

## AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU HASTA SERUMLARINDA IgG ANTİKORLARININ PPD'NİN ANTİJEN OLARAK KULLANILDIĞI ELISA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Ali ALBAY\*, Özgül KISA\*, Mehmet BAYSALLAR\*\*, A.Celal BAŞUSTAOĞLU\*\*, Hüseyin GÜN\*\*\*

Anahtar Terimler: Akciğer Tüberkülozu, PPD, ELISA

Key Words: Pulmonary tuberculosis, PPD, ELISA

### ÖZET

Aktif pulmoner tüberkülozlu hasta serumlarıyla, PPD(+) ve PPD(-) kontrol grubu serumlarda IgG antikor düzeyleri Purified Protein Derivate(PPD)'nin antijen olarak kullanıldığı ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. Aktif pulmoner tüberkülozlu hasta serumları, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hastalarda IgG düzeylerinin belirgin olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. PPD ile yapılan ELISA'nın aktif tüberkülozlu hastaları, sağlıklı gruplardan ayırt etmede ve antitüberküloz tedavinin etkilerini izlemede faydalı bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

### SUMMARY

Determination of IgG by Elisa Method Using PPD as the Antigen in Sera of Patients With Pulmonary Tuberculosis.

IgG antibody levels of patients with active pulmonary tuberculosis and PPD(-) or PPD(+) controls were investigated by ELISA method using Purified Protein Derivate(PPD) as the antigen. When compared with the control groups, the levels of IgG were found significantly higher in the sera of patients with active pulmonary tuberculosis.

We suggest that ELISA utilizing PPD as antigen can be a helpful method in the differentiation of patients with active tuberculosis from healthy individuals and in the follow up of the effects of antituberculosis treatment.

### GİRİŞ

Tüberküloz üçüncü dünya ülkelerinde önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. AIDS'li hastalarda da fırsatçı bir enfeksiyon olarak önemini korumaktadır(11). Tüberküloz enfeksiyonunun kesin tanısı bakteriyolojik olarak; basilin direkt ve teksif yayma preparatlarda görülmesi,

\* GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD., Dok.Öğr.

\*\* GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD., Yrd.Doç.Dr.

\*\*\* GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.Bşk., Doç.Dr.

kültürde üretilmesi veya histopatolojik olarak kazeifiye granülatöz dokunun saptanmasıyla olur. Bu yöntemlerden doğan zaman kaybı nedeniyle, neticelerin negatif çıkması durumunda klinik ve radyolojik tanıyı destekleyecek alternatif erken tanı yöntemlerine gereksinim vardır(2,3).

Birçok araştırmacı tarafından hemaglutinasyon, jel presipitasyon ve aglutinasyon yöntemleri kullanılarak tüberkülozun değişik evrelerinde hasta serumlarında antikor varlığı gösterilmiştir(4).

M.tuberculosis'in purifiye glikolipidleri ve proteinleri gibi kompleks mikobakteriyel antijenlerin ilk defa Nassau ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmasından sonra, bu antijenler kullanılarak uygulanan ELISA yöntemi tüberküloz tanısında önemli bir test haline gelmiştir(5,6).

1976 yılında Nassau ve arkadaşları tüberkülozlu hastalarda M.tuberculosis'e karşı oluşan IgG antikorlarını saptamak için ELISA yöntemini kullanmışlardır(7).

Çalışmamızda ELISA yönteminin, tüberküloz enfeksiyonunun erken tanısına katkılarını araştırmak için pulmoner tüberkülozlu hasta grupları ile, kontrol gruplarının serum IgG düzeylerini, diğer serolojik yöntemlere göre daha spesifik ve duyarlı olan bu yöntemi kullanarak araştırdık(8).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### HASTA VE KONTROL SERUM ÖRNEKLERİ:

GRUP I:YENİ DOĞANLAR:GATA Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Başkanlığında dünyaya gelen ve annelerinde Tüberküloz öyküsü bulunmayan 10 bebekten göbek kordon kanı alındı. Bu bebekler hiç tüberküloz basili ile karşılaşmamış ve aşılanmamış olduklarından kontrol grubu olarak kabul edildiler.

