

TÜBERKÜLOZUN SEROLOJİK TANISI

Doç. Dr. Halil İbrahim Özerol

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Tüberküloz basili 120 yıl önce keşfedilmiş ve günümüze kadar hastalık konusunda bir çok önemli gelişme kaydedilmiş olmasına rağmen, özellikle gelişmekte olan ülkelerde halen önemli sağlık problemlerinden birini oluşturmaktadır. Günümüzde, dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile infekte olup, yılda 10 milyon yeni olgu ve 3 milyon ölüm meydana gelmektedir. Tüberküloz olgularının yaklaşık %95'i ve bu hastalığa bağlı ölümlerin %98'i gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkmaktadır. Tüberküloz olgularının %75'i, ekonomik olarak üretken yaş grubunda görülmekte ve gelişmekte olan ülkelerdeki önlenebilir ölümlerin %25'ini tüberküloz oluşturmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün global tüberküloz kontrolü ile ilgili yedinci yıllık raporunda; global tüberküloz insidens hızının, Aşağı Sahra Afrika ve eski Sovyetler Birliği şehirlerinde daha fazla olmak üzere, yılda yaklaşık %0.4 oranında arttığı bildirilmektedir. 2001 yılında, 1.2 milyonu yayma pozitif olan, 2.4 milyon yeni tüberküloz olgusu saptanmıştır. Saptanan 1.2 milyon yayma pozitif olgu, tahmin edilen tüberküloz insidensinin sadece %32'sini

karşılarmaktadır. Yeni tüberküloz olgularının erken tespit edilmesi için yoğun çalışmalar yapılmakta ve DSÖ, 2005 yılı için vaka tespit oranını %70 olarak hedeflemektedir.

Tüberkülozlu hastanın erken tanısı ve optimal tedaviye başlanması, sadece hastanın iyileştirilmesini değil, aynı zamanda enfeksiyon ve hastalığın toplumdaki diğer insanlara bulaşmasını da önlemektedir. Tüberküloz kontrol programının temel kısımlarından biri olan hastaların tespiti, etkili tedavinin köşe taşlarından birini oluşturur. Günümüze kadar, hastanın tüberkülozlu olmadığını belirlemek açısından, basit bir ARB mikroskopisinden, son yıllarda geliştirilmiş olan karmaşık moleküler biyolojik tekniklere kadar, geniş bir yelpaze oluşturan tanı testlerinden hangisinin kullanımının daha uygun olduğunu gösteren rehberler oluşturulamamıştır. Tüberküloz tanısında iki temel yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi, direkt yaklaşım olup, mikobakteri veya ürünlerinin tespit edilmesini, ikincisi ise, indirekt yaklaşımla tüberküloza karşı konakta gelişen hümmoral ve hümmresel immün yanıtların tespit edilmesidir.

Tanı testlerinin bazı özelliklere sahip olması istenmektedir; hızlı, duyarlı, özgül, tekrarlanabilir, güvenilir, basit, prediktif değeri yüksek, maliyeti ucuz olmalı ve yaygın kullanılabilmesi için tanı değeri yüksek ve uygulanması kolay olmalıdır. İdeal olarak, kullanılan testler kantitatif olmalı ve en azından ferdi olguların bulaştırıcı olup olmadığını belirleyebilmelidir. Bu durum, özellikle, hastaneye yatırılan hastanın izole edilip edilmemesine ve temaslılara koruyucu tedavi verilip verilmemesine karar vermede önemlidir. Tanı yöntemleri, bölgedeki tüberküloz epidemiyolojisi ve toplumun ihtiyaçlarına göre seçilmelidir. Epidemiyolojik olarak, ülkeler

endemik veya endemik olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır. Tanıda izlenen yollar özel ihtiyaçlara ve ülkenin imkanlarına göre planlanmalıdır.

Tüberküloz tanısı için geliştirilen yeni testlerin değerlendirilmesinde duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değerinden söz edilir. Anahtar özellikteki bu performans parametrelerinin tayin edilmesi için, alan deneylerinden elde edilen veriler 2x2 tabloda özetlenir. Yeni tanı metoduyla alınan pozitif ve negatif sonuçlar, altın standart kabul edilen yöntemle alınan pozitif ve negatif sonuçlarla karşılaştırılır. Bahsedilen bu parametrelerin nasıl hesaplanacağı Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Testlerin değerlendirilmesinde kullanılan parametreler ve hesaplanması.

		Yayma		Toplam	
		+	-		
Kültür	+	a	b	a+b	Duyarlılık = $a/a+c$
	-	c	d	c+d	Özgüllük = $d/b+d$
Toplam		a+c	b+d		Pozitif prediktif değer = $a/a+b$
					Negatif prediktif değer = $d/c+d$

Buradaki a, b, c ve d sayıları direkt olarak deney sonuçlarından elde edilir. Duyarlılık, tamamen pozitif örnek sayısına (a+b) bağlıdır. Bu nedenle, %10 prevalanslı bir bölgede 500 hastada yapılan bir deneyin duyarlılık göstergesi toplam 50 olgu olacaktır. Prevalansın %2'den %20'ye değişim

gösterdiği bir yerde 1000 tüberküloz şüpheli kişiye uygulanacak %98 özgüllükte ve %70 duyarlılıkta bir testi değerlendirmek için farklı olasılıklar üzerinde durulmalıdır. EZN boyalı yayma ve kültür pozitiflikleri için, bu olasılıklar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Uygulanan testin duyarlılık ve özgüllüğünden, prevalansa bağlı olarak hesaplanan veriler.

	Prevalans			
	%2	%5	%10	%20
Yayma+, kültür+ (gerçek pozitifler)	14	35	70	140
Yayma+, kültür - (yalancı pozitifler)	20	19	18	16
Yayma-, kültür + (yalancı negatifler)	6	15	30	60
Yayma-, kültür - (gerçek negatifler)	960	931	882	784

Yayma ile gerçek negatif hastaların sayısının fazla olduğu düşük prevalanslı alanlarda, özgüllük çok önemlidir. Yukarıdaki örnekte, %2 prevalansta, yalancı pozitif vakaların sayısı (20) ve pozitiflerin sayısı (14+6=20) birbirine eşittir. Yüksek prevalanslı alanlarda, taranacak olan infekte olmayan hasta sayısının daha az ve atlanan vaka sayısının (yalancı negatif) nispeten daha fazla olması nedeniyle özgüllüğünün yüksek olması istenebilir.

Tüberkülozun endemik olmadığı ülkelerde tanı gereksinimleri, yüksek riskli gruplarda latent infeksiyonların gösterilmesi, hastaların erken fazda yakalanması, hastane ve toplumdaki bulaşlara bağlı salgınlara daha hızlı tespiti ve tüberküloz dışı mikobakterilerle infekte hastaların belirlenmesini içerir. Tüberküloz insidensinin düşük olduğu gelişmiş ülkelerde tüberkülin testi duyarlılığının prediktif değeri daha düşüktür. Tüberkülozun endemik olduğu ülkelere ise tanı gereksinimleri, standardize edilmiş mikroskopi teknikleri, çocukluk çağı ve ekstrapulmoner tüberküloz için sıvı kültür yöntemlerinin kullanılması, basil sayısının az olduğu durumlarda mikobakteri antijenlerinin kimyasal ve fiziksel

yöntemlerle araştırılması, antijen veya antikor tespiti, hücresel bağışıklığın belirlenmesi, yüksek oranda yapılan BCG aşılamalarının immünolojik test sonuçlarını etkilemesi probleminin aşılması, nükleik asit amplifikasyonu ve faj tiplleme testlerinin uygulanması gerekir.

