

## TÜBERKÜLOZ ÖN TANILI HASTALARDA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ANTİKORLARININ DAĞILIMI

Ahmet YÜCEL, Süleyman ÖNAL, Vedat BULUT, Tuncer TUĞ, Mustafa YILMAZ

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.03.1999

### Distribution of Anti Mycobacterium Tuberculosis Antibodies in Suspected Cases

#### SUMMARY

In this study, we evaluated the data from individuals who applied to out-patient clinics in Fırat Medical Center from 1996 to 1998 and suspected of tuberculosis, retrospectively. All individuals were classified into different groups in regard with their ages and sexes. In sera of the cases, immunoglobulin G and M (IgG, IgM) against *Mycobacterium tuberculosis* antigens were determined by using ELISA as described by manufacturers (Alpha biotech, Immunodiagnostics, Clark). No difference was found in IgG seropositivity of female and male populations. However, when compared IgM seropositivity in female population (12%) to male population (8.8%) it was high in a manner of statistical significance ( $p<0.05$ ). Taken consider into frequency of cases, and percentages in regard with age groups of seropositive and seronegative cases, no statistical significance amongst age groups was observed.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, ELISA

#### ÖZET

Bu çalışmada, retrospektif olarak 1996-1998 yılları arasında Fırat Tıp Merkezi, polikliniklerine başvuran ve tüberküloz ön tanısı alan bireylerden elde edilen veriler değerlendirildi. Bireyler yaş ve cinsiyetlerine göre çeşitli gruplara ayrıldı. Olguların serumlarında, *Mycobacterium tuberculosis* antijenlerine karşı oluşan immünoglobulin G ve M (IgG, IgM) üretici firmaların (Alphabiotech, Immunodiagnostics, Clark) belirttiği şekilde ELISA yöntemi uygulanılarak belirlendi. Kadın ve erkek populasyonlarda IgG pozitifliği açısından fark bulunmadı. Ancak, IgM pozitifliği kadın populasyonda (%12) erkek populasyonla (%8.8) kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Seropozitif ve seronegatif olguların yaş gruplarına göre sayı ve yüzde dağılımı ele alındığında, yaş grupları arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmedi.

**Anahtar kelimeler:** *Mycobacterium Tuberculosis*, Tüberküloz, ELISA

## GİRİŞ

Tüberküloz hastalığı, sağaltım yöntemlerindeki ilerlemelere karşın, özellikle az gelişmiş ülkelerde bir sorundur (1). Diğer taraftan, gelişmiş ülkelerde üçüncü dünya ülkelerinden göçler, edinsel immün yetmezlik sendromu (AIDS) olgularındaki artış ve antitüberküloz ilaçlara direnç gösteren yeni suşların ortaya çıkması sonucunda son yıllarda tüberküloz olguları önem kazanmıştır (2). Günümüzde, tüberkülozlu olgu sayısı 80 milyonu geçmiş ve her yıl bu sayı 10 milyon kadar artmaktadır. Her yıl, 3 milyon olgu ise ölümlerle sonuçlanmaktadır (3). Yurdumuzda ise, BCG rutin uygulamada bulunmakla beraber, Sağlık Bakanlığı verilerine göre yaklaşık olarak 12 milyon (nüfusun %20 kadarı) insan enfektedir (4).

Son yıllarda onkolojik hastalıkların tedavilerindeki ve transplantasyon tekniklerindeki gelişmelerin yanı sıra, HIV enfeksiyonunun hızla yayılması, immünsüpresif hasta popülasyonunun giderek artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, bu hasta grubunda tüberkülozun görülme sıklığında da belirgin bir artış olmuş ve tüberküloz tedavisinde güçlük yaratan dirençli suşlar gündeme gelmiştir. Tüm bu nedenlerle bu enfeksiyonun erken ve kesin tanısının konması, tedavilerinin planlanması önemli hale gelmiştir (1,2,4).

