

ÇOCUKLUK ÇAĞI TÜBERKÜLOZUNDA TANI YÖNTEMLERİ

Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

Tüberküloz esas olarak akciğeri tutmakla birlikte birçok sistemi etkileyebilen bir hastalıktır. Tanısı diğer bakteriyel hastalıklara göre oldukça sorunludur. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında altın standart olan kültürde etkenin üremesi hem zor, hem de zaman alıcıdır; bu nedenle sıklıkla kültür sonucu çıkana kadar diğer pozitif bulguların ışığında tedaviye başlanmış olur. Tüberküloz tanısında hem tutulan sistemin/organın (akciğer, lenfadenit, merkezi sinir sistemi, böbrek, kemik-eklem gibi) tüberküloz hastalığına spesifik bulgularının değerlendirilmesi (akciğer, beyin omurilik sıvısı değerlendirmeleri gibi), hem de tüberküloz enfeksiyon kanıtlarının (PPD, ARB pozitifliği, DNA hibridizasyonu veya PCR ile mikobakteri DNA'sının belirlenmesi gibi) araştırılması önemlidir. Ayrıca tüberküloz tanısında; aile öyküsü veya hasta bir kişiyle temas öyküsü; başka hastalıklarda beklenenden çok daha fazla önemlidir. Tüberküloz tanısında hem genel *M.tuberculosis* spesifik tanı yöntemlerinin (ARB, PPD, kültür, PCR yöntemleri, lusiferaz gibi), hem de tutulan sisteme göre diğer rutin tanı yöntemlerinin (akciğer grafisi/tomografisi, beyin tomografisi/beyin MR, BOS/plevral/peritoneal sıvı bulguları, balgam veya açlık mide suyu değerlendirmeleri gibi) önemli yeri vardır. Genellikle klinik bulgular ve sistemlere yönelik rutin laboratuvar ile şüphelenilen olgularda spesifik (*M.tuberculosis*'i saptayacak) yöntemlere başvurulur. Sıklıkla da spesifik yöntemlerin sonuçları daha geç geldiğinden klinik temelde ampirik tedavi başlanır. Bu yazıda sadece spesifik tanı yöntemlerinden bahsedilecektir.

Kültür: *M.tuberculosis* yavaş üreyen bir bakteridir. Klasik olarak Löwenstein-Jensen besiyerinde diğer bakterilere göre daha uzun bir sürede (2-8 hafta, ortalama 4 hafta) ürer, 12-21 gün sonra ilk koloniler görülmeye başlayabilir. Daha yeni olan spesifik ve büyümenin radyometrik olarak BACTEC yöntemiyle değerlendirildiği sıvı besiyerlerinde daha kısa sürede (7-14 gün) sonuç alınır. Bu sistemlerde antibiyogram da yapılabilir. Geleneksel yöntemlere göre daha hassastır, BOS'da PCR'la birlikte 2 cfu/ml mikobakteri bile bu kültür metodlarıyla saptanabilir. Kültür sonucunun diğer bakterilere göre oldukça geç çıkması nedeniyle tedaviye, klinik şüphe durumunda, genellikle ampirik başlanır. Kültür en kesin tanı yöntemidir. Ancak çocuklarda hastalığın özelliği itibarıyla az sayıda bakteri bulunduğundan genellikle üretmek çok zordur. Optimal şartlarda alınmış mide açlık suyunda <% 50 (bronkoskopide daha az), plevral hastalıkta plevral sıvıda <% 30, lenf nodu tüberkülozunda <% 50, perikardiyal hastalıkta perikard sıvısında % 30-70, beyin omurilik sıvısında (BOS) optimal şartlarda ve 5-10 ml BOS alındığında % 50-70 civarındadır.