GRUP II:PPD(+) ve PPD(-) SAĞLIKLI KİŞİLER:GATA Tıp Fakültesinde öğrenim gören akciğer grafileri normal PPD(+) 10 ve PPD(-) 24 kişiden kan alındı.

GRUP III:AKTİF AKCİĞER TÜBERKÜLOZLU KİŞİLER:Atatürk Sanatoryumu Göğüs Hastalıkları Hastanesinde tedavi gören aktif pulmoner tüberkülozlu 52 hastadan kan alındı. Bu olgularda direkt yayma, teksif ve kültürde ARB pozitifliği.

ANTIJEN:Kopenhag-Danimarka Statents Serum Enstitüsünden sağlanan PPD(Lot no:81) antijen olarak kullanıldı.

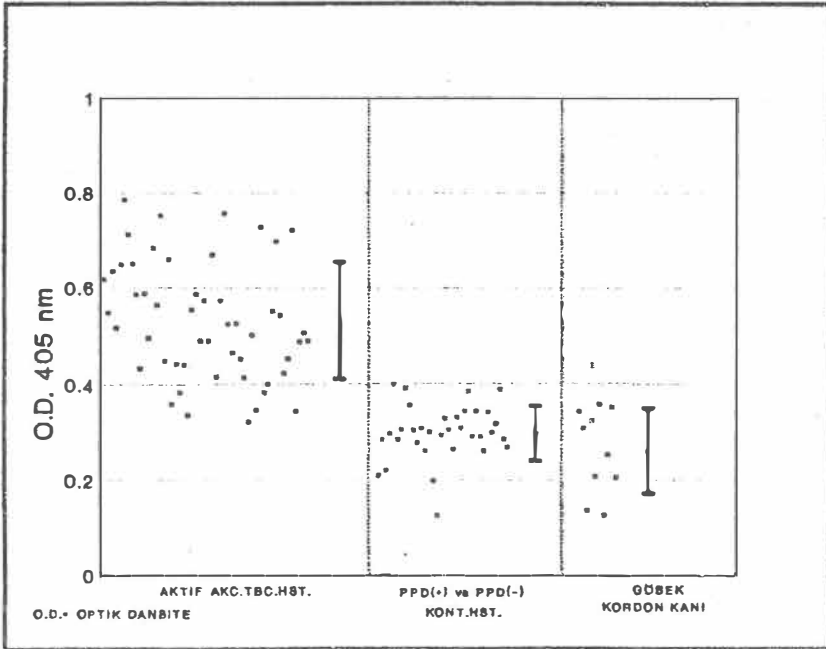
PLEYTLERİN ANTIJEN İLE KAPLANMASI:PD 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ile 10µg/ml olacak şekilde dilüe edildi ve her kuyucuğa 100 µlt konuldu. Oda ısısında (23°C) bir saat inkübasyon yapıldıktan sonra PBS-Tween-20 ile altı kez yıkandı. Kuyucuklar % 5 Bovine Serum Albumine(BSA) ile doldurularak oda ısısında bir saat inkübasyondan sonra, pleytler ters çevrilerek boşaltıldı ve kurutularak +4°C'de saklandı(9).

## ELISA TESTİNİN UYGULANIŞI

1. Serum örnekleri PBS-Tween-20 kullanılarak % 1'lik solüsyonu hazırlananı BSA ile 1/40 dilüe edildi. Kuyucuklara sırası ile 100  $\mu$ l konularak oda ısısında iki saat inkübe edildi.
2. Pleytler PBS-Tween-20 ile üç kez yıkandıktan sonra alkalin sonra fosfataz konjugat IgG'nin (% 1'lik BSA ile 1/1000 dilüsyonda) 100  $\mu$ l'si her bir kuyucuğa konuldu ve oda ısısında iki saat inkübe edildi.
3. Pleytler PBS-Tween-20 ile üç kez yıkandı ve tüm kuyucuklara taze hazırlanmış p-nitrophenyle phosphate disodium'un substrat buffer'daki (1 mg/ml) solüsyonundan 100'er  $\mu$ l ilave edildi. 37°C'de 30 dakika bekletildikten sonra reaksiyon 3 N NaOH ile durduruldu ve 405 nm'de absorbanslar okunarak kaydedildi.

