

KLİNİK VE RADYOLOJİK BULGULAR İLE AKCİĞER TÜBERKÜLOZU ÖN TANISI ALAN HASTALARIN MİKROBİYOLOJİK SONUÇLARI*

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF THE CASES PREDIAGNOSED AS PULMONARY TUBERCULOSIS BASED ON CLINICAL AND RADIOLOGICAL FINDINGS

Gülnur TARHAN**, **Salih CESUR****, **Ezgi ÖZYILMAZ*****

İsmail CEYHAN**, **Müjgan GÜLER*****, **Özcan KONUR*****

Bülent ÇİFTÇİ***, **Yurdanur ERDOĞAN*****

ÖZET: Bu çalışmada, klinik ve radyolojik bulgular ile akciğer tüberkülozu ön tanısı almış tedavi öncesi 34 yeni olgu, mikroskopi [Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN) ve Auramine-Rhodamine (A-R) boyama ile], kültür [Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine ekim ile] ve üç ayrı moleküler yöntem [Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Gen-Probe amplifiye *M.tuberculosis* direk test ve TaqMan Real Time ABI 5700 PCR] ile değerlendirmiştir. Hastalara ait balgam örneklerinin 19'unda (%55.8) EZN boyama ile, 18'inde (%52.9) A-R boyama ile ve 20'sinde (%58.8) kültür yöntemi ile pozitiflik saptanmıştır. Moleküler yöntemlerden Cobas Amplicor ve TaqMan PCR ile 21 örnek (%61.7) pozitif sonuç verirken, Gen-Probe AMTD yönteminde 16 örnek (%47.0) pozitif olarak bulunmuştur. İncelenen 34 örneğin 10'unda (%29.4) tüm testler pozitif iken, altısında (%17.6) tüm testler negatif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, tüberküloz tanısında moleküler yöntemler klinik bulgular ve bakteriyolojik yöntem (mikroskopi ve kültür) sonuçlarının desteklenmesinde olanağı olan laboratuvarlarda oldukça yararlı olarak kullanılabilirler.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, akciğer tüberkülozu, mikrobiyolojik tanı, moleküler yöntem.

ABSTRACT: In the present study, 34 new pulmonary tuberculosis cases prediagnosed upon clinical and radiological findings, have been evaluated by means of microbiological aspects such as microscopy [Ehrlich-Ziehl Neelsen (EZN) and Auramin-Rhodamine (A-R) stains], culture [inoculation into Löwenstein-Jensen (LJ) media] and three different molecular methods [Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction (PCR), Gen-Probe amplified *M.tuberculosis* direct test and TaqMan Real Time ABI 5700 PCR]. *M.tuberculosis* positivity of the

* V. Ulusal Mikobakteri Simpozyumu'nda (9-11 Aralık 2004, Çeşme-İzmir) sözlü olarak sunulmuştur.

** Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

*** Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Merkezi, Ankara.

sputum samples were 55.8% (n: 19) with EZN staining, 52.9% (n: 18) with A-R staining and 58.8% (n: 20) with culture methods. Among molecular techniques, Cobas Amplicor and TaqMan PCR yielded positive results in 21 patients (61.7%), however, the positivity rate of Gen-Probe AMTD was 47.0% (n: 16). Of 34 samples, 10 (29.4%) were found to be positive with all of the methods used, while six (17.6%) of them were negative with all methods. It can be concluded that molecular methods may aid to the diagnosis of tuberculosis, in conjunction with clinical findings and bacteriological results.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, pulmonary tuberculosis, microbiological diagnosis, molecular methods.

