
Değişik Yaş Gruplarında Tetanoz Antitoksin Düzeylerinin İndirekt Hemaglütinasyon Yöntemiyle Araştırılması

Onur URAL* Duygu FINDIK**

* Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi. Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

** Selçuk Üniversitesi. Tıp Fakültesi. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Bu çalışmada; Konya yöresinde, yaşları 1 ile 78 arasında değişen sağlıklı 100 kişide tetanoz antitoksin düzeyleri ölçüldü. Tetanoz antitoksini hindi eritrositlerinin kullanıldığı indirekt hemaglütinasyon yöntemi ile araştırıldı. 0.125 Hemaglütinasyon U/ml üzerindeki değerler koruyucu olarak kabul edildi. Olguların %69'unda koruyucu seviyede tetanoz antitoksini bulundu. Tetanoz antitoksin titresinin yaşla azaldığı izlendi.

Anahtar Kelimeler: Tetanoz Antitoksin, İndirekt Hemaglütinasyon.

SUMMARY

Investigation of Tetanus Antitoxin Levels In Some Age Groups with Indirect Hemagglutination

In this study, the antitoxin titers of 100 persons in various ages (from 1 to 78) were evaluated in Konya region. Tetanus antitoxin titers were determined by indirect hemagglutination technique using turkey red blood cells. An hemagglutination unit greater than 0.125 HA U/ml was accepted against tetanus. Protective levels of tetanus antitoxin were found in 69% of the population. Tetanus antitoxin titers were decreased by aging.

Key Words: Tetanus Antitoxin, Indirect Hemagglutination.

GİRİŞ

Gelişmekte olan ülkelerde tetanoz hastalığı hala önemini korumaktadır (1,2,3,4). Ülkemiz gibi trafik kazalarının yoğun olduğu, sağlıksız koşullarda doğumların ve kadınların kişisel abortus girişimlerinin sık görüldüğü, her türlü yaralanmada ilk müdahalenin ve immünizasyonun yetersiz olduğu toplumlarda tetanoz olgularının görülmesi doğaldır (1,3).

Tetanoza yakalanan kişiler yetersiz aşılanmış veya hiç aşılanmamış kişilerdir (3,5). Aktif immünizasyon, çocuklarda 'difteri-boğamaca-tetanoz' aşısı şeklinde 2. 3. 4. ve 18. aylarda yapılır. Daha sonra rapellerin 10 yılda bir yapılması 0.01 IU/ml düzeyinin üstünde koruyucu tetanoz antitoksin titresinin sağlanması için gereklidir (3,6,7).

Bu çalışmada, indirekt hemaglütinasyon yöntemiyle değişik yaş gruplarında tetanoz antitoksin düzeylerini araştırmayı ve yöremizde tetanoza karşı immünite durumunu ortaya koymayı amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Konya yöresinde, yaşları 1 ile 78 arasında değişen sağlıklı 50 kadın, 50 erkekten oluşan toplam 100 kişiden kan alınarak serumları ayrıldı. Bütün serumlar çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı. Kan alınan bütün bireylere tetanoz immünitesini araştırmak amacıyla bir anket verilerek yaşı, mesleği, primer immünizasyonun tam olarak yapıp yapılmadığı, rapelleri yapılmışsa zamanları sorularak kaydedildi.

Serumlardaki tetanoz antitoksin düzeyleri; Mai ve Rosin'in tanımladığı, ritzurra ve arkadaşlarının modifiye ettiği, hindi eritrositlerinin kullanıldığı indirekt hemaglütinasyon (IHA) yöntemiyle araştırıldı (8,9).

Bu amaçla şu hazırlıklar yapıldı:

1. Yüzde 8'lik hindi eritrosit süspansiyonu: hindiden 1/5 sıratlı kan alındı ve %8 lik eritrosit süspansiyonu hazırlandı.

2. Solüsyon 1 (S1): NaCl: 4.8 g, Na₂HPO₄.2H₂O: 7.02 g, KH₂PO₄: 1.45 g tartılarak 1 litre distile suda çözüldü ve pH: 7.4'e ayarlandı.

3. Solüsyon 1 ile sulandırılarak %3'lük formalin solüsyonu elde edildi.

4. Solüsyon 2 (S2): NaCl: 4.5 g, Na₂HPO₄.2H₂O: 4.17 g, KH₂PO₄: 6.91 gr tartılarak 1 litre distile suda çözüldü ve pH: 6.4 e ayarlandı.

