılanmış olanların sayısı 14 idi, bunların 1'inde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunurken, T-SPOT™ .TB pozitif hiçbir olguda yalnız başına pozitif bulunmadı. 10 olguda yalnızca TDT pozitif, 3'ünde ise her iki test birlikte negatif olarak bulundu. Olgulardan BCG ile aşılanmamış olanların sayısı 14 idi, bunların hiçbirinde TDT ile T-SPOT™ .TB birlikte pozitif bulunmazken, 2'sinde yalnızca T-SPOT™ .TB pozitif, 4'ünde yalnızca TDT pozitif, 8'inde her iki test birlikte negatif olarak bulundu (Grafik 8).

GRAFİK 8: BCG ile TDT , T-SPOT TB Uyum Grafiği (Grup 4 n:28)



Toplam 178 olgunun değerlendirildiği çalışmamızda, olgular gruplarına ve yüksek risk gruplarındakiler BCG aşılama durumlarına göre değerlendirilerek, istatistiksel analiz uygulanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. TDT ile T-SPOT. TB Sonuçlarının Karşılaştırılması

Değişken	N	Pozitif Uyum	Negatif Uyum	Toplam Uyumsuzluk	Toplam Uyum	Kapa Değeri (P Değeri)
Grup 1	28	78,6	7,1	14,3	85,7	K= 0,681 (p<0,001)
Grup 2	56	12,5	41,1	46,4	53,6	K= 0,011 (p>0,05)
Grup 3	66	21,2	42,4	36,4	63,6	K= 0,305 (p=0,006)
BCG (+) (Grup 2,3)	92	16,3	43,5	40,2	59,9	K= 0,237 (p=0,005)
BCG (-) (Grup 2,3)	30	20	36,7	43,3	56,7	K= 0,133 (p>0,05)

En yüksek uyum aktif akciğer tüberkülozlu olguların bulunduğu Grup 1’de %85.7 (K= 0.681 (p<0.001)) olarak saptandı. Grup 3’te her iki testin arasında, düşük oranda (%63.6(K= 0.305 (p=0.006)) uyum olmasına rağmen, Grup 2’den (%53.6 (K= 0.011 (p>0.05)) anlamlı şekilde daha yüksek olarak saptanmıştır.

Her iki risk grubu, BCG ile aşılama durumuna göre değerlendirildiği zaman; aşıllı olanlarda pozitif uyum, aşısız olanlardan daha düşük (%16.3, %20), negatif uyum ise belirgin olarak daha yüksek (%43.5, %36.7) bulunmuştur. Her iki gruptaki toplam uyum, aşıllı olanlarda çok az da olsa daha yüksek olmakla birlikte her iki grupta da (K= 0.237 (p=0.005), K= 0.133 (p>0.05)), düşük düzeyde saptanmıştır.

Testler arasında yalnızca Grup 1’de anlamlı düzeyde uyum saptanırken (p<0.001), diğer gruplardaki uyum anlamsız bulunmuştur (Grup 2; p>0.05, Grup 3; p=0.006, BCG’ lilerde; P=0.005, BCG’ sizlerde; p>0.05).

Testler BCG ile uyumlarına göre değerlendirildiklerinde; tüm gruplarda BCG ile TDT arasındaki uyumun BCG ile T-SPOT™ .TB arasındaki uyumdan yüksek olarak saptanmıştır (Tablo4, Tablo 5). BCG ile TDT arasındaki toplam uyum %59.0 iken, BCG ile T-SPOT™ .TB arasındaki toplam uyum %33.1 olarak bulunmuştur.

Tablo 4: BCG&TDT Uyum Düzeyleri

	BCG&TDT UYUMU			
	Pozitif Uyum	Negatif Uyum	Toplam Uyum	Uyumsuzluk
Grup 1	%46.4	%3.6	%50.0	%50.0
Grup 2	%35.7	%25.0	%60.7	%39.3
Grup 3	%45.5	%9.1	%54.5	%45.5
Grup 4	%39.3	%35.7	%75.0	%25.0
Toplam	%41.6	%17.4	%59.0	%41.0

Tablo 5: BCG&T-SPOT TB Uyum Düzeyleri

	BCG&T-SPOT TB UYUMU			
	Pozitif Uyum	Negatif Uyum	Toplam Uyum	Uyumsuzluk
Grup 1	%39.3	%10.7	%50.0	%50.0
Grup 2	%12.5	%16.1	%28.6	%71.4
Grup 3	%15.1	%9.1	%24.2	%75.8
Grup 4	%3.6	%42.9	%46.4	%53.6
Toplam	%16.3	%16.9	%33.1	%67.9

Yalnız riskli gruplar değerlendirildiğinde, BCG ile TDT arasındaki toplam uyum (%57.4), BCG ile T-SPOT™ TB arasındaki toplam uyumdan (%27.0) yüksek saptanmıştır (Tablo 6)