Endemik ülkelere tanı, minimum alt yapı ve donanım nedeniyle yoğun laboratuvar çalışmalarına dayanır. Bu ülkelere tüberkülozlu hastaların tanısında yararlanılan en önemli laboratuvar aracı, balgam yaymalarının mikroskopik incelenmesidir. Günümüzde, yıllık tüberküloz olgu tahmini 10 milyon olup bunun, sadece, 1.2 milyonu yayma pozitif olarak tanınmaktadır. Yayma mikroskopisine alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gereklidir. Bu metotlarda aranan özellikler; iki saatin altında sonuç vermeli, kolay yorumlanmalı, HIV pozitif hastalarda iyi sonuç vermeli ve mümkün olduğu kadar erken tedaviye başlanmasını sağlamalıdır.

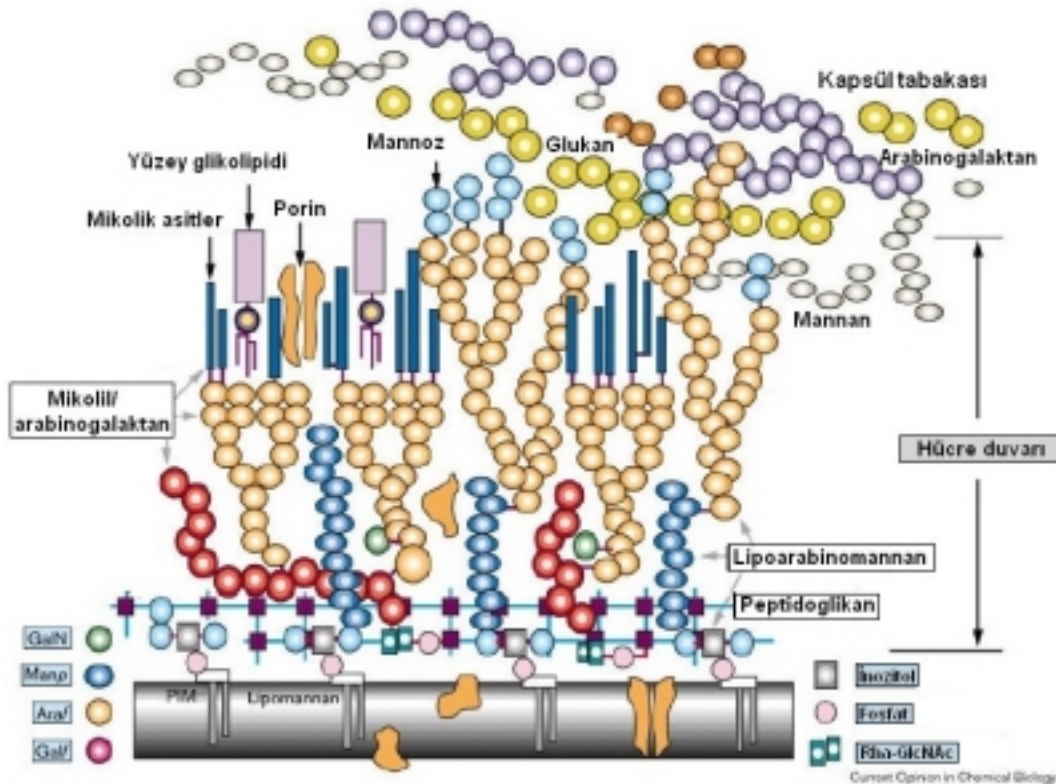
Tüberküloz tanısında kaydedilen bir çok gelişmeye rağmen; standart mikroskopi, seroloji, deri testleri, alternatif sıvı kültür besiyerleri, faj replikasyon sistemleri, moleküler problemler, amplifikasyon testleri ve antijen tespit

testlerinden hiçbirisi ideal değildir. Klinik uygulamada tüm sorulara yanıt veremezler. Çoğu zaman birden fazla testin birlikte uygulanması gerekmektedir. Tanı algoritmalarının düzenlenebilmesi ve bu testlerin uygun kullanılmasını belirleyebilmek için klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Mikobakteri antijenleri

Mikobakterilerin hücre duvarında glikolipit yapısında antijenler bulunmaktadır (Şekil 1). Bu glikolipitler: PGL antijen (phenol glycolipit veya triglycosyl phenolphthiocerol dimycocerosate), DAT (2,3-diacyltrehalose), TAT (2,3,6-triacyltrehalose), CF (cord factor, veya trehalose-6,6'-dimycolate), ve SL-I (2,3,6,6'-tetraacyl trehalose 2'-sulphate)

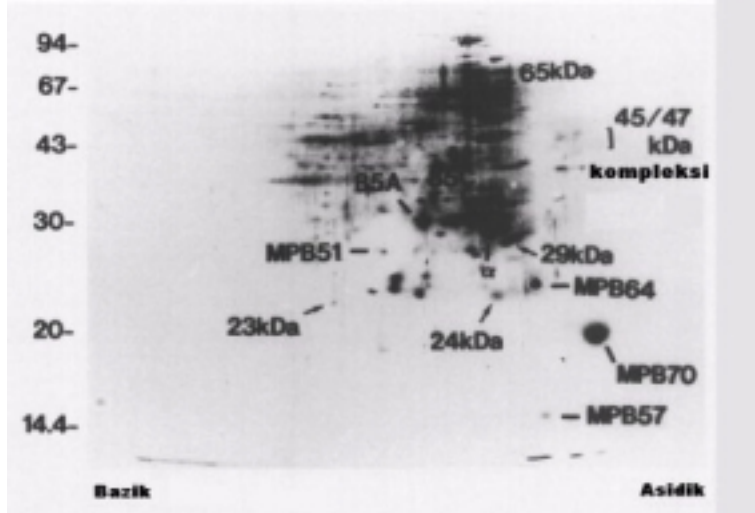
antijenleridir. Hücre duvarında bulunan antijenlerden başka hücre dışına salınan (A38 ve A30 gibi) ve sitoplazmada bulunan antijenler de tespit edilmiştir. Mikobakteri kültür filtratlarından α antijen, MPB51, MPB64, MPB70, MPB83, MPB57 ve diğer bir çok protein ekstrakte edilmiş ve klonlanmıştır. Hastaların bu protein-antijenlere verdikleri humoral yanıtlar incelenerek tüberküloz tanısı ve prognozu belirlenebilir. İki boyutlu elektroforez (2-DE) bu proteinlerin ayrılmasında büyük kolaylık sağlar. BCG'nin kültür filtratları 2-DE ile incelenmiş ve Ag85 kompleksi ile MPB51'nin immünodominant antijenler olduğu bildirilmiştir. Ayrıca MPB64, MPB70, 65-kDa protein (groEL/hsp60 analogu), MPB57 (groES/hsp10 analogu) ve BCG 45/47 kDa kompleksi belirgin lekeler halinde tanımlanmıştır (Şekil 2).