Aside rezistan bakteri (ARB) saptanması (acid-fast staining): Bakterinin spesifik boyama (Ziehl-Neelsen) ile gösterilmesidir. Mikobakteriler bu boyamada mavi zeminde kırmızı renkli çomak veya kokobasil şeklinde görülürler. Başka non-patojenik mikobakterilerin de yanlış pozitif sonuç verebilmeleri ve genellikle yüksek sayıda bakteri varlığında testin pozitif olması gibi sakıncaları yanında yararlı bir test olarak değerlendirilir. Plevral ve perikardiyal hastalıkta nadiren pozitif, menenjitte BOS'da % 30 pozitifdir. Balgamda genellikle bol bakteri (5000/ml) varsa yaymada rahat görülebilir. Ziehl-Neelsen boyamasında ölü bakteriler görülmez. Ziehl-Neelsen boyaması yerine auramine floresan yöntemiyle

de boyama yapılabilir ve mikobakteriler siyah zeminde sarı floresan refle ile görülürler. Bu yöntemde ölü bakteriler de görülebilir. ARB pozitifliği *M.tuberculosis* yanında non-tüberküloz mikobakterilere de bağlı olabilir. Ama klinik ve diğer laboratuvar bulguların tüberkülozu desteklediği bir hastada ARB saptanması tüberküloz için çok değerli bir tanı yöntemidir.

Histopatolojik değerlendirme: Histopatolojik örneklerde (lenfadenit, akciğer, karaciğer gibi biyopsi materyallerinde) tipik granülomatöz iltihap, kazeifikasyon nekrozu ve dokuda ARB müsbet bakterinin görülmesi tanıda çok değerlidir, kesin tanı koydurur. Ancak pediyatrik olguların çoğunda biyopsi alınabilecek bir durum olmaz.

Tüberkülin deri testi (PPD; purified protein derivative; saflaştırılmış protein türevi): Mikobakteriyel proteinlerin enjeksiyonuyla daha önce tüberküloz bakterisiyle karşılaşmış kişide enjeksiyon bölgesine gelen duyarlanmış CD4+ T helper hücreleri tarafından salgılanan sitokinler pnl., monosit ve makrofaj migrasyonuna yol açar. Sitokinlerin lokal inflamatuvar etkileri ve inflamasyon nedeniyle bölgesel kırmızılık ve şişme (eritem) gelişir. Monosit ve makrofajların indüklediği fibrin depozisyonuyla şişlik sertleşir (endurasyon). Tüberkülin yanıtı, infeksiyon gelişen bir kişide 3 hafta - 3 ay (sıklıkla 4-8 haftada) gelişir. Standart olarak 5 tüberkülin ünitesi (TU) (0.1 ml) ön kol volar yüze intradermal olarak yapılır ve 48-72. saatlerde gelişen endürasyonun (hipereminin değil) çapı (enjeksiyon yapılan yöne dik yönde) ölçülür. <48 saatte yapılan değerlendirme farklı immunolojik mekanizmalara bağlı olarak yanlış pozitif sonuç verebilir. Bazan >72 saatte reaksiyon gelişebilir, bu endurasyon da anlamlı kabul edilir. >10 mm endurasyon (tüberkülin pozitifliği) aşı-sız kişide tüberküloz infeksiyonunu gösterir, klinik bulgular olan bir çocukta hastalığı destekler. Tüberkülin deneyi non-tüberküloz mikobakteriyel (NTM) infeksiyon veya BCG aşısına bağlı olarak da pozitif olabilir. NTM infeksiyonda genellikle <10 mm reaksiyon beklenir. Doğumdan sonra yapılan BCG'den 6-12 ay sonra bebeklerin genellikle <50%'inde tüberkülin pozitifliği olduğu ve tüm aşılanmış bebeklerin >5 yıl sonra tüberkülin negatif hale geldikleri kabul edilir. Büyük çocuk ve erişkinlerde bu süre 10-15 yıla uzayabilir. Genelde tüberkülin değerlendirmesinde aşı ve aşı-sız çocuklar aynı şekilde değerlendirilir (Tablo). Ancak ülkemizde genellikle aşıli kişilerin tüberkülin endurasyonları

Tablo. Tüberkülin deri testi endurasyonu pozitif kabul edilen durumlar.

