

Tanımlı Kocagöz

Tüberküloz tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Yılda yaklaşık 10 milyon yeni tüberküloz hastası ortaya çıkmakta ve 3 milyon kişi bu hastalıktan ölmektedir. Bağışıklık sistemini baskılayıcı tedavilerin artması ve AIDS'in dünyada hızla yayılması tüberkülozun da hızla tırmanışa geçmesine neden olmuştur. Birçok ülkede yapılan araştırmalar AIDS hastalarının %18-25'inin hastalık süreci sırasında tüberküloza yakalandıklarını ortaya koymuştur. Tüberküloz hastalarının erken tanı ve tedavisi hastaların iyileştirilebilmesi ve bu hastalıktan toplumun korunmasında en etkili yoldur. Bu nedenle tüberküloza yakalandığı düşünülen hastaların tanılarını kanıtlayacak, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pahalı olmayan laboratuvar yöntemlerinin günlük kullanıma girmesi önemli bir gereksinim haline gelmiştir.

Bağışıklık sistemi baskılanmamış kişilerde tüberküloz %85 olguda tek başına akciğerlerde ortaya çıkar. Geriye kalan %15 olgunun bir kısmında da diğer organ tutulumu ile birlikte akciğerlerde de hastalık vardır. Oysa bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde olguların sadece %38'inde tek başına akciğer tutulumu görülürken %32'sinde başka organla birlikte akciğer, %30'unda ise tek başına akciğer dışı infeksiyon görülmektedir. Akciğer dışı tüberküloz olgularında örnek alınması ve alınan örnekte tüberküloz basiliinin saptanması güçleşmektedir.

Mikroskopi: Robert Koch'un tüberküloz basilini buluşundan günümüze dek yüzyılı aşkın süre geçmesine karşın, mikroskopi hala en hızlı ve en ucuz tanı yöntemi olmaya devam etmektedir. Ziehl-Neelsen gibi aside dirençli boyama teknikleri ile mikroskopta mikobakterilerin görülmesi özgüllüğü yüksek bir şekilde tanı konmasını sağlar. Buna karşın mikroskopi duyarlılığı düşük bir yöntemdir ve incelenen örneğin mililitresinde en az 5-10 bin kadar bakteri bulunursa mikroskop incelemesi ile bunları yakalamak mümkün olur. Florokrom boyaların kullanılması bu duyarlılığı artırırken özgüllüğün azalması sözkonusudur.

Kültür: Kültür ile örnekteki birkaç canlı mikobakterinin dahi gösterilebilmesi olasıdır. Ancak Löwenstein Jensen gibi klasik besiyerlerinde kolonilerin gözle görülebilir boya ulaşması 3-8 hafta kadar sürmektedir.

BACTEC gibi radyometrik kültür yöntemleri ile *M. tuberculosis*'in klinik örneklerde varlığının gösterilmesi ortalama on güne indirilmiş, ancak yöntemin pahalı oluşu ve radyoizotoplar gerektirmesi özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın kullanımını kısıtlamıştır. Tüplerde oksijen tüketilmesi ve karbondioksit oluşumunu gösteren bir indikatör esasına dayanan "Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT)" radyoizotop kullanımı sorunu çözmüş, ancak bu sistem de henüz ekonomik olmaktan uzak kalmıştır. Bizim geliştirmekte olduğumuz ve mikobakteri varlığında henüz koloniler ortaya çıkmadan rengi kırmızıdan sarıya dönen "TK-besiyeri" hem hızlı tanı hem de ekonomik olma açısından umut vermektedir. Bu besiyerinin diğer hızlı kültür sistemlerine bir başka önemli üstünlüğü ise kontaminasyon varlığında renginin yeşile dönmesi ve böylece kontaminasyonu gerçek mikobakteri üremesinden ayırt edebilmesidir.

