

Tüberküloz meninjit tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması

Usage of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis

Gönül Aslan¹, Gürol Emekdaş¹, Mahmut Ülger¹, Seda Tezcan¹, Ali Kaya², Okan Doğu³, Necdet Kuyucu⁴

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ²Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, ³Nöroloji Anabilim Dalı, ⁴Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Mersin

İletişim / Correspondence: Gönül Aslan Adres / Address: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zeytinlibahçe/Mersin Tel: 0324 341 28 15/1102 Fax: 0324 337 43 05 E-mail: drgaslan@mersin.edu.tr, drgaslan@gmail.com

ÖZET

Tüberküloz meninjitin (TBM) erken tanısı çok önemlidir. Bu çalışmada, TBM şüpheli hastaların beyin omurilik sıvılarında (BOS) *Mycobacterium tuberculosis*'i saptamak için DNA temelli yöntemlerden biri olan polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) değeri geleneksel metotlar ile [Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) ve kültür] karşılaştırılarak araştırılmıştır. 68 TBM şüpheli hastanın BOS örneğinin 7'si PZR, 5'i kültür (BACTEC 460/Löwenstein-Jensen) yöntemi ile pozitif olarak belirlenmiştir. EZN ile pozitif sonuç bulunamamıştır. Bu çalışmada PZR'nun duyarlılığı %80, özgüllüğü %95, pozitif tahmin değeri %57 ve negatif tahmin değeri %98'dir. TBM'in tanısında PZR, geleneksel kültür metotları ile birlikte kullanılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz meninjit, erken tanı, polimeraz zincir reaksiyonu

SUMMARY

The early diagnosis of tuberculous meningitis (TBM) is very important. In this study, the value of the polymerase chain reaction (PCR), one of the DNA-based assays, was compared together with conventional methods [Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) and culture] for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in cerebrospinal fluid (CSF) from patients suspected of TBM. Of the 68 CSF specimens from probable TBM patients, 7 were positive by PCR, 5 were positive by culture (BACTEC 460/ Löwenstein-Jensen). No positive results were found by EZN. The PCR for this study had a sensitivity of 80%, a specificity of 95%, a positive predictive value of 57%, and negative predictive value of 98%. In the diagnosis of TBM, PCR should be used together with conventional culture methods.

Key words: Tuberculous meningitis, early diagnosis, polymerase chain reaction

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) gelişen tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen tüm dünyada önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir(1). Tüm TB olgularının %20'sinde ekstrapulmoner yerleşim görülmekte, bunların yaklaşık %5'ini de merkezi sinir sistemi tüberkülozları oluşturmaktadır(2). Merkezi sinir sistemi tüberkülozları meninjit (en yaygın form), intrakranial tüberküloz ve spinal TB şeklinde ortaya çıkmaktadır(3). Tüberküloz meninjit (TBM) gerek teşhisindeki güçlükler gerekse de ciddi komplikasyonları ve yüksek mortalitesi nedeniyle hala önemli bir sağlık problemidir. Erişkinde TBM, tek başına veya hastalığın genellikle pulmoner/miliyer formuna paralel ola-

rak gelişirken çocuklarda genellikle primer enfeksiyonun komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır. TBM'e ait semptom, belirti ve sekellerin çoğu meninks enfeksiyonuna immünolojik olarak yönelen inflamatuvar cevap sonucu gelişmektedir. TBM mortalite ve morbidite açısından en kötü prognozlu meninjit türü olduğundan hızlı tanı ve tedavi sekel gelişmesini ve mortaliteyi azaltmaktadır. Hastalığın kesin tanısı beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda *Mycobacterium tuberculosis*'in üretilmesi veya aside dirençli bakteri (ARB) görülmesi ile konmaktadır. BOS'ta ARB görülmesi nadir ve kültürde üretilmesi genellikle güçtür. Tanıdaki güçlükler, ARB aranması yönteminin sensitivitesinin düşük olması, kültürün altın standart yön-

tem olmasına rağmen uzun sürede sonuçlanması yeni tanı arayışlarını gündemde tutmaktadır. Bu nedenle son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu(PZR) gibi, hızlı moleküler tanı yöntemleri kullanılarak alınan sonuçlarla, klinik ve BOS biyokimya bulguları birlikte değerlendirilip varılan tanı ile tedaviye başlanması önerilmektedir. TBM'de gecikmiş tanı ve tedavi yüksek oranda ciddi nörolojik sekillere ve mortaliteye neden olmaktadır(4).