GİRİŞ

Tüberkülozun yayılımının önlenmesinde en önemli basamak, aktif olguların tespiti ve doğru tanının konulabilmesidir. Klinik bulgular ile birlikte etkenin mikroskopik olarak tanımlanması ve kültürde üretilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak mikroskopi yönteminin duyarlılığının düşük olması ve kültür yöntemi ile tanı için de 2-8 haftalık bir sürenin gerekliliği, kesin tanının gecikmesine neden olmaktadır. Son yıllarda moleküler yöntemler mikobakteri laboratuvarlarında konvansiyonel yöntemlere destekleyici olarak rutin tanı amacıyla kullanılmaya başlanmıştır¹. Bunlardan Amplifiye *Mycobacterium tuberculosis* Direk Testi (Gen-Probe, California; AMTD) ile Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* polimeraz zincir reaksiyonu (MTB PCR; Roche Diagnostics, USA) testi solunum yolu örneklerinde *Mycobacterium tuberculosis* complex'in hızlı tanısında yaygın olarak kullanılan FDA onaylı yöntemlerdir². Değişik merkezlerde yapılan araştırmalarda bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri, AMTD için %90.9-95.5 ve %98.8-100, Cobas Amplicor MTB PCR için %79.4-91.9 ve %99.6-99.8 olarak belirlenmiştir²⁻⁸. TaqMan Real Time ABI 5700 PCR (Applied Biosystem, USA) ise rutin tanı laboratuvarlarında son zamanlarda kullanıma sunulan yeni bir yöntem olup bu testin duyarlılık ve özgüllüğü ile ilgili henüz detaylı bir klinik veri analizi yapılmamıştır.

Bu çalışmada, klinik ve radyolojik bulgularla akciğer tüberkülozu ön tanısı alan, tedaviye başlanmamış 34 yeni olgunun *M.tuberculosis* açısından bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesine klinik ve radyolojik bulgular ile akciğer tüberkülozu tanısıyla yatırılan ve tedaviye başlanmamış 34 hasta dahil edildi. Çalışma için hastalardan yazılı onay ile etik kurul onayı alındı.

Hastalardan alınan balgam örnekleri %4'lük NaOH + %2.94'lük trisodyum sitrat- N-asetil L sistein (NALC) yöntemiyle dekontamine ve homojenize edildi⁹. Hazırlanan süspansiyondan birer ml DNA izolasyonunda kullanmak amacıyla 3 ayrı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu örnekler moleküler yöntemler ile çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı. Geri kalan kısımdan eş zamanlı olarak Ehrlich-

Ziehl Neelsen (EZN) ve Auramine-Rhodamine (A-R) yöntemleri ile boyama ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine ekim yapıldı. Kültür tüpleri, 37°C'de 8 hafta süre ile inkübe edildi ve bu sürenin sonunda üreme görülmeyen ekimler negatif olarak değerlendirildi. Üreme saptanan örneklerde *M.tuberculosis*'in tanımlaması, nitrat, niasin, tiofen 2-karboksilik asit hidrazid (TCH) ve paranitro-benzoik asit (PNB) testleri ile yapıldı. Nitrat, niasin, TCH pozitif, PNB negatif suşlar *M.tuberculosis* olarak tanımlandı¹⁰.

Moleküler yöntemlerde kullanılmak üzere ayrılan örneklerden DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon ve sonuçların değerlendirilmesi, üretici firmaların önerilerine ve standart uygulama protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi. Kullanılan moleküler yöntemler; Gen-Probe AMTD (Gen-Probe Inc., San Diago, California), Cobas Amplicor MTB PCR (Roche Diagnostics Inc., Branchburg, USA) ve TaqMan Real Time ABI 5700 PCR (ABI PRISM 5700- Applied Biosystem/ Gene Amp 5700, Foster City, CA, USA) idi.

BULGULAR

Klinik ve radyolojik bulgularla akciğer tüberkülozu tanısı konulan ve tedavi almamış 34 yeni olguya ait balgam örneklerinin bakteriyolojik ve moleküler yöntemler ile alınan sonuçları Tablo I'de gösterilmiştir. Çalışılan 34 balgam örneğinin 10'unda (%29.4) tüm testler ile pozitif sonuç alınırken 6'sında (%17.6) tüm testlerin negatif olduğu izlenmiştir.