Serolojik yöntemler: Tüberküloz tanısı için ilk kullanılan yöntemler olmasına karşın serolojik testlerin özgüllüğünün düşük olması kullanımlarını kısıtlamıştır. Bunun en önemli nedeni çevrede yaygın olarak bulunan *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin çapraz tepkimeye yol açan antijenleri ile sıklıkla karşılaşılmasıdır. Bu durumu önlemek için testlerde kullanılacak, her mikobakteriye özgül antijen arayışları sürmektedir. Tüm bunlara karşın özellikle akciğer dışı tüberküloz olgularında serolojik yöntemler tanıya yardımcı olabilmektedir.

Hücre kökenli enzimlerin araştırılması: Adenozin deaminaz (ADA) pürin metabolizmasında işlevi olan bir enzimdir ve monosit, makrofaj ve özellikle T-lenfosit gibi birçok hücrenin olgunlaşmasında önemli rol oynar. Plevra, periton, perikard ve beyin omurilik sıvılarında, bu boşluklarda tüberküloz bulunduğu zaman ADA düzeyinin yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Bu durum kötü huylu tümörlerin varlığı gibi durumlarda da görülmekle beraber ADA düzeyindeki yükseklik genellikle tüberküloz olduğu kadar belirgin değildir. Bazı araştırmalarda beyin omurilik sıvılarında, tüberküloz menenjit olgularında, diğer hastalıklarla karşılaştırıldığında ADA anlamlı ölçüde artmış bulunurken, plevral sıvı örneklerinde tüm olgularda böyle kesin ayırım yapılabildiğini sağlayacak yeterli farklılık gösterilememiştir.

Aktive olmuş makrofaj, monosit ve granülositlerden salgılanan ve bakterilerin duvarındaki peptidoglikanı parçalayan lizozimin de tüberküloz plörezi olgularında plevral sıvıda belirgin şekilde arttığı ve bunun tanıda çok yararlı olabileceği gösterilmiştir.

Nükleik asit problemleri: Mikobakterilerin kromozomal DNA veya ribozomal RNA'ları, bunlara özgül olarak bağlanabilen DNA veya RNA problemleri ile saptanabilmektedir. Bu yöntemlerin özgüllüklerinin çok yüksek olmasına

karşın duyarlılıkları oldukça düşüktür. Bu nedenle klinik örneklerde mikobakteri saptanmasından çok, kültürde üretilen mikobakterilerin türünün hızlı ve kesin bir şekilde saptanmasında kullanım alanı bulmuştur. Yöntemin duyarlılığını arttırmak için “dallanan DNA sinyal arttırma sistemi” adı verilen yeni bir teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemde özgül problemler aracılığı ile çok sayıda bildirici enzim molekülünün hedef nükleik aside bağlanması sağlanmaktadır.

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri: Mullis tarafından 1985 yılında PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu) tanımlandıktan sonra nükleik asitler *in vitro* özgül olarak çoğaltılabilir hale gelmişlerdir. Bu yöntemler ile klinik örneklerdeki mikobakterilerin varlığı nükleik asitlerinin bir bölgesinin milyonlarca kat çoğaltılması ile kolayca saptanabilmektedir. Bu yöntemlerin duyarlılığı çok yüksek olduğu için, dikkatli, kontrollü bir çalışma gerektirmekte, en küçük kontaminasyon dahi yalancı pozitif sonuçlara yol açabilmektedir.

PCR: Bu yöntemde çoğaltılması istenen DNA örneği, DNA replikasyonu için gereken maddelerle birlikte, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur. İlk basamak denatürasyondur. 94°C'ye dek ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir (Annealing). Sadece çoğaltılmak istenen DNA dizisini özgül olarak tanıyan iki primer, sıcaklığın (55-70°C'ye) düşürülmesiyle, birbirinden ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA tek zincirlerine bağlanır. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Optimum çalışma sıcaklığı 72°C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda primerlerden başlayarak DNA sentezi yapar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası iki katına çıkarılmış olur. Deney tüpleri bu üç değişik ısıda sıra ile belli süreler otomatik olarak ve istenildiği sayıda döngüye programlanabilen bir araç tarafından tutulur. Geometrik olarak artan ve kısa sürede çok büyük miktarlara ulaşan özgül DNA ürününün elektroforez gibi bir yöntemle gösterilmesi oldukça kolaydır.

