

48482

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI VE TÜBERKÜLOZ
ANABİLİM DALI

**AKTİF AKCİĞER TÜBERKÜLOZUNUN TANISINDA
A 60 ANTİJENİNE KARŞI ANTİKOR DÜZEYİ ÖLÇÜMÜNÜN DEĞERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Münire ÇAKIR GÖKIRMAK

ANKARA - 1996

Yetişmemde büyük emeği geçen tez hocam Prof. Dr. Belma obanlı başta olmak üzere kliniğimizdeki tüm hocalarıma, tezimin laboratuvar çalışmalarındaki desteğinden ötürü Dr. Sedef Bengisun'a, istatistiksel değerlendirmelerdeki yardımlarından ötürü Atilla Halil Elhan'a, uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını gördüğüm tüm asistan arkadaşlarıma ve klinik personeline ve beni bugünlere getiren aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Dr. Münire akır Gkırnak

İÇİNDEKİLER:

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
Tüberkülozun tarihçesi.....	3
Mikobakteriyum tüberkülozis.....	3
Tüberküloz patogenezi.....	9
Tüberküloz immünolojisi.....	10
Tüberküloz tanısında geleneksel yöntemler.....	13
Tüberkülozda yeni tanı yöntemleri.....	17
MATERYAL METOD.....	25
BULGULAR.....	28
TARTIŞMA.....	43
SONUÇLAR.....	57
ÖZET.....	59
KAYNAKLAR.....	60

KISALTMALAR:**ARB:** Asidorezistan basil**BCG:** Bacillus Calmette-Guerin**BOS:** Beyin Omurilik Sıvısı**CD:** Cluster Designation**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay**EÜ:** ELISA ünitesi**HIV:** Human Immunodeficiency Virus**IFN:** İnterferon**IL:** İnterlökin**MHK:** Majör histokompatibilite**OD:** Optik dansite**OT:** Old tüberkülin**PCR:** Polymerase chain reaction**PMNL:** Polimorfonükleer lökosit**PPD:** Purified Protein Derivative**RFLP:** Restriction fragment length polymorphism**SD:** Standart deviasyon**TH:** T Helper**TMB:** Tetrametilbenzidin**TNF:** Tümör nekrozis faktör

GİRİŞ VE AMAÇ

Tarihin bilinen en eski hastalıklarından biri olan tüberküloz, günümüzde hem ülkemiz, hem de gelişmiş ve gelişmekte olan tüm dünya ülkeleri için önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (1,8,13,27,46,65,81,82). Bu durumun, gelişmiş ülkelerde 1980'li yıllarda HIV ile enfekte kişilerin sayısındaki artışa paralel olduğu düşünülmektedir (8,45,46,53,61,78). Ülkemizde ise, HIV enfeksiyonu henüz akciğer tüberkülozlu hastaların sayısında artışa neden olacak düzeyde bir problem oluşturmamakla birlikte, son yıllarda tüberkülozlu hastaların sayısında artış gözlenmiştir (1,13,61).

Tüberküloz enfeksiyonu vücutta tüm dokularda görülebilmekle birlikte; akciğer tüberkülozu, epidemiyolojik açıdan en önemli yere sahiptir, çünkü hastalık damlacık enfeksiyonu yolu ile bulaşmakta ve böylece enfekte kişilerin sayısı artmaktadır. Enfekte kişilerden % 10'unun hayatlarının bir döneminde aktif hastalık geliştirecekleri düşünülürse, hastalığın kontrol altına alınmasında akciğer tüberkülozlu hastalara tanı konmasının önemi anlaşılır (1,4,27,52).

Tüberküloz tanısında öykü, fizik muayene, akciğer grafileri, tüberkülin deri testi yardımcıdır (1,82). Ancak hastalığın kesin tanısı, M. tüberkülozis'in hastadan alınan balgam veya diğer materyallerde mikroskopik olarak gösterilmesi veya kültürlerde üretilmesi ile konur (1).

Aktif akciğer tüberkülozundan kuşkulanan hastalarda, balgamın direkt incelemesi her zaman sonuç vermemekte, kültür sonuçlarının beklenmesi ise tanıda gecikmeye yol açmaktadır (29,82). Çocuk tüberkülozu ve akciğer dışı organ tüberkülozlarında da muayene için materyal elde edilmesi güçtür (1,35,37).

Son yıllarda akciğer ve akciğer-dışı organ tüberkülozlarının tanısında kullanılmak üzere yeni tanı yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla, çeşitli antijenlerle yapılan serolojik testler, adenozin deaminaz düzeyi ölçümü, radyometrik kültür yöntemleri, tüberkülostearik asit düzeyi ölçümü, nükleik asit

prob'ları, polimeraz zincir reaksiyonu ve RFLP (restriction fragment length polymorphism) gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (65,71,82).

Biz de çalışmamızda, aktif akciğer tüberkülozlu hastalarda, A60 antijenine karşı oluşan spesifik antikor düzeylerinin ELISA ile ölçümünün tanıya katkısını incelemeyi amaçladık. Ayrıca, hastalarda, PPD reaktivitesi, balgam ARB müspetliği, radyolojik lezyonların yaygınlığı ve semptom süreleri ile antikor düzeyi; sağlıklı kişilerde ise, yaş ve antikor düzeyi arasında bir korelasyon bulunup bulunmadığını araştırdık.



GENEL BİLGİLER

TÜBERKÜLOZUN TARİHÇESİ:

Tüberkülozun binlerce yıldır insanları etkilediği bilinmektedir. Neolitik döneme (M.Ö. 4000) ait insan iskeletlerinde, spinal tüberkülozu düşündüren, lezyonlar bulunmuştur. Yine, Mısır mumyalarında (M.Ö. 3700-1000) tüberküloza ait olduğu düşünülen bulgular mevcuttur (61). Yüzyıllarca hastalığa ilişkin klinik bilgiler elde edilmesine karşın, hastalığın bulaşıcı olduğu, ancak 1865 yılında, Villemin tarafından kanıtlanmış, hastalık etkeni M. Tüberkülozis ise 1882'de Robert Koch tarafından tanımlanmıştır (1,61,93). 1921'de, Calmette ve Guerin kendi adlarıyla anılan tüberküloz aşısı BCG'yi bulmuşlar, 1944'te ise ilk antitüberkülo ilaç olan streptomisin keşfedilmiştir. Önceleri tedavi süreleri 18-24 ay iken, 1970'li yıllardan itibaren tedavi süreleri 6-9 aya kadar indirilebilmiştir(61).

1970'li yıllardan sonra tüberküloz konusunda elde edilen pek çok bilimsel gelişmeye karşın, dünyadaki tüberküloz sorununda anlamlı bir iyileşme sağlanamamıştır. 1990 Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünü oluşturan, 1.7 milyar kişi tüberküloz basili ile enfektedir ve bu sayıya her yıl 100-200 milyon kişi eklenmektedir. Dünyada 20 milyondan fazla tüberküloz hastası bulunmakta ve bunlara her yıl 8 milyon yeni hasta eklenmekte, yılda 3 milyon kişi ise hastalıktan kaybedilmektedir (5,8,61). Bu özellikleri ile tüberküloz, dünyada 5. ölüm nedeni olarak varlığını sürdürmektedir (61).

MİKOBAKTERİYUM TÜBERKÜLOZİS:

Mikobakteriler, basit bitkilere yakın Actinomycetales soyundan gelmektedirler(1). Mikobakteriyum adı altında başlıca üç grup mikroorganizma mevcuttur. Bunların ilki, Lepra etkeni, M. Leprae'dir. İkinci grupta, M. tüberkülozis bulunur ki, insan tipi ve sığır tipi (M. tuberculosis bovis) olarak iki tip mikroorganizma içerir. İnsanda pulmoner lezyonlara neden olan daha çok, M. tüberkülozis humanus olmakla birlikte, her iki tip, insan için patojenisite özelliğine sahiptir. Mikobakteriler içinde üçüncü bir grup da atipik mikobakterilerdir (1,80).

Tüm mikobakteriler, aside dirençlilik, kesin aerob olma, yavaş büyüme ve metabolize etme, diğer tüm mikroorganizmalardan çok daha kötü şartlara rezistans gösterme gibi, ortak özellikler taşımakla birlikte, metabolik aktiviteleri ve farklı türlerde yerleşim göstermeleri açısından türler arasında farklılıklar mevcuttur (53,93).

M. tüberkülozis, 0.3-0.6 ve 1-4 mikron boyutlarında, düz veya hafifçe eğri, tek veya birkaç tanesi bir arada bulunan, çizgi veya inci dizisi şeklinde görülen, Ziehl-Neelson ve florokrom yöntemleri ile kuvvetli aside direnç ve asit-alkole direnç özellikleri gösteren basil olarak tanımlanmıştır (53,80,93).

Mikobakterilerin boyanma özellikleri:

M. tüberkülozis basilleri, Gram boyama veya diğer basit boyama yöntemleri ile kolayca boyanmazlar. Bu durum, muhtemelen hücrelerin, yüksek lipid içeriklerine bağlı olarak, boyanın penetrasyonuna direnç göstermelerindedir. Doğal şartlarda Gram boyası ile boyandıklarında, açık mavi renk alırlar ve alkol ve aseton ile dekolorize olmazlar, bu nedenle Gram pozitif olarak tanımlanmışlardır. Ancak lipid içeriği, hücre duvarı yapısı ve antibiyotik rezistansı bakımından Gram-negatif bakterilere daha çok benzerlik gösterirler. Basilleri Gram-nötr olarak tanımlayanlar da mevcuttur (80,93).

Tüm mikobakteri türlerinin en önemli özelliği, asit veya asit alkol ile dekolorizasyona gösterdikleri dirençtir. Aside dirençlilik olarak tanımlanan bu özellik, bazı *Nocardia* suşları ve yine bazı *Korinebakteri* suşlarında mevcuttur. Bu mikroorganizmalar dışında, bakteriyel endosporlar, bazı mantar sporları, lipid pnömonili hastaların akciğerlerindeki inklüzyonlar da aside dirençlilik özelliği gösterebilir (93). Aside dirençlilik için, mikolik asitlerin varlığı, bazik fuchsinin hücre içi madde ile kompleks oluşturması, mikobakteriyel RNA'nın boyayı tutması gibi, mekanizmalar öne sürülmekle birlikte, mekanizma ne olursa olsun, bu özellik, patojen mikobakterilerin izolasyonu ve tanımlanması açısından yardımcıdır (93).

Mikobakterilerin metabolizması:

Çoğu bakteriye oranla mikobakteriler çok yavaş ürerler. *M. tüberkülozis* için in vitro üreme süresi, besiyerinin niteliğine göre, 10-20 saattir; in vivo olarak da, yeterli oksijen ortamında, eşit sürede, ortalama 20 saatte bir bölünme ile çoğalır (1,53).

Mikobakteriler aerob veya mikroaerofildirler. *M. tüberkülozis* akciğerde hastalık yapması, bu nedenledir. Yine, reaktivasyon tüberkülozunda, akciğer apekslerindeki dorman basillerin aktive oluşu, muhtemelen bu bölgelerde alveoler oksijen basıncının daha yüksek oluşuna bağlıdır (93).

M. tüberkülozis ve diğer mikobakteriler karbon kaynağı olarak gliserolü kullanırlar. Gliserolün kullanılması, virülans bakımından önemlidir, çünkü gliserol doku içeriğinde çokça bulunur. Yapılan araştırmalarda, uzun süre gliserol ile beslenen enfekte deney hayvanlarında, basil sayısı ve hastalık yaygınlığında artış gözlenmiştir (93).

Tüberküloz basilinin en önemli nitrojen kaynağı ise asparajindir. Glutamik asit, yalnızca sınırlı konsantrasyonlarda, asparajinin yerini alabilir, Histidin, aspartik asit ve L-prolin bir düzeye kadar kullanılabilir, ancak üreme hızı bu durumda daha yavaştır (93).

Mikobakterilerin üremesi için çeşitli elementlerin de ortamda bulunması gerekir. Bunlar çinko ve az miktarda demirdir. Demir özellikle, vasata serum eklendiğinde önem kazanır, çünkü eklenecek serumdaki transferrin, demiri bağlar ve böylece mikobakterinin üremesi inhibe olur (62).

Tüberküloz basilinin kompozisyonu ve muhtemelen bazı metabolik aktiviteleri, in vitro ve in vivo farklılıklar göstermektedir. Bu farklar, konak enzimlerinin, mikobakteriyel yüzeye tutunması ile ortaya çıkar. Bu da göstermektedir ki, mikobakteri hücre yüzeyine tutunan konağa ait elemanlar, enfeksiyonda önemli rol oynayabilirler.

Mikobakteriyel yapı:

Mikobakteriler bir plazma membranı ile sınırlanan sitoplazmadan ve bunları çevreleyen lipidden zengin bir hücre duvarından oluşmuşlardır. Sitoplazmada, bir nükleer cisim içinde sıkıca katlanmış, fakat nükleer bir membranla çevrili olmayan tek bir kromozom vardır. Bazı mikobakterilerin sitoplazmalarında, plazmidler veya epizomlar diye adlandırılan ek, küçük DNA parçaları bulunur (62).

Mikobakteri hücre duvarı, diğer bakterilerin hücre duvarları ile karşılaştırıldığında, sadece daha kalın değil, aynı zamanda olağanüstü lipofilik özellik gösteren tek örnektir. Hücre duvarı mikobakterinin en karmaşık parçasını oluşturur. Lipidler, hücre duvar ağırlığının %60'ını oluştururlar ve çok farklı bileşikler içerirler. Bu bileşiklerin bir kısmı, diğer organizmalarda da bulunur, bir kısmı ise sadece mikobakteriye özgüdür (1,62).

Hücre duvarının yapısı ile ilgili olarak öne sürülen modelde, plazma membranının üstünde bulunan, en iç tabaka, peptidoglikandan oluşmuştur. Bu tabaka kısa peptid zincirleri ile çapraz bağlı, uzun polisakkarid zincirleri içerir. Polisakkarid zincirler, birbirini izleyen, N-glycolyl muramik asit ve N-acetyl glukaminden, çapraz bağlı peptid zincirler ise, dört aminoasitten oluşmuştur (62,93).

Peptidoglikanlara bitişik tabaka, arabinogalaktan tabakasıdır. Mikobakteriyel hücre duvar kitlesinin, %35'ini oluşturur. Arabinogalaktan, arabinoz ve galaktazdan oluşan dallı bir polisakkarittir. Peptidoglikana fosfodiester köprüleri ile bağlıdır. Arabinogalaktanların yan zincirlerindeki uç arabinaz birimlerine, mikolik asit diye adlandırılan, bir grup uzun zincirli, yağ asitleri kovalan bağlarla bağlanırlar. Bu asitler, hücre duvarının kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli oluşundan sorumludurlar (62,93).

Mikolik asitler, trehalose gibi şekerlerle bağlanarak "cord faktör" oluşturabilirler (1,62,93).

En dış tabaka, bir grup heterojen peptidoglikolipidler veya fenolik glikolipidlerden oluşmuştur ve mikozidler olarak adlandırılır (62,93).

Mikobakteriyel antijenler:

Mikobakteriler antijenik özellikte pek çok proteinleri, lipidleri ve polisakkaridleri içerirler. Antijenik yapıların sayısı tam olarak bilinmemektedir. Duyarlı yöntemlerle şimdiye dek bilinenler sadece 90 kadardır. Antijenik yapılar sadece sitoplazmada ve hücre duvarında lipidlere bağlı olarak bulunurlar (62).

Tüberküloz basilinin bulunmasından hemen sonra, Robert Koch, ısı ile öldürülmüş sıvı kültürden steril filtrat elde etmiş ve buna "old tüberkülin" (OT) adı verilmiştir. OT hem basilin üremesi boyunca salınan antijenik ürünleri, hem de ölü bakterinin otolizi ile ortaya çıkan antijenleri içerir (31). Tüberküloz basilinin kaba bir ekstraktı olan OT'in içerdiği antijenler sonraki araştırmacılar tarafından pürifiye edilmeye çalışılmıştır (72). OT'den ilk olarak PPD (purified protein derivative) elde edilmiştir. Florence Seibert tarafından 1934'te tanıtılan PPD, "old tüberkülin" in %50 doymuş amonyum sülfat ile presipitasyonundan elde edilmiştir (31). Bu preparat immünolojide, epidemiyolojide ve klinikte yaygın olarak kullanılmasına karşın kompleks karışımlar içermektedir ve PPD'nin de pürifiye edilmesine çalışılmıştır (72). Aslında hem old tüberkülin hem de PPD'de elde edilen saflaştırma, kültürlerin ısı ile öldürülmesi sırasında labil antijenik mikobakteriyel proteinlerin denatürasyonu veya koagülasyonu ile olmaktadır ki, bu proteinler belki de istenen spesifisiteye sahiptirler (31).