Tablo 6: Riskli Gruplarda BCG ile Testler Arasındaki Uyum Oranları

UYUM	Pozitif Uyum	Negatif Uyum	Toplam Uyum	Uyumsuzluk
BCG & TDT	%41.0	%16.4	%57.4	%42.6
BCG & T-SPOT TB	%13.9	%13.1	%27.0	%73.0

TARTIŞMA

Tüberkülozun yaygın olduğu toplumlarda, tüberküloz kontrol programlarının önemli bir bölümü, infekte kişilerin tanısı ve tedavisini içermektedir. TDT ve kemoterapinin hedefi düşük insidanslı LTBI' un belirgin tüberküloz infeksiyonuna ilerlemesini önlemektir.

TDT' nin uygulamasında; testi değerlendirmek için hastanın geri gelmesi, testin uygulanmasının ve değerlendirilmesinin değişkenlik göstermesi ve yorum farklılıkları içermesi gibi zorluklar içermektedir (67, 68). Ayrıca BCG aşılması ve tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonlarından kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle BCG ile çapraz reaksiyon vermeyecek antijenlerin arayışına gidilmiştir. Bu açıdan ESAT-6 ve CFP-10 proteinlerinin tanınması büyük bir gelişmedir.

Bu proteinler, *M. tuberculosis* genomunda "Region of Difference 1" (RD1) bölgesinden kodlanmıştır ve BCG ile diğer birçok tüberküloz dışı mikobakteride bulunmamaktadır (5, 27). LTBI' li kişilerde *M. tuberculosis*' in bu gibi spesifik antijenlere cevap olarak hafıza T hücreleri INF- γ üretirler. Bizim de, çalışmamızda kullandığımız RD1 – INF - γ bazlı testlerde ki amaç; PKMH' ni *M. Tuberculosis*' in RD1 bölgesinde kodlanan spesifik antijenleri ile uyarılması sonucunda, salgılanan INF- γ ' u (ELISA ile) ya da INF- γ üreten hücreleri (ELISPOT ile) saptamaktır (67, 69).

Çalışmamızda kullandığımız T-SPOTTM.TB testinin temeli (Oxford Immunotec, Oxon, İngiltere); tüberküloz basili ile infekte kişinin kanında ESAT-6 ve CFP-10 antijenlerine karşı spesifik INF- γ salgılayan CD4 T hücrelerin saptanması esasına dayanır.

Lee ve ark. (70) prospektif olarak 2 exvivo hücrel interferon (INF- γ) yanıtına dayanan kan testi ile TDT'ni 87'si aktif tüberkülozlu ve 131'i risk grubunda olmak üzere toplam 218 kişide karşılaştırmışlardır. T-SPOTTM.TB testinin duyarlılığının (%95.4), TDT' ye yanıt 10mm ve üzeri pozitif alındığında, (%66.7 p<0.001) ve QFT-G (%70.1) testinden daha sensitif bulmuşlardır (her biri için p<0.005). QFT-G testinin özgüllüğü, T-SPOTTM.TB' den daha yüksek olmasına rağmen (%91.6, %84.7), bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.13). *M. tuberculosis* infeksiyonunun tespiti için, INF- γ ölçen iki testin performansında bazı farklar olmasına rağmen, her ikisi de TDT' ne göre üstün bulunmuşlardır.

Diel ve ark. (71), Almanya’ da Polis Akademisinde *M. tuberculosis* salgını sırasında TDT’ ni ELISPOT ile kıyaslamışlardır. 36’sı yakın temaslı 333’ü rastlantısal temaslı olgu araştırılmaya dahil edilmiştir. TDT 5mm ve üzerinde pozitif olanlara ELISPOT testi uygulandığında; 36 yakın temasının 19’unda (%53), 333 rastlantısal temasının 52’sinde (%16) pozitif tespit edilmiştir. Toplam olarak 71 TDT pozitif olgunun 56’sında (%78,9) ve 298 TDT negatif olgunun 27’sinde (%9.1) ELISPOT testinin pozitif olduğu saptanmıştır ve TDT ile ELISPOT arasındaki uyum düşük bulunmuştur. Tersine aşısız kişilerde TDT’ inde endurasyon çapı 10mm ve üzeri pozitif kabul edildiğinde; TDT ile ELISPOT arasında kuvvetli uyum olduğu tespit edilmiştir. BCG aşıllı kişilerde, LTBI tanısında ELISPOT’ un TDT’ den daha iyi bir gösterge olduğu ortaya konulmuştur.