≥5 mm	İnfeksiyöz olgu ile temas, HIV infekte veya başka immunsuprese kişi, Anormal akciğer grafisi veya klinik olarak tüberküloz hastalığı şüphesi.
≥10 mm	Yüksek riskli kişiler (yüksek prevalanslı bölgelerde yaşayan veya göç etmiş olanlar), Kötü sağlık koşullarında yaşayanlar, Yüksek riskli hastalarla ilgilenen sağlık işinde çalışanlar, Yüksek riskli erişkinlerle temas eden çocuklar, Malnutrisyon, <4 yaş çocuklar.
≥15 mm	Risk faktörü olmayan kişiler.

klasik kitaplarda belirtilen değerlerin daha üzerindedir, bu durum tüberküloz infeksiyonunun beklenenden çok daha fazla düşünülmesine (dolayısıyla tekli ilaç tedavisi verilmesine) yol açabilir. Bursa'da yapılan bir çalışmada ilkökul çağı çocuklarında tüberkülin endurasyonu (90 persentil değerleri); aşı-sızlarda 10 mm iken bir, iki ve üç aşı-lılarda sırasıyla 15,

17.5 ve 20 mm olarak çıkmıştır. ≥ 10 mm (klasik bilgilere göre tekli ilaç tedavisi alma endikasyonu) endurasyon üç aşılı çocukların % 95'inde, iki ve bir aşılılarda ise sırasıyla % 69 ve % 36 olarak bulunmuş ve aradaki fark anlamlı çıkmıştır. Bu nedenle yazarların kanısı enfeksiyonu gösterebilecek tüberkülin endurasyonlarının aşı durumuna göre değerlendirilmesinin yararlı olacağı yönündedir. Tüberkülin reaksiyonu; çok küçük bebeklerde, malnutrisyon, immunsupresyon (ilaç, viral hastalıklar; kızamık, kabakulak, suçiçeği, influenza gibi canlı viral aşılar) ve bazan tüberküloz hastalığında da deprese olabilir. Steroid tedavisi etkisi değişken olmakla birlikte deprese edebilir. Tüberküloz hastalığı olan immun-kompetan kişilerin yaklaşık % 10'u (menenjit veya milier tüberkülozda % 50'ye kadar çıkabilir) başlangıçta negatif olup, ileride veya tedaviyle pozitifleşebilir. Yanlış negatifliğin en önemli nedenlerinden biri de yanlış uygulama tekniği veya yanlış okumadır.

Moleküler yöntemlerle tanı testleri: Bu testler (PCR, DNA hibridizasyon problemleri, RFLP) arasında en önemlisi ve klinikte en fazla kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. *M.tuberculosis* için spesifik DNA sekansları (*M.tuberculosis* için spesifik IS6110 ve 16S rRNA) gibi kullanarak nükleik asit amplifikasyonu yapılır. Sonuç 48 saatte önce çıkabilir. Sensitivite ve spesifisite erişkinlerde balgam kültürlerinde > 90 olarak bildirilmiştir. PCR ayrıca enfeksiyona yol açan mikobakteri suşunun ilaç duyarlılığı hakkında da bilgi verebilir. Ancak test sonuçları (standart örnekler kullanıldığında ve referans laboratuvarlarında bile) laboratuvarlar arasında çok değişir, yanlış pozitif ve yanlış negatif değerler sıklıkla; bu güvenilirliği azaltır. Relatif olarak pahalı bir testtir ve kontaminasyon riski vardır. Birkaç bakterinin bile kontaminasyonu, (PCR ile amplifiye edilerek) pozitif sonuç olarak rapor edilebilir. PCR dışındaki diğer DNA hibridizasyon testleri bu açıdan çok duyarlı değildir. Çocuklarda sensitivite % 25-80, spesifisite % 80-100 arasında değişmektedir. Negatif PCR tüberküloz tanısını ekarte ettirmez, aksine pozitif PCR da tek başına kesin tanı koydurmaz. PCR özellikle immunkompromize çocukta tüberküloz ile uyumlu akciğer bulguları varsa yararlı olabilir. Halen PCR sadece ARB pozitif klinik örneklerde ARB'nin *M.tuberculosis*'e bağlı olup olmadığını tespit için kullanılır. PCR henüz özellikle gelişmekte olan ülkelerde rutin kullanımdan uzak gibi görülmektedir.