Şekil 1. Mikobakteri hücre duvarı.

Tedavi sırasında lize olan mikobakteri hücrelerinden dışarı çıkan sitoplazmik antijenin tayini, kemoterapinin etkili olup olmadığının belirlenmesinde kullanılabilir. Bir çalışmada, hücre dışına salınan 30 kDa'luk antijenin,

sitoplazmada bulunan 65 kDa'luk antijene oranı tespit edilmiş ve oranın birden küçük olması halinde basillerin parçalanmış olduğu, birden büyük olmasının ise canlı basilleri gösterdiği bildirilmiştir.



Şekil 2. İki boyutlu elektroforezde saptanan bazı *Mycobacterium bovis* antijenleri. Molekül ağırlık standartları, kDa olarak gösterilmiştir. 85A = Ag85A; α = α antigen; 85C = Ag85C; 65 kDa = 65-kDa protein (groEL/hsp60 analogu); MPB = BCG'den salınan majör protein. MPB57 (groES/hsp10 analogu), MPB51, MPB64 ve BCG 45/47-kDa kompleksi görülmektedir. Ag85B 30 kDa'luk antijendir.

Tüberkülozlu hastalarda gelişen antikor yanıtı

Tüberkülozlu hastaların serumunda, *M. tuberculosis* antijenlerine karşı oluşmuş IgG, IgM ve IgA tipi antikorlar bulunur. Tüberkülozda humoral immün yanıtların önemli olduğunu gösteren bulgulardan biri, farklı hastalardan alınan serumların aynı antijenlerle reaksiyona girmemesidir. Enfeksiyona neden olan *M. tuberculosis* suşunun gen ekspresyon yapısı ve konağın immün yanıt oluşturabilme yeteneği, tüberküloz sırasında ortaya çıkan heterojen antikor repertuarını açıklayabilir. Ayrıca, hastalığın değişik dönemlerinde farklı

antijenlerin oluşması ve tanınması da söz konusudur.

Tüberkülozun serolojik tanısında hangi antijenlerin kullanılması gerektiği, sadece antijen tanınması ile sınırlı değildir. Antijen tanınması ile aynı öneme sahip üç konu daha vardır:

1. Antijen kokteylleri: Tüberküloz sırasında serumda ortaya çıkan antikorlar tarafından tanınan bir tek antijen veya sık rastlanan antijen kombinasyonu olmaması nedeniyle, serolojik tanı testlerinde antijen kokteylleri kullanılmalıdır. Farklı hastalarda, çok az miktarda antikor üretilen immün süpresyonlu hastalar dahil, çeşitli antikor

yanıtları oluşur. Antijen kombinasyonları, bu tüberküloz olgularının yakalanma şansını artırmaktadır.

2. Katı faz: Kokteyl esasına dayanan testlerde solid faz kullanılarak, kokteyilde bulunan her antijenin serolojik aktivitesinin tespiti sağlanır. Bu amaca ulaşabilmek için, nitrosellüloz temelli metodlar geliştirilmiştir.

3. Özgül antijen: Çapraz reaksiyon veren epitoplara bağlı yanlış pozitif test sonuçlarından kaçınabilmek için, antijenler *M. tuberculosis* (veya *M. tuberculosis* kompleksi)'ne özgül olmalıdır. Ayrıca, tüberkülozun karakteristik özelliği olan heterojen antikor repertuarını kapsayacak şekilde birden fazla antijen seçilmelidir. Panellerdeki antijenlerin seroreaktivitesi incelenmiştir; 38 kDa PhoS ve 14 kDa alfa-kristalin'inki en fazla bulunmuştur. Bu iki antijene eklenen diğer antijenler (ESAT-6, MPT64, MPT63, 19 kDa lipoprotein, MTSA-10), duyarlılığın artmasını sağlar.

Tüberkülozun serolojik tanısında kullanılan testler

Tüberkülozun serolojik olarak tanımlanması amacıyla geliştirilen testler üç grupta toplanabilir. Bunlar; mikobakterilere özgül antijenler veya bunlara karşı oluşan antikorları tespit eden testler ve tüberküloz enfeksiyonu sırasında üretimi artan interferon gamma (IFN-gamma) ölçüm testlerinden oluşur

Antijen tespitine dayanan testler

Mikobakteri antijenlerinin fraksiyonlarına ayrılması, izolasyonu ve analizi için geliştirilen tekniklerdeki ilerlemeler sonucunda, *M. tuberculosis*'in, bazılarında

karbonhidrat ve glikolipit kısımları bulunan çeşitli protein antijenleri gösterilmiş ve detaylı yapısal özellikleri tanımlanmıştır. Tüberkülozlu hastaların serumundan, dolaşan antijenler izole edilmiş ve bunların tanı amacıyla kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Ayrıca, mikobakterilerin plazma membranında bulunan antijenler, antijen 5, Lipoarabinomannan (LAM), sitoplazmik antijenler ve diğer antijenleri tespit eden çeşitli serolojik test kitleri hazırlanmıştır.

İdrar, balgam ve serumda lipoarabinomannan tespiti ile tüberküloz tanısı:

LAM, mikobakterilerin hücre duvarında bulunan bir lipopolisakarittir. LAM'ın, doğal mikobakteri enfeksiyonu sırasında antikor yanıtını indüklediği bilinmektedir. *M. tuberculosis*'ten saflaştırılan LAM, mikobakteri enfeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılmıştır. İdrar örneklerinde bulunan tüberküloz basillerini tespit etmek için, LAM'ı kantitatif olarak tespit eden bir test geliştirilmiştir. Alan taramalarında, akciğer ve akciğer dışı örneklerde bulunan LAM'ı, yarı kantitatif olarak tespit etmek amacıyla dipstik metodu kullanılmaktadır. Ön deney verilerine göre duyarlılığı %93 ve özgüllüğü %95 olan bir testtir. Balgam yaymaları referans alınarak yapılan bir çalışmada, anti-LAM pozitifliği; yayma pozitif akciğer tüberkülozlu hastalarda %66.9, yayma negatif hastalarda %34.4 ve sağlıklı kontrollerde %8 olarak bulunmuştur. Pozitif ve negatif prediktif değeri, sırasıyla %48.7 ve %87.4 olarak hesaplanmıştır. İdrarda, anti-LAM ELISA testi ile alınan %45.8 pozitifliğin ve %77.9 negatifliğin doğru sonuçlandığı tespit