5. Solüsyon 2 ile sulandırılarak 1/40.000'lik tannik asit hazırlandı.

6. Ankara Hıfzıssıhha Enstitüsü Bakteri Aşıları

Bölümü'nden alınan saf tetanoz toksoidi solüsyon 2 ile sulandırılarak 32 Lf/ml olacak şekilde ayarlandı.

7. Pozitif kontrol için tetanoz antitoksini 100 IU/ml kullanıldı (Hıfzıssıhha Enstitüsünden alındı).

8. Deney U tabanlı pleytlerde yapıldı.

Deneyin yapılışı:

a. Yüzde 8'lik hindi eritrosit süspansiyonu 3 defa S1 ile yıkandı ve eşit hacimde %3'lük formalinle karıştırılarak 37°C'de 18-20 saat inkübe edildi.

b. Formalinizasyondan sonra fazla formalin distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı.

c. Formalinize hindi eritrositleri, S2 ile sulandırılmış 1/40.000'lik tannik asitle eşit hacimde karıştırılarak, su banyosunda 56°C'de 30 dakika inkübe edildi.

d. Tannik asitle işleminden sonra hindi eritrositleri S2 ile 3 defa yıkandı.

e. Tannize eritrositler üzerine, S2 ile sulandırılmış 32 Lf/ml tetanoz toksoidi konarak daha önceki miktara getirildi ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi.

f. Hasta serumları, su banyosunda 56°C'de 30 dakika inaktive edildikten sonra S2 ile dilüsyonları yapıldı (1/8-1/512) ve U tabanlı mikroyeyletlere 50 µl olarak dağıtıldı. Üzerine 50 µl tetanoz toksoidi ile kaplı hindi eritrositleri ilave edildi. Oda ısısında 40 dakika inkübe edildikten sonra sonuçlar okundu.

g. Pozitif kontrol için tetanoz antitoksini (100 IU/ml) ve dilüsyonları kullanıldı.

h. Hemaglütinasyon ünitesinin hesaplanmasında: serumdaki antitoksin düzeyleri Hardegree ve arkadaşlarının kullandığı yöntemle göre belirlendi (10). 0.125 hemaglütinasyon ünitesi/ml (HA U/ml) ve üzerindeki değerler koruyucu düzey olarak belirlendi.

Sonuçların istatistiki değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 100 kişinin yaşları 1 ile 78 arasında değişmekteydi. Kadınların yaşları 1-72 erkeklerinki ise 1-78 arasındaydı. Kadınların ortalama yaşı 29, erkeklerin 34 idi. IHA yöntemiyle 100 bireyin 69'unda koruyucu düzeyde tetanoz antitoksini bulunurken, 31 bireyde tetanoz antitoksini koruyucu düzeyin altında idi.

Yaşlara göre pozitifliğin dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'de görüldüğü gibi 1-10 yaş grubunda te-

Tablo 1. Yaşlara Göre Tetanoz Antitoksin Pozitifliğinin Dağılımı.

Yaş grubu	Sayı n=100	Tetanoz Antitoksin (+)		Tetanoz Antitoksin (-)	
		n	%	n	%
1-10	20	18	90	2	10
11-20	15	13	86.6	2	13.8
21-30	15	13	86.6	2	13.8
31-40	15	14	93.3	1	6.7
41-50	15	7	46.6	8	53.4
51-üstü	20	4	20	16	80

$\chi^2=19.798$ $p<0.001$

tanoz antitoksin pozitifliği %90 iken, 51 yaş ve üzerinde %20 idi. İki grup arasında istatistiki olarak anlamlı fark vardı ($\chi^2=19.798$, $p<0.001$).

Cinsiyete göre tetanoz antitoksin pozitifliğinin dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi kadın ve erkek cinsi-

Tablo 2. Cinsiyete Göre Tetanoz Antitoksin Pozitifliği.

	Tetanoz antitoksini (+)		Tetanoz antitoksini (-)	
	n	%	n	%
Kadın n=50	39	78	11	22
Erkek n=50	30	60	20	40
Toplam	69		31	

$\chi^2=3.787$ $p>0.05$

yetleri arasında tetanoz antitoksin pozitifliği yönünden istatistiki olarak anlamlı fark yoktu ($\chi^2:3.787$ $p>0.05$).

Yapılan anketlerden alınan bilgilere göre, tetanoz aşılama şemasının eksiksiz yapılmasıyla, koruyucu antitoksin pozitifliği arasındaki ilişki Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Tetanoz Aşılama Şeması İle Koruyucu Antitoksin Pozitifliği Arasındaki İlişki.

