

AKCİĞER TÜBERKÜLOZUNUN TANISINDA SEROLOJİK BİR TEST

Dr. Kemal BALCI*

* S.Ü.T.F. Göğüs Hastalıkları ABD

ÖZET

Bu yazıda tüberkülozun serolojik tanısı için yeni bir antijenin kullanılmasıyla yapılan latex aglutinasyon testi tarif edilmiş ve sonuçları takdim edilmiştir. Araştırma 47'si aktif akciğer tüberkülozlu, 8'i inaktif tüberküloz lezyonlu, 32'si çeşitli tüberküloz harici akciğer hastalıklı ve 20'si sağlıklı 107 şahıs üzerinde yapılmıştır. Antijen, agarla solidifiye edilmiş Sauton vasatı üzerinde üretilen tüberküloz basillerinin cam boncuklarla mekanik olarak parçalanmasıyla elde edilmiştir.

Test sonucu 47 aktif tüberkülozluunun 34 (% 72,3)'ünde müsbet, 13 (% 27,7)'ünde menfi olmuştur. İnaktif tüberküloz lezyonlu 8 vakanın 7 (% 87,5) sinde test sonucu menfidir. Tüberküloz harici akciğer hastalıklı 32 vakanın hepsinde ve keza 20 sağlıklı kontrol vakalarının hepsinde test sonucu menfi kalmıştır. Bu sonuçlara göre testin duyarlılığı % 72,3 ve spesifikliğı % 98,3 bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz, serolojik tanı, latex aglutinasyon testi.

SUMMARY

A Test For Serodiagnosis Of Pulmonary Tuberculosis

In this article, a latex agglutination test using a new antigen for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis has been described and test results have been presented. Research has been conducted with 107 people including 47 with active pulmonary tuberculosis, 8 with inactive tuberculous lesions, 32 with non-tuberculous pulmonary diseases, and the remaining 20 healthy subjects. The antigen used in the test has been obtained by the mechanical breakdown with glass beads of the tuberculosis bacilli cultured on Sauton medium solidified with agar.

Test results have been positive in 34 of the 47 active tuberculosis patients (72,3 %), and negative in 14 (27,7 %). Test results have been negative in 7 (87,5 %) out of the 8 cases with inactive lesions. For all 32 with non-tuberculous pulmonary diseases, as well as the 20 healthy subjects tests have given negative results.

Based on these results the sensitivity of the test has been calculated as 72,3 % and its specificity as 98,3 %.

Key Words: Tuberculosis, serodiagnosis, latex agglutination test.

GİRİŞ

Tüberkülozun serolojik tanısı için geçen asrın sonlarından itibaren başlayan çalışmalarda 1960'lı yılların sonlarına kadar hemaglutinasyon, jel difüzyonu, kaolen ve latex aglutinasyonu esasına dayanan çeşitli testler denenmiş fakat bunların hiçbirisi bilhassa spesifisite bakımından yeterli olamamıştır

(1,2,3). 1976'da TB'luların kanlarında Koch basiline karşı oluşan antikorların ELİSA testi ile araştırılmaya başlanması üzerine bu konuda yeni bir hamle başlamıştır(4). Fakat sağladığı ilerlemelerle beraber ümitler vadeden bu hamle de TB'un serolojik tanısında rutin uygulamaya elverişli güvenilir bir testi ortaya koyamamıştır. Bu yazıda bu konuya katkısı olabilir ümidi ile yeni bir antijenin kul-

- Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

- Teşekkür : Bu çalışmada yardımlarını gördüğüm başta Prof. Dr. Bülent Baysal olmak üzere Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Departmanı mensuplarına minnetlerimi bildiririm.

lanılmasıyla yapılan latex aglutinasyon testi tarif ediliyor ve sonuçları takdim ediliyor.