## BULGULAR

Bu çalışmada 52 aktif pulmoner tüberkülozlu hasta serumu ile, 44 kontrol serumu ELISA yöntemiyle IgG varlığı yönünden incelendi. Antijen olarak PPD kullanıldı. Şekil 1'de aktif tüberkülozlu, PPD(+), PPD(-) kişilerde bebek kordon kanlarında PPD'ye spesifik IgG antikor titreleri arasındaki farklılıklar gözlenmektedir(Şekil 1).



Şekil 1:PPD Antijenine Karşı Saptanan IgG Antikor Düzeyleri

Aktif pulmoner tüberkülozlu hasta serumlarının IgG antikor düzeylerinde kontrol grup serumlarına göre istatistiksel olarak önemli titre farkları saptanmıştır. Hasta serumları ile kontrol grup serumlarının OD ortalamaları hesaplanarak iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulanmış ve t değeri  $t_H=11.92$  bulunmuştur.  $t_r$  değerine göre test sonuçları değerlendirilmiş ve anlamlı bulunmuştur ( $p(0.05)$ ). Tablo I'de çalışma gruplarının OD değerleri, negatif ve pozitif oranları gösterilmiştir. Bulduğumuz cut-off değerine göre, yalnızca pozitiflik değeri % 14 ve yalnızca negatiflik değeri de % 7 olarak saptanmıştır.

Tablo I:ELISA Test Sonuçları

HASTA GRUPLARI	O.D.ORTALAMASI	(+) SONUÇ	(-) SONUÇ	TOPLAM
AKTİF AKC.TBC. HASTALAR	0.531±0.122	48	4	52
PPD(+) ve PPD(-) KONTROL GRUP	0.298±0.057	5	29	34
BEBEK KORDON KANI	0.261±0.089	-	10	10

## TARTIŞMA

Tüberküloz enfeksiyonunun tanısında, klinik bulgular, radyolojik incelemeler, tüberkülin testi, basilin yayma ve kültür yapılarak araştırılması, kobay inokülasyonu, dokunun histopatolojik olarak incelenmesi gibi yöntemler sıralanabilir. Tüberkülozun kesin tanısı ise;

1. M.tuberkulozisi, lezyonun bronşa açılması koşuluyla yaymada görerek ve/veya kültürde üreterek tanımlayabiliriz. Lezyonun bronşa açılmadığı olgularda basili görme olanağımız yoktur. Ayrıca kültür için de 6-8 hafta gibi gecikme sayılabilecek önemli bir süre beklemek zorundayız.
2. Histopatolojik tanı kazeifiye granülomatöz dokunun görülmesi sonucu konur, ancak invaziv biyopsi yöntemleri gerektirmektedir.

Bu nedenler araştırmacıları daha kolay uygulanabilen erken tanı yöntemlerini aramaya yöneltmiştir. Serolojik yöntemler bu amaca en uygun deneylerdir(10).

Son yıllarda gündeme gelen serolojik tanı tüberküloz için de ümit vermektedir. Tüberküloz enfeksiyonunun serolojik tanısında, IgG antikorlarının ELISA testiyle araştırılmasının tanı açısından değeri, çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir(1,2,11,12).

Kullanılan antijen tipinin testin özgülüğü üzerindeki rolü büyüktür. Antijenler saflaştırıldıkça özgülük artmaktadır(13). Çalışmamızda PPD antijeni kullanılmıştır. Çünkü tüberküloz enfeksiyonunu veya tüberkülozu tayin etmede

kullanılan standart antijen budur. PPD ile daha önce yapılan çalışmalarda da araştırmacılar PPD'nin diğer antijenlere göre daha iyi sonuç verdiğini vurgulamışlardır(2,4).

Araştırmamızda aktif pulmoner tüberkülozlu hasta serumlarının IgG antikor düzeylerinde, kontrol grup serumlarına göre önemli titre artışları saptanmıştır. Sonuçlarımız diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumludur(1,2,11).