edilmiştir. Tüberkülozun endemik olduğu alanlarda, özellikle akciğer tüberkülozunun diğer indikatörleri ile birlikte olduğunda, anti-LAM negatifliğinin pratik önemi vardır. Anti-LAM ELISA testi, yayma sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, yayma pozitif akciğer tüberkülozlu hastaların %90.6'sında ve yayma negatif olanların %52.5'inde doğru olarak tanı konulmuştur. İdrar dışında, akciğer tüberkülozlu hastaların balgam ve serumunda bulunan mikobakteri antijen veya antikorlarını tespit eden, immün blotlama ve immünoassay temelli testler geliştirilmiş ve bu testlerle hızlı tanı konulduğu belirtilmiştir. Bu testlerden biri olan balgamda LAM'ı tespit eden test, LAM'a karşı farelerde oluşturulan monoklonal antikorların kullanıldığı antikor yakalama yöntemine dayanır. *M. tuberculosis*'e karşı tavşanlarda oluşturulan antikorlar tespit edici kaynak olarak kullanılır. Bu test, balgamda bulunan LAM'ın tespitinde, özgül ve duyarlı bir test olup, tüberküloz tanısında oldukça yararlıdır. Yayması negatif veya pozitif olan, kültürü pozitif tüberkülozlu hastalar, tüberküloz dışı solunum yolu hastalığı olanlar ve normal kişilerde, Dot assay kullanılarak yapılan bir çalışmada; balgam ve serumda antijen tespitinin duyarlılığı %86.1, özgüllüğü %92.9, pozitif prediktif değeri %91.6 ve negatif prediktif değeri %88.2 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, balgamda antikor tespitinin duyarlılığı %83.6, özgüllüğü %95.4, pozitif prediktif değeri %94.4 ve negatif prediktif değeri %85.6 olarak saptanmıştır.

Vücut sıvılarındaki antijenlerin tespit edilmesi: Son yıllarda, nükleik asit

amplifikasyon yöntemlerindeki ilerlemelerin antijen tespitini kolaylaştırmasına rağmen, beyin-omurilik ve plevra sıvısı gibi biyolojik sıvılarda bulunan 3-20 ng/ml konsantrasyonlardaki mikobakteri antijenlerinin tespit edilmesinde serolojik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Antijen tespiti amacıyla; sandviç ELISA, inhibisyon ELISA, lateks aglütinasyon ve zıt pasif hemaglütinasyon yöntemine dayanan testler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin çoğunda; ses dalgaları ile parçalanmış mikobakteriler, ekstrakte edilen glikolipitler, PPD, antijen 5 (38 kDa), antijen A60, 45/47 kDa'luk antijenler, antijen Kp90, 30 kDa'luk antijen, P32 antijeni, kord faktörü (trehaloz dimikolat) ve LAM antijen olarak kullanılmaktadır. Antijen olarak kord faktörü kullanılan ELISA testinin, akciğer tüberkülozu tanısında duyarlılığı %66.6-74.1 ve özgüllüğü %95.2-99.0 olarak bulunmuştur. Antijen 5 ve LAM dışında, bu testlerin çoğunda, mikobakteri antijenlerine karşı oluşan poliklonal antikorlar kullanılmaktadır. Testlerin duyarlılığı %40-75 ve özgüllüğü %90-99 arasında değişmektedir.

Erişkinlerden elde edilen klinik örneklerde mikobakteri antijenlerinin tespitini amaçlayan çok sayıda çalışma olmasına rağmen, çocuklarda bu konuda çok az araştırma yapılmıştır. Tüberkülozlu erişkinlerden elde edilen klinik örneklerde, *M. tuberculosis*'e özgül antijenleri tespit eden testlerin duyarlılık ve özgüllükleri oldukça yüksektir. Klinik örneklerde, *M. tuberculosis*'e ait bir mikobakteri mikolik asiti olan tüberkülostearik asiti tespit eden testler kullanılmıştır. Tüberkülostearik asit

tespiti ile karboksilik asitlerin kromatografik profilleri birleştirilip klinik ve kültür sonuçları ile karşılaştırılan bir çalışmada, akciğer tüberkülozlu erişkin hastalarda duyarlılık %95 ve özgüllük %91 olarak belirlenmiştir. Bu yöntemler, teknik olarak ileri donanım ve uzmanlık gerektirir ve çocuklarda duyarlılık ve özgüllük oranları belirlenmemiştir.

BOS'ta dolaşan mikobakteri antijenlerinin tespit edilmesi ile, tüberküloz menenjitli diğer menenjitlerden ayırt edilebilir. Mikobakterilere özgül antijenlerin BOS'da bulunduğunu gösteren metotlar tanımlanmış ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir. İlk araştırmalarda, direkt olarak, kaba antijenlere karşı oluşan poliklonal antikorlarla ELISA teknikleri uygulanmış ve özgüllük ve duyarlılık oranlarının düşük olması beklenirken, duyarlılık %68 ve özgüllük %100 olarak bulunmuştur. Ayrıca, tavşanlarda antimikobakteri IgG antikorları geliştirilip, BOS'ta dolaşan antijenleri tespit için revers pasif hemaglutinasyon yapılmış ve testin duyarlılığı %94.1 ve özgüllüğü %99 olarak bildirilmiştir. İmmünblot testi ile BOS'ta dolaşan mikobakteri antijenlerinin özellikleri belirlenmiş ve en fazla 30-32 ve 71 kDa'lık antijenlerin bulunduğu bildirilmiştir.

Antikor tespitine dayalı tüberküloz tanı yöntemleri

Tüberkülozlu hastaların serumunda mikobakteri antijenlerine karşı oluşan antikorlar monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılarak tespit edilir. Çevredeki mikobakterilerle çapraz reaksiyonlar nedeniyle, yanlış pozitif test

sonuçlar alınabilmektedir. Mikobakteri antijenlerinin saflaştırılması için geliştirilen metodlar henüz yenidir, bu nedenle, şu an mevcut olan bir çok test, farklı araştırmacılarca değişken sonuçlar vermiştir. Burada dikkate alınması gereken önemli bir nokta; mikobakteri hastalıklarında ortaya çıkan bağışık yanıtların, HLA klas II allotipleri ile ilişkili olması ve farklı hastalarda aynı antijenlerin tanınmamasıdır. Bu nedenle, antikor bazlı mikobakteri tespit sistemleri başarısı sınırlıdır ve aşağıdaki türden yeni yaklaşımlar araştırılmaktadır;

Tüberkülozlu hastalarda özgül antikorları tespit etmek için bir çok serolojik test incelenmiştir. Bu tür serolojik testlerde, antijenik proteinler (A65, A60, A38, A14, A19, A90, A34 ve A55 kDa'luk antijenler) ve polisakkaritler (LAM, PGP) dışında ısı şok proteinleri, diaçil trehaloz, ekskretuar-sekretuar antijenler ve saflaştırılmış protein türevleri kullanılarak hızlı bir tüberküloz tanı testi geliştirmek için ELISA tekniğine uygun bir çok antijen denenmiştir. Önceleri, *M. tuberculosis* veya *M. bovis*'in kültür filtratları ve sonikasyonla parçalanmış ürünleri kullanılmış iken, daha sonradan *M. tuberculosis*'in saflaştırılan protein deriveleri (PPD) veya *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guerin)'den elde edilen A60 gibi yarı saflaştırılmış antijenler kullanılmıştır. Bu antijenler, çevrede bulunan mikobakteri ve diğer mikroorganizmaların benzer antijenleri ile çapraz reaksiyon verdiklerinden, özgüllükleri düşük olarak tespit edilmiştir. A5, A6 ve rekombinant teknoloji ile hazırlanan daha saf proteinlerin özgüllüklerinin daha iyi, ancak duyarlılıklarının düşük olduğu