Tablo I: Hastaların Balgam Örneklerinde Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Alınan Sonuçlar

Yöntem	Pozitif Hasta Sayısı (%)
EZN Boyama	19 (55.8)
A-R Boyama	18 (52.9)
Kültür	20 (58.8)
Gen-Probe AMTD	16 (47.0)
Cobas Amplicor MTB PCR	21 (61.7)
TaqMan Real Time ABI 5700 PCR	21 (61.7)

TARTIŞMA

Dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektidir ve yılda yaklaşık sekiz milyon yeni olgu bildirilmektedir. Tüberkülozun insidansı sürekli olarak yükselmekte ve çok ilaca dirençli *M.tuberculosis* suşlarında hızlı bir artış saptanmaktadır. Hastalığın kontrol altına alınmasında hızlı laboratuvar tanısının önemli bir yeri vardır. Bu amaçla son yıllarda çeşitli nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, konvansiyonel yöntemlere destekleyici olarak kullanılmaktadır. Kültür ile kıyaslandığında moleküler testlerin duyarlılığı %56-100 arasında bildirilmektedir¹¹. Solunum yolu örneklerinde kültüre göre duyarlılık %84 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte laboratuvarlar arasında ciddi farklılıklar olabilmekte, hatta %70-80'lere ulaşan yalancı pozitif veya negatif sonuç veren çok merkezli laboratuvar verileri bildirilmektedir^{11,12}. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli testlerde, duyarlılık, özgüllük,

tekrarlanabilirlik, pozitif ve negatif prediktif test değerleri gibi bir test için önemli olan konularda ciddi sorunlar ile karşılaşmaktadır. Yalancı pozitiflik yanında yalancı negatiflik de önemli bir sorundur. Mikobakterilerden yeterince nükleik asit elde etmenin güçlüğü ve klinik örneklerdeki inhibitör maddeler yalancı negatifliğin önemli nedenlerindendir. Amplifikasyonda kullanılan Taq polimeraz enziminin, hemoglobin, SDS (sodium dodecyl sulfate) ve heparinle inhibe olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu testlerde kontaminasyon önlemlerine dikkat edilmesi, her testte düşük pozitif, yüksek pozitif ve negatif kontroller kullanılması gerekmektedir¹².

Moleküler testler tanıda tek başına kullanılamazlar, bu nedenle klinik ve bakteriyolojik testlerle (mikroskopi ve kültür) birlikte değerlendirilmelidirler. Çalışmamızda klinik ve radyolojik olarak akciğer tüberküloz tanısı almış 34 hastada üç ayrı moleküler test ile yapılan değerlendirmede, Cobas Amplicor MTB PCR ve TaqMan Real Time ABI 5700 PCR ile örneklerin %61.7'si, Gen-Probe AMTD ile de %47'si pozitif bulunmuştur. Konvansiyonel yöntemler ile yapılan incelemede EZN boyama ile saptanan pozitiflik oranı %55.8, A-R boyama ile %52.9 ve kültür yöntemi ile %58.8'dir. Görüldüğü gibi Gen-Probe AMTD ile saptanan pozitiflik oranı mikroskopi ile saptanan orandan daha düşüktür. Dolayısıyla AMTD yöntemi, gerek diğer moleküler yöntemler gerekse konvansiyonel yöntemler ile birlikte değerlendirildiğinde tanıda kullanımı uygun görünmemektedir.

İlaç duyarlılık kontrol merkezi (FDA), tüberküloz tanısında moleküler yöntemleri sadece akciğer kaynaklı örnekler için önermektedir. Rajelehti ve arkadaşları¹³, 151 aktif akciğer tüberküloz şüpheli hastadan alınan 224 balgam örneğinde yaptıkları çalışmada, kültürle kıyaslandığında aside dirençli boyamanın duyarlılık ve özgüllüğünü %67 ve %98, Cobas Amplicor MTB PCR için ise %83 ve %99 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada hastalardan ardışık 3 balgam örneği alındığında Cobas Amplicor MTB PCR duyarlılığı %91 olarak saptanmıştır. Çoğu araştırmacı, bu testlerin klinik olarak akciğer tüberkülozu şüphesi düşük olan hastalarda kullanılmamasını önermektedir². Bu belirsizliklere rağmen moleküler testler, rutin uygulamada çabuk sonuç vermeleri nedeniyle artan oranda talep edilmektedir. Yüksek klinik şüphesi olan hastalarda moleküler testler negatif olsa bile tedavi başlanmalıdır. Mitarai ve arkadaşları¹⁴, Cobas Amplicor MTB PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğünü akciğer tüberkülozunda %60.2 ve %99.8 olarak bildirmektedir. Bu çalışmada Cobas Amplicor MTB PZR testinin mikroskopiden daha yüksek duyarlılıkta olduğu belirlenmiştir. Alp ve arkadaşlarının¹⁵ 2098 klinik örneği retrospektif olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, EZN ve Cobas Amplicor MTB PCR testinin duyarlılıkları sırasıyla %42.9 ve %67.3 olarak saptanmıştır. Vuorinen ve arkadaşları¹⁶, solunum yolu örneklerinde kültürle kıyaslandığında AMTD yönteminin duyarlılığını %80.8, Cobas Amplicor MTB PCR yönteminin duyarlılığını ise %84.6 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada klinik verilerle birlikte değerlendirildiğinde kültürün duyarlılığı %89.7, mikroskopinin %75.9, AMTD'nin %82.8, Cobas Amplicor MTB PCR'in ise %82 olarak bildirilmiştir¹⁶.