1928'de Seibert, hücre ekstraktlarında, dört ayrı protein ve iki ayrı polisakkaridi tanımlamıştır (40,62). Daniel ve Affronti, mikobakteriyel kültür filtratlarında, Seibert tarafından tanımlanan fraksiyonların antijenik içeriğini, immünelektroforetik yöntemlerle araştırmışlardır (62). 1971'de Janicki ve arkadaşları, M. tüberkülozis antijenleri için bir referans sistemi oluşturmuşlardır (55). Bu referans sisteminde, antijen 1 ve 2, D-arabinomannan ve D-arabinogalaktandır. Bu antijenik polisakkaridler mikobakterilerin çoğunluğunda

bulunurlar. Antijen 3'ün, ilk kez Seibert tarafından tanımlanan yüksek molekül ağırlıklı glukoz olduğu bilinmektedir (31).

Antijen 5, ısıtılmamış kültür filtratlarından, immünoabsorban afinite kromatografi yöntemi ile elde edilmiş, 28.000-35.000 Dalton ağırlığında, antijenik bir proteindir. Aminoasit analizinde aspartik asitten zengin oluşu, sitoplazmik orijinli olduğunu düşündürmektedir (32).Chawla ve arkadaşlarınca, M. tuberculosis H37Ra suşunun salin-ekstrakte antijenlerinin immüno kimyasal analizi sonucunda, dört majör fraksiyon saptanmış, bu fraksiyonlardan FI ve FII'nin tüberkülozlu hastaların antikörlerine daha güçlü reaksiyon verdiği, 32.000 Dalton ağırlığındaki FII fraksiyonunun, benzer molekül ağırlığındaki antijen 5 ile aynı molekül olabileceği belirtilmiştir (21).

Antijen 5 ve 6'nın, M. tuberculosis için rölatif olarak spesifik olabilecekleri öne sürülmüştür (31).

Antijen 60:

Janicki'nin oluşturduğu referans sisteminde immünelektroforezle ayrılan bir düzine kadar M. tuberculosis antijeninin tanınmasından sonra, 1980 yılında Closs ve arkadaşları, M. tuberculosis ve M. bovis'e ait 30 antijenin çapraz immünelektroforezle ayrıldığı bir başka referans sistemi oluşturdular (23). Bu referans sistemine göre, M. bovis sitoplazmasının analizi, çapraz immünelektroforez plate'lerinde, daha az mobil bir polimer olan, Antijen 60'ı (A 60) ortaya çıkardı. A 60, old tüberkülin veya PPD'nin başlıca termostabil antijenidir (24,25). Majör termostabil antijenler ailesine ait olan A 60, yalnız mikobakterium cinsinden olan mikroorganizmalarda değil, bu cinsle ilişkili korinebakterium ve nokardia cinsinde de mevcuttur (24,25).

A 60'ın saflaştırılmasında, eksklüzyon jel kromatografi ve lektin afinite kromatografi teknikleri kullanılmıştır (24). A 60 antijeninin bileşimi, organik çözücüler, kimyasal maddeler ve enzimler kullanılarak incelendiğinde; serbest ve bağlı iki lipid fraksiyonu ile protein ve polisakkarid kısımlardan oluştuğu

görülmüştür (24). Tüberkülozlu hastalar ve mikobakteriyel homojenatlar enjekte edilmiş olan farelerde anti-A60 antikorlarının oluşumu A 60'ın immünolojik rolünü ortaya koymuştur (25). A 60 antijeni, hem selüler hem de hümoral cevabı uyarmaktadır (25). A 60 antijenine karşı antikorlar, BOS'nda da saptanmıştır, bu antikorların intratekal olarak sentezlendiğini gösteren kanıtlar mevcuttur (83, 96).

TÜBERKÜLOZ PATOGENEZİ:

Mikobakterium tüberkülozis damlacık çekirdeği ile taşınır (1,4,38). Damlacık çekirdeği, akciğer tüberkülozlu hastaların, konuşma, öksürme, aksırmaları ile oluşur. Yine, lezyonların manipülasyonu ve doku veya sekresyonların hastane veya laboratuvarlarda işleme tabi tutulmaları sırasında da oluşur. Damlacık çekirdekleri 1-5 mikrometre çapında olup uzun süre oda havasında asılı kalırlar (1,4,28,38,53).

Bir ila üç basil içeren damlacık çekirdeğinin inhalasyonundan sonra, basiller bir respiratuar bronşiyol veya alveol içinde yerleşirler (1). Burada makrofajlar tarafından fagosite edilen basilin, enfeksiyon oluşturup oluşturumaması, virülansına ve onu fagosite eden makrofajın sahip olduğu öldürme kabiliyetine bağlıdır. Eğer basil ilk savunmaya rağmen canlı kalmayı başarırsa, alveoler makrofaj içinde çoğalır. Daha sonra lenfatik kanallar aracılığıyla bölgesel lenf düğümlerine taşınır; primer odak ve bölgesel lenfadenit ilişkisi primer kompleks olarak tanımlanır. Basiller, bölgesel lenf düğümlerinden lenfohematojen yayım ile sistemik dolaşıma karışarak vücudun bütün organ ve dokularına yayılırlar (1,53). Bazı organ ve dokular basilin çoğalmasına rezistans gösterirken, akciğer apeksleri, böbrekler, kemikler ve beyin basillerin üremesi için uygun ortamı oluştururlar (4). Basillerin inhale edilışinden 4-6 hafta sonra gelişen spesifik immünite çoğu kez basilin daha fazla çoğalmasını önler. Bu dönemde, konak asemptomatik olup, enfeksiyonun tek kanıtı, PPD deri testinin müspetleşmesidir. Primer enfeksiyon süresince, klinik ve/veya radyolojik belirtiler veren hastalık gelişimi "primer tüberküloz" olarak tanımlanır (1). Primer tüberküloz

gelişmeyen enfekte kişilerin yaklaşık %10'unda ise, hayatlarının bir döneminde tüberküloz hastalığı görülür (4). Reaktivasyon tüberkülozu denen bu durum, dorman halde bulunan basillerin yeniden çoğalmaya başlaması ile gerçekleşir. Reaktivasyon tüberkülozunun en sık geliştiği yer akciğer apeksi olmakla birlikte, vücutta herhangi bir odakta da, hastalığın bu şekildeki geç progresyonu görülebilir. Akciğer-dışı organ tüberkülozları da, bu organlarda yerleşen latent dönemdeki basillerin reaktivasyonu sonucu gelişirler (1).

TÜBERKÜLOZ İMMÜNOLOJİSİ:

Konağın tüberküloz enfeksiyonunu kontrol yeteneği, etkin bir hücresel immün cevap oluşturmaya bağlıdır. Hücresel immünite, spesifik antijenle karşılaşan T lenfositlerin duyarlanması ve makrofaj fonksiyonlarını düzenlemek üzere medyatörler salgılaması ile olur. Bu nedenle hücresel immünitenin spesifitesi primer olarak makrofaja değil, T lenfositine bağlıdır(38).

M. tüberkülozis ile enfekte olduktan hemen sonra, konak akciğerinde, vazodilatasyon, ödem, fibrinöz eksüda, PMNL (polimorfonükleer lökosit), lenfosit ve monositleri içeren bir lökosit hücre akını ile karakterize nonspesifik enflamatuvar veya eksüdatif bir cevap görülür. Bu devrede henüz selüler immünite gelişmemiş olduğundan basiller üremeye devam ederler (38).

Tüberkülozlu vakalarda, enfekte olmayan şahıslara göre, PMNL aktivasyonunun daha yüksek derecede olduğunu ve opsonize mikobakteriyi hemen fagosite ettiğini gösteren belirtiler olmakla birlikte PMNL'in tüberküloz basilini öldürmede efektif olup olmadığı konusu tartışmalıdır. Ancak PMNL'ler granülomatöz enflamasyonda monositlerden önce dokuya gelirler, granülom oluşumunda önemli hücrelerdir (38).

Etkin hücresel immünitenin gerçekleşmesi için, T hücrelere sunulmak üzere antijenlerin işlenmesi, makrofajların önemli bir fonksiyonudur. Bu işlem makrofajın endozomal kompartmanında gerçekleşir. Burada antijen, MHK (majör histokompatibilite) Klas II molekülleri ile birleştikten sonra makrofaj yüzeyinde

eksprese edilir ve mikobakteriyel immünitede dominant olan CD4 T hücrelerinin aktivasyonunu sağlar (38).

Makrofajın sunduğu antijen ile aktive olan CD4 T lenfositler, ürettikleri lenfokinlere göre yeniden subgruplara ayrılmaktadır. Farelerde CD4 T hücreler iki subgruba ayrılmış, TH1 sub grubunun, interferon- γ , interlökin-2 (IL-2), tümör nekrozis faktör- β ürettiği, TH2 hücrelerin ise IL-4, IL-5 ve IL-10'u salgıladığı gözlenmiştir (38,42). İnsanlarda da CD4 T hücrelerinin, subgrupları tanımlanmıştır, ancak her sub grubun lenfokin repertuarı kesin olarak bilinmemektedir. T hücrelerinin değişik kabiliyete sahip subpopülasyonlarının bulunması, farklı bireylerde hücre sel immünite ve gecikmiş tipte hipersensitivite arasındaki dengenin, T hücre sub gruplarının farklı derecelerde aktivasyonu ile ilgili olabileceği ihtimalini akla getirmektedir (38).

Makrofaj sitoplazmasına alınan antijenler MHK Klas I molekülle ri ile de birleşebilirler ki, bu antijen kompleksi CD8 T hücrelerini uyarmaktadır. Aktive CD8 T hücrelerinin, fagosite ettikleri bakteriyi öldüremeyen makrofajlardan bakterinin salınımını kolaylaştırdıkları, böylece etkin olmayan makrofajlardan salınan bakterilerin, daha etkin hücreler tarafından fagosite edilmelerine yardımcı oldukları düşünülmüştür (38).

Sonuç olarak, hem CD4, hem de CD8 T hücre sub gruplarının tüberküloz basiline karşı savunmada önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. CD4 veya CD8 hücrelerinden yoksun bırakılan farelerin, enfeksiyonu kontrol yeteneklerini kaybettikleri ve basil sayılarının giderek arttığı gözlenmiştir (38,59).

Aktive CD4 T lenfositlerden salınan lenfokinlerin, özellikle IFN- γ 'nın makrofajları aktive ettiği bilinmektedir (26,42,53). Aktive makrofajlar daha büyük hücrelerdir, yüksek metabolik hıza ve artmış lizozim ve enzim içeriğine sahiptirler; fagositoz, sindirim, basili öldürme, enzim sekresyonu ve antijen sunma gibi çeşitli fonksiyonları daha efektif olarak gerçekleştirirler. Ancak makrofajların aktivasyonu, yalnız enfeksiyonun kontrol edilmesi ile değil, aynı zamanda bazı

zararlı moleküllerin salınımı ile sonuçlanır. TNF- α , tüberkülozun ateş, kilo kaybı gibi çoğu sistemik belirtilerinden sorumlu tutulmaktadır(42,52,53). Sonuç olarak, tüberküloz hastalığı sırasında ortaya çıkan sistemik semptomlar; bakteri tarafından salınan enzim veya toksinlere bağlı olarak değil, konağın basile verdiği immün cevabın sonucunda ortaya çıkmaktadırlar (4).

Tüberküloz patogenezinde belirleyici faktör, T lenfosit bağımlı, selüler immünite olmakla birlikte, tüberkülozlu hastalarda B-lenfosit bağımlı hümoral cevap da oluşmaktadır. T lenfositlerden salınan, IL-4, IL-6 gibi lenfokinler, B lenfositleri aktive etmekte ve immünglobulinlerin oluşumuna yol açmaktadır. Aktif tüberkülozlu hastalarda IgM, IgG ve IgA tipinde immünglobulinlerin arttığı saptanmıştır (30,48,50,59,75,86).

Primer ve postprimer tüberküloz hastalarında tedavi öncesi oluşan antikor cevabının, tedaviye başlandıktan sonra arttığı bildirilmiştir (58).

Hümoral immünitenin, tüberkülozda konak savunmasındaki rolü bilinmemektedir (40). Tüberküloz immünitesinde önemli bir basamak olan mikobakterilerin makrofajlarca fagositozu, opsonizan antikorlardan önemli ölçüde etkilenmemektedir (38). Lenzini ve arkadaşları, tüberküloz hastalarını klinik ve immünolojik açıdan dört grupta toplamışlardır. İmmün yanıtın çok reaktif bulunduğu RR grubunda, lezyonlar lokalizedir, histopatolojik olarak lenfosit ve epiteloid hücre üstünlüğü vardır, tüberkülin testi müspettir, tüberkülin antijenlerine karşı antikor titresi düşüktür, tedaviye cevap çok iyidir. Hücrel immünitenin bulunmadığı karşı uçta yer alan, UU grubunda ise, tüberkülin testi negatiftir, yaygın hastalık mevcuttur, serumda tüberkülin antijenlerine karşı hümoral immüniteyi yansıtan, presipitan antikorlar bulunur, tedaviye cevap olumsuzdur. Bu iki aşırı uç arasında ise, reaktif gruba yakın RI ve reaktif olmayan gruba yakın UI grubu vardır (1,40). Hücrel ve hümoral immünitenin birbirine zıt olarak ortaya çıktığını destekleyen bir başka çalışmada da, tüberkülin deri testi ile, anerjik oldukları saptanan hastalarda, mikobakteriyel antijenlere karşı antikor titrelerinin

daha yüksek olduğu bildirilmiştir (33). Ayrıca, tüberkülozlu hastaların serumlarında saptanan immünkomplekslerin, kötü prognoza işaret ettiği bildirilmektedir (38).

TÜBERKÜLOZ TANISINDA GELENEKSEL YÖNTEMLER:

Tüberküloz hastalığının tanısında en önemli adım klinik kuşkudur. Hastada öksürük, ateş, gece terlemesi, kilo kaybı, halsizlik ve hemoptizi olması, tüberkülozu düşündüren belirtiler olmakla birlikte, hiçbiri tüberküloza özgü değildir (82). Tüberkülozun kesin tanısı muayene materyallerinde ARB'in gösterilmesi veya kültürlerde üretilmesi ile konur. Ancak tanıya yardımcı bir takım *indirekt testler* mevcuttur.

Radyolojik incelemeler:

Radyolojik inceleme için iki metod vardır.

Mikrofilm: Tüberkülozun kitlesel taramaları için uygun bir radyolojik metoddur. Normal grafilere göre daha kontrastlı bir imaj verir, küçük dansitelerin gözden kaçabilmesi gibi bir dezavantajı vardır (27).

Standart radyogram: Akciğer tüberkülozundan kuşkulanan kişilerde standart PA ve lateral grafilere çekilir. Apikolordotik veya oblik grafilere de lezyonları gözlemede yardımcı olabilir (4). Primer ve postprimer tüberkülozlu hastaların radyolojileri oldukça farklı özellikler taşır (68). Ancak radyolojinin aktif akciğer tüberkülozu tanısında sensitivitesi yüksek, buna karşılık spesifitesi düşüktür; yani aslında tüberküloza ait olmayan lezyonlar tüberküloza aitmiş gibi yorumlanabilirler. Tüberküloz hastalığı, pnömokonyoz, pnömoni, bronşektazi, sarkoidoz, akciğer absesi, akciğer kanserleri ve fungal enfeksiyonlar gibi pek çok hastalığı taklit edebilmektedir (4).

Tüberkülin deri testi:

Tüberkülin deri testi, M. tüberkülozis ile enfeksiyonu göstermeye yarayan geleneksel bir metoddur. Standardize edilmiş bir tüberkülin solüsyonundan 0.1 ml'nin (5 tüberkülin ünitesi) ön kola intradermal olarak uygulanarak (Mantoux testi) 48-72 saat sonra, lokal immünolojik reaksiyon

neticesinde oluşan indürasyonun çapının ölçülmesi tekniğidir (27). Beş milimetreden küçük çaplı indürasyon negatif, 5-10 mm.lik indürasyon şüpheli reaksiyon, 10 mm.'den büyük çaptaki indürasyon ise pozitif reaksiyon olarak yorumlanır.

Bazı kişilerde PPD ilk uygulamada negatif sonuç verdiği halde, bir süre sonra tekrar uygulama yapıldığında pozitif sonuç alınabilir. Daha çok yaşlılarda görülebilen bu duruma " booster fenomeni " denir (1,4,9).

PPD testinin faydasını kısıtlayan bir takım faktörler mevcuttur. İki testin yorumu için yukarıda verilen değerler, enfekte olanla olmayanı ayırt etmemizi sağlayan kesin sınırlar değildir. Bu nedenle, farklı toplumlarda sınır olarak farklı indürasyon çaplarının kullanılması önerilmiştir (4,53). İkincisi de, PPD reaksiyonunu artırabilen veya azaltabilen pek çok faktör mevcuttur.

Yanlış pozitif sonuçlar, PPD ve diğer nontüberküloz mikobakterilerin ortak antijenlere sahip olmalarının bir sonucudur (8,53). Her ne kadar bu çapraz reaksiyonlar, M. tüberkülozise bağlı reaksiyonlardan daha küçük indürasyona neden olmakta ise de, nontüberküloz mikobakterilerin sık karşılaşıldığı bölgelerde bu durum önem kazanmaktadır. Önceden BCG aşısının uygulanması da PPD reaksiyonunu artırabilen bir faktördür (53).