belirlenmiştir. *M. bovis* hücre duvarından saflaştırılan glikolipitlerin kullanıldığı ilk ELISA testlerinde, duyarlılık %91.3'ün üzerine çıkarılmış ve özgüllükleri %97.8-100 arasında tutulmuştur. Bu glikolipitlerin özgül oldukları, tavşanlarda oluşan anti-glikolipit antikorların, *M. tuberculosis* kompleksi antijenleri ile reaksiyon verirken, diğer mikobakterilerin kaba ekstraktları ile reaksiyon vermemesi ile gösterilmiştir. Bu bulgular, tüberkülozun serolojik tanısında glikolipit antijenlerin kullanılabileceği düşüncesiyle, ELISA tekniği ile bir çok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Ancak, elde edilen sonuçlar birbiriyle uyuşmamaktadır. Diaçiltrehaloz (DAT) antijeni ile yapılan iki çalışmada da özgüllük %98 olarak bulunurken, duyarlılık birinde %11.5 ve diğerinde %86.7 olarak bildirilmiştir. Bu sonuçların, ELISA kuyucuklarındaki farklı glikolipit miktarlarına bağlı olduğu sanılmaktadır. Antijen olarak fenol glikolipit kullanılan iki çalışmada, testlerin duyarlılığı %97.5 ve %60 olmak üzere yine iki farklı sonuç bildirilmiştir. Bu ELISA protokollerinde, özgül olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için yapılan yıkama solusyonlarındaki deterjanlar farklıdır. İlk ELISA testlerinde, zemine yüksek oranda bağlanmaların nedeninin BSA olduğu bildirilmiştir.

Çocuklarda, *M. tuberculosis*'in saf veya kompleks haldeki antijenlerine karşı oluşan antikorları tespit etmek için ELISA testleri geliştirilmiştir. İlk geliştirilen ELISA kitlerinde sonikasyonla elde edilen mikobakteri antijenleri kullanılmış ve testin duyarlılığının %26 ve özgüllüğünün %40 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, beş yaşından

küçük çocuklarda testin BCG aşısından etkilendiği gösterilmiştir. PPD'ye karşı oluşan antikorları tespit eden ELISA testlerinin duyarlılığı, kültürü pozitif akciğer tüberkülozlu çocuklarda %51 iken, klinik olgularda %28 olarak bulunmuştur. Otoklavlanmış *M. tuberculosis* kullanılınc; serumdaki antikorları tespit etmesi yönünden; klinik akciğer tüberkülozlu çocuklarda duyarlılık %62 olarak tespit edilmiş iken, kültürü pozitif hastalarda %69, milyer tüberkülozda %100, tüberküloz menenjitte %80 ve plevra tüberkülozunda %78 oranında duyarlılık elde edilmiştir. Bu test; tüberkülin deri testi sonucu, BCG ile aşılama veya beslenme durumundan etkilenmezken, tedavi süresi, artan yaş ve enfeksiyonun kronikleşmesi ile pozitif olarak ilişkili bulunmuştur. Tüberkülozlu çocuklarda mikobakterilerin A60 antijenine karşı oluşan IgG ve IgM antikorlarını tespit eden ELISA testi kullanılmış ve özgüllük oranı %98 olarak seçilince IgG antikorlarını tespit duyarlılığının %68 ve IgM duyarlılığının da %19 olduğu görülmüştür. Aynı anti-A60 ELISA kullanılan, ancak özgüllüğü %95 olarak seçilen bir çalışmada, IgG antikor tespit duyarlılığı; geçirilmiş tüberkülozda %26, asemptomatik primer tüberkülozda %6, semptomlu tüberkülozda %14 ve nontüberküloz adenitte %9 olarak bulunmuştur. Çocuklarda tüberküloz tanısında yararlı olan ve çeşitli klinik durumlarda yeterli duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliğe sahip serolojik tanı testi bulunmamaktadır.

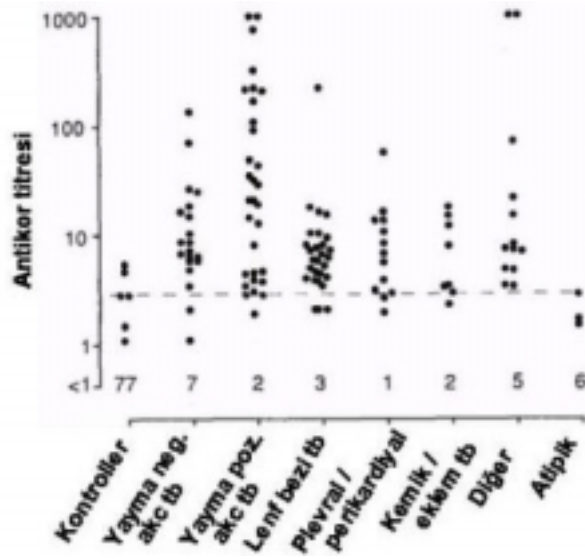
M. tuberculosis'in gen ekspresyon kütüphaneleri, tüberkülozlu hastaların serumları ve tavşanlarda *M. tuberculosis*'e karşı oluşan antiserumlar taranarak, yeni antijenlerin *M. tuberculosis*'e karşı oluşan özgül antikorları tespit etme kapasiteleri belirlenmiştir. Tüberkülozlu hastalardaki antikorları tespit etmek için ELISA ile önceden bildirilen 38 kDa antijenle birlikte üç antijen, Mtb11 (CFP-10 adı da verilir), Mtb8 ve Mtb48 incelenmiştir. Deneylerin sonucunda birden fazla antijenin birlikte kullanılmasıyla *M. tuberculosis* antikorlarının tespiti için duyarlılığı daha yüksek testler geliştirilebilecektir.

Mikobakterilere özgül farklı antijenlerin etkinliği ve tüberküloz tanısında farklı antijen kombinasyonlarının uygulanabilirliğini araştırmak için yapılan bir çalışmada A60, A38 ve Kp90 antijenleri kullanılmıştır. Duyarlılık ve özgüllük oranları A60 IgG için %80.8 ve %88.4, A38 IgG için %64.2 ve %80.7 iken, Kp90 IgA için %62.6 ve %66.3 olarak bildirilmiştir. Antijen kombinasyonları yapıp, tek antijenle yapılan serolojik testin cut-off değerine ayarlama yapılıncaya, duyarlılık ve özgüllükte %10-20 artma elde edilmiştir. Bu şekilde, duyarlılık ve özgüllüğü %80 oranında olan serolojik testlerin, ancak düşük insidensli alanlarda kullanılabileceği, yüksek insidensli alanlarda tanı değerinin zayıf olacağı bilinmelidir.