	Koruyucu >0.125 HA U/ml		Koruyucu olmayan <0.125 HA U/ml	
	n	%	n	%
Primer aşılama tam n=58 (grup A)	54	93.1	4	6.9
1 veya 2 doz yapılmış n=30 (grup B)	10	33.3	20	66.7
Hiç aşılanmamış n=12 (grup C)	5	41.6	7	58.4

A ve B grupları arasında istatistiki olarak ($\chi^2:35.613$ $P<0.001$) ve A ve C grupları arasında istatistiki olarak ($\chi^2:19.861$ $P<0.001$) anlamlı fark vardır.

Tetanoz antitoksin pozitifliği ile, son tetanoz aşısından sonra geçen süre arasındaki ilişki Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Tetanoz Antitoksin Pozitifliği İle Son Tetanoz Aşısından Sonra Geçen Süre Arasındaki İlişki.

	5 yıldan az		6-10 yıl		10 yıldan fazla	
	n	%	n	%	n	%
Koruyucu >0.125 HA U/ml (n= 69)	49	71.1	18	26.1	2	2.8
Koruyucu olmayan < 0.125 HA U/ml (n=31)	7	22.5	8	25.8	16	32.3

Tablo 4'de görüldüğü gibi aşılama sonrası geçen süre uzadıkça, antitoksin pozitifliği düşmektedir.

Tetanoz antitoksin pozitifliği ile meslekler arasındaki ilişki ise Tablo 5'de verilmiştir.

Öğrenciler, %87.5 oranı ile en yüksek pozitifliğe sahipti.

Tablo 5. Tetanoz Antitoksin Pozitifliği ile Meslekler Arasındaki İlişki.

	Tetanoz antitoksini (+)		Tetanoz antitoksini (-)	
	n	%	n	%
Öğrenci (n=32)	28	87.5	4	12.5
Çiftçi (n=25)	17	68	8	32
Ev kadını (n=21)	11	52.3	10	47.7
Sağlık per. (n=17)	12	70.5	5	29.5
Diğer (n=5)	1	20	4	80

TARTIŞMA

Tetanoz ölüm oranı yüksek olan bir enfeksiyon hastalığıdır. Tedavisinde başarı şansı az olduğundan, aşılama ile tetanozdan korunmanın önemi artmaktadır. Bağışıklama sonucu oluşan tetanoz antitoksinlerinin araştırılması, bu hastalıktan korunma düzeyini göstermesi bakımından değerlidir (1,3,6).

Çalışmamızda indirekt hemaglutinasyon yöntemi-

miyle, koruyucu tetanoz antitoksin pozitifliği %69 oranında bulunmuştur. Ülkemizde değişik yaş gruplarında yapılan çalışmalara göre; Aksu ve ark. 1989'da ELISA ile gebe kadınlarda %41.5, Atabey ve ark. 1990'da indirekt hemaglutinasyonla %50.7, Hacibektaşoğlu ve ark. 1991'de ELISA ile %92.9, Felek ve ark. 1993'de ELISA ile askerlerde %82, Akyol ve ark. 1994'de ELISA ile değişik toplum kesimlerinde %8.3-68 arasında değişen tetanoz antitoksin pozitiflik oranları bildirmişlerdir (6,11-14).

Yurt dışında yapılan çalışmalarda ise; Bistoni ve ark. İtalya'da %13.6, Simonsen ve ark. Danimarka'da %11, ABD ve Danimarka'da yapılan çeşitli çalışmalarda %40-70 arasında, Schroder ve ark. 1991'de 19-90 yaşları arasında erkeklerde %96, kadınlarda %71, yine Schroder ve ark. 1992'de 17-60 yaş arası toplumda %97, Wesche ve ark. 1992'de kırsal kesimde yaşlılarda %14, Vernacchio ve ark. 1994'de gebe kadınlarda %61.2 oranlarında koruyucu tetanoz antitoksin düzeyleri saptadıklarını bildirmişlerdir (7,15-19).

Görüldüğü gibi ülkemizde koruyucu tetanoz antitoksin pozitifliği %8.3-92, yurt dışındaki çalışmalarda %11-97 arasında değişmektedir. Çalışmalarda bildirilen bu oranların farklı olması seçilen yaş gruplarına, grupların aşılama durumlarına (askerler, gebeler, çocukluk dönemi gibi) ve kullanılan farklı tanı yöntemlerine bağlı olabilir.

Aşılama ile tetanoza karşı oluşan antitoksinler çok değişik yöntemlerle araştırılmaktadır (3). Bunlar arasında indirekt hemaglutinasyon, toksin nötralizasyonu, counter immün elektroforez, radioimmün assay ve ELISA en sık kullanılanlarıdır (10,15,20-24). Epidemiyolojik çalışmalarda duyarlı bir yöntem olduğu belirtilen indirekt hemaglutinasyonun ucuz bir yöntem olduğu görülmüştür (8,15).