Tüberküloz basilleri pek çok doku ve organlarda enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, en sık olarak akciğerleri tutmaktadır. Kan yolu ile diğer organlara yayılması kişinin immün direnci ile yakın ilişkilidir. İmmün direnci iyi olmayan bireylerde önemli bir sağlık sorunu olup profilaktik tedavi gerekebilir. Konvansiyonel yöntemlerin dışında antijen ve antikor arama metodları henüz rutin uygulamaya geçirilememiştir. Hastalığın tanısında daha ziyade boyama, mikroskopi, kültür, Mantoux testi ve akciğer grafileri yeterli olmakla beraber, az sayıda basil çıkaran ve tanıda güçlük çekilen olgularda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR-PCR) gibi moleküler teknikler uygulanmaktadır. Günümüzde akciğer tüberkülozunda, klinik bulgularla ön tanı konulup, radyolojik ve bakteriyolojik bulgularla tanı kesinleştirilmektedir. Kesin tanıyı sağlayan kültür yöntemleri uzun zaman almakta, balgamda asite dirençli basil'in boyama yöntemiyle saptanması (ARB) ise %50'den daha

düşük oranlarda gerçekleştirilmektedir (5). Serolojik yöntemlerin ise tek başına tüberkülozun kesin tanısında yeterli olmadığı bilinmektedir (6,7,8). Çünkü, hücre içi bir enfeksiyon etkeni olan tüberküloz basiline karşı gelişen immün yanıt hücresel olup, T hücrelerinin, T hücre reseptörleri (TcR) repertuarının ve makrofaj etkinliğinin immün yanıtta rolleri tartışılmazdır (3). Tüberküloza karşı hücresel immün yanıtın *in vivo* ölçme yöntemi olarak kullanılan Mantoux testi son derece önemli bir klinik veri sunar. Bunlara rağmen, hızlı sonuç veren mikobakteri lipoarabinomannan antikorlarının ölçümüne dayalı teknikler gelecek için umut vermektedir (9). Bu nedenlerden dolayı, tüberkülozun tanısında hızlı yöntemler araştırılmaktadır. Bakteri antijenlerine karşı serumda oluşan antikorların saptanmasını sağlayan enzim-linked immunosorbent assay (ELISA), bunlardan birisidir (10,11). ELISA'nın geliştirilmesinden sonra diğer enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi tüberkülozlularda da *Mycobacterium tuberculosis* antijenine karşı antikorları saptayarak tanı konulabileceği üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (12,13,14).

Bu çalışmada, retrospektif olarak tüberküloz ön tanılı veya tüberküloz hastalıklı olguların IgG ve IgM pozitiflikleri arasındaki ilişkiler incelendi ve serolojik tetkiklerin tüberkülozda ne kadar önemli olabileceği araştırıldı.

## MATERYAL VE METOT

1996-1998 yılları arasında Fırat Tıp Merkezi, polikliniklerine başvuran ve tüberküloz ön tanısı alan, 129'u kadın ve 155'i erkek, 284 bireyden elde edilen veriler değerlendirildi. Bireyler dekarlar halinde yaşlarına ve cinsiyetlerine göre gruplara ayrıldı.

Hasta serumlarında *Mycobacterium tuberculosis* antijenlerine karşı oluşan IgG ve IgM sınıfından antikorlar ELISA ile belirlendi. Bu çalışmada kullanılan antijen, antijen-60 (A60) olup termostabil makromoleküler antijen (TMA) ailesinin *Mycobacterium-bovis* BCG stoplazmasından elde edilen majör antijen kompleksidir ve bütün mikobakterilerde bulunur. A 60 hem humoral hem de hücresel immün yanıtta yol açmaktadır (15). Optik



**Tablo 1.** *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı gelişen IgG ve IgM antikorlarının pozitif ve negatifliğinin sayı ve yüzde dağılımı

	Kadın		Erkek			Toplam Olgu	
	Olgu	%	Olgu	..	%	Olgu	%
IgG (-)/IgM (-)	67	23,6	89	31,3		156	54,9
IgG (+)/IgM (-)	28	9,9	41	14,4		69	24,3
IgG (-)/IgM (+)	27	9,5	14	4,9		41	14,4
IgG (+)/IgM (+)	7	2,5	11	3,9		18	6,4
<b>Toplam</b>	<b>129</b>	<b>45,5</b>	<b>155</b>	<b>54,5</b>		<b>284</b>	<b>100</b>

dansite (OD), otomatik mikropate okuyucusunda (ELX800) saptandı.

Bu çalışmada istatistiksel anlamlılık, Fischer' in kesin  $\chi^2$  testi ve Kruskal-Wallis testleri kullanılarak belirlendi.