M. tuberculosis'in hücre duvarında bulunan PGL, DAT, TAT, CF ve SL-I gibi antijenik glikolipitler ELISA testlerinde kullanılarak, tüberkülozun serolojik tanısında değerlendirilmiştir. Farklı çalışmaların sonucuna göre, bu glikolipit antijenlerin yararı tartışmalıdır. Mikobakteri glikolipitleri kullanılarak yapılan antikor ölçümlerindeki farklılıkların nedeni olarak, kuyucuklara bağlanan glikolipit miktarı ve deterjan olarak Tween 20 kullanılması suçlanmıştır. Standartlaştırılmış ELISA şartları da önemlidir. DAT, TAT, SL-I ve PGL antijenlerinin kullanıldığı testlerde yıkama solüsyonuna Tween 20 eklenmesi tavsiye edilmezken, CF antijeni ile kullanılabileceği belirtilmektedir. Bu antijenleri çözmek amacıyla kullanılan n-hekzan miktarının artırılması, bloklayıcı ajan olarak da %0.5 jelatin kullanılması önerilmektedir.

Hızlı tüberküloz tanısı amacıyla, anti-tüberküloz glikolipit (anti-TBGL) antikorları ile geliştirilen ELISA testinin yayma ve kültürü negatif aktif tüberkülozlu hastalarda %73.5 ve özgüllüğü %95.7 bulunmuştur.

M. tuberculosis'in 38 kDa'luk antijenine karşı oluşan antikorlar, %98 özgüllükte, akciğer tüberkülozunda %76, akciğer dışı tüberkülozda %73 ve yayma negatif akciğer tüberkülozunda %70 pozitif sonuç vermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı klinik gruplarda ELISA ile saptanan antikor titreleri

Antikor tespit testleri ile, akut tüberküloz olgularının kronik olanlardan ayırdedilmesi problemlidir. Ayrıca, immün yetmezlikli kişilerde testin duyarlılığı azalmaktadır. Özgül *M. tuberculosis* antijenlerinden A35 kDa'nın nitrosellüloz striptlere bağlanmasıyla hazırlanan serolojik

testlerin, kültürle karşılaştırıldığında duyarlılığının ve özgüllüğünün %100 olduğu bildirilmiştir. Bu testin uygulanmasının basit ve raf ömrünün 2 yıl olduğu bildirilmiştir.

Akciğer tüberkülozunun tanısında kullanılan, antikor tespiti esasına dayalı testlerden bir kaçı Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Akciğer tüberkülozu tanısında kullanılan antikor tespit temeline dayanan ticari testler.

Kullanılan antijen	Testin adı	Metodu	Duyarlılık	özgüllük
Lipoarabinomannan (LAM)	MycoDot TM	Dot-blot	%70-75	%96.7
Rekombinant protein peptit	Detect -TB	ELISA	%75	%97
38 kDa (rekombinant antijen) ve LAM	Pathozyme Myco	ELISA	%57-89	%92-100
38 kDa ve 16 kDa (rekombinant antijen)	Pathozyme TB plus	ELISA	%71-89	%98-100
Antijen - 60	Antigen A60	Membran	%71-100	%71-95
38 kDa (rekombinant)	ICT tuberculosis	bazlı	%49-89	%98-100

Tüberkülozun erken tanısı amacıyla geliştirilen, Pathozyme Myco pleytlerine rekombinant 38 kDa + LAM antijenleri

bağlanmış iken, Pathozyme TB Complex Plus pleytlerine rekombinant 38 kDa ve 16 kDa antijenleri bağlanmıştır. Moleküler ağırlığı 38 kDa ve 16 kDa olan antijenler, *M. tuberculosis* kompleksi (*M. tuberculosis*, *M. africanum* ve *M. bovis*)'ne özgül antijenlerdir. 38 kDa antijen içeren testlerin duyarlılığı %80 ve özgüllüğü %100'dür. LAM, LPS'e benzer, yüksek derecede immünojen ve mikobakterilere özgüdür. Pathozyme Myco kitinde A38 kDa ve LAM kombinasyonu kullanılarak kitin duyarlılığı artırılmıştır. Pathozyme TB Complex Plusda ise, 38kDa ve 16kDa kullanılmış ve kitin özgüllüğü değişmeden duyarlılığında artma sağlanmıştır. Antijen 38 kDa aktif hastalığa özgüdür. Antijen 16 kDa ise, hastalığın erken döneminde tespit edilebilir ve çocuklardaki tüberkülozun tanısında yararlıdır. Ayrıca, bu kitler, hastanın immün durumu hakkında da bilgi verirler. Myco, mikobakteri türlerine karşı oluşan IgG, IgA ve IgM antikorlarını tespit etmek için kullanılan genel bir tarama kitidir. Pathozyme TB Complex Plus ise mikobakteri kompleksine özgül IgG antikorlarını tespit eder ve doğrulama amacıyla kullanılmalıdır. Tedavi edilen ve iyileşen kişilerde, Pathozyme TB Complex Plus ile negatif sonuçlar alınırken Myco kiti, diğer antijenlere karşı oluşan antikorların, etkili tedaviden sonra yıllarca devam etmesi nedeniyle, pozitif sonuç vermektedir.

İmmünokromatografi temeline dayanan antikor tespit testleri:

Tüberkülozlu hastaların kan, plazma veya serumlarında bulunan antikorları tespit etmek amacıyla, immünokromatografik yöntemli, hızlı in vitro testler (InstaTest TB, TB STAT-PAK ve ICT diagnostics, BIO-ANALYTICS TB gibi) geliştirilmiştir. Bu testlerde, membrana bağlanmış tüberküloz antijeni kombinasyonları ve kolloid haldeki altın partiküllerine birleştirilen antikor bağlayıcı bir protein kullanılır. Piyasada kart test şeklinde bulunmaktadır. Test kasetine örnek eklenir ve antikor bağlayan protein-kolloid altın kompleksi arasında ilerlemesi için beklenir. İlerleme sırasında örnekte tüberküloza karşı oluşmuş antikorlar varsa bağlanır ve bir kompleks oluşur. Oluşan kompleks, üzerinde sabitleştirilmiş antijen bulunan membrandan geçirilince antikorlar antijene bağlanır. Test kartı üzerindeki B zonunda pembe/menekşe renginde bir bant görülür. Bağlanmayan kompleksler kontrol alanına doğru göç etmeye devam eder ve bu alanda pembe/menekşe renginde bir bant oluşturur. Bu bandın oluşması testin doğru yapıldığını göstermektedir. Bu test, aktif tüberkülozlu hastaların taranmasında kullanılır. Negatif sonuçlar tüberküloz olasılığını ekarte ettirmezken, pozitif sonuçların doğrulanması gerekmektedir. İmmünokromatografik temelli testlerin duyarlılık ve özgüllüğü, sırasıyla %75-97 ve %95-98'dir. Aktif ve sessiz tüberküloz enfeksiyonu arasında ayırım yapabilmesi nedeniyle, tüberkülozun endemik olduğu ülkelerde denenebilir.