PPD deri testinin yanlış negatif yorumlanmasına neden olan faktörler ise şunlardır (1,4,9,53):

1)İmmünitede azalma olan durumlar: Kişinin tifo, boğmaca, brusellozis gibi bakteriyel, kabakulak, suçiçeği, kızamık gibi viral enfeksiyonları geçiriyor olması, çok küçük ya da ileri yaşta oluşu, malnütrisyonlu oluşu, cerrahi ve travmatik ağır stresler geçirmesi, kronik böbrek yetmezliği oluşu, steroidler ve antineoplastik ajanların kullanımı, lenfoid tipte maligniteler ve ağır sistemik tüberküloz hastalığı, yanlış negatif sonuç doğurabilir.

2)PPD solüsyonu ile ilgili hatalar: Solüsyonun ısı ve/veya ışığa maruz bırakılması, son kullanma tarihinin geçmesi sonucu kimyasal bozulma,

solüsyonun kontaminasyonu ve plastik kaba absorpsiyonu nedeni ile test yanlış negatif sonuç verebilir.

3)PPD'nin yanlış uygulanması: Solüsyonun gerekenden az miktarda zerk edilmesi, intradermal yerine subkutan uygulanması, solüsyonun enjektörde bekletilmesi de yanlış negatif sonuca yol açabilen faktörlerdir.

4)Son olarak, testin yanlış okunması ve kaydedilmesi de aynı sonucu doğurabilir.

Tüberkülin reaksiyonunun pozitif oluşu hastalık anlamına gelmemektedir. Vücutta canlı basil bulunduğu sürece, aktif hastalık olsun veya olmasın reaksiyon pozitif kalır. Kısaca, PPD deri testi, aktif veya geçirilmiş enfeksiyon arasında ayırım yapamamaktadır.

Sıvı ve sekresyonların analizi:

Tüberkülozun özellikle ekstrapulmoner formları, normal vücut sıvılarında değişikliklere ve efüzyon oluşumuna yol açabilir. Bu sıvıların analizi tanıda yol gösterici olabilir (71).

Ampirik tedavi:

Klinik ve radyolojik bulguların tüberkülozu düşündürdüğü ancak kanıtlanamadığı durumlarda uygun tedavi başlanıp, kültür sonuçları beklenebilir; ayrıca tedaviye yanıtın değerlendirilmesi tanıya yardımcı olabilir (1,47,52,71,82). Ampirik tedavi başlanan hastalarda, 3 ay süresince cevap alınmadığı takdirde, radyolojik anomalliğin ya inaktif tüberküloza veya başka bir olaya bağlı olduğu düşünülmelidir (53).

Tüberküloz tanısında kullanılan bu indirekt testlerin yanısıra, kesin tanı için, basilin gösterildiği *direkt testler* kullanılırlar :

Bakteriyolojik incelemeler:

Akciğer tüberkülozu ve diğer akciğer dışı tüberküloz hastalığının kesin tanısı bakteriyolojik incelemelerle; M. tüberkülozis'in muayene materyallerinde gösterilmesi ile konur (53). Ayrıca izole edilen mikobakterinin türünün belirlenmesi

ve üretilen basilin tüberküloz ilaçlarına duyarlılığının belirlenmesi de, bakteriyolojik incelemenin amaçlarındandır.

Bakteriyolojik incelemeler, M. tüberkülozis için çok aşamalı işlemlerdir. Klinik örneğin uygun şekilde elde edilmesi ile başlayan ilk aşamayı, örneğin uygun şekilde laboratuara iletilmesi, laboratuarda örneğin organik artıklardan temizlenmesi ve santrifüje edilmesi izler. Daha sonra örnek direkt yayma ile incelenip, kültürlere ekilir ve daha sonra da biyokimyasal incelemelerle adlandırma ve duyarlılık testleri yapılır.

Mikroskopik inceleme: Uygulama kolaylığı, ucuzluğu ve yüksek sayılabilecek sensitivite ve spesifitesi nedeniyle, tanısal değerlendirmede temeldir. Uygun şekilde hazırlanan preparatlar, Ziehl-Neelson veya florokrom boyama teknikleriyle boyanıp incelenir. Bu yöntemle M. tüberkülozis'in görülebilmesi için örneğin mililitresinde 10^4 basil bulunması gerekmektedir. Mikroskopik inceleme öncelikle, doğrudan doğruya materyalden yapılan preparatlarda yapılır, sonuç alınamadığı durumlarda ise homojenizasyon ve yoğunlaştırma yöntemleri uygulanır (1).

Akciğer tüberkülozlu hastalarda muayene maddesi öncelikle balgamdır. Balgam çıkaramayan hastalarda, hipertonic tuzlu su aerosolü inhalasyonu ile %30-60 oranında sonuç alınabilir (52,53). Laringeal sürüntünün tanı değeri %25, açlık mide suyundan sonuç alma oranı ise %10-30 olarak saptanmıştır(63).

Eğer bu yöntemlerle sonuç alınamazsa, fiberoptik bronkoskopi uygulanmalı ve elde edilen bronşiyal yıkama sıvısı, bronkoalveoler lavaj ve bronşiyal biyopside gerekli incelemeler yapılmalıdır (1,52,53).

Kültür: Homojenizasyon ve yoğunlaştırma yapılan materyal mikroskopik inceleme sonrası uygun besiyerlerine ekilir. Mikobakteriler için farklı kültür ortamları bulunmaktadır. Bunlar kabaca, yumurtalı-patatesli (Löwenstein-Jensen ve American Trudeau Society kültürleri) ve agarlı besiyerleri (Middlebrook 7H-10, 7H-11 ve Dobos oleik-albümin agarları) olarak iki grupta toplanabilir. Olanak

varsa, her iki besiyerine de ekim yapılması önerilmektedir. Katı ortam olarak kullanılan Löwenstein-Jensen besiyerinde koloniler 2. veya 3. haftada gözle görülecek hale gelir. Altıncı veya 8. haftanın sonunda üreme olmazsa, sonuç negatif olarak bildirilir (1,4,53).

Akciğer tüberkülozlu hastaların, %50-60'ında yaymalarda ARB saptanmakta (29,53), %95-98'inde kültürlerde üreme sağlanabilmektedir (63). Hastaların %2-5'inde ise ne yayma, ne de kültürle tanıya ulaşılamamaktadır (63).

Hayvan deneyi: Günümüzde iyi geliştirilmiş kültür ortamlarının varlığı nedeniyle, kobay inokülasyonuna büyük oranda başvurulmamaktadır (1). Bu işlem aşağıdaki durumlarda, oldukça seyrek olarak kullanılmaktadır (63):

- 1) Örnekler kültürde sürekli kontamine oluyorsa,
- 2) Örnekler mikroskopide pozitifken, kültürlerde sürekli negatif sonuç alınıyorsa,
- 3) Tüberküloz basilinin tanısı için yeterli çaba harcanmasına rağmen, çok az basilin bulunduğu düşünülen klinik örnek aseptik koşullarda alınmışsa,
- 4) Diğer mikobakterileri de içerdiği bilinen örnekte, çok az sayıda, M. tüberkülozis'in varlığı düşünülüyorsa.

TÜBERKÜLOZDA YENİ TANI YÖNTEMLERİ:

Radyometrik kültür yöntemleri:

Bu yöntemde, alınan örnek, C¹⁴ ile işaretlenmiş, palmitik asit içeren kültür ortamına ekilir. Örnekte mikobakterilerin bulunması durumunda, mikobakteriler üremeleri esnasında besiyerinde bulunan yağ asitlerini metabolize ederler ve bu sırada radyoaktif ¹⁴CO₂ oluşur. Bu yöntemde, BACTEC sistemi, kültür kabının üzerinde toplanan CO₂'nin radyoaktivitesini ölçer, burada radyoaktivitenin belirlenmesi, mikobakterinin varlığını gösterir. Klinik örnekte mikobakterinin varlığı, BACTEC yöntemi ile geleneksel kültür yöntemlerine göre çok daha kısa sürede saptanmaktadır (4,53,82).

M. tüberkülozis için biyokimyasal testler:

Bu yöntemler, mikobakterinin yapısında bulunan tüberkülostearik asit, mikolik asit gibi bazı maddelerin, değişik kromatografik yöntemlerle belirlenmesi esasına dayanmaktadır (4).

Nükleik asit problemleri:

Değişik rekombinant DNA teknikleri ve bunu izleyen ayrıntılı genomik incelemeler, ölçülebilir büyüklükte, saf DNA parçalarının veya bazı mikroorganizmalar için özgül olan nükleotid sıralarının elde edilebilmesine olanak sağlamıştır. M. tüberkülozis için de özgül olan nükleotid sıraları belirlenmiş ve bu mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Elde edilen bu DNA parçası, tüberkülozlu bir hastadan alınan örnekteki hedef basil DNA'sını özgül olarak saptamada bir prob olarak kullanılabilir. DNA probu, hedef DNA ile birleşir ve bu olaya hibridizasyon denir. Probun belirlenmesine olanak sağlamak için ise, radyoaktif veya nonradyoaktif işaret eklenir. Prob, klinik örnekteki DNA ile hibridize olursa, bağlı işaret ölçülerek, mikroorganizmanın bulunduğu sonucuna varılır.

Bu problemlerle tanının konabilmesi için, 10^5 - 10^8 basil gereklidir. Bu nedenle klinik örneklerde, yeterli sonuç alınamaz; çoğalmakta olan kültürlerde kullanımı anlamlıdır (8,36,53,71).

DNA problemlerine alternatif bir yaklaşım olan RNA problemleri, bir mikroorganizma için binlerce hedef bulabileceğinden, yöntemin sensitivitesi bu problemlerle daha yüksektir (71).

Gelişmekte olan ülkelerde, yöntemin pahalı oluşu nedeniyle kullanımı kısıtlıdır, ancak, radyoizotop yerine biyotinle işaretlenmiş prob'ların kullanımı ile, bu ülkelerde de yöntemin kullanımı mümkün olabilecektir (36).

Polimeraz zincir reaksiyonu:

Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction - PCR) spesifik DNA dizilerinin, bir primer aracılığıyla yönlendirilen in vitro enzimatik amplifikasyonu yöntemidir (53). İlk kez, 1989 yılında tanımlanan bu teknikle, bir

kaç saat içinde, spesifik hedef DNA dizisinin bir milyondan fazla kopyası elde edilir (15,82).

Değişik klinik örneklerin kullanıldığı bir çok çalışmada PCR, tüberküloz tanısı için duyarlı ve özgül bir yöntem olarak bildirilmektedir (8,45). Ayrıca PCR'ın ilaç direncini belirlemede kullanılabileceğini düşündüren çalışmalar da mevcuttur (63,71).

RFLP (Restriction fragment length polymorphism):

Restriksiyon endonükleazlar DNA'yı belirli noktalardan kesen enzimlerdir. Enzimin tanıma bölgesi klasik olarak 4-8 nükleotid arasında değişir. Enzim ile kesim sonucunda oluşan fragmanlar elektroforez ile ayrılabilir. Bu yöntem, özellikle epidemiyolojik çalışmalar için önemlidir. Bir salgının belirli bir suşla oluştuğu bu yöntemle gösterilebilmektedir (8,51,53,71,82).

Luciferase reporter assay:

Bu yöntem, ilaç direncinin hızlı belirlenebilmesi için geliştirilmiştir (71,82).

Ayrıca, tüm bu tekniklerin yanısıra, ilgili bölgelerin tüberkülozla tutulumunda plevral, perikardiyal ve beyin-omurilik sıvılarında, adenozin deaminaz enziminin; yine plevral tüberkülozda, plevra sıvısında lizozim düzeylerinin yüksek olarak ölçümünün tanıda yardımcı olabileceği bildirilmiştir (71).

Serolojik testler ve ELISA:

Mikobakteriyel antijenlere karşı antikor oluşumu, hem primer hem de postprimer tüberkülozlu hastalarda gösterilmiştir (58). Uzun yıllardan beri, bu antikorları tespit edebilecek, güvenilir serolojik metodlar araştırılmaktadır (46).

Robert Koch'un hastalığın teşhisi için yaptığı, tüberküloz basilinin direkt aglütinasyon testi, serolojik testler ile ilgili ilk başarısız girişimdir (49). Basilin tanımlanmasından 16 yıl sonra ise, Arloing geliştirdiği aglütinasyon testini, pulmoner tüberkülozlu hastaların %57'sinde pozitif bulurken, sağlıklı kontrol grubu

ile başka hastalıkları olan kişilerde bu oranı %11 olarak bildirmiştir (35,49). Sonraki yıllarda, mikobakteriyel hastalıkların serolojik teşhisi için, hemaglütinasyon, lateks aglütinasyon, immünodifüzyon, jel elektroforezi, kompleman birleşmesi, floresan antikor testi, radioimünoassay, dot immünoblotting assay, antigen capture assay gibi pek çok teknik denenmiştir (37,44,49,89). Ancak, bu çalışmalarda, ilk sonuçlar umut verici iken, daha sonra testlerin özgüllüğü yeterli bulunmamıştır.

1972 yılında, Engvall ve Perlman'ın oldukça duyarlı ve tekrarlanabilir bir test olan ELISA'yı (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tanımlamalarının ardından, ELISA testi, enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (35).

ELISA testinde, solid fazda bir absorbana fikse edilen antijene, antikor bağlanması ölçülmektedir (35). Serolojik işlemlerle ilgili genel kural, uygulanan tekniğin majör olarak duyarlılığı, kullanılan antijenin ise majör olarak özgüllüğü belirlemesidir(35). Mikobakteriyel hastalıklarda, özgüllük önemli bir özelliktir. Bu hastalıklarda görülen nonspesifik immünolojik reaksiyonların çoğu, bu mikroorganizmaların türler arasında veya ait oldukları cins ile ortak antijenlere sahip olmalarındandır. İnsanlar ve hayvanlar, çevresel mikobakterilere tekrarlayan maruziyet sonucu, düşük derecelerde immün duyarlanma oluştururlar (35). Bu nedenle, özgüllüğü yüksek olan serolojik testlerin geliştirilebilmesi için, kullanılan antijenik materyalin, çevresel organizmalarla ortak epitoplara taşımamaları veya bunların tanınmasına izin vermemeleri gerekir (35).

ELISA testinin son aşaması ise, sistemde bulunan antikor miktarına göre, miktarı belirlenen bir enzimin, süstratı ile reaksiyona girerek renk oluşturmasıdır (35). Bu tip reaksiyonların tümü zaman ve ısıya bağımlıdır. Bu son reaksiyon aşamasında, şartlarda farklılık oluşu, test sonuçlarının değerlendirilmesinde istem dışı hatalar oluşmasına neden olabilir. Yine testin yapılışı sırasında, yıkama tekniklerinin farklı oluşu, ek bir hata oranı doğurur. Bu

nedenle, tüm ELISA testlerinde, pozitif ve negatif serum örnekleri aynı anda çalışılmalıdır (35).

ELISA testi ile hem antijen, hem de antikor düzeyi ölçümü mümkün olmaktadır. Antijen ölçümleri için balgam ve BOS kullanılmış, antikor ölçümleri ise serumda, BOS'da, bronş yıkama sıvısında ve kapiller kanda gerçekleştirilmiştir (17,54,57,60,64,69,70,77,79,83,88,95). Tüberkülozun teşhisi için uygulanan serolojik testlerde, kullanılan antijenler başlangıçta ham antijenler iken giderek daha saf antijenler kullanılmaya başlanmıştır.

Tüberkülozun serolojik teşhisi ile ilgili ilk çalışma Nassau ve arkadaşlarınınca 1976 yılında yapılmıştır (49). M. tüberkülozis H37 Rv suşunun ısıtılmamış filtratının kullanıldığı çalışmada, duyarlılık, %56.5 ve özgüllük % 97.9 olarak bulunmuştur (35).

Grange ve arkadaşlarının, M. Bovis BCG sonikatını kullandıkları çalışmada, tüberkülozlu hastaların serumlarında, kontrol hastaları, sarkoidozisli hastalar ve Crohn hastalığı bulunan hastalara nazaran, ortalama IgG düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, bir başka çalışmalarında, BCG aşısının sağlıklı kontrollerde IgG titreleri üzerine bir etkisi olmadığını saptamıştır. IgG düzeylerinin, tüberkülin negatiflerde, pozitiflere göre daha düşük olduğunu bildiren araştırmacılar, IgM ve IgA'nın ise diyagnostik olmadığını, tüberkülin müspetliği ile bu immünglobulinlerin düzeyi arasında da bir ilişki olmadığını savunmuşlardır (48).

Kardjito ve ark., Garcia-Ortigoza ve ark., Samuel ve ark., M. tüberkülozis BCG suşunun soniklenmiş antijenini kullanarak, Benjamin ve ark. tüberküloz süzütüsünü, Kiran ve ark. ise tüberküloz ekstraktını kullanarak testin duyarlılığını ve özgüllüğünü araştırmışlardır. Tablo I'de ham basil antijenleri kullanılarak yapılan ELISA testlerinde elde edilen sensitivite ve spesifisite değerleri görülmektedir.

TABLO I: Ham basil antijenleri ile elde edilen ELISA testi sonuçları (35).