Bu çalışmamızda 2003-2006 yılları arasında laboratuvarımıza TBM şüphesi ile gönderilen 68 BOS örneğinden *M. tuberculosis* izolasyonu için klasik yöntemlerin yanı sıra PZR kullanılması ve PZR'nun tanısallık performansının tartışılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

2003-2006 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza TBM şüphesi ile gönderilen 68 BOS örneği santrifüj edildikten sonra sedimentten Löwenstein-Jensen(LJ) ve/veya BACTEC 12B besiyerine ekim yapılmış ve yayma preparat hazırlanmıştır. Yayma preparatlar Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile boyanıp ARB pozitifliği yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca sedimentlerde PZR yöntemi ile *M. tuberculosis* varlığı araştırılmıştır. Kültürde üreme gösteren örnekler için *M.tuberculosis* kompleksi (MTC) ve tüberküloz dışı mikobakterilerin (NTM) ayrımı p-nitro- α -asetilamino- β -hidroksi-propiofen (NAP) testi ve klasik identifikasyon (niasin, nitrat, katalaz) yöntemi ile yapılmıştır. MTC suşlarının primer antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları BACTEC 460 sistemi ile incelenmiştir(5)

Nükleik asit izolasyonu. DNA ekstraksiyonu modifiye klasik fenol-kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Steril vücut sıvısı örneklerinden 1000 μ l'lik ependorfa alınarak 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dipte 100 μ l kalacak şekilde atılarak, üzerine 400 μ g/ml konsantrasyonundaki Proteinaz-K solüsyonundan 100 μ l ilave edilmiş ve 56°C'de 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün, örnekler -20°C'de 1 sa-

at bekletildikten sonra 10 dk kaynatılmıştır. Daha sonra fenol-kloroform (1:1) ve kloroform ile muamele edildikten sonra etanol ile çöktürülmüştür. Dipteki DNA örneği 25 μ l DNaz ve RNaz içermeyen steril distile su ile karıştırılmıştır ve PZR'da kullanılıncaya kadar -20°C'de bekletilmiştir (6)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR). PZR ile mikobakterilerin ısı şok proteini (hsp65), Forward ve Reverse primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR koşullarının standardizasyonu amacıyla ön denemeler yapılmıştır. PZR karışımı, kontaminasyonun önlenmesi amacıyla steril, temiz kabinlerde hazırlanmıştır. PZR karışımı 50 μ l olacak şekilde, steril distile su, tampon (1X, Promega, USA), MgCl₂ (2.5 mM, Promega, USA), dNTP (200 μ l, Promega, USA), primer Tb 11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT, MOLBIOL, Germany. 50 pM/ μ l), primer Tb 12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT, MOLBIOL, Germany). 50 pM/ μ l, Taq polimeraz (2.5 U/ μ l, Promega, USA) ve ekstrakte edilen DNA ilave edilerek hazırlanmıştır. Amplifikasyonda kullanılan PZR programı 42 siklus [(1 dak 95°C, 1 dak 60°C, 1 dak 72°C) ve (5 dak 72°C)] şeklindedir (7) Primerlerin çoğalttığı bölge 439 bp'lik beklenen bant uzunluğu, moleküler ağırlık marker (Roche, Germany. DNA 100 base pair ladder) yardımıyla yorumlanmıştır.

Restriksiyon analizi(RFLP). PZR ile çoğaltılan amplifikasyon ürünleri % 3'lük agaroz jele yüklenerek elektroforez yapılmıştır. Bant oluşumu gözlenen örnekler Hae III (Sigma, Germany) ve BstE II (Sigma, Germany) enzimleri ile kesilmiştir. Bu enzimlerin tanıma bölgeleri ve kesim sonucu oluşacak bant uzunlukları her mikobakteri türü için farklıdır. Hae III ve BstE II enzimlerinden kesim reaksiyonu hazırlamak için 10 μ l PCR ürünü, 0,5 μ l (5 U) enzim, 2,5 μ l kesim tamponu (5X buffer) ve 12 μ l su kullanılarak toplam hacim 25 μ l olarak hazırlanmıştır. BstE II içeren tüpler 60 °C' de, Hae III içeren tüpler ise 37°C' de 2 saat bekletilmiştir. Kesim ürünleri % 3'lük agarozaya yüklenip, 100mA, 70 Voltta

35 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonucu Uvitec jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilerek yorumlanmıştır (8).