MATERYAL VE METOD

Vakalar

Test 4 gruba ayrılan 107 şahıs üzerinde uygulandı:

1. Grup: Aktif akciğer TB'lu 47 vaka. Tanı 45 vakada Koch basilinin mikroskopik olarak gösterilmesi, bir vakada larinks biyopsisinin bir vakada da servikal lenf bezi biyopsisinin histopatolojik tanısı ile kondu. Yeni veya tedavi altında olan eski bir vaka olsun seçimde vakalar arasında bir ayırım yapılmadı. Yalnızca testin yapıldığı tarihte ARB'nin pozitif olması veya histopatolojik tanı dikkate alındı.

2. Gurup: İnaktif lezyonlu 8 vaka. Bunların 7'si en aşağı 5 seneden daha evvel ARB'leri (+) olan ve tedavi olmuş vakalar idi. Tedaviye son verildiği zamandan beri akciğerdeki sekel lezyonlarda radyolojik bir değişiklik olmamıştı ve ARB aranması hep menfi kalmıştı. Bir vaka ise 9 aylık tedaviyi takiben akciğerdeki lezyonda son 6 ayda radyolojik bir değişiklik olmadığı ve ARB araştırmaları, kültürü dahil, hep menfi kaldığı için testin yapıldığı tarihte inaktif lezyonlu kabul edilmişti.

3. Gurup: TB harici çeşitli akciğer hastalıklı 32 vaka. Bunların 16'sında PPD testi menfi veya şüpheli, 9'unda pozitif idi. 7'sinde de PPD testi yapılmamıştı.

4. Gurup: 20 sağlam kontrol. Bunların 16'sında PPD testi pozitif, 4'ünde menfi idi. 17'si BCG ile aşılanmıştı.

Antijen Hazırlanması

% 1,8 agar'lı Sauton petri kutularına dökülür, sıcakta sterilize edilir, soğutularak katılaştırılır ve üzerine sterilize edilmiş filter paper (589¹ Black ribbon ashless Filter Paper CIRCLES-Dassel, W. Germany) konur. Filtre kağıdının üzerine TB'li bir hastadan üretilmiş INH, RF, SM ve ETB'ye hassas TB basili ekilir. Kapakları kapatıldıktan sonra petri kutularının etrafı parafilm ile çevrilir. Basiller alttan diffüze olan Sauton besiyeri nedeni ile filtre kağıdı üzerinde koloniler halinde ürerler.

40-45 günlük bol üremiş kültürlerden 400 mg basil alınır ve bir şişe içindeki 60 mL distile su içine

konur. Şişe bir saat kaynayan su banyosunda bırakılır. Sonra bir gece buzdolabında +4° C'da bırakılır. Şişe buzdolabından alınır ve içine 2 mm çaplı cam boncuklardan takriben sıvının hacmine eşit olacak hacim (binlerce cam boncuk) konur. Sonra şişe elektronik vibratör (IKA-VIBRAX-VXR) üzerine yerleştirilir ve 2200 rpm'de bir saat vibrasyon yaptırılır. Sonra tekrar buzdolabında +4° C'da bir gece bırakılır, ertesi gün tekrar elektronik vibratör üzerine konarak tekrar bir saat 2200 rpm'de vibrasyon yaptırılır. Bu işlem 4 gün aynı şekilde tekrarlanır. Bu şekilde basiller hergün birer saatten toplam 5 saat cam boncuklarla mekanik olarak parçalanmaya tabi tutulmuş olur. Sonra içinde parçalanmış basiller bulunan sıvı filter paper'dan (Quantitative Ashless No: 6, Lot 68251249 Toyo Roshi Kaisha Ltd.) süzülür. Alttaki süzüntünün üzerine nihai dilüsyonu 1/1000 olacak şekilde sodium azide ilave edilir. Bu stok antijen solüsyonudur.