Referans	Antijen	Hasta grubu		Kontrol grubu		Duyarlılık	Özgüllük
		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		
Nassau	TB filtratı	26	20	1	47	0.565	0.979
	TB filtratı	37	9	4	44	0.804	0.917
Grange	BCG sonikatı	73	27	1	29	0.730	0.967
Kardjito	BCG sonikatı	82	25	4	139	0.766	0.972
Grange	BCG sonikatı	136	64	1	49	0.680	0.980
Jagannath	TB sonikatı	35	36	12	75	0.493	0.862
Garcia-Ortigoza	BCG sonikatı	39	11	0	50	0.780	1.000
Samuel	BCG sonikatı	37	3	0	20	0.925	1.000
Benjamin	TB filtratı	15	12	7	38	0.556	0.844
Kiran	TB sonikatı	47	3	1	29	0.940	0.967
	TB ekstraktı	47	3	1	29	0.940	0.967

Tüberkülozun serolojik tanısında kullanılan bir diğer antijen de PPD'dir. PPD, M. tüberkülozis'in ısıtılarak öldürülmüş kültüründen elde edilen nispeten ham bir antijendir. Daha saf antijenlerin elde edilmesindeki güçlük nedeniyle, PPD de serolojik testlerde sıkça kullanılmıştır (20,34,56,60,75,85,94). Tablo II'de bazı araştırmacıların PPD antijeni ile elde ettikleri sonuçlar görülmektedir.

Daha saf antijenlerin bulunmasına yönelik çalışmalar sonucunda, Daniel ve arkadaşlarıncı, M. tüberkülozis kültür süzüntülerinden immün sorbent afinite kromatografi yöntemiyle elde edilen Antijen 5 de pek çok araştırmada, antijen olarak kullanılmıştır (3,10,11,18,32,34,66).

M. tüberkülozis H37 Ra'dan elde edilen, homojen sitoplazmik bir protein olan Antijen 6 ise, akciğer dışı tüberküloz tanısında değerli bulunmuştur (35,84).

Reggiardo ve arkadaşları, kromatografik yöntemlerle seroloji yönünden aktif üç farklı glikolipid elde etmişler ve bu glikolipidlerle, hem direkt ve indirekt hemaglutinasyon, hem de ELISA testi uygulayarak, serolojik cevabı incelemişlerdir. Sonuçta, en iyi serolojik cevabın, aktif glikolipid A1 ile olduğunu belirtmişlerdir (35).

Turneer ve arkadaşlarınınca, BCG P32 antijeni ile yapılan çalışmada da, aktif tüberkülozlu hastalarda IgG, IgM ve IgA düzeyleri ölçülmüştür (86). Tablo III'te daha saf antijenlerle yapılan çalışmalardan bazıları ile elde edilen sonuçlar görülmektedir.

TABLO II: PPD antijeni ile elde edilen ELISA testi sonuçları.

Araştırmacı	Hasta	Kontrol	Duyarlılık	Özgüllük
Kalish (1983)(56)	18	119	0.61	0.87
Zeiss (1984)(94)	21	126	0.67	0.79
Kiran (1985)(60)	50	30	0.80	0.78
Daniel (1985)(34)	41	59	0.31	0.93
Thongkrajai (1989)(85)			0.75	0.83

TABLO III: Saf antijenlerle yapılan ELISA testi sonuçları.

Araştırmacı	Antijen	Hasta	Kontrol	Duyarlılık	Özgüllük
Daniel (1985)(34)	A5	41	59	0.49	0.98
Ma (1986)(66)	A5	82	82	0.89	0.94
Daniel (1986)(35)	TB-C-1	61	113	0.69	0.88
Turneer (1988)(86)	P32	102	221	0.55	0.95
Alde (1989)(3)	A5	21	19	0.86	1.00

Son yıllarda, M. Bovis BCG sitoplazmasından elde edilen ve oldukça saf bir antijen olarak kabul edilen A 60 ile de pek çok test yapılmıştır (7,19,16,41,44,50,74,76,87,96). BCG, M. tüberkülozis'in virulan suşları ile antijenik olarak aynı özellikleri taşıdığından, A60'ın insanlarda tüberküloz teşhisinde kullanılabileceği düşünülmüştür (6). Bu antijen ile elde edilen ELISA testi sonuçları Tablo XV'te görülmektedir.

ELISA testi ile antikor aranması, yalnız akciğer tüberkülozlu olgularda değil, barsak tüberkülozu, kemik ve eklem tüberkülozu, tüberküloz menenjit tanılı hastalarda da gerçekleştirilmiştir (22,35,84).



MATERYAL METOD:

Çalışmaya toplam 150 olgu alındı. Olgular bakteriyolojik bulguları ve tüberküloz öykülerine ve basille temas durumlarına göre beş ayrı grupta toplandılar:

1) Aktif tüberkülozlu olgular: Bu olgular A.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları ve tüberküloz kliniğinde yatarak tedavi gören, balgam ARB'leri müspet olan veya balgam yaymaları ARB için menfi olup, kültürlerinde üreme olan hastalardı. Hastalardan kan örnekleri en geç tedaviye başlandıktan sonraki üç gün içinde alındı.

2) Son iki yıl içinde aktif akciğer tüberkülozu tanısı ile tedavi görmüş olan inaktif olgular.

3) On yıldan daha uzun süre önce aktif akciğer tüberkülozu tanısı ile tedavi görmüş olan inaktif olgular: Bu olguların tümü, kliniğimizde bir başka nedenle yatmakta olan, balgam ARB'leri menfi olup, akciğer grafilerinde tüberkülozu düşündüren görünümleri olan ve tüberküloz öyküsü veren olgulardı.

4) Tüberküloz basiliyle temaslı olan sağlıklı kontrol grubu: Bu grubu, kliniğimizde en az iki yıldır çalışmakta olan hekim, hemşire ve hizmetliler oluşturuyordu.

5) Tüberküloz basiliyle temaslı olmayan sağlıklı kontrol grubu.

Tüm olgulardan alınan kan örnekleri, önce oda ısısında bekletildi, daha sonra serumları santrifüj ile ayrıldıktan sonra üç ayrı tüpe bölünerek, -20 derecede saklandı.

Tüm olguların yaşları ile, aktif tüberkülozlu olguların PPD'leri, radyolojik bulguları, balgam ARB'leri, tanı konuncaya kadar geçen semptom süreleri kaydedildi.

Olgulardan alınan serum örneklerinde, A-60 antijenine karşı spesifik antikor düzeylerinin ölçümünde, ANDA.TB ELISA test kiti (Anda Biologicals, France) kullanıldı.

Serumların bir kısmı, test kiti prospektüsünde belirtildiği şekilde 1/100 dilüsyonda çalışıldı, ancak bu şekilde fotometrenin okuyamadığı çok yüksek değerler elde edildi. Bu nedenle ve test kiti içeriğinde belirtildiği şekilde, serumlar 1/500 oranında seyreltilerek yeniden çalışıldı. Dilüe edilmiş serum örneklerinden 100 mikrolitre alınarak, A 60 antijeni ile kaplı ELISA havuzcuklarına konulup, 37°C'de 60 dakika süreyle inkübe edildi. Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkamadan sonra, bu kez, peroksidaz ile işaretli anti-immünglobulin solüsyonundan (Anti-IgG, Anti-IgM veya Anti-IgA) 100 mikrolitre konuldu. 37°C'de 30 dakikalık ikinci bir inkübasyondan sonra, yeniden yıkama yapıldı. Bir OPD enzimatik süstratı eklendi (TMB-100 mikrolitre) ve kolorimetrik reaksiyon için 37°C'de karanlık ortamda 15 dakika daha inkübe edildi. 100 mikrolitre H₂SO₄ ilavesinden sonra, optik dansite (OD) değerleri bir fotometrede 450 nm'de okundu.

Aktif, inaktif ve kontrol gruplarının OD değerleri elde edildikten sonra, basile teması olmayan kontrol grubunun ortalama OD + 2.SD (standart deviasyon) değeri, ayırım (cut-off) noktası olarak kabul edildi.

Daha sonra, belirlenen cut-off değerine göre, ELISA testinin tanısal parametreleri olan duyarlılık, özgüllük, yalancı pozitiflik, yalancı negatiflik, pozitif güvenilirlik ve negatif güvenilirlik oranları saptandı. Bu parametrelerin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanıldı:

$$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{Doğru pozitif}}{\text{Doğru pozitif} + \text{Yanlış negatif}} \times 100$$

$$\text{Özgüllük} = \frac{\text{Doğru negatif}}{\text{Doğru negatif} + \text{Yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{Pozitif prediktif değer} = \frac{\text{Doğru pozitif}}{\text{Total pozitif}}$$

$$\text{Negatif prediktif değer} = \frac{\text{Doğru negatif}}{\text{Total negatif}}$$

Formüllerde;

Doğru pozitif; test ile doğrulukla saptanan hasta kişilere,

Doğru negatif; test ile doğrulukla saptanan sağlıklı kişilere,

Yanlış pozitif; test ile hasta bulunan sağlıklı kişilere,

Yanlış negatif; test ile sağlıklı bulunan hasta kişilere, karşılık gelmektedir.

Çalışmanın istatistiksel değerlendirmelerinde, parametrik varsayımları yerine getirebilmek için, logaritmik transformasyon yapıldı. OD değerlerinin gruplar arasındaki farklılıkları tek yönlü varyans analizi ve ona bağlı olarak Tukey-HSD testi kullanılarak araştırıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise, aktif tüberkülozlu hastaların IgG, IgM ve IgA düzeyleri ile, PPD ölçümleri, radyolojik yaygınlığın derecesi ve tanıya kadar geçen semptom süreleri arasında bir korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Balgam ARB'leri menfi ve müspet olan kişilerin ortalama OD değerleri arasındaki farklılık Student's t testi kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca, sağlıklı kontrol gruplarında (Grup IV ve V) yaş ile immünglobulin düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı incelendi. Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak ilişki katsayıları hesaplandı.

BULGULAR:

Çalışmaya alınan 150 olgunun; 59'u aktif akciğer tüberkülozlu (Grup I), 19'u son iki yıl içinde tedavi gören inaktif akciğer tüberkülozlu (Grup II), 21'i on yıldan daha fazla süre önce tedavi gören inaktif akciğer tüberkülozlu (Grup III), 29'u basile teması olan sağlıklı olgular (Grup IV), 22'si ise basile teması olmayan sağlıklı olgulardı (Grup V).

Grupların yaş ortalamaları Tablo IV'te yer almaktadır.

Tablo IV: Grupların yaş ortalamaları.

GRUP	Olgu sayısı	Ort ± SD
I	59	43.06 ± 14.68 (16 - 70)
II	19	35.47 ± 13.14 (21 - 65)
III	21	62.24 ± 9.35 (43 - 72)
IV	29	39.97 ± 11.37 (24 - 66)
V	22	47.23 ± 13.62 (19 - 70)

Ort: Ortalama

SD: Standart deviasyon

Olguların yaş ortalamaları incelendiğinde, Grup III'teki olguların (10 yıldan daha uzun süre önce tüberküloz tedavisi görenler) diğer tüm gruplardaki olgulara göre yaş ortalamalarının yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). Grup V'teki olgular (temaslı olmayan kontrol grubu) ise, Grup II'deki olgulara (son iki yıl içinde tüberküloz tedavisi gören inaktif tüberkülozlu olgular) göre daha yüksek yaş ortalamasına sahipti ($p<0.05$).

Tüm gruplardaki olguların serum IgG, IgM ve IgA düzeylerine karşılık gelen optik dansite değerleri Tablo V, VI, VII, VIII ve IX'da yer almaktadır.

TABLO V: Aktif akciğer tüberkülozlu hastaların serum immünglobulin düzeylerine karşılık gelen optik dansite (OD) değerleri.

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
H.S.	0.523	0.483	0.541
İ.Y.	0.120	0.448	0.280
M.K.	0.211	0.423	0.626
İ.Ş.	0.619	1.002	2.537
E.K.	1.269	1.978	2.077
F.B.	0.840	0.555	0.814
N.T.	0.638	0.881	1.123
N.T.	0.189	0.256	0.309
H.Ö.	0.569	0.391	0.763
A.Ö.	0.245	0.253	0.254
T.Ö.	0.544	0.230	0.321
O.T.	0.341	0.170	0.627
H.C.	0.692	0.598	0.635
N.A.	0.226	0.402	0.159
Ş.K.	1.301	0.796	1.926
S.E.	1.208	0.809	1.870
Z.Ü.	0.335	0.380	0.312
Z.A.	0.348	0.376	0.693
M.A.	0.369	0.457	0.408
S.S.	0.164	0.151	0.377
S.Ç.	0.888	0.514	1.471
T.Ç.	0.929	0.382	0.991
H.İ.G.	0.841	0.391	0.407

TABLO V: Devam

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
G.K.	0.402	0.464	0.310
B.B.	0.305	0.207	0.155
İ.K.	0.491	0.190	0.698
Y.T.	0.142	0.432	0.496
H.E.	0.173	0.273	0.396
H.A.Ö.	0.134	0.178	0.166
K.M.	0.269	0.427	0.703
H.İ.	1.254	0.319	0.830
M.D.	0.565	0.230	0.832
K.K.	0.097	0.263	0.231
M.A.	0.226	0.617	0.356
İ.A.	0.545	0.349	1.924
H.U.	0.191	0.211	1.973
Ş.Ş.	0.324	0.177	0.441
O.A.	0.700	0.314	1.316
N.D.	0.171	0.468	0.471
H.A.	0.313	0.199	0.656
M.S.	0.501	0.363	1.907
D.D.	1.236	1.514	2.481
G.Y.	0.331	0.550	0.502
Y.K.	0.182	0.420	0.470
M.Ş.	1.234	0.656	1.010
U.Y.	0.201	0.273	0.951
C.G.	0.271	0.343	0.270
O.T.	0.222	0.411	1.553

TABLO V: Devam

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
Y.T.	0.104	0.179	0.339
Y.A.	0.546	0.262	1.464
H.T.	0.105	0.270	0.224
Y.A.	0.291	0.249	0.047
H.Ş.	0.515	0.422	1.153
A.Y.	0.858	0.364	0.908
S.Y.	0.316	0.502	0.624
E.T.	1.298	0.334	2.126
P.D.	0.125	0.244	0.375
R.B.	0.806	0.199	1.584
İ.D.	0.387	0.604	0.932

TABLO VI: Son iki yıl içinde tüberküloz tedavisi gören inaktif tüberkülozlu hastaların serum immünglobulin düzeylerine karşılık gelen OD değerleri.

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
N.Y.	0.149	0.401	0.927
S.G.	0.770	0.435	0.220
D.P.	0.686	0.290	0.799
M.C.	0.284	0.258	0.725
S.Y.	0.311	0.372	2.302
Z.E.	0.224	0.193	0.410
İ.S.	0.667	0.528	0.741
H.K.	0.262	0.487	0.460
C.T.	0.131	0.250	0.521
M.T.	0.128	0.228	0.592
E.Y.	0.638	0.346	0.857
H.Ç.	0.343	0.666	0.254
D.A.	0.393	0.488	0.741
M.P.	0.692	0.277	1.873
F.K.	0.115	0.447	0.406
A.B.	0.406	0.353	1.495
İ.E.	0.585	0.191	0.311
H.E.	0.361	0.236	0.736
Z.E.	0.307	0.370	0.569

TABLO VII: On yıldan uzun süre önce tedavi gören inaktif tüberkülozlu hastaların serum immünglobulin düzeylerine karşılık gelen OD değerleri.

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
N.D.	0.846	0.439	2.893
K.U.	0.499	1.003	0.606
M.A.	0.858	0.325	1.645
G.K.	0.264	0.216	0.844
Ş.Y.	0.123	0.368	0.248
M.Ö.	0.544	0.635	1.239
H.S.	0.625	0.412	1.731
A.Ö.	0.176	0.234	0.668
Ö.S.	0.636	0.478	1.336
D.Ü.	0.158	0.303	0.514
B.K.	0.158	0.207	0.201
M.A.	0.110	0.111	0.115
H.Y.	0.212	0.175	0.550
D.E.	0.405	0.299	0.805
H.İ.	0.309	0.445	0.350
K.O.	0.101	0.150	0.486
K.Ö.	0.242	0.254	0.835
A.U.	0.602	0.584	2.138
B.T.	0.129	0.096	0.312
M.D.	0.146	0.466	0.340
F.G.	0.170	0.354	2.126

TABLO VIII: Basille temaslı olan sağlıklı kontrol grubunda serum immünglobulin düzeylerine karşılık gelen OD değerleri.