SDA (Strand Displacement Amplification-Zincir Ayırma Çoğaltma): PCR'a benzeyen bu yöntem *E. coli* DNA polimerazı Klenow parçasının çift zincirli DNA üzerinde kesilmiş tek zincir varlığında, bu noktadan başlayarak, bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme yeteneğine dayanır. Bütün tepkime 37°C'de yürütülür ve primer bağlanması, kesilme, zincir ayrılması ve DNA sentezi ile PCR'da olduğu gibi özgül bir bölge geometrik olarak çoğaltılır. Yöntemin özgülüğü yine sadece aranan etkene özgül DNA dizilerini tanıyacak primerlerin kullanılmasına bağlıdır.

TMA (Transcription Mediated Amplification-Transkripsiyona Dayalı Çoğaltma): TMA da SDA gibi izotermal bir amplifikasyon yöntemidir. Bu yön-

temde çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA'dır. Önce ribozomal RNA'nın "reverse transcriptase" ile DNA kopyası çıkarılır. Sonra bundan RNA polimeraz ile yeniden birçok RNA kopyası yapılır. Tepkimelerin kendi kendine tekrarlaması ile ürün çoğaltılmış olur. *M. tuberculosis*'e özgül bir işaretli prob ile çoğaltılan ürünün varlığı belirlenir. Bu yöntem için gerekli olan RNA 1000 kopya kadardır ki; bu bir basilde bulunan ribozomal RNA'nın yarı miktarına eşdeğerdir.

Bildirici mikobakteriyofaj: Ateş böceğinin ışık üretmesinden sorumlu lusi-feraz enzim geninin mikobakteriyofajlara klonlanması ile bildirici fajlar elde edilmiştir. Klinik örneklerde bu fajlar ile infekte edilen basiller "luciferin" eklendiğinde ışık oluşturarak karanlık alanda kolayca görünür hale gelirler. Bu yöntem ile canlı ve cansız bakteriler de ayırt edilebildiğinden basillerin bir ilaç varlığında ışık üretilip üretilmediklerine bakılarak, kısa sürede antitüberküloz ilaçlara duyarlılık da belirlenebilmektedir.

Mikobakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan yöntemler: Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda *M. tuberculosis* dışındaki mikobakterilerin de enfeksiyona yol açabilmesi, tedavileri birbirinden önemli farklılıklar gösteren mikobakterilerin tiplendirilmesinin büyük önem kazanmasına neden olmuştur. Haftalarca sürmekte olan biyokimyasal tiplendirme yöntemlerinin yerini günümüzde hızlı moleküler yöntemler almaktadır. Özgül nükleik asit problemleri ile bazı atipik mikobakterilerin tanımlanması günlük kullanıma girmiştir. Bilinen tüm mikobakteri tiplerini kesin olarak tanımlayabilen, hsp65 geninin PCR ile çoğaltılması ve restriksiyon enzim analizine dayanan yöntem ise gelecek için en umut veren yöntemler arasındadır.

İlaç direncinin hızlı saptanmasında kullanılan yöntemler: Klasik kültür besiyerleri ile mikobakterilerin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarını aylarca sürebilirken, hızlı kültür sistemlerinin kullanılmaya başlaması ile bu süre bir miktar kısalmıştır. Yukarıda belirttiğimiz bildirici mikobakteriyofajlar ile bu sürenin bir veya birkaç güne indirilebileceği düşünülmektedir. Fluorometrik nükleik asit çoğaltma sistemlerinin ortaya çıkması günümüzde ilaç direncinden sorumlu mutasyonların birkaç saat içerisinde saptanabilmesini sağlayabilecek güçtedir. Halen geliştirmekte olduğumuz bu tür bir yöntem ile, aside dirençli basilin bulunduğu klinik örneklerden, doğrudan rifampisin direncine neden olan mutasyonların %90'dan fazlasını saptayabilmekte, bu mutasyonların rifabutine çapraz direnç oluşturup oluşturmadığını da belirleyebilmekteyiz.