Cinsiyetler arasında tetanoz antitoksin pozitifliği yönünden anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 2). Fakat yaş ilerledikçe tetanoz antitoksin pozitiflik oranının azaldığı izlenmiştir. 1-10 yaş grubunda %90 olan pozitiflik oranı 51 yaş ve üzerinde %20'lere düşmüştür. Atabey ve ark. 30 yaş üstünde, Schroder ve ark. 60 yaş üstünde koruyucu antitoksin düzeylerinin düştüğünü veya kaybolduğunu bildirmişlerdir (12,17). Bu düşüşün sebebinin ileri yaşlarda spesifik antikor yapan B-lenfositlerin sayısında ve gücünde olan azalmaya, rapellerin düzenli yapılmamasına bağlı olabileceği düşünülmüştür (25).

Primer aşılama ve rapelleri tam olanlarda %93.1 olan pozitiflik, aşının bir veya iki dozu yapılmışlarda %33.3 ve hiç aşılanmamışlarda %41.6 bu-

lunmuş olup, primer aşılması tam olan gruptaki pozitiflik oranı istatistik olarak diğer iki gruba göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Hiç aşılanmamışlarda %41.6 bulunan antitoksin pozitifliği, bireylerin aşı kartlarının olmaması ve sağlık kuruluşlarının büyük çoğunluğunda yapılan müdahalelerin hastaya açıklanmamasından doğan bilgi eksikliğine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Atabey ve ark. da aynı gruplarında sırasıyla %97.4, %53.3 ve %6.6 oranında antikor pozitifliği bulmuşlardır (12). Bu sonuçlar primer aşılama ve rapellerin zamanında yapılmasının koruyuculuk üzerindeki olumlu etkilerini göstermektedir.

Primer immünizasyondan sonra oluşan antitoksinin vücutta kalış süresi, 10 yıldan fazla olup bu süre sonuna yakın yapılacak rapel aşı dozuyla, koruyucu düzey en az bir 10 yıl daha uzatılabilir (2,3,26-29). Tablo 4'de görüldüğü gibi koruyucu antitoksini olan bireylerin %97.2'sinde primer immünizasyon sonrası en fazla 10 yıl geçmiştir (Tablo 4).

Bu durum sık aşılanmanın gereksiz fakat en az 10 yıllık aralarla rapel yapılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Öğrenciler %87.5 oranı ile en yüksek pozitifliğe sahipti. Okul döneminde aşıların ve rapellerin düzenli yapılması, ileri yaşlarda bu uygulamalara uyulmaması farklılığın nedeni olabilir (Tablo 5).

Sonuç olarak; tetanoz ülkemizde erişkin yaşlarda ve özellikle yüksek mortalitesi nedeniyle yenidoğan döneminde halâ önemini koruyan, önlenebilir bir enfeksiyon hastalığıdır.

Çalışmamızda tetanoz antitoksin pozitifliği %69 oranında bulunmuştur. Antitoksin titrlerinin zamanla (özellikle 10 yıldan sonra) ve yaşla azaldığı (50 yaş üzerinde) saptanmıştır.

Bu nedenle;

1. Hastanın immunizasyon durumu dikkate alınarak, tetanoz riski taşıyan her türlü yaralanmadan sonra (trafik kazası, silah yaralanması gibi) tetanoz profilaksisinin uygulanmasının,