Ewer ve ark. (72) İngiltere’de bir okulda tek bir olgudan kaynaklanan bir tüberküloz salgınında *M. tuberculosis* bulaş riski nedeniyle 535 öğrencide TDT ve ELISPOT test ile tarama yapmışlardır. Tüm olgularda, testleri, BCG aşılama ve birbirleri ile aralarındaki uyum açısından karşılaştırmışlardır. TDT ile ELISPOT testleri arasında uyum bulunmuştur (%89 uyum $K = 0.72$, $p < 0.0001$). Bununla birlikte TDT anlamlı bir biçimde BCG aşısı yapmış kişilerde pozitif bulunurken; ELISPOT testi pozitifliği ile BCG aşılama arasında uyum olmadığını bulmuşlardır. ELISPOT testi *M. tuberculosis*’ e maruziyeti saptama açısından TDT’ ye göre daha üstün bulunmuştur.

Meier ve ark. (73) rastgele seçilmiş tüberkülozlu ya da tüberküloz şüpheli 90 hastada T-SPOTTM.TB testini klasik tanı yöntemleriyle kıyaslamışlardır. T-SPOTTM.TB testi akciğer ve akciğer dışı tüberkülozlu 72 hastanın 70’ inde (%97.2) pozitif saptamışlardır. Hem TDT hem de T-SPOTTM.TB yapılan 59 hastanın 45’inde akciğer ve akciğer dışı tüberküloz gösterilmiş ve bunların hepsinde T-SPOTTM.TB testi pozitif bulunurken (%100), TDT sadece 40’ ında (%82) pozitif olarak bulunmuştur. T-SPOTTM.TB testinin klinik uygulamada %97 tanısal duyarlılığa sahip olduğunu göstermişlerdir. T-SPOTTM.TB enfeksiyonu tespit etmede duyarlı bir test olduğunu düşük insidanslı yerlerde tüberkülozu saptamada, tanı algoritmasına ek bir fayda sağladığını bildirmişlerdir.

Lalvani ve ark. (69) bakteriyolojik olarak doğrulanmış 47 tüberküloz hastasının 45’inde ELISPOT testinin pozitif olduğu ve testin duyarlılığının %96 olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada tüberküloz dışı hastalığı olan bireylerin oluşturduğu kontrol grubundaki 47 vakanın 36’sı (%77) BCG aşıllı olmasına rağmen sadece 4’ü ELISPOT testine

pozitif cevap vermiş ve bu teste cevap vermiş olanların sadece 1 tanesi BCG pozitif bulunmuştur. Böylece testin özgüllüğü de %92 olarak belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada tüberküloz hastalığı olan 26 hastaya TDT yapılmış ve bunların 18'i (%69) pozitif bulunmuştur ($p=0.003$). Bu 26 hastanın 22'sinde (%88) ELISPOT testine pozitif yanıt vermiştir. Bu çalışmada TDT'nin duyarlılığı %69 olarak bulunurken, ELISPOT testinin duyarlılığı %96 olarak tespit edilmiştir ve iki tanı yöntemi arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.003$).

INF- γ yanıtına dayalı testler ile, aktif tüberkülozlu hastalarda ve latent infeksiyon riski yüksek olan asemptomatik bireylerdeki, *M. tuberculosis* infeksiyonunun hızlı tespitini olanaklı kıldığı, aynı zamanda BCG aşılması ile *M. tuberculosis* infeksiyonu ayırımını başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu durum, endemik bölgelerde tüberküloz kontrolünü kolaylaştırmaktadır. Zambia' da yapılan benzer bir çalışmada (74); HIV pozitif ve negatif hastalarda LTBI tespitinde ELISPOT testinin duyarlılığı %90–100 arasında bulunmuş ve immunsuprese hastalarda LTBI' unun tespitinde TDT' ye göre daha duyarlı ve özgül olduğunu saptanmıştır.

Liebeshuetz ve ark. (75) Afrika'da HIV prevalansının yüksek olduğu bir bölgede tüberküloz şüpheli 293 çocukta ELISPOT ve TDT çalışmışlar. Tüberkülozlu çocuklarda ELISPOT duyarlılığının TDT' e göre anlamlı olarak yüksek olarak bulmuşlardır (ELISPOT %83, TDT %63).

Diğer bir çalışmada Richeldi ve ark. (76); kültür ile doğrulanmış TDT yalancı negatif olan asemptomatik immunsupresif bir yetişkinde ELISPOT testini pozitif olarak buldular. ELISPOT testini immunsupresif yalancı negatif TDT' nin olduğu durumlarda tüberküloz tanısına yardımcı olduğunu bildirmişlerdir.