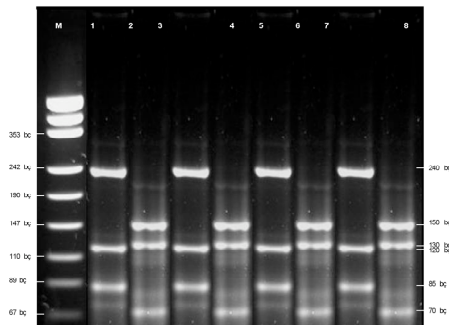
BULGULAR

Olgularımızın 18'inin çocuk, 40'ının erişkin yaş grubunda yer aldığı, 32'sinin erkek, 26'sının kadın olduğu belirlenmiştir. Toplam 58 hastadan 68 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. 10 hastadan 2'ser örnek gönderildiği belirlenmiştir. Kültürde üreme tesbit edilen hastaların 2'si çocuk (erkek) 3'ü erişkin (kadın)dir. 58 hastadan gönderilen 68 örneğin hiçbirinde ARB pozitifliği tesbit edilmezken, 5'inin (%7.3) LJ ve/veya BACTEC 12B kültürlerinde *M. tuberculosis* ürettiği tesbit edilmiştir. BOS örneklerinden yapılan PZR'unda 7 hastada *M. tuberculosis* varlığı gösterilmiştir. Kültür pozitif 4 hastaya ait PZR-RFLP sonuçları Şekil 1'de gözlenmektedir. PZR ile *M. tuberculosis* varlığı belirlenen olguların üçünde yanlış pozitiflik tesbit edilmiştir. Kültürde üreme kaydedilen bir hasta PZR ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Kültür pozitif olgulardan yalnızca birinde INH direnci belirlenmiştir. Diğer isolatlar majör antitüberkülozlara karşı duyarlı olarak bulunmuştur.

Hastalardan biri gecikmiş tanı nedeniyle kaybedilmiştir. İkisinin tedavisi sürmektedir. Hastalardan birine tedavisinin ikinci ayından sonra ulaşamamıştır. Diğer hastamızın tedavisi tamamlanmıştır düzenli olarak kontrollerine gelmektedir.

Konvansiyonel kültür yöntemleri ile PZR'nin ta-

Şekil 1. BOS'tan izole edilen *M. tuberculosis* suşlarının *Bst EII* ve *Hae III* enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin görünümü (Sıra 1 DNA belirteci *Msp I*, 3, 5 ve 7 *Bst EII* kesimi, ve 2, 4, 6 ve 8 *Hae III* kesimi



Tablo 1. PZR yönteminin tanısal performans değerlendirme sonuçları

LJ/BACTEC	PZR		Duyarlılık %	Özgüllük %	Pozitif prediktif değer %	Negatif prediktif değer %	Uyumluluk
	Pozitif	Negatif					
Pozitif	4	1	80	95	57	98	94
Negatif	3	61					

nısal performansları değerlendirildiğinde duyarlılığın %80, özgüllüğün %95, pozitif prediktif değer %57, negatif prediktif değer %94, testler arası uyumun ise %94 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

Mycobacterium tuberculosis, konak-patojen ilişkilerini yönlendirilmesinde rol oynayan birçok yapısal komponentler içeren bir bakteridir. Bakteri her geçen gün tıp dünyasını şaşırtmaya ve meşgul etmeye devam etmektedir. Merkezi sinir sisteminde TB oluşumu genellikle subependimal bir tüberkülozun subaraknoid aralığa açılması ve hematogen yolla yayılmasıyla oluşur(9,10).

Ekstrapulmoner TB ve TBM ayırıcı tanıda birçok hastalıkla karışması ve atipik semptomlar göstermesi nedeniyle çoğu zaman TB hatıra getirilmediğinden tanı yanlış konabilmektedir. Ferg ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 190 hastaya otopsi ile TBM tanısı konmuş ve bu hastaların %49.6'sına da ölümden önce yanlış tanı konulduğu tespit edilmiştir(11).

Söylemez ve ark (12) tarafından ekstrapulmoner TB şüpheli örneklerden *M.tuberculosis* izolasyonunda nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin kullanıldığı çalışmada, nükleik asit amplifikasyon tekniğinin sensitivitesi %86, spesifitesi %100, PPD%100, NPD%90 olarak; EZN boyama yönteminin ise sensitivitesi %50, spesifitesi %56, PPD%47, NPD%59 olarak bildirilmiştir.