Lusiferaz (luciferase) testi: Gelecekte ümit veren alternatif bir metod gibi duran bu testte; *M.tuberculosis*'e spesifik bir bakteriyofaj (luciferase reporter mycobacteriophage; LRP) kullanılır. Lusiferaz geni (*lux*) faja klonlanır, faj bakteriyeye bağlanır ve DNA'sına girer. Faj birçok *lux* kopyesi verir ve bu da yüksek lusiferaz düzeyleri oluşturur. Lusiferaz aktivitesi uygun substrat ve ATP eşliğinde (yani sadece canlı mikobakteri varsa) ışık reaksiyonu vermesiyle belirlenir. Ölü bakteride (örneğin bakterisid bir ilaç verilmiş ve mikobakteri üremesi durdurulmuş veya öldürülmüşse) ışık reaksiyonu görülmez; bu açıdan hızlı antibiyotik duyarlılık testi (INH, RMP gibi) amacıyla da kullanılabilir (pozitif kültürlerde 24-48 saat içinde). Test genetik bazlı direnci değil klinik antibiyotik aktivitesi hakkında bilgi verir. PCR'daki gibi komplike ekipmana ihtiyaç göstermemesi ve kontaminasyon riski taşıması olumlu yönleridir. Henüz klinik örneklerdeki çalışmalar yetersiz düzeydedir.

Serolojik testler: Tüberküloz tanısında serolojik testlerle (mikobakteriyel antijenlere -örneğin antijen 60 gibi- karşı IgG ve M gibi) ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen, çocukluk çağı tüberkülozunda rutin tanı için şimdilik yerleri yoktur. Mikobakteriyel antijenleri kullanarak yapılan son çalışmalar tartışmalı sonuçlar vermiştir. Genelde bu serolojik testler pratik kullanım için kabul edilemez derecede düşük sensitivite ve spesifisitede, ayrıca pahalı ve zor uygulanabilen niteliktedirler. IFN-gama ve IFN-alfanın tüberküloz plörezi ve peritonitlerde yükseldiğine dair çalışmalar vardır, ancak araştırma safhasındadır. Tüberkülozda genellikle tip 2 sitokin aktivasyonu olur, ancak hastalığın nedeni veya sonucu olabilecek bu durumun tanıda kullanılabileceği yolunda çalışmalar henüz yoktur.

Adenozin deaminaz aktivitesi (ADA): Tüberkülozlu olgularda serumda, plevral ve peritoneal hastalıkta plevra ve periton sıvılarında diğer nedenlere göre (malignansi, siroz gibi) daha yüksek ADA saptanmıştır. Genellikle pürülan olaylarda da artan ADA en yüksek olarak tüberkülozda artmaktadır. Tüberküloz için serum ve plevral sıvıda >50 U/ml değerler diğer klinik bulgular eşliğinde tanıyı desteklemektedir. ADA isoenzimleri (ADA1, ADA2) de çalışılmakla birlikte halen klinik önemleri net değildir. Yüksek olan ADA aktivitesi uygun tedavi ile birkaç ayda düzelmeye başlar.