Zellweger ve ark. (77) TDT ile T-SPOTTM.TB testini yayma pozitif akciğer tüberkülozlu bir olgu ile birlikte yaşayan kişilerde kıyaslamışlardır. Sonuçları; yaş, BCG aşılması ve tüberkülozlu olgu ile temas düzeyi ile analiz etmişlerdir. TDT ile temas düzeyi arasında bir korelasyon olmadığını, fakat T-SPOTTM.TB sonuçlarıyla temas düzeyi arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir ($p=0.029$). Daha önce BCG aşılı olan temaslılarda TDT anlamlı olarak, aşılı olmayanlardan daha fazla pozitif (%52, ($p<0.001$)) bulunmuşken, aşılamanın T-SPOTTM.TB (0%)sonuçlarına bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Hill ve ark. (78) Gambia’ da *M. tuberculosis*’ e maruz kalmış çocuklarda TDT ve ELISPOT testini kıyaslamışlardır. Testler arasındaki uyumu %83 olarak bulmuşlar ve uyumsuzluğun anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. ELISPOT testinin TDT’ ye göre biraz daha fazla duyarlı olduğunu ve BCG aşılmasından etkilenmediğini belirtmişlerdir. Maksimum duyarlılık önemli olduğu zaman, her iki testin birlikte kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Wrighton-Smith P. ve ark. (79), yaptıkları çalışmada LTBI taraması için 3 farklı grup oluşturmuşlar, birinci gruba sadece TDT, ikinci gruba sadece T-SPOT™.TB, üçüncü gruba ise önce TDT uygulayıp pozitif sonuç verenlere T-SPOT™.TB testini uygulamışlardır. Bunlardan üçüncü gruptaki sonuçların en efektif olduğunu bulmuşlar ve LTBI taramasında daha uygun olacağını belirtmişlerdir.

Doherty TM. ve ark. (80), yaptıkları çalışmada; tüberküloz hastalarıyla teması bulunan, tüberküloza bağlı herhangi bir belirtisi olmayan ve enfeksiyona ilişkin radyolojik veya başka herhangi bir bulgusu olmayan, 24 sağlıklı kişiyi 2 yıl boyunca takip etmişlerdir. Tüberküloz hastalığı geliştiren 7 temasının 6’sı (%86) çalışma başlangıcında ESAT–6’ ya pozitif yanıt vermiş, diğer grupta ise sadece 3 temaslı (%18) pozitif bulunmuştur (Bu 3 temasının 2’si semptomları olan ancak tüberküloz hastası oldukları mikrobiyolojik olarak kanıtlanamayan gruptadır).

Kolsuz ve ark. (81) yaptıkları çalışmada, 223 tüberküloz temaslı bireyin 6 aylık takibi sonucunda bunların 4’ünde (%1,8) hastalığı tespit etmişlerdir. Geri kalan 219 temaslıdan 137’sine (%61,5) profilaktik tedavi verilmiştir. Profilaktik tedavi verilmeyen 82 temasının 6 aylık izlemi sonucunda, 3. ayda 1 kişide(%1,2), 6. ayda 3 kişide (%4,2) olmak üzere izlem sonunda 4 kişide (%4,9) tüberküloz hastalığı saptanmıştır. Profilaksi alan 137 temasının hiçbirinde aktif hastalık saptanmamış, tüm temashılar değerlendirildiğinde ise ilk 6 ayda 8 (%3,6) olguda tüberküloz hastalığı bulunmuştur.

Arslan (82) çalışmasında, profilaktik tedavi vererek takip ettikleri 380 olgunun 6’sında (%1,6) aktif tüberküloz hastalığı gelişmiştir. Tüberküloz hastalığı gelişen bu 6 temasının 2’sinde (%33,3) TDT pozitifken, RD1-ELISPOT testi 5’inde (%83,3) pozitif bulunmuştur.

Pathan ve ark. (83) yaptıkları çalışmada, temashıların ESAT–6 spesifik CD4 T hücre cevaplarının, kültür negatif tüberküloz hastalarınınkinden anlamlı olarak yüksek (p=0.009),

kültür pozitif TB hastalarınıninkinden ise daha az olsa da anlamlı olarak yüksek ($p=0.044$) bulmuşlardır. “Kültür negatif akciğer TB hastalarının, CD4 T hücre sayısının düşüklüğü, hastalık ilişkili nonspesifik immün baskılanmaya bağlı olsa, tedavi ile spesifik T hücre frekanslarında yükseliş beklenir” hipotezi ortaya atılarak, çalışmaya katılan tüberküloz hastalarının 12’sini takip etmişler. Ortalama 18.6 haftalık tedavi süresi sonrasında, ESAT–6 proteinine spesifik yanıt veren T hücre frekanslarında, % 95 güven aralığında (CI) 0,62 oranında (0,37–0,76) azalma tespit edilmiştir. Bu azalma başlangıç değerinin %38’ine eşittir. Haftalık azalma oranı ortalaması; %5,5’tir (%95 CI, 2,4–8,4). Böylece; bu hipotezin yanlış olduğu, 4 ESAT–6 spesifik T hücreler sayısının, bu kişilerdeki, *M. tuberculosis* basilinin *invivo* varlığı ile ilişkili olduğu varsayımı doğrular bir sonuca varmışlardır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, diğer çalışmalarda da olduğu gibi; LTBI tanısında T-SPOT™.TB testi TDT’ den anlamlı derecede daha duyarlı ve özgül olarak saptandı. TDT’ nin duyarlılığı %78.6 saptanırken T-SPOT™.TB’ nin duyarlılığı %92.9 olarak saptandı. TDT’ nin özgüllüğü %46.4, T-SPOT™.TB’ nin özgüllüğü %89.3 olarak bulunmuştur. Hasta grubu dışında kalan tüm gruplarda BCG ile TDT arasındaki uyum, BCG ile T-SPOT™.TB arasındaki uyumda daha yüksek bulundu (Grup 2: %60.7-%28.6, Grup 3: %54.5-%24.2, Grup 4: %75.0-%46.4,).