Tüberküloz tanısında çok antijenli serolojik testler, mikroskopi kadar duyarlı olabilir. Akciğer tüberkülozunun tanısı amacıyla kullanılan immünokromatografik testlerden,

ICT tüberküloz kitinde, rekombinant teknoloji ile *Escherichia coli*'de üretilen 38 kDa'luk antijene ilaveten, dört *M. tuberculosis* antijeni vardır. Bu kitte birden fazla antijen kullanılarak, testin özgüllüğünde azalma olmadan duyarlılığı artırılmıştır. *M. tuberculosis*'e karşı oluşan IgG antikor yanıtlarını tespit eder. Her antijen için duyarlılık %96.5 ve özgüllük %98 olarak bulunmuş olup, BCG aşılama ve tüberkülin duyarlılığından etkilenmediği bildirilmiştir. Aktif tüberkülozlu hastaları, sağlıklı ve PPD pozitif hastalardan kolayca ayırt edebilmektedir. Endemik ülkelerde kullanılabileceği düşünülmektedir. Tüberküloz semptomları olan kültürü negatif hastalarda, ICT testi pozitif sonuç vermektedir. Anti-MPB64 monoklonal antikorlar kullanılarak, MPB64 antijenini tespit eden immünokromatografik testler de geliştirilmiştir.

Mikobakterilerin süperoksit dismutazına karşı oluşan antikorların tespit edilmesi:

Süperoksit dismutaz, *M. tuberculosis* tarafından salgılanan önemli bir proteindir. Kültürü yapılabilen *M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. scrofulaceum* gibi mikobakterilerin süperoksit dismutazı (SOD) saflaştırılmış ve anti-SOD antikorlarının oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu antikorlar immün presipitasyon ve ELISA testlerinde kullanılmıştır. Tüberkülozun serolojik tanısı amacıyla değerlendirilmiş ve Hindistan ya da Mısır gibi tüberküloz prevalansının yüksek olduğu ülkelere (pozitif prediktif değeri %77-88) göre, daha düşük

prevalanslı ülkelerde yararlı olabileceği (pozitif prediktif değeri %93-94) bulunmuştur.

Tüberküloz menenjitin serolojik tanısı

Antimikobakteri antikorlarının intratekal sentezini tespit eden serolojik testlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Mikobakteri türüne yüksek derecede özgül ve duyarlı olması için, iyi immünojen bir antijenin kullanılması gerekir. PPD gibi kaba antijenlerin kullanılması halinde, duyarlılık ve özgüllük düşük olacaktır. ELISA testlerinin başlangıçta düşük olan duyarlılıkları, ELISA tekniklerinin geliştirilmesi ve özgül *M. tuberculosis* antijenlerinin tanımlanması sonunda artırılmıştır. A38 kDa (A5 veya A78 olarak da adlandırılır) antijenine karşı farelerde oluşturulan monoklonal antikorların kullanıldığı, solid faz antikor yarışmasına dayanan ELISA testleri, akciğer ve akciğer dışı tüberküloz tanısında yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Akciğer dışı tüberkülozda tanı duyarlılığı %73 ve özgüllüğü %98 olarak tespit edilmiştir.

Tüberküloz menenjitli olgularda, BOS'da anti-BCG salgılayan hücreleri tespit eden ELISA testlerinin kullanılması duyarlılığı artırır. Bu metodun duyarlılığı %96 ve özgüllüğü %92'dir. BOS'da anti-PPD IgG antikorlarının kantitatif ölçümünde kullanılan hücre-ELISA metodunun duyarlılık ve özgüllüğü de, sırasıyla, %96 ve %92'dir.

Diğer tanı metotları

Tüberkülin testinin spesifikliğinin az olması nedeniyle, antijenleri tespit edebilen ve mikobakterilerle infekte ve aktif tüberkülozlu hastalar arasında ayırım yapabilen yeni testlere

ihtiyaç vardır. Bu kriterlere uyan testlerden biri, MPB 64 transdermal yama testidir.

MPB 64 transdermal yama testi: MPB 64, *M. tuberculosis* kompleksine özgül bir antijendir. MPB 64 antijeni, aktif tüberkülozlu hastaları tespit etmek için, transdermal yama testi şeklinde uygulanır. Bu testte, yama uygulanmasından 72 saat sonra pozitif reaksiyon alınır ve bir hafta pozitif kalır. Özgüllüğü %100 ve duyarlılığı %87.8'dir. Tüberkülin testi pozitif olan ve tüberkülozlu olmayan kontrollerde, transdermal MPB 64 yama testi negatiftir. Transdermal MPB 64 yama testi, tedavisi tamamlanan tüberkülozlu hastalarda negatifleşmektedir. Bu nedenle, aktif tüberkülozlu hastaları tespit etmesi dışında, tedavinin izlenmesinde de yararlıdır.

İnterferon gamma üretiminin ölçülmesi: Tüberküloz infeksiyonunun ilk dönemi, solunumla vücuda giren tüberküloz basillerinin alveoler makrofajlar tarafından sindirilmesidir. Makrofajların yeteneğine bağlı olarak, ya infeksiyona direnç gelişir veya basiller çoğalır ve makrofajları tahrip eder. İkinci dönemde, yeni makrofajlar içinde basiller logaritmik olarak çoğalır. Yaklaşık 2 hafta sonra, mikobakteri peptitlerine özgül CD4 T lenfositleri ortaya çıkar. Gamma interferon üretilerek makrofajlar aktive edilir ve tüberküloz basillerinin hücre içinde daha etkili olarak öldürülebilmesi gerçekleşir.

Tüberküloz infeksiyonunu hızlı ve doğru bir şekilde tespit edebilmek için *M. tuberculosis*'e karşı duyarlılaşmış T lenfositlerinin, in vitro kan testleri ve in vivo deri testleri ile tespit edilmesine dayalı testler geliştirilmiştir. Perifer kanından elde

edilen mononükleer hücreler, in vitro şartlarda uyarılır ve duyarlılaşan T lenfositlerinden salınan interferon (IFN) gamma üretimi ELISA ile ölçülür. PPD yanıtından sonra, kanda gamma IFN tespiti yapan testler (CSL/QuantiFERON TB testi) geliştirilmiş ve tüberküloz tanısında yayma ve kültür yerine kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu testte; *M. tuberculosis*, *M. avium* ve *M. bovis* den elde edilen PPD'lerle stimülasyondan sonra, tam kandaki T lenfositleri tarafından üretilen IFN-gamma ölçülür. IFN-gamma ELISA sonuçları ile hasta ve kontrol grubundan elde edilen tüberkülin deri testi sonuçları arasında iyi bir korelasyon vardır. QuantiFERON-TB testinin duyarlılığı %90 ve özgüllüğü %95-98'dir. Plevra tüberkülozunda, IFN-gamma duyarlılığının %85.7 ve özgüllüğünün %97.1 olduğu kültür ve plevral biyopsi ile doğrulanmıştır. HIV pozitif ve negatif hasta sonuçları benzerdir. Rekombinant antijenler kullanılarak BCG aşılarında etkileşim önlenmiştir. Tekli rekombinan antijenli testlerin özgüllüğü artırılmış, ancak duyarlılığı kısmen azalmıştır. Duyarlılığı artırmak için, özgül antijen kombinasyonları ile çalışmalar yapılmaktadır. Bu testlerin değerlendirilmesinde, PPD hipersensitivitesi altın standart olarak kullanılır, ancak tüberkülin reaktivitesi mükemmel sonuçlar vermediği için bu değerlendirmeler hatalıdır.