ELISA ile saptanan antikor titreleri çeşitli faktörlere göre değişebilir. Bunlardan bir tanesi de yöresel farklılıklardır. Antikor titresini belirlemede serum dilüsyon oranları da önem taşımaktadır. Tüberküloz sıklığının yüksek olduğu toplumlarda özgüllük düşük, tüberkülozun az görüldüğü toplumlarda ise daha yüksektir.

Çalışmamızda PPD antijeni için ELISA testinin duyarlılığı % 92, özgüllüğü ise % 85 bulunmuştur.

Pozitif prediktif değer % 91, negatif prediktif değer % 88 olarak saptanmıştır. Yalancı negatiflik oranı % 7 ve yalancı pozitiflik oranı ise % 14 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak diyebiliriz ki; serumda IgG antikor düzeyini ölçerek elde ettiğimiz bulgular, aktif tüberkülozlu olguların önceden enfeksiyon geçirecek veya BCG aşısı ile hücrel immünite kazanmış PPD(+) olgulardan ve PPD(-) normal sağlıklı kişilerden ayırt edilebileceğini göstermektedir. Bu amaçla tüberkülozun serolojik tanısında, antikorların saptanmasında ELISA testinin kullanılabilirliği anlaşılmaktadır. PPD ile yapılan ELISA'nın, akut tüberkülozlu hastaları kontrol gruplarından ayırt etmede ve antitüberküloz tedavinin etkilerini izlemede faydalı bir yöntem olarak kabul edilebileceği düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR

- 1- Wade AA., Cohen J., Rabson AR.:An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Adsorbed Mycobacterial Sonicates for the Serodiagnosis of Tuberculosis. *Afr.Med.J.*71:154, 1987.
- 2- Kalish SB., Radin RC., Phair JP., Levitz D., Zeiss CR., and Metzger E.:Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique in the Differential Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis in Humans. *J.Infectious Diseases*, 147(3):523, 1983.
- 3- Winters WD., Cox RA.:Serodiagnosis of Tuberculosis by Radioimmunoassay. *Am Rev Respir Dis*, 124:582, 1981.
- 4- Zeiss CR., Radin RC., Williams JE., Levitz D., and Phair JP.:Detection of Immunoglobulin G Antibody to Purified Protein Derivate in Patients with Tuberculosis by Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *J Clin Biol*, 15(1) 93, 1982.
- 5- Alde SMA.,Pinasco HM.,Pelosi FR.,Budam HF., Palma-Beltran OH., and Gonzales-Montaner LJ.: Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Using an IgG Antibody to mycobacterium tuberculosis Antigen 5 in the Diagnosis of Active Tuberculosis in Children. *Am Rev Respir Dis.*, 139:748, 1989.
- 6- Nassau E., Parsons ER., JOHNSON GD.:The Detection of Antibodies to Mycobacterium tuberculosis by Microplate and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Tubercle*, 57:67, 1976.

- 7- Raheman SF., Wagner S., Mauch H., Vasudeva ND., Ingole DL.:Evaluation of a Dual-antigen ELISA Test for the Serodiagnosis of Tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 66(2):203, 1988.
- 8- Levy H., Wade AA., Feldman C., Rabson AR.:Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies Against Mycobacterium Tuberculosis in Bronchial Washing and Serum. *Chest*, 93:762, 1988.
- 9- Hernandez R., Munoz O., and Guiscafre H.:Sensitive Enzyme Immunoassay for Early Diagnosis of Tuberculosis Meningitis. *J.Clin.Biol.*, 20(3):533, 1984.
- 10- Kocabaş A.:Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü, Çukurova Üniversitesi Basımevi Adana, 199, 1991.
- 11- Levy H., Waddee AA., Feldman C., Rabson AR.:Differentiation of Sarcoidosis from Tuberculosis Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies Against Mycobacterium tuberculosis. *Chest*, 94:1254, 1988.
- 12- Reggiardo Z., Vazquez E., Schnaper L.:ELISA Tests for Antibodies Against Mycobacterial Glycolipids. *J.Immunol.Methods*, 34:55, 1980.
- 13- Daniel TM.:The Serodiagnosis of Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases by ELISA. *Am Rev.Respir Dis.*, 135:1137, 1987.