BCG ile testler arasındaki toplam uyum; TDT ile %59.0, T-SPOT™.TB ile %33.1 olarak saptandı. Farklılığın, aşı olgulardaki pozitif BCG&TDT (%41.6) uyumun, pozitif BCG&T-SPOT™.TB uyumundan (%16.3) olmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı. Her iki testin BCG ile negatif uyumları; TDT ile %17.4, T-SPOT™.TB %16.9 olarak birbirine yakın oranlarda saptandı.

Testler ile BCG aşılınması arasındaki uyum; yalnızca yüksek riskli gruplar alındığında (Grup 2 ve Grup 3), TDT ile orta düzeyde uyum saptanırken (%65.4), T-SPOT™.TB ile uyum düşük düzeyde (%27) saptanmıştır. Yine riskli gruplarda TDT ile BCG arasındaki pozitif uyum (%41.0), T-SPOT™.TB ile BCG arasındaki pozitif uyumun (%13.9) yaklaşık üç katı kadarken; negatif uyum oranları birbirine yakın (TDT ile %16.4, T-SPOT™.TB ile %13.1) bulunmuştur.

Sonuç olarak; LTBI tanısının doğru konmasında, kimlere tedavi verilmesi gerektiğinin saptanmasında, T-SPOT™.TB testinin TDT’ den daha faydalı olduğu saptanmıştır. Testin maliyetinin yüksekliği, ileri düzey laboratuvar ve yetişmiş personele

ihtiyaç duyulması rutin olarak kullanılmasına engel gibi görünmektedir. Ancak LTBI tanısında yüz yılı aşkın süredir kullanılan TDT; sonuçlarının subjektif olması, test yapılan kişilere 2-3.'üncü günlerde tekrar ulaşılması gerekliliği, aşı yapılan bölgede ikincil nedenlerle reaksiyon oluşabilmesi, kişilerin immün durumları, aşı olmaları ve tüberküloz dışı mikobakteri infeksiyonları nedeniyle, yanlış pozitif veya negatif sonuçlar vermektedir. Buna göre:

1. Yüksek risk gruplarında TDT ile BCG arasındaki pozitif uyumun (%41.0) yüksek olması nedeniyle, T-SPOT™.TB testinin yapılmasının uygun olacağı,
2. Ülkemizde olduğu gibi aşılanmanın rutin olarak yapıldığı ülkelerde; T-SPOT™.TB testinin TDT ile birlikte ve/veya TDT' nin doğrulanması amacıyla uygulanabileceği, bununla ilgili olarak da; T-SPOT™.TB testinin, TDT sonuçlarının doğrulanması amacıyla kullanılırken bir takım kriterlerin geliştirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu,
3. T-SPOT™.TB testinin, LTBI tanısı dışında, özellikle materyale ulaşmanın zor olduğu, klinik olarak tüberküloz düşünülen ancak direk mikrobiyolojik yöntemlerle (Direkt mikroskopi, kültür) tanı konulamayan vakalarda yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle tanıda faydalanılabileceği düşünülmüştür.

ÖZET

Tüberküloz enfeksiyonunun epidemiyolojisinde, LTBI' nun önemi çok büyüktür çünkü LTBI' luların yaklaşık %10'unda hayatlarının bir döneminde aktif tüberküloz hastalığı gelişmektedir. Ancak; LTBI' nun tanısında, yüzyılı aşkın bir süredir kayda değer bir gelişme meydana gelmemiştir. Tanıda duyarlılığı, özgüllüğü ve yorumlanması halen daha tartışmalı olan TDT kullanılmaktadır. Yakın zamanda tanımlanan, *M. tuberculosis*'in RD1 gen bölgesinde kodlanan spesifik antijenlere karşı oluşan immün yanıt ile ilgili çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmektedir.

Çalışmamızda; RD1 gen bölgesinden elde edilen ESAT-6, CFP-10 proteinlerine karşı immün yanıtla oluşan IFN γ , ELISPOT yöntemiyle araştırılmıştır. Bu amaçla, "T-SPOT™ .TB" (Oxford İmmunotec Ltd. Oxon/England) ticari kitleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar aynı deneklere uygulanan TDT sonuçlarıyla kıyaslanmıştır.