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
Ö.Ö.	0.262	0.351	0.201
A.A.	0.140	0.331	0.221
N.S.	0.398	0.492	0.697
D.B.	0.434	0.351	0.269
S.Ö.	0.105	0.407	0.182
H.U.	0.104	0.413	0.217
A.B.	0.082	0.091	0.102
N.Ö.	0.105	0.384	0.252
A.P.	0.098	0.740	0.177
A.Ş.	0.211	0.334	0.413
H.Y.	0.177	0.420	0.379
S.B.	0.212	0.309	0.277
A.Y.	0.146	0.334	0.409
Ş.T.	0.130	0.532	0.253
S.C.	0.166	0.163	1.330
İ.S.	0.536	0.219	1.210
H.T.	0.435	0.428	0.642
Z.D.	0.099	0.108	0.127
B.Y.	0.123	0.200	0.226
K.İ.	0.085	0.102	0.159
İ.S.	0.087	0.169	0.135
M.A.U.	0.126	0.110	0.142
O.A.	0.223	0.175	0.313
A.U.	0.221	0.290	0.367

TABLO VIII: Devam

N.S.	0.164	0.141	0.048
E.E.	0.269	0.292	0.200
T.A.	0.139	0.498	0.241
B.Ç.	0.291	0.213	0.397
Ş.T.	0.128	0.822	0.431

TABLO IX: Basille temaslı olmayan sağlıklı kontrol grubunda serum immünglobulin düzeylerine karşılık gelen OD değerleri.

HASTA ADI	IgG	IgM	IgA
H.G.	0.152	0.504	0.264
H.A.	0.194	0.197	0.287
E.A.	0.108	0.403	0.177
F.İ.	0.113	0.150	0.320
M.İ.	0.288	0.199	0.353
M.A.	0.153	0.296	0.260
A.E.	0.126	0.537	0.292
S.K.	0.136	0.292	0.158
H.E.	0.111	0.208	0.252
D.G.	0.327	0.413	0.499
F.D.	0.172	0.579	0.964
M.Ç.	0.195	0.528	0.297
H.E.	0.272	0.480	0.347
T.S.	0.103	0.298	0.193
H.H.D.	0.117	0.203	0.499
H.Ç.	0.427	0.539	0.470
A.V.	0.145	0.309	0.549
M.G.	0.159	0.169	0.454

TABLO IX: Devam

F.E.	0.142	0.289	0.354
A.D.	0.140	0.929	0.867
N.E.	0.376	0.405	1.072
K.K.	0.327	0.304	0.569

Grupların ortalama OD değerleri incelendiğinde, IgG için, Grup I ve Grup II arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı, ancak bu iki grubun ortalama değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Tablo X'da tüm grupların IgG için ortalama OD değerleri grlmektedir.

Grupların IgM için ortalama OD değerleri incelendiğinde, gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p<0.05$). Tablo XI'de grupların IgM için ortalama OD değerleri grlmektedir.

IgA için ortalama OD değerlerinin incelenmesi sonucu ise, Grup I ile Grup V'in, Grup I,II ve III ile Grup IV'n değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p<0.05$). Tablo XII'de IgA için ortalama OD değerleri grlmektedir.

TABLO X: Grupların IgG için ortalama OD değerleri.

GRUP	OLGU SAYISI	ORT \pm SD
GRUP I	59	0.496 \pm 0.359
GRUP II	19	0.392 \pm 0.216
GRUP III	21	0.348 \pm 0.248
GRUP IV	29	0.196 \pm 0.120
GRUP V	22	0.195 \pm 0.096

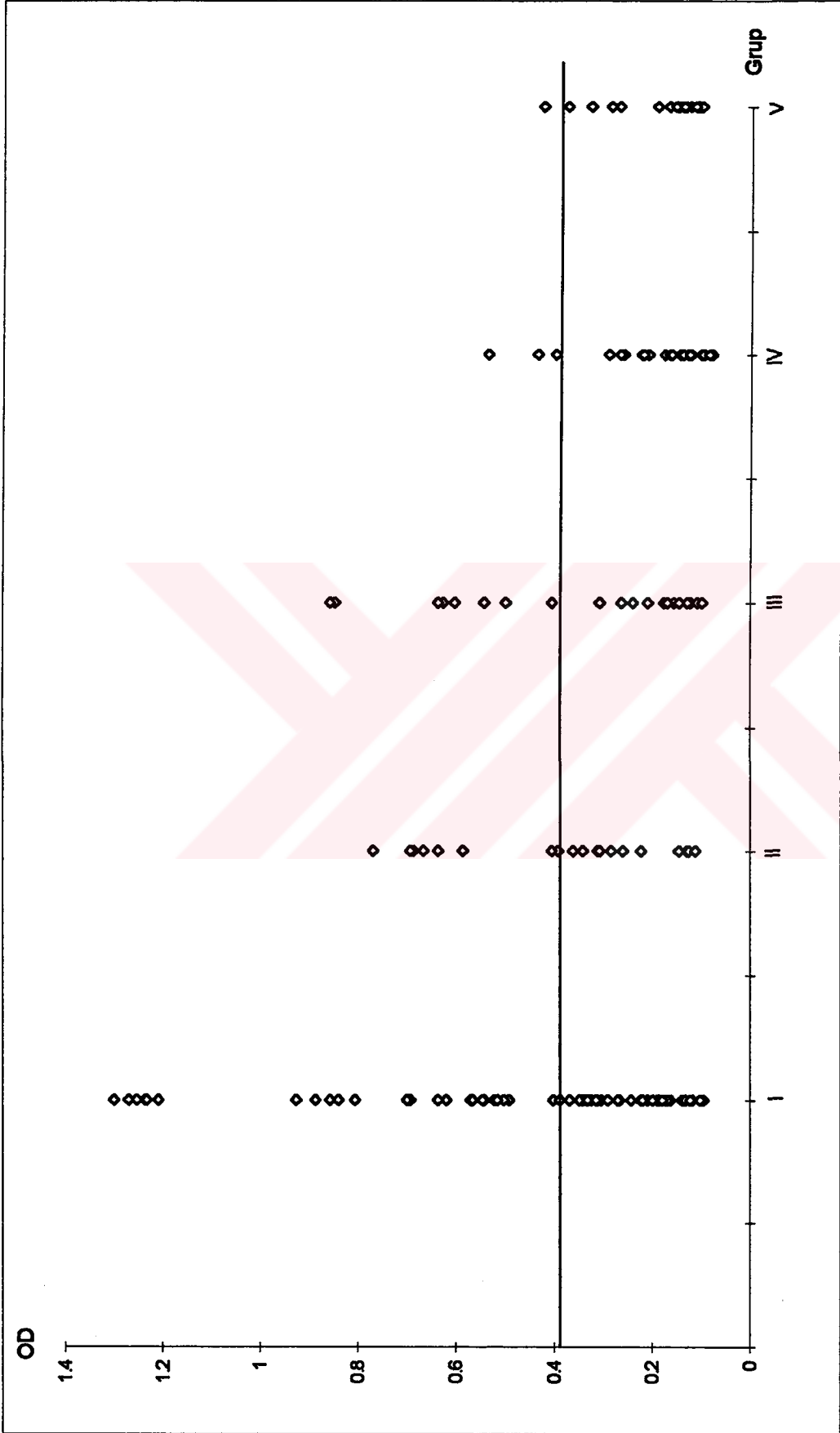
TABLO XI: Grupların IgM için ortalama OD değerleri.

GRUP	OLGU SAYISI	ORT ± SD
GRUP I	59	0.437 ± 0.310
GRUP II	19	0.359 ± 0.128
GRUP III	21	0.360 ± 0.209
GRUP IV	29	0.325 ± 0.180
GRUP V	22	0.374 ± 0.183

TABLO XII: Grupların IgA için ortalama OD değerleri.

GRUP	OLGU SAYISI	ORT ± SD
GRUP I	59	0.854 ± 0.647
GRUP II	19	0.786 ± 0.547
GRUP III	21	0.952 ± 0.761
GRUP IV	29	0.345 ± 0.296
GRUP V	22	0.432 ± 0.249

ELISA testinin aktif akciğer tüberkulozunda tanı değerini araştırmak üzere testin tanısal parametreleri olan duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer öncelikle IgG için hesaplandı. Bunun için, basille teması olmayan sağlıklı kontrol grubundaki olguların ortalama OD değeri+ 2.SD (standart sapma) ayırım (cut-off) noktası olarak belirlendi (IgG için 0.386). Şekil I'de, tüm gruplardaki olgular için, cut-off değerine göre IgG'ye karşılık gelen OD değerleri dağılımı görölmektedir. Bu ayırım noktası için; 59 kişilik hasta grubunda, 28 kişi ayırım değeri üzerinde sonuç verirken, 31 kişi negatif sonuç verdi. Bu durumda IgG için, duyarlılık ((28/59) x 100) = % 47.5 bulundu. Yalancı negatiflik oranı ise, ((31/59) x 100) = %52.5 idi. Grup II ve III'te, yani tüm inaktif olgular içinde ise, 15 kişi ayırım değerinin üzerinde sonuç verdi (15/40 = %37.5). Basille teması olmayan



Şekil I: Tüm gruplarda IgG için cut-off değerine göre OD değerleri dağılımı.

kontrol grubunda ise yalnız bir olgu ayırım değerinin üzerinde sonuç verdi. Bu durumda, yalancı pozitiflik oranı %4.5, testin özgüllüğü ise, % 95.5 bulundu. IgG için pozitif prediktif değer %96.5 , negatif prediktif değer ise %59.6 idi.

Tüm immünglobulinler (IgG, IgM ve IgA) için ayrı ayrı cut-off noktası belirlenip, testin duyarlılığı ve özgüllüğü her üç immünglobulin için yeniden hesaplandığında ise, duyarlılık %52.5, özgüllük ise, % 81.8 olarak saptandı.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise aktif akciğer tüberkülozu olan grupta, immünglobulin düzeyleri ile, PPD değeri, balgam ARB müspetliği, radyolojik yaygınlık ve teşhise kadar geçen semptom süresi; sağlıklı kontrol gruplarında ise immünglobulin düzeyleri ile yaş arasında bir korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Tablo XIII'de aktif tüberkülozlu gruptaki olguların bu özellikleri görülmektedir.

TABLO XIII: Aktif akciğer tüberkülozlu grubun yaş, PPD , balgam ARB, radyolojik yaygınlık, semptom süresi değerleri.

HASTA ADI	YAŞ	PPD (mm)	BALGAM ARB	RADYOLOJİK YAYGINLIK	SEMPATOM SÜRESİ (AY)
H.S.	43	-	+++	2	12
İ.Y.	22	-	++	2	1
M.K.	61	-	+	1	1
İ.Ş.	47	-	++	6	4
E.K.	32	-	++	4	1/3
F.B.	27	-	++	6	3
N.T.	35	18	++	4	1
N.T.	37	16	+++	2	1
H.Ö.	26	-	++	2	1/4
A.Ö.	70	-	+	6	3
T.Ö.	45	-	+	3	2
O.T.	28	5	+++	1	1/4

TABLO XIII: Devam

H.C.	42	-	+++	5	1.5
N.A.	57	-	-	1	2.5
Ş.K.	53	18	++	5	2
S.E.	61	25	-	6	3
Z.Ü.	30	-	-	2	1.5
Z.A.	65	25	-	1	12
M.A.	56	20	-	1	12
S.S.	66	-	++	1	1.5
S.Ç.	52	-	+	1	3
T.Ç.	40	-	++	5	1
H.İ.G.	21	15	++	2	2
G.K.	34	-	-	2	1/2
B.B.	37	-	++	4	1
İ.K.	50	-	+++	4	2
Y.T.	38	-	+++	4	1
H.E.	46	-	++	3	3
H.A.Ö.	68	21	+	1	2
K.M.	55	-	+	2	1
H.İ.	16	-	-	6	12
M.D.	38	19	-	6	2.5
K.K.	30	-	-	1	1
M.A.	24	-	+	2	12
İ.A.	29	18	+++	3	2
H.U.	70	-	++	3	1/4
Ş.Ş.	34	15	-	1	1
O.A.	26	18	++	1	1.5

TABLO XIII: Devam

N.D.	68	22	-	6	3
H.A.	37	12	++	4	1
M.S.	53	-	+++	2	1
D.D.	60	15	+	2	3
G.Y.	31	13	+++	2	6
Y.K.	54	-	-	1	1
M.Ş.	59	20	+	3	2
U.Y.	39	20	++	3	1
C.G.	25	-	-	6	1
O.T.	56	-	+	2	12
Y.T.	28	-	+	2	1
Y.A.	44	23	-	6	12
H.T.	45	20	++	1	1
Y.A.	33	18	+++	2	3
H.Ş.	70	16	++	2	1
A.Y.	47	16	+++	5	2
S.Y.	37	20	++	1	5
E.T.	41	-	+	1	2
P.D.	58	25	++	2	1
R.B.	41	19	++	1	12
İ.D.	18	18	++	1	12

Aktif akciğer tüberkülozlu grupta, IgG,IgM ve IgA değerleri ile PPD değerleri arasında bir korelasyon saptanmadı ($r=0.179$, $p>0.05$).

Aynı grupta, balgam ARB müspetliği ile immünglobulin düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı da araştırıldı. Balgam ARB'leri menfi olan grup

ile, balgam ARB'leri müspet olan grubun ortalama OD değerleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$)

Hastalar, hastalığın radyolojik yaygınlık derecesine göre, her bir akciğerde tutulan zon sayısı gözönüne alınarak, 1 ile 6 derece arasında derecelendirildi. Tablo XIV'de radyolojik yaygınlığın derecesine göre, ortalama immünglobulin değerleri görülmektedir.

TABLO XIV: Radyolojik yaygınlığa göre ortalama immünglobulin değerleri.

RADYOLOJİK YAYGINLIK	IgG	IgM	IgA
1. DERECE	0.406 ± 0.330	0.338 ± 0.139	0.734 ± 0.569
2. DERECE	0.400 ± 0.290	0.458 ± 0.294	0.726 ± 0.667
3. DERECE	0.481 ± 0.408	0.332 ± 0.166	1.096 ± 0.717
4. DERECE	0.526 ± 0.402	0.648 ± 0.704	0.867 ± 0.670
5. DERECE	0.945 ± 0.257	0.535 ± 0.204	1.115 ± 0.562
6. DERECE	0.635 ± 0.398	0.471 ± 0.272	1.038 ± 0.773

Radyolojik derecelere göre karşılaştırmada da istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Hastaların teşhislerine kadar geçen semptom süresi ile oluşan antikor düzeylerine karşılık gelen OD değerleri incelendiğinde, IgG için sınırda anlamlı fakat zayıf bir ilişki saptandı ($r=0.256$, $p=0.05$).

Sağlıklı kontrol grubunda, antikor düzeylerinin yaş ile ilişkisi de araştırıldı. Basile teması olan grup ile teması olmayan grupta, yaş ile IgG düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı, ancak yaş ve IgM düzeylerinin negatif yönde zayıf ilişkili olduğu görüldü ($r= - 0.362$, $p<0.01$).

TARTIŞMA:

Tüberküloz hastalığı, tüm dünyada, önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde 1980'li yıllara kadar hastalık prevalansında düşme görülürken, bu yıllardan itibaren önce bir duraklamayı takiben, 1985 yılından sonra, hastalığın prevalansında artış gözlenmiştir. 1990 yılında, Dünya Sağlık Örgütü'nce, tüberkülozun, ölüm nedenleri arasında 5. sırada olduğu bildirilmiştir.

Tüberküloz hastalığının erken teşhisi, hastalığın yayılma özelliği nedeniyle önem taşımaktadır. Hastalığın yayılmasından, primer olarak aktif akciğer tüberkülozlu kişiler sorumludur. Bu kişilerden etrafa yayılan, basil içeren damlacık çekirdeklerinin inhalasyonu ile enfekte olan kişilerden %10'u, hayatlarının bir döneminde, aktif tüberküloz hastalığı geliştirmekte ve hastalığın yayılması için potansiyel oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, hastalığın kontrol altına alınabilmesi, aktif akciğer tüberkülozlu hastalara, en kısa sürede tanı konup tedavi başlanarak, bu kişilerin çevrelerini enfekte etmelerini önlemeye bağlıdır.

Tüberküloz hastalığının kesin tanısı, enfekte doku ve sekresyonlarda, yaymada ARB görülmesi ve kültürlerde ARB üretilmesi ile olur. Ancak, ARB'in yaymada direkt olarak veya homojenizasyon işleminden sonra gösterilmesi her vakada mümkün olmamaktadır. Basilin üreme özellikleri nedeniyle de, kültürlerde üreme 3 ile 6 haftalık bir zaman almakta ve tanıda gecikmeye yol açmaktadır. Çocuk tüberkülozu ve akciğer dışı organ tüberkülozlarında, muayene materyalinin elde edilmesindeki güçlük nedeniyle, tanı bu hastalarda da oldukça güçlükle konmaktadır.

Tüberküloz hastalığının, bakteriyolojik tanısındaki bu güçlükler nedeniyle, uzun yıllardan bu yana, serolojik teşhisle ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Tüberkülozlu hastalarda, serolojik testlerle, hem antijen aranması, hem de mikobakteriyel antijenlere karşı antikor bakılması denenmiştir (36). Yanez ve arkadaşları, balgamda (92), Wu ve arkadaşları ise BOS'da (91), mikobakterilere

ait antijenleri aramışlardır. ELISA testinin balgamda kullanımı zordur, çünkü balgam nonhomojen jel kıvamında bir materyaldir, bu teknikler ise bakteriyel ürünün üniform dağılımını gerektirmektedir, bu nedenle balgam bu teknikler için uygun bir materyal değildir. Ayrıca, ELISA yöntemi ile, antijenin saptanabilmesi için, muayene maddesinin mililitresinde, 10.000 basil bulunması gerektiği vurgulanmıştır (36).