İn vivo deri testlerinde PPD'ye alternatif olarak kullanılan ESAT 6 (erken salınan tüberküloz antijeni, early secretory antigen TB) ve CFP 10 (koloni oluşturan protein, colony forming protein) gibi antijenler de, IFN gamma indüksiyonu amacıyla kullanılmıştır. ESAT 6 (6 kDa), özgül bir antijen ve tüberkülozlu hastalarda T lenfositleri tarafından üretilen IFN gammanın

güçlü bir indükleyicisidir. *M. tuberculosis* genomunda, RD ile gösterilen farklı bölgeler bulunur. *M. bovis* genomundaki RD bölgesi silinmiştir. Bu bölgelerde kodlanan antijenlerden bazıları tanı veya enfeksiyondan korunma amacıyla kullanılır. RD1 bölgesi, tüberküloza bağışıklık yanıtı sırasında ortaya çıkan ESAT 6 salınımını sağlar. Tüberkülozlu hastaların T lenfositleri ESAT 6 antijenlerini tanıırken, BCG ile aşı veya aşısız sağlıklı kişilerin T lenfositlerince tanınamamaktadır. Tedavi edilmeyen hastalara göre, tedavi edilen tüberkülozlu hastalarda IFN gamma düzeyi artar ve tüberküloza bağışıklık yanıtını gösterir. Bu nedenle, tüberkülozlu hastaların izlenmesinde yararlı olabilir.

Jelleşme testi: Jelleşme testi, tüberkülozlu hastalardan alınan tam kanda, yüksek miktarda fibrinojen bulunması ve eşit hacimde %1.25 glutaraldehid eklenip karıştırıldıktan 10 dakika sonra koagüle olması gözlemine dayanır (ANDA Biologicals, gelification test). Diğer solunum yolu hastalıklarında da benzer sonuçlar alınır, ancak testin ucuz ve uygulanmasının kolay olması nedeniyle, ön elemelerde kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Sonuç

Tüberküloz tanısında serolojik testlerin kullanılmasına uzun zaman önce başlanılmış olmasına rağmen, bu testler rutin olarak kullanılabilecek performansı göstermemiştir. Son yıllarda, humoral bağışıklık ve HIV çalışmalarından elde edilen bilgiler sonucu, özgül ve duyarlı serolojik kitler geliştirilmiştir. Piyasada bulunan testler, özellikleri bilinen immünodominant antijenler kullanılarak hazırlanmış ve dipstik veya ELISA şeklinde,

IgG veya diğer immünglobulinleri tespit edecek şekilde sunulmuştur.

Seroloji, özellikle klinik ve radyolojik tüberküloz bulguları olmayan hastaların hızlı tanısını sağlar. Röntgen bulguları doku hasarından sonra ortaya çıkarken, hastalığın başında üretilen antikorlar serolojik olarak erkenden tespit edilebilir. Ayrıca, çocuklarda, serumun elde edilmesi balgamdan daha kolay olduğu için tercih edilmektedir. Seroloji, akciğer dışı tüberküloz tanısına da yardım eder. BCG ile aşıllılarda gelişen hücresel yanıtlardan etkilenmemesi de önemli bir avantajdır. Serolojik kitler, humoral yanıt sonunda üretilen antikorları tespit ettiğinden BCG'den etkilenmez. Bazı serolojik tanı kitleri kantitatif sonuçlar (U/ml) vermektedir. Tedavi sırasındaki titre değişimleri hastaların izlenmesinde kullanılabilir.

Bu testlerin dezavantajları; yüksek enfeksiyon hızı olan ülkelerdeki hastalarda, AIDS'li ve yayma negatif hastalarda duyarlılığının düşük olmasıdır. Ayrıca, pahalı, deneyimli personel gerektiren ve *M. tuberculosis* ile tüberküloz dışı mikobakterileri her zaman birbirinden ayırt ettiremeyen testlerdir.

Serolojik testlerin çoğu, kısa zamanda tamamlanması ve negatif prediktif değerinin yüksek olmasından dolayı tarama amacıyla yararlı olan testlerdir. Tüberküloz insidensi, ülkedeki ekonomik koşullar, kullanılacak testte ait bilgiler dikkate alınarak serolojik yöntemlere baş vurulabilir.

KAYNAKLAR

1. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis* 2002;186:1797-807.
2. Devi KR, Kumar KS, Ramalingam B, Alamelu R. Purification and characterization of three immunodominant proteins (38, 30, and 16 kDa) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif* 2002;24:188-95.
3. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361:1168-73.
4. Gounder C, Queiroz Mello FC, Conde MB, et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1989-93.
5. Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J Microbiol Methods* 2001;45:41-52.
6. Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, et al. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:883-91.
7. Johnson PD, Stuart RL, Grayson ML, et al. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:934-7.
8. Julian E, Cama M, Martinez P, Luquin M. An ELISA for five glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay. *J Immunol Methods* 2001;251:21-30.
9. Julian E, Matas L, Perez A, et al. Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J Clin Microbiol* 2002;40:3782-8.
10. Katti MK. Immunodiagnosis of tuberculous meningitis: rapid detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid by reverse passive hemagglutination assay and their characterization by Western blotting. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31:59-64.
11. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis* 2003;187:117-23.
12. Lopez M, n LM, Segura E, et al. 6,6'-Dimycoloyl trehalose from a rapidly growing *Mycobacterium*: an alternative antigen for tuberculosis serodiagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;36:47-54.
13. Mitsuyama M, Akagawa K. Up-to-date understanding of tuberculosis immunity. *Kekkaku* 2003;78:51-5.
14. Naito M, Izumi S, Yamada T. Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of Humoral Responses to Culture Filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG in Patients with Leprosy and Tuberculosis. *Int J Leprosy* 1998;66(2):208-213. *International Journal Leprosy* 1998;66:208-13.
15. Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, et al. Detection of active tuberculosis by an MPB-64

- transdermal patch: a field study. *Scand J Infect Dis* 2001;33:405-7.
16. Pereira Arias-Bouda LM, Nguyen LN, Ho LM, et al. Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *J Clin Microbiol* 2000;38:2278-83.
 17. Perkins MD, Conde MB, Martins M, Kritski AL. Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay. *Chest* 2003;123:107-12.
 18. Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:2227-31.
 19. Pym AS, Brodin P, Majlessi L, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003;9:533-9.
 20. Stavri H, Moldovan O, Mihaltan F, et al. Rapid dot sputum and serum assay in pulmonary tuberculosis. *J Microbiol Methods* 2003;52:285-96.
 21. Tessema TA, Bjune G, Hamasur B, et al. Circulating antibodies to lipoarabinomannan in relation to sputum microscopy, clinical features and urinary anti-lipoarabinomannan detection in pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2002;34:97-103.
 22. Tessema TA, Hamasur B, Bjune G, et al. Diagnostic evaluation of urinary lipoarabinomannan at an Ethiopian tuberculosis centre. *Scand J Infect Dis* 2001;33:279-84.
 23. WHO report 2003. Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing. 2003.