#### BULGULAR

Bu çalışmada, 129'u kadın, 284'ü erkek bireyin serumlarında *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı gelişen IgG ve IgM antikorların ölçülmesi sonucunda, 156 bireyde (K/E: 67/89; %54,92) her iki

antikor da negatif bulundu. Buna karşılık, serumlarında yalnızca IgG pozitifliği sunan olguların sayısı 69 du (K/E:28/41; %29,30). Enfeksiyon etkeni ile ilk olarak karşılaştığı varsayılabilir IgM pozitif ve IgG negatif olguların sayısı ise 41'dir (K/E:27/14; %14,44). Toplam 18 olguda ise (K/E:7/11; %6,34) her iki sınıf antikor pozitif bulundu. Bulgular Tablo 1'de özetlendi. Kadın ve erkek popülasyonlarda IgG pozitifliği açısından fark bulunmadı. Ancak, IgM pozitifliği kadın popülasyonda (%12) erkek popülasyonla (%8,8) kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ( $p<0,05$ ).

Seropozitif ve seronegatif olguların yaş

**Tablo 2.** Seropozitif olguların yaş gruplarına göre sayı ve yüzde dağılımı

Yaşı	IgG (-)/IgM (-)		IgG (+)/IgM (-)		IgG (-)/IgM (+)		IgG (+)/IgM (+)	
	Olgu	%	Olgu	%	Olgu	%	Olgu	%
	K/E		K/E		K/E		K/E	
4-10	70	7,9	10	16,1	1	4,6	1	6,6
	4/6		5/5		1/0		1/0	
11-20	14	11,1	17	27,4	4	18,2	3	20,0
	6/8		7/10		2/2		2/1	
21-30	31	24,6	10	16,1	3	13,6	3	20,0
	14/17		4/6		2/1		2/1	
31-40	22	17,5	8	12,9	4	18,2	3	20,0
	10/12		4/4		3/1		1/2	
41-50	13	10,3	6	9,7	3	13,6	3	20,0
	9/10		3/3		1/2		2/1	
51-60	13	10,3	6	9,7	4	18,2	1	6,7
	6/7		2/4		3/1		0/1	
>60	17	13,5	5	8,1	3	13,6	1	6,7
	8/9		3/2		2/1		1/0	
<b>Toplam</b>	<b>126</b>	<b>100</b>	<b>62</b>	<b>100</b>	<b>22</b>	<b>100</b>	<b>15</b>	<b>100</b>
	57/69		28/34		14/8		9/6	

gruplarına göre sayı ve yüzde dağılımı ele alındığında (Tablo 2), yaş grupları arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmedi. Yaşları hakkında veri elde edilebilen 225 olgu 4-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60 ve 60 yaş üzeri olmak üzere tasnif edildi.

### TARTIŞMA

Dünya nüfusunun 1/4'ünü oluşturan gelişmiş ülkelerde (Avrupa ülkeleri, Japonya, Yeni Zelande ve Avustralya) yıllık enfeksiyon riski %0.1-0.001 arasındadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %75'ini oluşturan gelişmekte olan ülkelerde ise, dünyadaki tüm tüberkülozlu hastaların %95'i bulunmaktadır. Tüberkülozdan ölümlerin %99'u da bu ülkelerde gerçekleşmektedir. Ayrıca, gelişmiş ülkelerde enfekte olanların %80'ini 50 ve üzeri yaş grubundaki kişiler oluştururken, gelişmekte olan ülkelerde, enfekte olanların %75'i 50 yaşın altındadır (16). WHO verilerine göre dünyada 1.7 milyar insanın *M. tuberculosis* ile enfekte olduğu, gelişmekte olan ülkelerde önlenebilir ölümlerin %26'sını tüberkülozun oluşturduğu, 1990 yılında dünyada 9.5 milyon tüberküloz olgusu ve 2.5 milyon ölüm görüldüğü, 1992'de 8 milyondan fazla yeni olgu saptandığı ve bu sayının 2004'de 12 milyon olacağı tahmin edilmektedir (17).