Serolojik testlerle antikor bakılması, çok eskilere dayanmakla birlikte, ELISA yöntemiyle çalışmalar, 1976 yılında, Nassau ve arkadaşlarının çalışması ile başlamıştır. Bu yöntemle antikor aranırken, çok çeşitli antijenler kullanılmıştır (12,43). BCG hücresi, mikobakteriyel sonikatlar, ekstraktlar, PPD gibi ham basil antijenleri ile yapılan ilk çalışmaları, antijen 5, antijen 6, antijen 60 gibi daha saf antijenler ile yapılan çalışmalar takip etmiştir.

Biz de çalışmamızda, saflaştırılmış antijenlerden biri olduğu kabul edilen A60 antijenine karşı IgG, IgM ve IgA yapısındaki antikor düzeylerini, aktif tüberkülozlu, inaktif tüberkülozlu ve sağlıklı kişilerde araştırdık. Ayrıca, bu antikorların düzeyi ile, yaş, PPD reaktivitesi, balgam ARB müspetliği, radyolojik yaygınlığın derecesi ve hastaların tanıya kadar olan semptom süreleri arasında bir korelasyon olup olmadığını araştırdık.

Tüberküloz basili ile ilk karşılaşmada, önce IgM yapısındaki antikorların yükseldiği, bir kaç gün içinde, bu antikorların yerlerini, uzun süreli IgG yapısındaki antikora bıraktığı bildirilmektedir (40,67). Basil ile post primer enfeksiyonda ise, IgM antikorlarında yükselme olmaksızın, IgG antikorlarının fazla miktarda ve birdenbire yükselmesi, bir çeşit rapel etkisi (booster effect) olarak tanımlanmıştır (67). Yine, postprimer olgularda, IgM'in ancak bir süperenfeksiyonu göstermede yararlı olacağı vurgulanmıştır. Günümüz teknikleri ile, yalnızca IgG antikor ölçümünün, diyagnostik uygulamada yeri olabileceği öne sürülmektedir (35). Biz de, bu nedenle, çalışmamızda, postprimer tüberküloz olduğunu düşündüğümüz

vakalarımızda, öncelikle, IgG tipindeki antikorlar ile elde edilen sonuçları inceledik.

Çalışmamızda, aktif tüberkülozlu grubun IgG için ortalama OD değeri, son iki yıl içinde tüberküloz tedavisi gören grup ile istatistiki olarak anlamlı bir fark göstermemekte iken, bu iki grup, diğer tüm gruplardan (Grup III, IV ve V) istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek OD değerine sahipti.

A60 antijeni ile yapılan önceki serolojik çalışmalarda da, aktif tüberkülozlu grubun, sağlıklı kontrollere göre yüksek ortalama OD değerine sahip olduğu saptanmıştır.

Charpin ve arkadaşları, yaymada ARB'i menfi olup, kültürlerde üremesi olan aktif akciğer tüberkülozlu 25 hastanın IgG için ortalama OD değerini, 0.76 ± 0.47 olarak saptarken, sağlıklı kontrol grubunun, ortalama OD değerini 0.23 ± 0.13 olarak saptamıştır. İki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (19). Bu çalışmada da, bizim çalışmamızda olduğu gibi, son iki yıl içinde tüberküloz tanısı ve tedavisi almış olan inaktif grup ile, aktif akciğer tüberkülozu tanısı konan hastalar arasında, anlamlı bir fark saptanmamıştır. Maes, aktif tüberküloz için tedavi başladıktan 7 ay sonrasına kadar antikor titresinin yüksek kalacağını bildirmişti (67). Fadda ve arkadaşları, M tüberkülozis'in kültürlerde üretildiği pulmoner tüberkülozlu hastalarda tedavi sonrası spesifik IgG düzeylerinin arttığını ve bu özelliğin tedavi altındaki hastaların takibinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır (41).

Turneer ve arkadaşları ise, primer asemptomatik ve semptomatik tüberkülozlu çocuklarda yaptıkları çalışmalarında, tedavi gören grupta ortalama OD değerlerini, tedavi almamış gruba göre yüksek bulmuşlar ve bunun antitüberkülo ilaçlar ile harab olan mikobakterilerden artmış antijen salınımına bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada, tedavisi iki yıldan kısa süre önce tamamlanan çocuklar ile, 2 yıldan daha uzun süre önce tamamlanan

çocuklar arasında anlamlı bir fark bulunmaması, antikorların uzun sürede progresif olarak azaldıktan sonra negatifleşebileceğini ortaya koymaktadır (87).

Caminero ve arkadaşlarının çalışmasında, aktif akciğer tüberkülozlu grubun ortalama EÜ (ELISA ünitesi) değeri, hem inaktif tüberküloz grubundan, hem de sağlıklı kişiler ve nontüberküloz pnömopatili kişileri içeren kontrol grubundan yüksek saptanmıştır. Bu çalışmada, inaktif tüberkülozlu grubun tedavilerinin ne kadar zaman önce sonlandığı belirtilmemiştir (16).

Çalışmamızda, son iki yıl içinde tedavi gören inaktif olgularla, 10 yıldan uzun süre önce tedavi gören olgular arasında, IgG için ortalama OD değerlerinin farklı olması, tedaviden sonraki yıllar içinde, antikor düzeyinin giderek düştüğünü ve sağlıklı kişilerin düzeyine kadar azaldığını göstermektedir.

Çalışmamızda araştırdığımız diğer bir nokta, basile temasın sağlıklı kişilerde, antikor düzeyini etkileyip etkilemediği konusu idi. En az iki yıl süre ile Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz kliniğinde çalışmakta olan personelin antikor titresine karşılık gelen ortalama OD değeri, basile teması olmayan olguların ortalama OD değerinden farklı bulunmadı. Wirmann'ın bir süpermarket çalışanlarında A60 antijenine karşı ölçtüğü antikor titresini sonuçları, basille temasın antikor titresini üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Süpermarkette çalışan ve müşterilerle direkt temas halinde olan kişilerden % 14'ü, seropozitif olarak saptanırken, sağlıklı erişkin popülasyonun seropozitivite oranı % 1.5 bulunmuştur. Süpermarket çalışanlarından, müşterilerle direkt temas halinde bulunmayan, yönetici, ticari eşyaların sevki ile uğraşan veya süpermarketin temizliğinde görevli kişilerin ise tümü seronegatif olarak saptanmıştır (90).

Gevaudan ve arkadaşlarının çalışmasında da, 200 sağlıklı kontrolden (148'i PPD pozitif, BCG aşıları kişi) yalnızca 10 kişide seropozitivite saptanmıştır ki, bu on kişi, göğüs hastalıkları kliniğinde çalışan hemşireler ile mikobakteri laboratuvarında görevli laborantlardan oluşmaktadır. Aynı çalışmada, non-

tüberküloz akciğer hastalığı olan hastaların 1/4'ünde de, anti-A60 IgG antikoruna zayıf pozitif olarak saptanmıştır (44).

Çalışmamızda basile temasın ortalama antikor titresini etkilememesi, toplumumuzda tüberkülozun yaygın olarak bulunmasının bir sonucu olabilir. Mikobakteriyel temasın zaten var olması, hastane çalışanları ile hastane dışındaki kişiler arasındaki farkı azaltmaktadır. Ancak çalışmamızda da, ortalama değerler farklı olmamakla birlikte, seropozitif kişilerin sayısı araştırıldığında, temaslı olmayan gruptan yalnız bir kişi (1/22= % 4.5) seropozitif olarak saptanırken, hastane çalışanlarından dört kişinin (4/29= % 13.7) seropozitif olduğu görülmüştür.

IgM için ortalama OD değerleri, çalışmamızda tüm gruplar için istatistiki olarak anlamlı fark göstermedi. Bu durum, çalışmaya alınan kişilerin, erişkin yaş grubunda olması ile açıklanabilir. Tüberküloz enfeksiyonunun yaygın olduğu ülkemizde, çoğu kişinin, basile temasının çocuk yaşta gerçekleştiği ve primer enfeksiyonu geçirdiği düşünülmektedir. Primer enfeksiyon sırasında, belirgin olarak yükselen IgM titresini, bir kaç gün içinde düşerek yerini IgG'ye bırakmaktadır. Dolayısıyla erişkin yaş grubunda, hasta veya sağlıklı tüm kişilerde, ortalama IgM titresinin farklı olmayışı şaşırtıcı değildir.

Charpin ve arkadaşlarının çalışmasında, ortalama IgM değerleri de, aktif ve son iki yıl içinde tüberküloz geçiren inaktif grup arasında farklı bulunmazken, bu iki grubun ortalama IgM değeri, diğer iki gruptan (>10 yıllık inaktif tüberküloz grubu ve sağlıklı kontrol grubu) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (19). Charpin'in çalışmasında, Avrupalı, Kuzey Afrikalı, Siyah Afrikalı ve Asyalı olmak üzere dört etnik orijinden insan bulunmaktadır, ancak çoğunluğu Avrupalılar oluşturmaktadır. Çalışmaya alınan kişilerde primer tüberküloz mu, yoksa postprimer tüberküloz mu olduğu belirtilmemiştir. Ülkemiz kadar yaygın enfeksiyon prevalansına sahip olmayan Avrupalılarda, primer enfeksiyonun erişkin yaşta görülme şansı ülkemize oranla daha fazladır. Bu nedenle, bu

çalıřmada ve enfeksiyon prevalansının dūřuk olduđu ũlkelerden bildirilen diđer çalıřmalarda, aktif tūberkūlozlu kiřilerde IgM'in yũksek oluřu muhtemelen bu nedenledir.

Gevaudan ve arkadaşlarının çalıřmasında da IgM, primer tūberkūlozlu grupta oldukça yũksek seropozitiviteye sahip iken, postprimer tūberkūlozlu grupta, IgM seropozitivite oranı, çok daha dūřuk (pulmoner tūberkūlozlu grupta, 262 vakanın 16'sında, %5 vakada) saptanmıř, kontrol grubunda ise seropozitiviteye rastlanmamıřtır (44).

Baelden ve arkadaşlarının çalıřmalarında, IgM ōlũmleri, yakında enfekte olduđu dūřũnũlen iki grupta (latent aktif primer tūberkūloz ve patent aktif primer tūberkūloz) bile çok dūřuk pozitivite deđerlerine sahip bulunmuř ve sonuçların deđerlendirilmesinde IgM ōlũmleri gŕzardı edilmiřtir (6).

Aynı şekilde, Tumeer ve arkadaşlarının çalışmasında da, sağlıklı kontrol grubundaki çocuklarla, mikobakteriden bağımsız hastalığı olan çocuklar, yakın zamanda BCG ile aşılanmış grup, semptomatik veya asemptomatik primer tūberkūlozlu çocuklar ve atipik mikobakterilerle enfekte adenitli ocuklarda, IgG ve IgM değerlerinin bũyũk oranda çakıştığı gŕzlenmiřtir(87).

Çalışmamızda IgA yapısındaki antikorların ōlũmũnde ise, aktif akciğer tūberkūlozlu grup ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanmıştır.

ELISA testinin tūberkūloz hastalığında tanı değerini anlamak için ortalama immũnglobulin dũzeylerinin gruplar arasındaki farkını belirlemek yeterli değerdir. Bunun için testin tanısıl parametreleri olan duyarlılık, ōzgũllũk, pozitif ve negatif prediktif değerin hesaplanması gereklidir. Tūberkūloz hastaları ve sağlıklı bireylerin antikor dũzeyleri geniş bir aralığa yayılmakta, bu nedenle sayılan parametreleri hesaplamak için bir ayırım değerini saptanmaktadır. Çalışmamızda, daha ōnce yapılan benzer çalışmaları gŕzŕnũne alarak, sağlıklı kontrol grubunun ortalaması + 2.SD cut-off değerini olarak alındığında IgG için testin duyarlılığı

%47.5, özgülüğü ise %95.5 olarak hesaplandı. IgM değerleri ortalama olarak gruplar arasında fark göstermemesine rağmen sonuçlar her iki immünglobulin için değerlendirildi, sonuçta IgM 'in değerlendirilmesinin testin tanısal değerine katkısı olmadığı görüldü. Her üç immünglobulinin (IgG, IgM ve IgA) birlikte değerlendirilmesinde ise duyarlılık %52.5'e yükselirken, özgülük %81.8'e düştü.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı cut-off değerleri kullanılmıştır(67). Belçika'da 160 ELISA ünitesi cut-off değeri olarak yeterli bulunurken, Fransa,İspanya ve Almanya'da 200 ELISA ünitesi tercih edilmiş, Çin ve Senegal'de ise 250-280 ELISA ünitesinin cut-off değeri olarak daha uygun olacağı düşünülmüştür (67). Cut-off değerindeki bu farklılıklar, bu ülkelerde enfeksiyon prevalansının farklı oluşundan ileri gelmektedir. Hastalık prevalansının yüksek olduğu ülkelerde sensitivite yüksek, ancak spesifisite düşüktür. Testin spesifisitesinin artırılabilmesi için, bu ülkelerde, cut-off değerinin daha yüksek tutulması gerekmektedir. Ülkemiz, hastalık prevalansının yüksek olduğu bir ülke olmasına karşın, bizim çalışmamızda testin duyarlılığı düşük, özgülüğü ise yüksek bulunmuştur. Ancak, çalışmamız ile diğer çalışmalar arasında, sonuçların değerlendirilmesi bakımından önemli bir fark mevcuttur. A60 antijeni ile yapılan önceki çalışmalarda, serumlar 1/100 oranında dilüe edilirken, çalışmamızda, bu dilüsyonda çok yüksek değerler elde edilmesi nedeniyle , serumlar 1/500 oranında sulandırılmıştır. Sulandırım oranındaki bu fark nedeniyle, cut-off değerinin yükseltilmesinden ziyade, duyarlılığın artırılabilmesi için, düşürülmesi denenmiştir. Sağlıklı kontrol grubunun ortalama OD değeri + 1.SD, cut-off olarak alındığında, IgG için testin duyarlılığı %64.4, özgülüğü ise, %81.8 olmaktadır. Her üç immünglobulin aynı anda değerlendirildiğinde ise, bu cut-off değeri için duyarlılık %72.9, özgülük ise %72.7 bulunmaktadır. Sonuçların değerlendirilmesinde, testin özgülüğünün daha yüksek bulunduğu, ortalama OD + 2.SD değerinin cut-off olarak alındığı, değerler incelenecektir.

Çalışmamızda, %4.5 oranında (1/22) yalancı pozitiflik saptanmıştır. Yalancı pozitiflik, M.tüberkülozis ile aynı antijen veya epitoplara taşıyan çevresel mikobakterilere maruziyet sonucu ortaya çıkabilmektedir (6,10). Korinebakterium ve Nokardia, antijenik benzerlikler nedeniyle çapraz reaksiyon oluşturabilirler (6,67). Tüberküloz dışı hastalığı, özellikle de akciğer hastalığı olanlarda da, sağlıklı kişilere oranla seropozitivite oranları yüksek bulunmaktadır (67). Ayrıca, inaktif tüberkülozlu olgularda, yalancı pozitiflik, önemli bir problem oluşturmaktadır. Çalışmamızda, sağlıklı kontrol grubunda yalnız bir kişide seropozitivite saptanmıştır, ancak, bu kişinin eşinin bir kaç yıl önce aktif akciğer tüberkülozu tanısıyla tedavi gördüğü öğrenilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen yalancı negatiflik oranı ise, % 52.5 gibi oldukça yüksek bir değerdir. Yalancı negatifliğin, ağır tüberküloz enfeksiyonlarında, mikobakteriyel antijenlerin salınımı ile immünkomplekslerin oluşumuna ve serumda spesifik antikor aktivitesinin düşmesine bağlı olabileceği bildirilmiştir (6). Bazı araştırmacılar, uzun süreli hastalık ve alkolizm gibi durumların azalmış spesifik humoral cevaptan sorumlu olabileceğini ileri sürerken, bazıları da supresör monosit ve T lenfositlerin sayılarındaki artışın, B hücrelerin aktivitelerini ve dolayısı ile, antikor seviyelerini düşürebileceğini öne sürmektedirler (6).

A60 antijenine karşı antikor ölçümleri, gerek tüberküloz hastalığının tanısında kullanım değerinin araştırılması ve gerekse de hastalığın gelişim sürecinde antikor titrelerindeki değişimin incelenmesi amacıyla pek çok araştırmacı tarafından yapılmıştır.

Charpin ve arkadaşları, çalışmalarında, IgG için duyarlılığı %48, özgüllüğü %71 olarak saptamışlardır. Bu çalışmada, IgM'in de kullanılması ile duyarlılık %68'e , özgüllük ise %100'e yükselmiştir. IgM'in testin duyarlılığı ve özgüllüğüne olan katkısı, bizim çalışmamızda gözlenmemiştir. IgG için elde edilen sensitivite değeri bizim elde ettiğimiz değere oldukça yakın olmakla birlikte, özgüllük bizim elde ettiğimiz değerden daha düşüktür. Bu fark, Charpin'in

çalışmasında özgüllük hesabı yapılırken, inaktif tüberkülozlu hastaların da değerlendirmeye katılmasındandır. Bizim çalışmamızda da, inaktif tüberkülozlu grup dahil edildiğinde testin özgüllüğü, %76.9'a düşmektedir.