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre Cobas Amplicor MTB PCR ve Taq Man Real Time ABI 5700 PCR testlerinin mikroskopi ve kültür yöntemlerine destekleyici olarak solunum yolu örneklerinde hızlı tanı amacıyla kullanılabileceği görülmektedir. Testlerin duyarlılık, özgüllük ve maliyet etkinlik analizinin belirlenmesine

gereksinim vardır. Bu testler canlı ya da ölü mikobakteri ayrımını yapamadığı için tedavi takibinde kullanılmamalıdır. Klinisyenler moleküler testlerin sonuçlarını klinik tanıyı göz önünde bulundurarak yorumlamalıdır. Sonuç olarak, moleküler yöntemlerin yüksek maliyetleri nedeniyle, klinik şüphenin yüksek olduğu, konvansiyonel yöntemlerle kesin tanı konulamayan ve tanısız problem yaşanan akciğer tüberkülozlu tedavi almamış olgularda kullanılmasının uygun olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Salfinger M, Pfyffer GE: The new diagnostic mycobacteriology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994, 13: 961-979.
2. Soini H, Musser JM: Molecular diagnosis of Mycobacteria. Clin Chem 2001, 47: 809-814.
3. Bergman JS, Woods GL: Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M.tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996, 34: 1083-1085.
4. Stauffer F, Mutschlechner R, Hasenberger P, Stadbauer S, Schinko H: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995, 14: 1046-1051.
5. Tevere VJ, Hewitt PL, Dare A, et al: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan -*Mycobacterium* primers and hybridization to an *M.tuberculosis*- specific probe. J Clin Microbiol 1996, 43: 918-923.
6. Bergmann JS, Yuoh G, Fish G, Woods GL: Clinical evaluation of the enhance Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. J Clin Microbiol 1999, 37: 1419-1425.
7. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al: Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 1998, 36: 684-689.
8. Smith MB, Bergmann JS, Onoroto M, Mathews G, Woods GL: Evaluation of the enhanced amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. Arch Pathol Lab Med 1999, 123: 1101-1103.
9. Kubica GPW, Dye E, Cohn ML, Middlebrook G: Sputum digestion and decontamination with *N*-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1993, 87: 775-779.
10. Isenberg HD (ed): Identification tests for Mycobacteria, p: 3.12.1-3.12.20. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol 3, 2005. ASM Press, Washington DC.
11. Clarridge JE 3rd, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB: Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 1993, 31: 2049-2056.
12. Öztürk R: Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde sorunlar ve standardizasyon, s: 45-56. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001, Nobel Kitabevi, İstanbul.
13. Rajalahti I, Vuorinen P, Nieminen MM, Miettinen A: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimens by the automated Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. J Clin Microbiol 1998, 36: 975-978.
14. Mitarai S, Kuashima A, Tamura A, Nagai H, Shishido H: Clinical evaluation of Amplicor *Mycobacterium* detection system for the diagnosis of pulmonary mycobacterial infection using sputum. Tuberculosis 2001, 81: 319-325.
15. Alp A, Pınar A, Haşçelik G: Klinik örneklerden *Mycobacterium tuberculosis* saptanmasında Cobas Amplicor sistemi ve mikroskopik inceleme yöntemlerinin BACTEC Radyometrik yöntemi ile karşılaştırılması. Mikrobiyol Bül, 2004, 38: 193-201.
16. Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, Hällström O: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. J Clin Microbiol 1995, 33: 1856-1859.