Çalışmamızda tüberküloz enfeksiyonu tanısında, T-SPOT™.TB testinin TDT' den anlamlı olarak, daha duyarlı (%92.9, %78.6) ve özgül (%89.3, %46.4) olduğu saptandı. Risk gruplarında BCG ile TDT arasındaki uyum (%57.4), BCG ile T-SPOT™.TB arasındaki uyumdan (%27.0) daha yüksek bulundu. Testler arasındaki en yüksek uyum, aktif akciğer tüberkülozlu olguların bulunduğu Grup 1'de %85.7 (K= 0.681, p<0.001)) olarak saptandı. Grup 3'te her iki testin arasında, düşük oranda (%63.6(K= 0.305, p=0.006)) uyum olmasına rağmen, Grup 2'den (%53.6 (K= 0.011, p>0.05)) anlamlı olarak daha yüksek olarak saptandı.

Sonuç olarak; ülkemizde olduğu gibi aşılamanın rutin olarak yapıldığı ülkelerde; TDT ile birlikte ve/veya TDT' nin doğrulanması amacıyla uygulanabileceği, yüksek risk gruplarında TDT ile BCG arasındaki pozitif uyumun (%41.0) yüksek olması nedeniyle, T-SPOT™.TB testinin yapılmasının uygun olacağı, klinik olarak tüberküloz düşünülen ancak direkt mikrobiyolojik yöntemlerle (Direkt mikroskopi, kültür) tanı konulamayan vakalarda yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle tanıda faydalanılabileceği, düşünülmüştür.

SUMMARY

LTBI is very important in the tuberculosis infection epidemiology because 10% of LTBI have an active tuberculosis infection in a period of their life. There has been no improvement in the diagnosis of LTBI for more than a century. TDT which's specificity sensitivity and explication is contentious is used in the diagnosis. The result of the studies that the immune response to RD1 gene region spesific antigens to *M. tuberculosis* is hopeful and has been identified newly.

IFN γ which occurs by an immune response to RD1 gene region proteins ESAT-6, CFP-10 is analyzed with ELISPOT in our study. For this aim, "T-SPOT™ *TB*" (Oxford Immunotec Ltd. Oxon/England) commercial kits were used. The derivated results were compared with the TDT results of the same subjects.

In this study, we determined that T-SPOT test is significantly more sensitive (92.9%, 78.6%) and more spesific (89.3%, 46.4%) than TDT in diagnosis of tuberculosis infection. Among the risk groups, the concordance rate detected between BCG and TDT (57.4%) was higher than the one between BCG and T-SPOT (27%). The highest concordance rate among the tests was detected as 85.7% ($K = 0.681$ ($p = 0.001$)) in Group 1 which was including active pulmonary tuberculosis cases. Despite, the low concordance rate between the two tests in Group 3 (63.3% ($K = 0.305$ ($p = 0.006$))), this rate was significantly higher than the rate in Group 2. (53.6 % ($K = 0.011$ $p = 0.05$)).

Consequently, among the countries like us where the vaccination is routinely applied, this test may be used with TDT or to confirm TDT results, because of the high positive concordance rate (41.0%) between the TDT and BCG among the high risk groups, the application of T-SPOT™ *TB* test is appropriate and when the diagnosis is clinically predicted but could not be diagnosed by microbiological assays (direct microscopy, culture) it is thought that the application is useful because of high sensitivity and specificity.

KAYNAKLAR

1. http://www.who.int/tb/publications/globalreport/2006/pdf/full_report_correctedversion.pdf
2. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/pdf/eur.pdf
3. Yağcı A. ESAT-6/CFP-10 Bazlı Elispot Tekniğinin Tüberküloz Tanısındaki Yeri, IV. Tüberküloz Sempozyumu 08.12.2005 Malatya Sempozyum Kitabı S: 91-97
4. Health Protection Agency. Tuberculosis
www.hpa.org.uk/infections/topics_az/menu.htm. Date last updated: December 2005.
Date last accessed February. 24. 2006
5. Behr M., Wilson M., Gill W., Salomon H., et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray. Science 1999, 284: 1520-1523
6. Andersen P., Munk ME., Pollock JM., Doherty TM. Specific immun-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356: 1099-1104
7. Kıyan M. Mycobacteriaceae. Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 419-437.
8. Gümüşlü F, Ceyhan İ, Kocagöz T, Sönmez N. Tüberküloz laboratuvar rehberi. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı, 1998: 1-20.
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycobacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997: 703
10. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri infeksiyonları. Mycobacteriaceae. İzmir: Barış Yayınları, 1994: 343-379.
11. Gedikoğlu S. Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı. İnfeksiyon Derg 1997; 11(4:Ek yayın): 13-17.
12. Kocabaş A. Mikobakterilerin yapısal ve antijenik özellikleri. Kocabaş A ed. Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. Ankara: Emel Matbaası, 1991: 47.
13. Aşcıoğlu SA, Hayran M. Tüberküloz. İnfeksiyon Bülteni 1996; 1(1): 5-8.
14. Anđ Ö, Erturan Z. Tüberkülozun dönüşü ve direnç sorunu. Anđ Ö, Uzun M, eds. Tüberküloz tanı, direnç, tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No:26, 1996: 17-25.
15. Kılıçturgay K. Tüberkülozda immünopatogenez. İnfeksiyon Derg 1997; 11 (4: Ek yayın): 7-10