Baelden ve arkadaşlarının çalışmalarında, 197 kontrol (yenidoğanlar, sağlıklı erişkinler, tüberküloz-dışı hastalar) ve 188 tüberküloz enfeksiyonu olan hastada (tüberkülin konversiyonu 2 yıldan daha eski veya zamanı bilinmeyen kişiler, inaktif postprimer tüberkülozlu hastalar, son iki yıl içinde tüberkülin konversiyonu olup radyolojik bulgusu olmayan; aktif latent primer tüberkülozlu hastalar, tüberkülin müspet olup aynı anda geçirilmiş enfeksiyonun radyolojik bulgusunu taşıyan; aktif patent primer tüberkülozlu hastalar, aktif postprimer pulmoner veya plevral tüberkülozlu hastalar, ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalar ve aktif mikst pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozlu hastalar) A60 antijenine karşı, IgG ve IgM düzeyi saptanmıştır (6). Bu çalışmada, IgM düzeyi bütün gruplarda çoğunlukla negatif bulunmuştur. IgG düzeylerinin incelenmesinde, (cut-off değeri 1EU) yenidoğan ve sağlıklı kontrol grubundaki tüm kişiler negatif sonuç verirken, tüberküloz-dışı hastalığı olan 124 kişilik grupta, %6.4 oranında yabancı pozitiflik saptanmıştır. Tüberküloz enfeksiyonunun çeşitli safhalarında seropozitivite oranları ise; latent aktif primer tüberkülozda %5.9, patent aktif primer tüberkülozda %42.8, aktif postprimer formda %82.8, tüberküloz enfeksiyonunda %14.7, inaktif tüberküloz grubunda ise %50 bulunmuştur (6).

Bu çalışmada, tüberküloz-dışı akciğer hastalığı olan kişiler hesap dışı bırakıldığında, yanlış pozitiflik 0, spesifisite ise %100'e yaklaşmaktadır. Yalnız postprimer tüberkülozlu olgular değerlendirildiğinde ise, testin duyarlılığı %84.7'dir (6).

Fadda ve arkadaşlarının çalışmalarında, 90 postprimer tüberkülozlu hasta ve 43 kontrol değerlendirilmiş, testin sensitivitesi %69.8, spesifisitesi ise %100 bulunmuştur. Bu çalışmada ilgi çeken özellik, tedavi başlanmamış hastalarda sensitivitenin çok daha düşük (%57.1) bulunmasıdır (41).

Gevaudan ve arkadaşlarının çalışmalarında, primer ve postprimer tüberkülozlu 1250 olgunun serumları çalışılmıştır. Bu çalışmada üç ayrı cut-off değeri için duyarlılık ve özgüllük hesaplanmıştır (44). Bu, farklı cut-off değerlerine göre elde edilen sensitivite ve spesifisite oranları tablo XV'te görülmektedir.

Barihuta ve arkadaşlarıncı yapılan çalışmada, P32 ve A60 antijenleri kullanılmıştır. Aktif pulmoner tüberkülozlu hastalarda sensitivite %76.8, ekstrapulmoner tüberkülozlu vakalarda ise %61.9 saptanmıştır. Bu çalışmada, HIV pozitif ve negatif kişilerde sensitivite yönünden bir fark görülmemiştir. Spesifisite ise, sağlıklı bireylerde %95.2 iken, tüberküloz dışı tropikal hastalığı olan kişilerin katılması sonucu %68.1'e düşmüştür (7).

Raheman ve arkadaşları iki farklı antijen ile (M. tüberkülozis'in antijen sitozolik fraksiyonu ve A60) yaptıkları çalışmalarında, sitozolik antijenin daha spesifik, A60'ın ise daha sensitif olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, daha önce yaptıkları bir çalışmanın sonucunda yanlış negatif sonuçları, spesifik mikobakteriyel antijenlere antikor cevabının oluşmamasına bağlamışlar ve yanlış negatiflik oranını düşürmek için iki farklı antijen kullanmışlardır. Bu çalışmada, olguların klinik bulguları ve test sonuçları birleştirilerek, duyarlılık 0.974, özgüllük ise 1.00 olarak saptanmıştır (76).

Tumeer ve arkadaşları, A60 ile yaptıkları çalışmanın sonucunda primer tüberküloz ve mikobakteriyel adenitli çocuklarda IgM ve IgG ölçümlerinin tanıya katkı sağlamadığını öne sürmüşlerdir. (87). Bu çalışmada, semptomatik primer tüberkülozlu hastalar için testin sensitivitesi IgM için %17, IgG için %14, spesifisite ise %95 olarak saptanmıştır.

Zou ve arkadaşlarının çalışmalarında, 560 pulmoner ve ekstrapulmoner tüberkülozlu hastanın kan, plevra mayi ve BOS'nda ve 734 kontrol kişide, A60 antijenine karşı antikor düzeylerine bakılmış, aktif postprimer pulmoner tüberkülozlu hastalarda IgM ve IgG için, sensitivite %31 ve %88.5 olarak saptanmıştır. İnaktif pulmoner tüberkülozlu hastalarda seropozitivite oranı %41

bulunmuştur (96). Sağlıklı bireylerde yanlış pozitiflik oranı %0.38 ve tüberküloz dışı hastalığı olanlarda ise %6.3 olarak saptanmıştır.

Caminero ve arkadaşları, 205 aktif tüberkülozlu, 20 inaktif tüberkülozlu, 22 lepromatöz lepralı ve 51 kontrol vakasında yaptıkları çalışmalarında, cut-off değeri olarak 250 ELISA ünitesini kullandıklarında, sensitiviteyi %52 olarak saptamışlardır. İnaktif tüberkülozlu hastalarda seropozitivite oranı %35 bulunmuş, testin özgüllüğü ise, PPD-negatif pnömonili iki olguda görülen yanlış pozitiflik dolayısı ile %96 olarak hesaplanmıştır (16).

Gupta ve arkadaşlarının Hindistan'da yaptıkları çalışmada ise, 147 aktif postprimer tüberkülozlu, 130 ekstrapulmoner tüberkülozlu, 60 inaktif tüberkülozlu hastada ve 131 kişilik kontrol grubunda A60 antijenine karşı antikor düzeyi ölçülmüştür. Bu çalışmada, IgM için üç ayrı cut-off değeri için sonuçlar değerlendirilmiş ve 1.50 ayırım için en uygun değer olarak belirlenmiştir. IgG için ise dört ayrı cut-off denenmiş ve ayırım için en uygun değer %92.5 özgüllük ve %83.0 duyarlılık oranı sağlayan 250 ünite olduğu düşünülmüştür. IgA için ise duyarlılık %79., özgüllük ise %95.4 bulunmuştur. Bu çalışmada vurgulanan özellik, IgG ve IgA'nın birlikte değerlendirilmesinin testin duyarlılık ve özgüllüğünü artırmasıdır. İnaktif tüberkülozlu olgularda IgG için %46.6 gibi oldukça yüksek oranda seropozitivite saptanmıştır (50).

Ülkemizde, tüberküloz tanısında ELISA ile ilgili ilk çalışma, Aksu ve arkadaşlarınca yapılmıştır. Bu çalışmada, hücre duvarı antijenine karşı spesifik IgG antikorları ölçülmüştür. Yetmiş bir hasta ve 30 sağlıklı kontrol ile yapılan çalışmada, yöntemin duyarlılığı %92.9, özgüllüğü ise %93.3 bulunmuştur (2).

Öztürk ve arkadaşlarının, mikobakterilerin sonike edilmiş adsorbe antijeni (MSAA) ve PPD'ye karşı spesifik antikor düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında, MSAA ile, IgG için duyarlılık %89.9, özgüllük %98.7; PPD ile, IgG için duyarlılık %87.3, özgüllük ise %94.7 olarak saptanmıştır (73).

Durupınar ve arkadaşları A60 antijeni ile yaptıkları çalışmalarında, 21 aktif tüberkülozlu, 19 inaktif tüberkülozlu ve 15 sağlıklı kişinin serumlarında antikor düzeylerini ölçmüşler, testin duyarlılığı %83, özgüllüğü ise %80 olarak bulunmuştur (39).

Doğan ve arkadaşları 40 çocuk hasta ve 40 sağlıklı çocukta anti-A60 IgG titrelerini saptamış ve cut-off değeri 3 olarak kabul edildiğinde duyarlılığı 0.33, özgüllüğü 0.98; sınırı 2.2 (ortalama+ 1.SD) aldıklarında ise duyarlılığı 0.68, özgüllüğü 0.73 olarak bulmuşlardır (37). Tablo XV'te A60 antijeni ile yapılan testlerde elde edilen duyarlılık ve özgüllük değerleri görülmektedir.

TABLO XV: A60 antijeni ile elde edilen ELISA sonuçları.

Araştırmacı	Antikor	Duyarlılık	Özgüllük
Raheman (1988) (76)	IgG(Çift antijen için)	%97.4	%100
Charpin (1990) (19)	IgG	%48	%71
	IgM	%76	%98
Baelden (1990) (6)	IgG	%78	%86
Fadda (1992) (41)	IgG	%57.1	%100
Gevaudan (1992) (44)	IgG(cuf-off 150 EÜ)	%99.4	%61.4
	IgG(cut-off 200 EÜ)	%98.69	%86.7
	IgG(cut-off 300 EÜ)	%81.70	%100
Qadri (1992) (74)	IgG	%82	%76
Barihuta (1993) (7)	IgG	%76.8	%95.2
Caminero (1994) (16)	IgG	%52	%96
Zou (1994) (96)	IgG	%85.4	%83.8
Turneer (1994) (87)	IgM	%17	%95
	IgG	%14	%95

TABLO XV: Devam

Gupta (1995) (50)	IgG	%92.5	%83
	IgG + IgA	%91.6	%90
Doğan (1991) (37)	IgG (cut-off 3)	%33	%93
	IgG (cut-off 2.2)	%68	%73
Durupınar (1992) (39)	IgG	%83	%80

Çalışmaların sonuçları incelendiğinde, duyarlılık değerlerinin IgG için erişkin yaş grubunda %48 ile %99.4, özgüllük değerlerinin ise %71 ile %100 arasında değiştii görölmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde incelediğimiz PPD reaktivitesi ile antikor düzeyleri arasındaki ilişki, daha önceki araştırmalarda da bizim sonuçlarımız ile uyumludur. Alde ve arkadaşlarının Antijen 5, Öztürk ve arkadaşlarının MSA A ve PPD antijenleri, Caminero ve arkadaşlarının A 60 antijenini kullanarak yaptıkları çalışmalarda da, PPD değerleri ile antikor seviyeleri arasında ilişki saptanmamıştır (3,16,73).

Çalışmamızda, balgam ARB müspetliği ile antikor düzeyleri arasında da ilişki saptanmadı. Ancak, bu durum, Caminero ve arkadaşlarının çalışmalarında elde edilen sonuca zıttır (16).

Çalışmamızda radyolojik yaygınlık ile antikor düzeyleri arasında da bir korelasyon görölmedi. Yapılan bir çalışmada, IgA düzeyinin hastalık yaygınlığı ile direkt korelasyon gösterdiği öne sürölmüştür (40). Ma ve arkadaşları antijen 5 ile yapılan çalışmada da hastalık derecesi ile antikor, titreleri arasında ilişki saptanmıştır (66). Bothamley ve arkadaşları, farklı antijenleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında, rekürren ve yaygın radyolojik hastalıkta, anti-38kDa antikorları yüksek, anti-14kDa antikorları ise düşük bulmuşlardır. Aynı çalışmada, daha az kavitasyon görölen olgularda ise anti-19kDa titrelerinin yüksek olduğu vurgulanmıştır (14).

Hussey'in çocuklarda, M tüberkülozis H37Rv suşunun ısıtılmış süspansiyonu ile yaptığı çalışmada, OD değerleri ile artan yaş ve enfeksiyon kronisitesi arasında bir korelasyon saptanırken, tüberkülin deri testi reaktivitesi, nütrisyonel durum ve önceki tedavinin süresi ile bir korelasyon saptanmamıştır (54).

Çalışmamızda saptadığımız tanıya kadar geçen semptom süresi ile IgG düzeyleri arasındaki ilişki, Stavri ve arkadaşlarının çalışmalarında da gösterilmiştir. Ham antijen ile yapılan bu çalışmada, pozitif titrelerin, üç aydan daha uzun süreli hastalıkta, akut hastalığa oranla daha fazla olduğu saptanmıştır (35).

Son olarak, erişkin yaş grubundaki sağlıklı kontrollerde yaş ile IgM arasındaki negatif korelasyonun, ülkemizde çocukluk çağında geçirildiği düşünülen primer enfeksiyon sırasında yükselen IgM düzeylerinin yaş ilerledikçe kaybolması ile alakalı olduğu düşünülmüştür.

SONUÇLAR:

Çalışmamızda aktif tüberkülozlu, inaktif tüberkülozlu ve sağlıklı kontrol gruplarında, A 60 antijenine karşı IgG, IgM ve IgA yapısındaki antikorların düzeyleri ELISA testi ile ölçüldü.

1) Tüm olgulardan alınan serumlar önce 1/100 oranında dilüe edildi, ancak bu dilüsyonda fotometrenin okuyamadığı çok yüksek OD değerleri elde edilince serumlar 1/500 sulandırımında yeniden çalışıldı.

2) Aktif tüberkülozlu grup ile son iki yıl içinde tüberküloz geçiren inaktif olgular grubunda (Grup I ve II) IgG için ortalama OD değerleri farklı bulunmadı, ancak bu iki grup diğer grupların hepsinden (Grup III, IV ve V) anlamlı derecede yüksek OD değerlerine sahipti ($p<0.05$).

3) IgM için ortalama OD değerleri, tüm gruplar için istatistiki olarak anlamlı bir fark göstermedi ($p>0.05$).

4) IgA için ortalama OD değerleri, Grup I'de Grup V'ten anlamlı derecede yüksekti, Grup I,II ve III'te de Grup IV'ten anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).

5) Basille teması olmayan sağlıklı kontrol grubunun ortalaması + 2.SD, cut-off değeri olarak kabul edildiğinde, IgG için sensitivite %47.5, spesifisite %95.5, yalancı pozitiflik %4.5, yalancı negatiflik %52.5 olarak saptandı. Bu ayırım değeri için, her üç immünglobulinin aynı anda değerlendirilmesinde ise, sensitivite %52.5, spesifisite %81.8 olarak hesaplandı.

6) İnaktif akciğer tüberkülozlu hasta grubunda %37.5 oranında yalancı pozitiflik mevcuttu.

7) Aktif tüberkülozlu grupta, PPD müspetliği ile antikor düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı ($r=0.179$, $p>0.05$).

8) Aktif akciğer tüberkülozlu grupta, balgam ARB'i müspet ve menfi olan kişilerin ortalama OD değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

9) Aktif akciğer tüberkülozlu grupta, radyolojik yaygınlığın derecesi ile antikor düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı ($p>0.05$).

10) Aktif akciğer tüberkülozu olan grupta, hastaya tanı konuluncaya kadar geçen semptom süresi ile IgG düzeyleri arasında zayıf, fakat anlamlı bir ilişki saptandı ($r=0.256$, $p=0.05$).

11) Sağlıklı kontrol grubunda (Grup IV ve V) ise, yaş ile antikor düzeyleri arasında korelasyon araştırıldığında, IgG ve IgA için bir korelasyon saptanmadı. IgM için ise negatif yönde anlamlı, fakat zayıf bir ilişki görüldü ($r= -0.362$, $p<0.01$).

Ülkemizde ELISA testinin tüberküloz hastalığının tanısında kullanılabilmesi için, en uygun dilüsyon oranını belirlemek ve daha büyük kontrol gruplarından elde edilecek ortalama değere göre cut-off noktasını bulmak gereklidir. Bu taktirde, çalışmamızda saptadığımız duyarlılık ve özgüllük oranları daha yüksek düzeylere ulaşabilir.

ÖZET:

Kliniğimizde yatarak tedavi gören 59 aktif akciğer tüberkülozlu hasta, son iki yıl içinde tüberküloz tedavisi görmüş olan 19 inaktif tüberkülozlu olgu, 10 yıldan daha fazla süre önce tedavi gören 21 inaktif tüberkülozlu olgu, basile sık teması olan sağlıklı olgular ve basile teması olmayan sağlıklı kontrol grubunda, ELISA yöntemiyle, A 60 antijenine karşı antikor düzeyleri ölçüldü.