TBM'in PZR ile hızlı tanısını amaçlayan başka bir çalışmada PZR ile %31.42, LJ kültür yöntemi ile %3.8, florokrom boyama yöntemi ile yalnızca %1.9 pozitiflik saptandığı, EZN ile boyanan örneklerde ise hiç pozitiflik saptanmadığı bildirilmektedir. Ayrıca çalışmada PZR sonuçlarının

hastaların klinik bulguları ile tamamen korelasyon gösterdiği vurgulanmaktadır(13).

Son yıllarda hızlı tanı ve tedavi gerektiren mortalitesi yüksek TBM gibi ekstrapulmoner TB olgularında moleküler yöntemlerin hızlı tanıda çok kritik ve önemli rol oynadığı belirtilmektedir(12,13,14). Bizim çalışmamızda da PZR 'nun erken tanıda özellikle klinik bulgularla beraber değerlendirildiğinde tanı değerinin yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Testin tanısal performansı değerlendirildiğinde sensitivite %80, spesifite %95, PPD%57, NPD%98 olarak belirlenmiştir. PZR ile pozitif olarak değerlendirilen iki olgu klinik olarak farklı tanıları almıştır. Bu olguların sonuçları yalancı pozitiflik olarak değerlendirilmiştir. Yalancı pozitif sonuçlar yalancı negatiflere göre daha sakıncalı bulunmalıdır. Çünkü yalancı pozitif sonuç hekimi tanıya yönelik çalışmalarından alıkoyması gibi uygunsuz tedaviye başlanmasına da yol açar. Yalancı negatif bir sonuç ise hekimin tanıya yönelik çalışmalarının devam etmesine engel değildir. Bu nedenle düşük özgüllük oldukça tehlikeli iken, düşük duyarlılık daha kabul edilebilir bir durumdur. Uygulamaları yeni başlayan bir testin değerlendirilmesinde PPD ve NPD gibi özelliklerin duyarlılık ve özgüllükten daha önemli olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda PZR'nun NPD(%98) PPD'den(%57)daha yüksek bulunmuştur. Bu da negatif bir test sonucu alındığında hekimin TBM tanısından uzaklaşma olasılığını artıracaktır. Klinisyen bu testlerin tanısal performanslarını değerlendirip, klinik ve diğer laboratuvar bulguları ile yorumlamalıdır.

Altın standart kültür yöntemi ile PZR'nin tesbit edilebildiği tüm gerçek pozitifler üretilmiştir. Kültür sensitivitesini çok düşük bildiren çalışmalar olmakla birlikte standart 12B (BACTEC 460) sıvı besiyeri ve LJ birlikte kullanıldığında duyarlılığın yükseleceği düşüncesindeyiz. Ayrıca çalışmamızda kültürde üreme kaydedilen bir örnek PZR ile negatif (yalancı negatif) olarak sonuçlanmıştır.

Ülkemizde Akhan ve ark. (15) tarafından menin-

jitli hastalarda yapılan çalışmada bizim çalışmamızdaki değerlere benzer şekilde PZR'nun duyarlılığı %83.3, özgüllüğü %97 olarak bildirilmiştir.

TBM'li hastalar (bizim olgularımızın dosya bilgileri de değerlendirildiğinde) genellikle uzun süre hastanede yatarak tanı ve tedavi almaktadırlar. Bu hastalardan mümkün olduğunca fazla sayıda klinik örnekte *M.tuberculosis* araştırılması izolasyon şansını artıracaktır. Bizim çalışmamızda olguların yalnızca 10'unda(%17) birden fazla (iki) örnekte *M.tuberculosis* araştırılması istenmiştir. Mortalite ile sonlanan yanlış tanı ile uzunca süre yanlış tedavi alan bir olgumuz 2 ay hastane tedavisinde olmasına ve aile hikayesi olmasına rağmen yalnızca 2 BOS örneği *M.tuberculosis* araştırılması için laboratuvarımıza gelmiştir. Ayırıcı tanıda birçok hastalıkla karışan, atipik semptomlar gösterebilen bu olguların laboratuvar tanılarının standardize olmaması nedeniyle klinik laboratuvar işbirliğine önem verilmesi, olgulara multidisipliner bölümlerce ortak yaklaşımların sergilenmesi alternatif tanı yöntemlerinin de uygulamasını sağlayacak ve doğru tanıya hız kazandıracaktır.