Tüberküloz hücrel bağışık yanıtın ön planda olduğu hücre içi enfeksiyonların tipik bir örneğidir. Bu enfeksiyonda hücrel bağışık yanıtın salgısal bağışık yanıtın daha önemli olduğu bilinmektedir (18). Hastalığın seyri esnasında vücutta *M. tuberculosis* antijenlerine karşı IgG, IgM ve IgA yapısında antikorlar oluşmaktadır. Özgül IgE yapımına ise rastlanılmamıştır (19,20). Hastalığın seyrinde IgM yapımından IgG yapımına geçişin olgulara göre aylar nadiren yıllar içinde olabildiği bildirilmektedir (18). Maes A60 ile ilgili çalışmada hastalığın başlangıcında IgG' nin düşük IgM' nin yüksek olduğunu, hastalığın aktif akut döneminde ise IgM' nin neredeyse kaybolup IgG' nin çok yükseldiğini bildirmektedir. Postprimer enfeksiyonda zayıf bir IgM cevabı tespit edilebilmektedir. Böylece IgG düzeyi takibi ile tedaviye cevabı izlemenin mümkün olduğunu bildirmişlerdir (1,19,20).

Tüberküloz tanısında, *Mycobacterium tuberculosis*' e karşı gelişen antikorların öneminin

hücrel immüniteyi ölçen, gecikmiş tip aşırı duyarlılık (Delayed-type hypersensitivity reaction:DTH) tepkimesi içeren Mantoux testinden sonra olduğu bilinmektedir (21). Yine de, pozitif deri testi ve bağışıklık arasında birebir denebilecek tarzda bir korelasyon bulunmamaktadır (22). Bacille Calmette-Guérin (BCG) avirulan bakteri kullanılarak uygulanan aşının bireylerin %70 kadarını 15 yıl için koruyabildiği belirtilmektedir (22). Ancak, aşya karşı gelişen antikorların immün yanıt açısından önemli olmadığı ve ölçülmesinin bağışıklık hakkında bilgi içermeyeceği çalışmamızdan anlaşılmaktadır. Ülkemizde, BCG aşısı rutin olarak uygulanmakla birlikte, çalışmamızda yer alan 4-10 yaş grubundaki 22 bireyin IgG seropozitifliğinin oranının (%7.9) diğer gruplardan daha fazla olmadığı gözlenmiştir ( $p>0.05$ ). Dekatlara göre IgG seropozitiflik oranları ele alındığında, bakteri ile karşılaşma oranının artışına bağlı olarak birinci dekat sonrası gruplarda bir yüzde artışı gözlenirse de, bu artışın gruplar arasında istatistiksel anlamlılık içermediği bulunmuştur. Birinci dekat sonrası IgM seropozitifliğindeki üç kattan fazla artış ise, BCG aşısının gelişmesine neden olduğu bellek B hücrelerinin 10 yıl içinde giderek azalması ile açıklanabilir. Çalışmamızda en göze çarpan bulgu kadın popülasyonda IgM pozitifliğinin erkeklere kıyasla daha yüksek bulunmuş olmasıdır. Bu iki temel nedene bağlı olabilir. Birincisi, bölgemizde kadın nüfusun eğitim olanaklarından cinsiyet ayrımı nedeni ile daha az yararlanmasıdır. Bu çalışmada, her ne kadar bu husus anket uygulanarak belirlenmediyse de varsayım olarak kadın nüfustaki eğitim düzeyinin düşük olmasının bu nüfusun bireysel hijyenik koşullarını yakından etkileyebileceği kesindir. İkinci bir varsayım ise kadınlarda Th kutuplaşmasının daha ziyade Th2 yönüne baskın olma eğiliminin etkili olabileceğidir. Bu nedenle, hücrel immün yanıtın yeterli olmaması ve Th2 sitokinlerden IL-4 ve IL-13 ün sıvısal immün yanıtı körüklemesi söz konusu olabilir. Bu durum, bir taraftan hücre içi enfeksiyonlara karşı kadın popülasyonun daha dayanıksız olması, diğer taraftan da Ig yanıtının ön plana çıkmasını açıklayabilir.

Bu nedenlerden dolayı tüberküloz tanısında hızlı yöntemler araştırılmaktadır. Bu yöntemler arasında humoral immün yanıtın ölçülmesi mikroorganizmanın üretiminde ki yenilikler, ELISA,



PCR, Hibrid yakalama sistemi gibi teknikler geliştirilmektedir (5,23,24).