190 mL glycine buffer (pH 8,2) üzerine 10 mL stok antijen solüsyonu ve 0,5 mL latex (Difco, 0,81) ilave edilir. Bu karışım testte kullanılan antijen (latex'li antijen) solüsyonudur. Shelf-life'ı en aşağı bir yıldır. Latex'li antijen içerisinde hazırlandıktan takriben iki ay içerisinde gözle görünür partiküller oluşabilir. Bu durumda latex'li antijeni filter paper'dan (589¹ Black ribbon ashless) bir defa süzükten sonra bunlar bir daha teşekkül etmez.

Gerek stok antijen solüsyonu ve gerekse latex'li antijen solüsyonu buzdolabında +4° C'da saklanmalıdır.

Antikor

Testte serum değil plazma kullanılır. Buna rağmen makalenin başlığında değiştirilemeyecek kadar yerleşmiş bir kelime olan "serodiagnosis" kelimesi kullanılmıştır. 3 mL heparinli kan alınır. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki plazma testte kullanılır. Bu çalışmada kanın alımını takiben 2 saat içerisinde test yapılmıştır.

Testin Yapılışı

İncelenecek her plazma için 2 tüp alınır. İçlerine birer mL Latex'li antijen konur. Birinci tüpteki latex'li antijen üzerine 0,05 mL (takriben bir damla), ikinci tüptekinin üzerine 0,10 mL (takriben 2 damla) plazma ilave edilir ve tüpler hafifçe çalkalanarak karışımları sağlanır. Tüplerin ağızları parafilm ile ka-

patılır. Tüpler bir gece oda hararetinde (22° - 23° C) bırakılır ve ertesi gün 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra hafifçe çalkalanarak çıplak gözle veya büyüteçle kontrol edilir. Menfi sonuçta karışımın sulandırılmış süt gibi hafif bulanıklığı değişmez. (+) sonuçta hafif berraklaşmış karışımın içinde çok sayıda küçük partiküller, (++) sonuçta tama yakın berraklaşmış karışımında çok sayıda belirgin partiküller ve (+++) sonuçta da tam berraklaşmış karışımında gene çok sayıda çok belirgin partiküller görülür.

Müsbet sonuçların ekserisinde müsbetlik dereceleri değişik olmak üzere her iki tüpte de partiküller görülür. Partiküller tüpün birinde görüle bile test sonucu müsbet kabul edilir. Testin müsbetliği TB basiline karşı şahsın kanında dolaşan antikorların bulunduğunu gösterir.

SONUÇLAR

Test sonucu 47 aktif akciğer TB'lunun 34 (% 72,3)'ünde müsbet 13 (% 27,7)'ünde menfi olmuştur. İnaktif TB lezyonlu 8 vakanın 7 (% 87,5)'sinde test sonucu menfidir. Bunlar en aşağı 5 senedir hiçbir aktivite belirtisi göstermeyen vakalardır. 9 aylık tedaviyi takiben testin yapıldığı tarihte inaktif lezyonlu kabul edilerek tedavisi kesilen bir vakada ise test sonucu müsbettir.

TB harici akciğer hastalıklı 32 vakanın hepsinde ve keza 20 sağlam kontrol vakalarının hepsinde test sonucu menfi kalmıştır (Tablo 1).

Sonuçlara göre testin duyarlılığı % 72,3 ve spesifikliği % 98,3 bulunmuştur.

TARTIŞMA

Geçen asrın sonlarından itibaren başlayan TB'un

serolojik tanısı üzerindeki çalışmalarda, 1986'da Nassau ve ark.'nın bu konuda ELİSA testini kullanmaları ile yeni bir çığır açılmıştır (4). Son 15 sene içerisinde bu metodla ve modifiye şekilleri ile basile karşı teşekkül eden antikorların çeşitli purifiye antijenlerle aranması (5,6,7) ve DNA problemleri ile yapılan araştırmalar(8) ile ileriye dönük ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Fakat bu çalışmalar da şimdiye kadar rutine intikal edebilecek bir sonuç vermemiştir.