Olgularımızdan birinde PZR ile uyumlu klinik tanı ile tedavi başlanmış tedaviden üç hafta sonra kültürde *M.tuberculosis* izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Kültür sonrası yapılan antitüberküloz duyarlılık testinde izolatan INH direnci olduğu belirlenmiştir. Tüm bu örnekler TB tanısında birden fazla yöntemin ancak her zaman altın standart kültür yöntemi ile birlikte uygulanmasının hızlı tanı ve uygun tedavinin planlanmasında gerekliliğini ortaya koymaktadır. Laboratuvarımızda istem yapılan örneklerde moleküler tanı yöntemi uygulanmaktadır. Ancak BOS örneklerinin çok küçük bir bölümünde klinik istem üzerine PZR yöntemi uygulanmıştır. Ancak Mersin Üniversitesi BAB tarafından desteklenen proje kapsamında BOS örneklerimizin tümüne PZR uygulama olanağı bulduğumuz bu çalışmada solunum yolu örnekleri dışında henüz standardize olmasa

da, yalancı pozitiflik/negatifliklere, sensitivite ve PPD'deki düşüklüğe rağmen mortalitesi yüksek TBM ve ekstrapulmoner TB olgularının saptanmasında moleküler yöntemlerle hızlı tanı avantajından yararlanılmıştır.

TBM tanısında PZR ve PZR temelli moleküler yöntemler ümit verici gelişmeler göstermektedir. Tanısal performans değerlendirmelerimiz literatürle (12,13,15) uyumlu gibi görünse de bu konuda daha fazla sayıda olgu içeren çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

TBM ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde hala önemli bir sağlık sorunudur. Düşük sosyoekonomik düzey, eğitimsizlik ve kötü yaşam koşulları TB' un bütün klinik formları gibi TBM'in de tipik ve atipik formlarının artışından sorumludur. Bu nedenle baş ağrısı, ateş, kusma, zayıflama gibi belirtilerle başvuran, ailesel öyküsü bulunan, sosyal yönden de TB'a yatkın olabilecek hastalarda ayrırcı tanıda TBM hatırlanmalı ve en azından üç örnekte mümkün olduğunca fazla miktarda örnekte *M. tuberculosis* araştırılmalıdır. Tüberkülozun kesin tanısı için altın standart kültür yöntemi mutlaka uygulanmalı ancak (en azından kültür sonuçlanana dek) hastalığın mortalite ve morbiditesini en aza indirebilmek için hızlı, moleküler tanı yöntemleri ile klinik tanının desteklenmesi alternatif olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Göğüş A, Şener N, Şengül M, Hamzaoglu A. Tibialis anterior tendonunun izole tüberküloz tenosinoviti: Olgu sunumu Acta Orthop Traumatol Turc 2000; 34: 321-324.
2. Oncul O, Baylan O, Mutlu H, Cavuslu S, Doganci L. Tuberculosis Meningitis with intracranial tuberculomas mimicking neurocysticercosis clinical and radiological findings. Jpn. J Infect Dis 2005; 58: 387-389.
3. Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. American Family Physician 2005; 72(9) 1761-1768.
4. Jesudason MV, Gladstone P. Culture proven cases of tuberculous meningitis: A 5 year retrospective analysis from Vellore. Indian J Med Microbiol 2006; 24(3):237.
5. Siddiqi SH. (Becton Dickinson and Company) 1995. BAC-TEC 460 TB System Product and Procedure Manual. Becton Dickinson and Company, Sparks, Md.
6. Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT. PCR detection of

Mycobacterium tuberculosis. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993: 191-196

7. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J of Clin Microbiol 1993;31:171-178.

8. Ergin A, Kocagöz T, Uş AD, Günali A. Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması. Mikrobiyol Bült 1999;33:251-261.

9. Şengöz G. Sekseniki tüberküloz meninjitli olgunun değerlendirilmesi. Tüberküloz ve Toraks Dergisi 2005; 53: 50-55

10. Donald PR, Schaaf HS, Schoeman JF. Tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: the Rich focus revisited. J Infect 2005;50:193-5.

11. Feng Y, Liu L, Zhang S. Clinical and pathological manifestations in 129 patients with tuberculous meningitis Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 1997;20:161-3.

12. Wiener RS, Della-Latta P, Schluger NW. Effect of nucleic acid amplification for *Mycobacterium tuberculosis* on clinical decision making in suspected extrapulmonary tuberculosis. Chest 2005;128:102-7.

13. Desai MM, Pal RB. Polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Indian J Med Sci 2002;56:546-52.

14. Rafi A, Naghily B. Efficiency of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculous meningitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003 Jun;34:357-60.

15. Akhan-Aşçıoğlu S, Hayran M. Tüberküloz. İnfek Bült 1996; 1: 5-8.