KAYNAKLAR

- 1- Baran J, Riederer KM, Khatib R: Limits of detection of M.tuberculosis in spiked cerebrospinal fluid using the polymerase chain reaction in tuberculosis meningitis, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:47 (2000).
- 2- Canbolat O, Ulusdoyuran S, Özgen G, Ceyhan I, Gümüşlü F, Akbay A: The comparison of adenosine deaminase activity values with polymerase chain reaction results in patients with tuberculosis, *J Clin Lab Anal* 13:209 (1999).
- 3- Collazos J, Espana P, Mayo J, et al: Sequential evaluation of serum adenosine deaminase in patients treated for tuberculosis, *Chest* 11:432 (1998).
- 4- Crawford JT: New technologies in the diagnosis of tuberculosis, *Semin Respir Infect* 9:62 (1994).
- 5- Delacourt C, Gobin J, Gaillard J, et al: Value of ELISA using antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children, *Chest* 104:393 (1993).
- 6- Delacourt C, Poveda JD, Churean C, et al: Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children, *J Pediatr* 126:703 (1995).
- 7- Dogan R, Demircin M, Sarıgül F, et al: Diagnostic value of adenosine deaminase activity in pericardial fluids, *J Cardiovasc Surg* 40:501 (1999).
- 8- Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, et al: Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction, *Am Rev Respir Dis* 144:1160 (1991).
- 9- Heefets LB, Good RC: Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis, "Bloom BR (ed): *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*", ASM Press, Washington (1994).
- 10- Hsu KH: Tuberculin reaction in children treated with isoniazid, *Am J Dis Child* 137:1090 (1983).
- 11- İldırım İ, Hacımustafaoğlu M, Ediz B: Correlation of tuberculin induration with the number of Bacillus Calmette-Guerin vaccines, *Pediatr Infect Dis J* 14:1060 (1995).
- 12- Kuyucu M, Karakurt C, Bilaloğlu E, et al: Adenosine deaminase in childhood pulmonary tuberculosis: Diagnostic value in serum, *J Trop Pediatr* 45:245 (1999).
- 13- Ogawa K, Koga H, Hirakata Y, et al: Differential diagnosis of tuberculous pleurisy by measurement of cytokine concentrations in pleural effusion, *Tuber Lung Dis* 78:29 (1997).
- 14- Pierre C, Olivier C, Lecossier D, et al: Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of mycobacterial DNA, *Am Rev Respir Dis* 147:420 (1993).
- 15- Riska PF, Jacobs WR, Bloom BR, et al: Specific identification of M.tuberculosis with the luciferase reporter mycobacteriophage: use of p-nitro-alpha-acethylamino-beta-hydroxy propiophenone, *J Clin Microbiol* 35:3225 (1997).
- 16- Riska PF, Su Y, Bardarov S, et al: Rapid film-based determination of antibiotic susceptibilities of M.tuberculosis strains using a luciferase reporter phage and the Bronx Box, *J Clin Microbiol* 37:1144 (1999).

- 17- Sada E, Aguliar D, Torres M, et al: Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis, *J Clin Microbiol* 30:2415 (1992).
- 18- Salyers AA, Whitt DD: *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*, s. 307, ASM Press, Washington (1994).
- 19- Sathar MA, Ungerer JP, Lockhat F, Simjee AE, Gouws E: Elevated adenosine deaminase activity in patients with HIV and tuberculosis, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11:337 (1999).
- 20- Seah GT, Scott GM, Rook GA: Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis, *J Infect Dis* 181:385 (2000).
- 21- Smith KC, Sterke JR, Eisenach K, et al: Detection of M.tuberculosis in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction, *Pediatrics* 97:155 (1996).
- 22- Starke JR: Tuberculosis, "Katz SL, Gershon AA, Hotez PF (eds): *Krugman Pediatric Infectious Diseases*, 10. baskı", Mosby, St. Louis (1998).
- 23- Starke JR, Munoz F: Tuberculosis, "Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds): *Nelson's Textbook of Pediatrics*, 16. baskı", WB Saunders, Philadelphia (2000).
- 24- Suffys P, Palomine JC, Cardoso Lsao S, Espitia C, Cataldi A, et al: Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of M.tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis* 4:179 (2000).
- 25- Turner M, VanNerom E, Nyabenda J, et al: Determination of humoral immunoglobulins M and G directed against mycobacterial antigen 60 failed to diagnose primary tuberculosis and mycobacterial adenitis in children, *Am J Respir Crit Care Med* 150:1508 (1994).
- 26- Valdes L, Alvarez D, San Jose E, et al: Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients, *Arch Intern Med* 158:2017 (1998).