Sonuç olarak; Tüberküloz tanısında kesin kriter Tbc basilinin saptanmasıdır. Bakteriyolojik yöntemlerin uzun zaman alması ve örneklerin yetersizliği, ileri moleküler tekniklerin pahalı ve yerleşik olmaması nedeniyle tüberküloz şüpheli

olguların antikor düzeylerinin tespit edilmesi ve tedaviden hastanın etkilenip etkilenmediğinin anlaşılmasına yardım edebileceği, kısa sürede ve kolay uygulanabilir olması düşüncesiyle bakteriyolojik tetkik istenen olgulardan anti tüberküloz antikorlarına (ELISA) da bakılmasının yararlı olacağı kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Öger O. Tüberküloz epidemiyolojisi ve Türkiye'de tüberküloz durumu. *Klinik Derg* 1989; 2: 43.
2. Kaufmann SHE, Van Embden JDA. A neglected disease strikes back. *Trends Microbiol* 1993; 1: 2.
3. Kaufmann SHE. Immune responses to intracellular bacteria. In Rich RR, Fleischer T A, Schwartz BD, Shearer WT. and Strober W. (Eds.), *Clinical Immunology*, Mosby Year-Book, Inc., Missouri, 1996; pp.503-518.
4. Akhan SA, Hayran M. Tüberküloz. *İnfeksiyon Bülteni*, 1996; 1: 5.
5. Drowart A, Huygen K, De Bruyn J. et al., Antibody levels to whole culture filtrate antigens and to purified p32 during treatment or smear-positive tuberculosis. *Chest* 1991; 100: 685-687.
6. Kesarwala HH, Kishiyama JL. Immunologic methods useful in the diagnosis of infectious diseases. In Lawlor GL, Fischer TJ, Adelman DC. (Eds.). *Manual allergy and immunology*, A Little Brown Inc. Boston. 1995; 483-501.
7. Wade AA, Cohen J, Robson AR. An Enzyme linked immunosorbent assay using adsorbed mycobacterial sonicates for the serodiagnosis of tuberculosis. *S Afr Med J* 1987; 71:154
8. Samastı M. Tüberkülozda mikrobiyolojik tanı yöntemleri. *Klinik Derg* 1989; 2: 6
9. Erturan Z, Erturan S, Uzun M, Anđ Ö. Evaluation of a rapid assay for detection of antibodies to mycobacterial lipoarabinomannan in patients with tuberculosis. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1997; 27:78-81.
10. Mehta PK, Khuller GP. Serodiagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using mannophosphoinositides of *Mycobacterium tuberculosis* H-37. *Rev Med Microbiol Immunol* 1988; 177:285-292.
11. Fadda G, Grillo R, Ginesu, F, Et al. Serodiagnosis and follow up of patients with pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 81-87.
12. Krombovitis E. Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* plasma membran antigen by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Microbiol* 1986; 21: 257-264.
13. Maes R, Homasson JP, Kubin M, Bayer M. Development of an enzyme immunoassay for the serodiagnosis of tuberculosis and mycobacterioses. *Med Microbiol Immunol* 1989; 178: 323-335.
14. Van Vooren JP, Farber CM, Et al. Antimycobacterial antibodies in pleural effusions. *Chest* 1990; 97: 88-90.
15. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:1137-1151.
16. Kocabaş A. Günümüzde Tüberküloz Sorunu. In Kocabaş A (Ed.), *Tüberküloz Klinik ve Kontrolü*. Çukurova Üniversitesi Basımevi, Adana 1991; 8-9.
17. Reviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of Tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273: 220-226.
18. Rose NR, Conway de Macario E, Fahey JL. *Manual of Clinical Laboratory Immunology* 4<sup>th</sup> ed. Washington DC ASM 1992; 2-10: 207-220.
19. Ezer G, Tüberküloz immunitesi. *Klinik Derg* 1989; 2: 15.

20. Öztürk R. Mikobakterilerin Sonike edilmiş Adsorbe antijeni ve Putrifıye Protein Derivesi kullanılarak yapılan ELISA ile Akciğer tüberkülozunun serolojik tanısı. T. Mikrobiol Cem Derg 1993; 23:84-90.
21. Ryan JL. Bacterial Diseases. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (Eds.). Basic&Clinical Immunology, Appleton-Lange. Connecticut. 1994; 627-636.
22. Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM. Vaccines. In Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM. (Eds.). Clinical Immunology, Gower Medical Publishing. London 1991; 266.
23. American Thoracic Society Workshop. Medical section of the American Lung Association: Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:1804-1814.
24. Forbes BA, Hicks KE. Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31 :1688-169