Aktif tüberküloz grubunda, IgG'ye karşılık gelen ortalama OD değerlerinin, son iki yıl içinde tüberküloz geçiren gruptan farklı olmadığı, bu iki grubun ise, diğer tüm gruplardan daha yüksek bir ortalamaya sahip olduğu gözlemlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun ortalaması + 2.SD değeri ayırım noktası olarak kabul edildiğinde, IgG için testin duyarlılığı %42.5, özgüllüğü ise, %95.5 olarak saptandı. Her üç immünglobulin grubu için sonuçların aynı anda değerlendirilmesi durumunda ise, duyarlılık %52.5, özgüllük %81.8 olarak saptandı.

Antikor düzeyleri ile PPD reaktivitesi, balgam ARB müspetliği, radyolojik yaygınlık ve tanıya kadar geçen septom süresi arasındaki ilişki araştırıldığında, yalnız semptom süresi ile IgG düzeyi arasında, anlamlı, fakat zayıf bir ilişki olduğu görüldü.

Sağlıklı kontrol grubunda ise, yaş ile IgM düzeyleri negatif yönde zayıf bir korelasyon gösterdi.

Sonuç olarak, A60 antijeni ile IgG düzeyinin ELISA testi ile ölçümünün, aktif akciğer tüberkülozu tanısında, özgüllüğü yüksek, ancak duyarlılığı düşük bir test olduğu, IgG ve IgA düzeylerinin aynı anda değerlendirilmesinin duyarlılığı az miktarda artırdığı, ancak özgüllüğü düşürdüğü saptandı.

Testin ancak, tüberküloz şüphesi olan kişilerde, ARB'in gösterilemediği durumlarda, tanıya yardımcı bir test olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR:

- 1-Akkaynak S. Tüberküloz. Ankara; Ayyıldız matbaası, 1986.
- 2-Aksu HSZ, Doğan ÜB, Akoğlu T, Aksaray N, Gürçay A. Mikobakteriyel hücre duvarı antijenine karşı, spesifik IgG antikörlerinin ELISA ile değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 1988; 2(2): 169-175.
- 3-Alde SLM, Pinasco HM, Pelosi FR, Budani HF, Palma-Bertran OH, Gonzales-Montaner LJ. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using an IgG antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5 in the diagnosis of active tuberculosis in children. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 748-751.
- 4-American Thoracic Society. Medical Section of the American Lung Association. Diagnostic standarts and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 725-735.
- 5-Arachi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organisation. *Tubercle* 1991; 72: 1-6.
- 6-Baelden M, Vanderelst B, Dieng M, Prignot J, Cocito C. Serological analysis of human tuberculosis by an ELISA with mycobacterial antigen 60. *Scan J Infect Dis* 1990; 22: 63-73.
- 7-Barihuta T, Rigouts L, Barette M, Collart JP, De Bruyn J, Kalende P, Kamamfu G, Douglas JT, Portaels F. Rapid, early and spesific diagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases in Burundi. *Ann Soc Belg Med Trop* 1993; 73 Suppl 1: 41-51.
- 8-Barnes PF, Barrows SA. Tuberculosis in the 1990s. *Ann Intern Med* 1993; 119: 400-410.
- 9-Bass JB. The tuberculin test. In: Reichman LB, Hershfield ES. *Tuberculosis. A Comprehensive International Approach*. New York: Marcel Dekker, 1993: 139-149.
- 10-Benjamin RG, Daniel TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to mycobacterium tuberculosis antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 1013-1016.
- 11-Benjamin RG, Debanne SM, Ma Y, Daniel TM. Evaluation of mycobacterial antigens in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1984; 18: 309-318.
- 12-Bhattacharya A, Ranadive SN, Kale M, Bharttarcharya S. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of immune complexes in clinical tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 205-209.
- 13-Bilgiç H. Tüberküloz epidemiyolojisi. In: Kocabaş A. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası, 1991: 401-37.
- 14-Bothamley GH, Rudd R, Festenstein F, Ivanyi J. Clinical value of the measurement of Mycobacterium tuberculosis specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 1992; 47: 270-275.
- 15-Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; 4: 1069-1071.

16-Caminero JA, Rodriguez de Castro F, Carrilo T, Lafarga B, Diaz F, Cabrera P. Value of ELISA using A60 antigen in the serodiagnosis of tuberculosis. *Respiration* 1994; 61: 283-286.

17-Chadramuki A, Bothamley GH, Brennan PJ, Ivanyi J. Levels of antibody to defined antigens of mycobacterium tuberculosis in tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 821-825.

18-Chan SL, Reggiardo Z, Daniel TM, Girling DJ, Mitchison DA. Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigens. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 385-390.

19-Charpin D, Herbault H, Gevaudan MJ, Saadjian M, De Micco M, Arnaud A, Vevloet D, Charpin J. Value of ELISA using A60 antigen in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 380-384.

20-Chau PY, Wan KC, Ng WS, So SY, Lau WY, Fan ST, Lee DKY. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibodies to purified protein derivative (PPD) in the diagnosis of active tuberculosis: evaluation of its potential and limitation in a high prevalence area. *Trop Geogr Med* 1987; 39: 228-232.

21-Chawla TC, Atreyi M, Kailkhani BL. Immunochemical characterization of saline extracted antigens of *Mycobacterium H37Ra*. *Int Archs Allergy Appl Immun* 1986; 80: 221-223.

22-Chawla TC, Sharma A, Kiran U, Schitniwas DKB, Tandon BN. Serodiagnosis of intestinal tuberculosis by enzyme immunoassay and soluble antigen fluorescent antibody tests using a saline extracted antigen. *Tubercle* 1986; 67: 55-60.

23-Closs O, Harboe M, Axelsen NX, Bunchchristensen K, Magnusson M. The antigens of *Mycobacterium Bovis* strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. *Scand J Immunol* 1980; 12: 249-

24-Cocito C, Vanlinden F. Preparation and properties of Antigen 60 from *Mycobacterium Bovis* BCG. *Clin Exp Immunol* 1986; 66: 262-272.

25-Cocito C. Properties of the mycobacterial antigen complex A 60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. *Chest* 1991; 100: 1687-93.

26-Cooper AM, Dalton K, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2243-2247.

27-Çelenk M. Tüberküloz epidemiyolojisi. *T Klin Tıp Bilimleri* 1994; 14: 391-403.

28-Çobanlı B. Akciğer tüberkülozu patogenezi. In: Kocabaş A. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası, 1991: 69-71.

29-Çobanlı B, Acıcan T, Ayas G, Çakır M, Zeydan E. Akciğer tüberkülozlu 1026 olgunun klinik, bakteriyolojik, radyolojik ve tedavi yaklaşımları açısından değerlendirilmesi. *Tüberküloz ve Toraks* 1994; 42(4): 252-256.

30-Dağlı E, Ersoy F, Yeniay İ, Sanal Ö, Ünlü M. Çocukluk çağı tüberkülozunda T-lenfosit subpopülasyonları ve serum immünglobulinleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1989; 32: 91-103.

31-Daniel TM. Tuberculin antigens: The need for purification. *Am Rev Respir Dis* 1976; 115: 717-719.

32-Daniel TM, Anderson PA. The isolation of immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of mycobacterium tuberculosis antigen 5. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 533-539.

33-Daniel TM. The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123: 556-559.

34-Daniel TM, Debanne SM, Van der Kuyp F. Enzyme-linked immunosorbent assay using mycobacterium tuberculosis antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. *Chest* 1985; 88(3): 388-392.

35-Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1137-1151.

36-Daniel TM. Rapid diagnosis of tuberculosis: Laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev Infect Dis* 1989; 11(2): 471-478.

37-Doğan S. Tüberküloz tanısında ELISA. *Uzmanlık Tezi. İstanbul, 1991.*

38-Dunlap NE, Briles DE. Immunology of tuberculosis. *Med Clin North Am* 1993; 77(6): 1235-1251.

39-Durupınar B, Yanbeyi S, Leblebicioğlu H, Günaydın M. Tüberkülozun serolojik tanısında enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testinin önemi. *Mikrobiyol Bül* 1992; 26: 338-343.

40-Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1062-1071.

41-Fadda G, Grillo R, Ginesu F, Santoru L, Zanetti S, Deltori G. Serodiagnosis and follow up of patients with pulmonary tuberculosis by enzyme linked immunosorbent assay. *Eur J Epidemiol* 1992; 8(1): 81-87.

42-Flesch IEA, Kaufmann SHE. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiol* 1993; 189: 316-339.

43-Garcia-Carreno FL, Carvajal RE, Hernandez R. Enzyme immunoassay using BCG in serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Hyg* 1986; 97: 483-487.

44-Gevaudan MJ, Bollet C, Charpin D, Mallet MN, De Micco P. Serological response of tuberculous patients to antigen 60 of BCG. *Eur J Epidemiol* 1992; 8(5): 666-676.

45-Godfrey-Faussett P. Molecular diagnosis of tuberculosis: the need for new diagnostic tools. *Thorax* 1995; 50: 709-711.

46-Good RC. Serologic methods for diagnosing tuberculosis. *Ann Intern Med* 1989; 110(2): 97-98.

47-Gordin FM, Slutkin G, Scheeter G, Goodman PC, Hopewell PC. Presumptive diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis based on radiographic findings. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1090-1093.

48-Grange JM, Gibson J, Nassau E, Kardjito T. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : a study of antibodies to Mycobacterium tuberculosis in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. *Tubercle* 1980; 61: 145-152.

49-Grange JM, Laszio A. A serodiagnostic test for tuberculosis: a need for assesment of their operational predictive accuracy and acceptability. *Bull World Health Organ* 1990; 68(5): 571-576.

50-Gupta S, Kumari S, Banwalikar JN, Gupta SK. Diagnostic utility of the estimation of mycobacterial antigen A60 specific immunoglobulins IgM, IgA and IgG in the sera of cases of adult human tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1995; 76(5): 418-24.

51-Hayward AC. Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacterium tuberculosis. *Thorax* 1995; 50: 1211-1218.

52-Hopewell PC. A clinical view of tuberculosis. *Radiol Clin North Am* 1995; 33(4): 641-653.

53-Hopewell PC, Bloom BR. Tuberculosis and other mycobacterial diseases. In: Murray JF, Nadel JA. *Textbook of Respiratory Medicine*. Volume I. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994: 1094-1151.

54-Hussey G, Kibel M, Dempster W. The serodiagnosis of tuberculosis in children: an evaluation of an ELISA test using IgG antibodies to M. tuberculosis, strain H37 RV. *Ann Trop Paedr* 1991; 11: 113-118.

55-Janicki BW, Chaparas SD, Daniel TM, Kubica GP, Wright GL, Yee GS. A reference system for antigens of mycobacterium tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1971; 104: 602-

56-Kalish SB, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E. Use of an enzyme linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *J Infect Dis* 1983; 47(3): 523-530.

57-Kalish SB, Radin RC, Levitz D, Zeiss R, Phair JP. The enzyme linked immunosorbent assay method for IgG antibody to purified protein derivative in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. *Ann Intern Med* 1983; 99(5): 630-633.

58-Kaplan MH, Chase MW. Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. I. Development of antibodies before and after antimicrobial therapy. *J Infect Dis* 1980; 142(6): 825-834.

59-Kaufmann SHE. In vitro analysis of the cellular immune mechanisms involved in immunity to tuberculosis. *Rev Infect Dis* 1989; 2 Suppl 3: 448-454.

60-Kiran U, Kumar SR, Sharma A. Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 1985; 66: 187-195.

61-Kocabaş A. Günümüzde tüberküloz sorunu. In: Kocabaş A. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası, 1991: 3-32.

62-Kocabaş A. Mikobakterilerin yapısal ve antijenik özellikleri. In: Kocabaş A. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası, 1991: 47-55.

63-Kocabaş A. Günümüzde ve gelecekte tüberküloz tanısı. In: Kocabaş A. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası, 1991: 243-262.

64-Levy H, Wadee AA, Feldman C, Rabson AR. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against mycobacterium tuberculosis in bronchial washings and serum. *Chest* 1988; 93(4): 762-766.

65-L'Herminez RH. Urgent need for a new approach to the diagnosis of tuberculosis in developing countries in the decade of AIDS. *Trop Geogr Med* 1993; 45(4): 145-9.

66-Ma Y, Wang Y, Daniel TM. Enzyme linked immunosorbent assay Mycobacterium tuberculosis antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1273-1275.

67-Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 in mycobacterial infections: Development of a new concept. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 696-709.

68-McAdams HP, Erasmus J, Winter JA. Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis. *Rad Clin North Am* 1995; 33(4): 655-678.

69-Mehta PK, Khuller GP. Serodiagnostic potentialities of enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA) using mannophosphoinositides of mycobacterium tuberculosis H37 Rv. *Med Microbiol* 1988; 177: 285-292.

70-Mohan C, Kumar A, Agarwal SC. Serodiagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis by enzyme linked immunosorbent assay of IgG antibodies using BCG "pressate" antigen. *Indian J Med Res* 1987; 85: 367-373.

71-Özdemir Ö. Tüberkülozda tanı yöntemleri. *T Klin Tıp Bilimleri* 1994; 14: 420-424.

72-Özşahin SL. Tüberküloz bakteriyolojisi. *T Klin Tıp Bilimleri* 1994;14: 404-408.

73-Öztürk R. Mikobakterilerin sonike edilmiş adsorbe antijeni ve pürifiye protein derivesi kullanılarak yapılan ELISA ile akciğer tüberkülozunun serolojik tanısı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1993; 23: 84-90.

74-Qadri SM, Smith KK. Nonspecificity of the Anda- A60-tb ELISA test for serodiagnosis of mycobacterial disease. *Can J Microbiol* 1992; 38(8): 804-6.

75-Radin RC, Zeiss CR, Phair JP. Antibodies to purified protein derivative in different immunoglobulin classes in the diagnosis of tuberculosis in man. *Int Archs Allergy Appl Immun* 1983; 70: 25-29.

76-Raheman SF, Wagner S, Mauch H, Vasudeva ND, Ingole DL. Evaluation of a dual antigen ELISA test for the serodiagnosis of tuberculosis. *Bull World Health Organ* 1988; 66(2): 203-209.

77-Rosen EU. The diagnostic value of an enzyme-linked immune sorbent assay using adsorbed mycobacterial sonicates in children. *Tubercle* 1990; 71: 127-130.

78-Rosen MJ. Pneumonia in patients with HIV infection. In: Niederman MS. *Pneumoniae*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994: 1067-1080.

79-Sada ED, Ferguson LE, Daniel TM. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30.000-Da native antigen of mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 1990;162: 928-931.

80-Saygun N. Mikobakteriler. In: Kocabaş A. *Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü*. Adana: Emel Matbaası, 1991: 41-45.

81-Sbarbaro JA. Tuberculosis in the 1990s. *Epidemiology and therapeutic challenge*. *Chest* 1995; 108: 58-62.

82-Schluger NW, Rom WN. Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 264-267.

83-Sindic CJM, Boucquey D, Van Antwerpen MP, Baelden MC, Laterre C, Cocito C. Intrathecal synthesis of antimycobacterial antibodies in patients with tuberculous meningitis. An immunoblotting study. *J Neurol Neurosurg Psych* 1990; 53: 662-666.

84-Stroebel AB, Daniel TM, Kau JHK, Leong JCY, Richardson H. Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1982; 146(2): 280-283.

85-Thongkrajai P, Lulitanon V, Chamnanvanakit C. Improved ELISA with immunoabsorbent-purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1989; 30: 101-104.

86-Turner M, Vooren JV, DeBruyn J, Serruys E, Dierclix P, Yemault J. Humoral immune response in human tuberculosis: Immunoglobulins G,A,M directed against the purified p32 protein antigen of mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin. *J Clin Microbiol* 1988; 29(9): 1714-1719.

87-Turner M, Van Nerom E, Nyabenda J, Waelbroeck A, Duvivier A, Toppet M. 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* 1994; 150: 1508-12.

88-Wadee AA, Cohen J, Rabson AR. An enzyme linked immunosorbent assay using adsorbed mycobacterial sonicates for the serodiagnosis of tuberculosis. *S Afr Med J* 1987; 71: 154-156.

89-Winters WD, Cox RA. Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 582-585.

90-Wirmann C. Public health application of a serological test for tuberculosis: study of the incidence of inapparent infections among the employees of an alsatian supermarket. *Eur J Epidemiol* 1990; 6(3): 304-308.

91-Wu CH, Fann MC, Lau YJ. Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid by enzyme-linked immunosorbent assay. *Tubercle* 1989; 70: 37-43.

92-Yanez MA, Coppola MP, Russo DE, Delaha E, Chaparas SD, Yeager H. Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5): 822-825.

93-Youmans GP. *Tuberculosis*. Philadelphia; WB Saunders Company, 1979.

94-Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS, Levitz D, Metzger E, Radin R, Phair JP. IgG antibody to purified protein derivative by enzyme linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 845-848.

95-Zheng YJ, Wang RH, Lin YZ, Daniel TM. Clinical evaluation of the diagnostic value of measuring IgG antibody to 3 mycobacterial antigen preparations in the capillary blood of children with tuberculosis and control subjects. *Tuber Lung Dis* 1994; 75: 366-370.

96-Zou YL, Zhang JD, Chen MH, Shi GQ, Prignot J, Cocito C. Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme linked immunosorbent assay for anti A60 immunoglobulins. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 1084-91.