Bu çalışmada 47 aktif TB'lunun 34 (% 72,3)'ünde test sonucunun pozitif bulunması testin duyarlılığının orta derecede olduğunu göstermektedir. Fakat testin % 98,3 gibi yüksek bir spesifikliğe sahip bulunması ise testin TB tanısında yüksek bir güvenilirliğe sahip olabileceği izlenimini vermektedir.

32 TB harici akciğer hastalıklının ve 20 sağlıklı şahsın hepsinde test sonucunun (-) kalması bu gruba girenlerde yanlış (+)'liğin bulunmayacağını yeterli delili olabilir. Bunların 25'inde PPD, geçirilen TB primo-enfeksiyonu veya yapılan BCG aşısı nedeni ile (+) idi. O halde BCG aşısı ve geçirilen primo-enfeksiyon testin yanlış (+)'liğine neden olmamaktadır.

Diğer taraftan testte kullanılan antijenin hazırlanışı çok kolaydır ve shelf-life'i en aşağı bir senedir. Testin yapılışı için deney tüpleri ve basit bir santrifüj yeterli olmaktadır. Bu hali ile testi geliştirmekte olan ülkelerin periferik bölgeleri dahil her yerde uygulamak mümkündür.

Sonuç olarak bu testin TB'un serolojik tanısı konusundaki araştırmalara bir yenisini ilave edebileceği ve rutin uygulamaya namzet olabileceği ileri sürülebilir.

Tablo 1. Aktif ve İnaktif lezyonlu tüberkülozlularda; tüberküloz harici akciğer hastalıklılarda ve sağlam kontrollarda test sonuçları.

Test Grupları	Test Sonuçları	
	Pozitif	Negatif
1. Tüberküloz, aktif, no= 47	34 (72, 3%)	13 (27, 7 %)
2. Tüberküloz, inaktif, no= 8	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
3. Tüberküloz harici akc. hast., no= 32	--	32 (100 %)
4. Sağlam kontrollar, no= 20	--	20 (100 %)

KAYNAKLAR

1. Middlebrook G. A hemolytic modification of the hemagglutination test for antibodies against tubercle bacillus antigens. J Clin Invest 1950; 29: 1480-1485.
2. Takahashi Y. Specific serum agglutination of kaolin particles sensitized with tubercle phosphatide and its clinical evaluation as a serodiagnostic test for tuberculosis. Ame Rev Resp Dis 1962; 85: 708-719.
3. Duboczy BO, White FC. Latex agglutination test for tuberculosis. Ame Rev Resp Dis 1966; 94: 914-922.
4. Nassau E, Parsons ER, Johnson GD. The detection of antibodies to Mycobacterium tuberculosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tubercle 1976; 57: 67-70.
5. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Ame Rev Resp Dis 1987; 135: 1137-1151.
6. Benjamin GR, et al. Evaluation of mycobacterial antigens in an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. J Med Microbiol 1984; 18: 309-318.
7. Vooren JPV, et al. Antimycobacterial antibodies in pleural effusions. Chest 1990; 97: 88-90.
8. Roberts MC, McMillan C, Coyle MB. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of mycobacterium tuberculosis and mycobacterium avium complex. J Clin Microbiol 1987; 25: 1239-1243.

Yazarın Adı	Yayın Yılı	Yayın Adı
Middlebrook G.	1950	J Clin Invest 29: 1480-1485
Takahashi Y.	1962	Ame Rev Resp Dis 85: 708-719
Duboczy BO, White FC.	1966	Ame Rev Resp Dis 94: 914-922
Nassau E, Parsons ER, Johnson GD.	1976	Tubercle 57: 67-70
Daniel TM, Debanne SM.	1987	Ame Rev Resp Dis 135: 1137-1151
Benjamin GR, et al.	1984	J Med Microbiol 18: 309-318
Vooren JPV, et al.	1990	Chest 97: 88-90
Roberts MC, McMillan C, Coyle MB.	1987	J Clin Microbiol 25: 1239-1243