16. Samuelson J. Infectious Diseases. Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. Philadelphia, 1999: 349–351.
17. Bayındır Ü. Solunum Sistemi Hastalıkları. Öbek A, ed. İç Hastalıkları, 3.baskı. Atlas Ofset, 1988: 427.
18. Balcı K. Göğüs hastalıkları: Plevra hastalıkları. 3. Baskı. Konya: Atlas Kitabevi, 1993: 495–525.
19. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Medical Microbiology. 20th eds. Connecticut: Prentice-Hall International Inc, 1995: 263.
20. Murray PR, Drew WC, Kobayashi GS, Thompson JH. Medical Microbiology. Wolfe Medical Publication Ltd, Mosby Company, 1990: 218
21. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of Mycobacterium bovis BCG. Infect Immun. 1993 May;61 (5):1730–4.
22. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, Andersen P. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of Mycobacterium tuberculosis. Scand J Immunol. 1998 Nov;48(5):535–43.
23. Wilcke JT, Jensen BN, Ravn P, Andersen AB, Haslov K. Clinical evaluation of MPT–64 and MPT–59, two proteins secreted from Mycobacterium tuberculosis, for skin test reagents Tuber Lung Dis. 1996 Jun;77(3):250–6.
24. Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Frias RA, Mendoza MT, Montoya JC, Honda I, Haga S, Toida I. MPB64 mycobacterial antigen: a new skin test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 1998 Jul;2(7): 541–6.
25. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. J Immunol. 1995 Apr 1;154 (7): 3359–72.
26. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun. 1995 May;63(5):1710–7.
27. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT–6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent

- Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1996 Jan;64(1):16–22.
28. Non-tuberculosis mycobacteria. 1995–1996 EPINEWS 1997; Week 50, <http://www.ssi.dk/dk/epinyt/1997/uge50.htm>
 29. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.* 1996 Mar;178(5):1274– 82.
 30. Skjot RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, Andersen P. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT–6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun.* 2000 Jan;68(1):214–20.
 31. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3684–9.
 32. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis.* 2003 Jan 1;187(1):117–23.
 33. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(3):709–17.
 34. Michael D. Iseman. *Klinisyenler için Tüberküloz Kılavuzu*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri. 2002; 63–96
 35. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI, editors. *Basic and Clinical Immunology*. Seventh Edition. A Lange Medical Book. 1991;78–100.
 36. Marcucci F, Waller M, Kirchner H, Krammer P. Production of immune interferon by murine T cell clones from long-term cultures. *Nature* 1981; 291: 79.
 37. Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Interleukin-2 mediated immune interferon (IFN- γ) production by human T-cell and T-cell subsets. *J Immunol* 1983; 130: 1784-1789.
 38. Ribera E, Espanol T, Martinez-Vazquez JM, Ocana I, Encaba G. Lymphocyte proliferation and gamma-interferon production after "in vitro" stimulation with PPD:

- differences between tuberculous and nontuberculous pleurisy in patients with positive tuberculin skin test. *Chest* 1990; 97: 1381–1385
39. Moore M, Dawson MM. Interferons. In: Dale MM, Fareman JC, editors. *Textbook Immunopharmacology*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications. 1989: 324–35
40. Paul EW. *Fundamental Immunology*. Second Edition. New York: Raven Press Ltd., 1989.622-623.
41. Shimokata K, Kawachi H, Kishimoto H, Maeda F, Ito Y. Local cellular immunity in tuberculosis pleurisy. *Am Rev Respir Dis* 1982;126: 822–824.
42. Farrar WL, Johnson HM, Ferrar JJ. Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T-lymphocytes by interleukin-2. *J Immunol* 1981; 126:1120-1125.
43. Mısırlıgil Z. Tüberküloz immünolojisi. Kocabas A, editor. *Tüberküloz kliniği ve kontrolü*. Adana:Çukurova Üniversitesi Basımevi, 1991:73-78.
44. Djeu JY, Heinbaugh JA, Holden HT, Herberman RB. Augmentation of mouse naturel killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J Immunol* 1979; 122:175
45. Kocagöz T. Yeni laboratuvar yöntemleri ile tüberküloz tanısı. *infeksiyon Derg* 1997; 11(4:Ek yayın): 29-33
46. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Anđ Ö, Uzun M eds. *Tüberküloz tanı, direnç, tedavi*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:26, 1996: 11–15
47. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. *Mycobacterium*. In: Hausler Wj, Herrmann KL, Isenberg HD, ShadomyHJ, eds. *Manuel of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 304–332
48. Keleşoğlu N. Tüberküloz tanısında bakteriyolojik yöntemler. Kocabaş A ed. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Ankara: Emel Matbaası, 1991: 211–217.
49. Witebsky FG, Conville PS. The laboratory diagnosis of Mycobacterial diseases. *Infec Dis Clin North Amer* 1993; 7 (2): 359.
50. Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı: Mycobacteriumlar. 2.Baskı. İzmir: Barış yayınları, 1995: 567–584.

51. Berlin OGW. Mycobacteria. Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, eds. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. St Louis, Philadelphia, Toronto Baltimore: The CV Mosby Company, 1990: 597.
52. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz tanısında yeni gelişmeler. Anđ Ö, Uzun M eds. Tüberküloz tanı, direnç, tedavi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:26, 1996: 11–15
53. Kasımoğlu Ö. Tüberküloz mikrobiyolojisi. Klimik Dergisi 1989; 2: 3.
54. Siddiqi SH. Bactec TB System, Product and Procedure Manual. Becton Dickinson, 1989.
55. Saniç A, Çoban AY. Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı. Samsun, 1999: 1–2
56. Palaci M, Uleki SYM, Sato DN et al. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996; 34: 762.
57. Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S et al. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol 1996; 34: 2236–2239.
58. Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, Bojak M, Bondi J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture systems. J Clin Microbiol 1997; 35: 2068–2071.
59. Schlossberg D. Tüberküloz. Bilimsel ve Teknik Yazı Çeviri Vakfı 1995: 39–47
60. 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.
61. Özdemir Ö. Tüberküloz tanı yöntemleri. Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri dergisi, Tüberküloz özel sayısı, 1994: 420–4
62. 21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı. Samsun. 2003: 411–427.
63. Charpin D, Herbault H. Value of ELISA using A60 antigen in diagnosis of active pulmonary tuberculosis. Am Rev Resp Dis, 1990, 142: 380–4.
64. Bennedson J, Thomsen VO, Pfyffer GE et al. Utility of PCR in diagnosis pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 1407–1411.
65. 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: 2049–2056.

66. Jonas V, AldenMJ, Curry JI, et al. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from induced sputum specimens using amplification of RNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31,2410
67. Barnes PF. Diagnosing Latent Tuberculosis Infection: Turning Glitter to Gold. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 5-6.
68. Huebner RE, Schein MF., Buss JB. Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis.* 1993 Dec;17(6):968–75.
69. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Mar; 163(4): 824–8.
70. Lee JY, Choi HJ, Park IN, et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur Respir J.* 2006 Jul;28(1):24–30.
71. Diel R, Ernst M, Doscher G, Visuri-Karbe L, Greinert U, Niemann S, Nienhaus A, Lange C. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting Mycobacterium tuberculosis infection with a blood test. *Eur Respir J.* 2006 Jul;28(1):16–23.
72. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalvani A. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet.* 2003 Apr 5;361(9364):1168–73.
73. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Aug;24(8):529–36.
74. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA. et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells. *AIDS.* 2002 Nov 22;16(17):2285–93
75. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet.* 2004 Dec 18–31;364(9452):2196–203.
76. Richeldi L, Ewer K, Losi et al. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med.* 2004 May 4;140(9):709–13.

77. Zellweger JP, Zellweger A, Ansermet S, de Senarclens B, Wrighton-Smith P Contact tracing using a new T-cell-based test: better correlation with tuberculosis exposure than the tuberculin skin test. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005 Nov;9(11):1242–7
78. Hill PC, Brookes RH, Adetifa IM, et al. Comparison of enzyme-linked immunospot assay and tuberculin skin test in healthy children exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. *Pediatrics.* 2006 May;117(5):1542–8.
79. Wrighton-Smith P., Zellweger JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection. *Eur Respir J.* 2006 Jul;28(1): 45–50.
- 80.124- Doherty TM, Demissie A, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT–6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40 (2):704–6.
81. Kolsuz M, Küçükkebabçı C, Demircan N, Uçgun İ, Metintaş M, Erginel S. Akciğer tüberkülozu olgularının yakın temaslılarının 6 aylık izlem sonuçları. *Toraks Dergisi* 2003;4:127–32.
82. Dr.Zeliha Arslan Tüberküloz Hastası İle Temaslı Çocuklarda, Inh. Profilaksisinin Elispot Yöntemi İle Değerlendirilmesi Uzmanlık Tezi İstanbul 2005