2. Primer immünizasyondan sonra, tetanoz aşısı rapellerinin 10 yılda bir düzenli olarak yapılmasının,

3. Yenidoğan tetanozunu önlemek için gebelere, eğer yapılmamış ise tetanoz aşısı ile profilaksi yapılmasının,

4. Aşının etkinliğinin zaman zaman yapılacak laboratuvar araştırmalarıyla ölçülmesinin uygun olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Altay G, Ergin T, Kökkaya A, Karagöl Z. Türkiye'de tetanoz immün insan globulini hazırlama deneyimi. Ankara Tıp Bülteni 1981;3:221-4.
2. Bilgehan H. Klinik Bakterioloji. Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 8. Baskı, İzmir, Fakülteler Kitabevi, 1993:282-92.
3. Bleck TP. Clostridium tetani. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Infectious Diseases. Fourth edition, Churchill Livingstone, New York, 1995:2173-8.
4. Cumberland NS, Kidd AG, Karalliedde L. Immunity to tetanus in United Kingdom populations. J Infect 1993;27:255-60.
5. Moray G, Çakmakçı M. Tetanoz hastalığı ve profilaksisi. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 1993;2:119-22.
6. Akyol G, Baysal B. Toplumun çeşitli gruplarında tetanoza karşı antitoksin seviyelerinin araştırılması. Mikrobiyol Bült 1995;28:365-9.
7. Vernacchio L, Madico G, Tilton RC. Neonatal tetanus in Peru: Risk assessment with modified ELISA and toxoid skin test. American Journal of Public Health Nurs 1993;83:754-6.
8. Pitzurra M, Bistoni F, Pitzurra L, Marconi P. Use of Turkey red blood cells in the passive haemagglutination test for studying tetanus immunity. Bull WHO 1983;61:311-38.
9. Neter E. Bacterial Haemagglutination Tests. In: Sonnenwirth AC, Jarrett L (eds). Gradwohl's Labra Methods and Diagnosis. 8. th ed CV Mosby Company St Louis. 1990:2333-9.
10. Hardegree MC, Barile MF, Pittman M, Maloney CJ, Schofield F, Macdonan R. Immunization against neonatal tetanus in New Guinea. Bull WHO 1970;43:461-8.
11. Aksu HS, Saltar M, Burgut M. Gebe kadınlarda ve tetanozlu bebeklerde tetanoz antikor düzeyleri. ÇÜ Tıp Fak Derg 1989;3:374-7.
12. Atabey SN, Gökoğlu M. Tetanoz aşılmasından sonra geçen sürenin antitoksin düzeyleri üzerine etkisi. Enfeksiyon Dergisi, 1990;4:601-8.
13. Hacıbektaşoğlu A, Serbes S, Paşa A, Barut A, Demiröz P. Tetanoz aşısı yapılanlarda tetanoz antitoksin düzeylerinin araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg 1991;48:181-9.
14. Felek S, Kılıç K, Ordulu U, Ocak S, Akbulut A. Türkiye'de uygulanan tetanoz aşısı programının retrospektif olarak yükümlü askerlerde değerlendirilmesi. Klimik Dergisi 1993;6:78.
15. Bistoni F, Marconi P, Perito S, Bastianini L, Antenocci R, Pitzurra M. Turkey red blood cells passive haemagglutination assay a guideline persons. Bull WHO 1985;63:905-14.
16. Simonsen O, Curlin GT, Huber DH, Kidd AG. Immunity against tetanus and response to revaccination in surgical patients more than 50 years of age. Surg Gynecol and Obstet 1987;164:329-34.
17. Schroder JP, Kuhlmann WD. Detection of tetanus antitoxin using Eu-labeled antihuman immunoglobulin G monoclonal antibodies in a time resolved fluorescence immunoassay. J Clin Microbiol 1991;9:1504-7.
18. Schroder JP, Kuhlmann WD. Preventive tetanus immunization and avoidance of side effects of booster immunization. Dtsch Med Wochenschr 1992;117:1903-6.
19. Vesche HA. Tetanus immunity in older adults. Public Health Nurs 1992;9:125-7.
20. Barile MF, Hardegree MC, Putman M. Immunization against neonatal tetanus in new guinea: The toxin neutralization test and the response of Guinea pigs to the toxoids as used in the immunization schedules in New Guinea. Bull WHO 1970;43:453-9.
21. Sedgwick AK, Ballow M, Sparks K, Tilton RC. Rapid quantitative microELISA for tetanus antibodies. J Clin Microbiol 1983;18:104-9.
22. Varella LR, Black FL, Mendizabal-Morris CA. Tetanus antitoxin titers in women of childbearing age from nine diverse population. J Infect Dis 1985;151:850-3.
23. Virella G, Hymann B. Quantitation of antitetanus and antidiphtheria antibodies by ELISA methodology and application. J Clin Lab Analysis 1991;5:43-8.
24. Winsnes R, Christiansen G. Quantification of tetanus antitoxin in human sera: comparison of counter immunoelectrophoresis and passive hemagglutination with toxin neutralization in mice. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B. 1979;87:197-200.
25. Burns EA, Lum LG, Hommedien L, Goodwin JS. Specific humoral immunity in the elderly in vivo and invitro responses to vaccination. J Gerontol 1993;48:231-6.
26. Black RE, Huber DH, Curlin GT. Reduction of neonatal tetanus by mass immunization of non-pregnant women: duration of protection provided by one or two doses of aluminium-adsorbed tetanus toxoid. Bull WHO 1980;58:927-30.
27. Gentile G, Maloney CJ, Macdonan R. Prevalence of hyperimmunization against tetanus in Italians born after the introduction of mandatory vaccination of children with tetanus toxoid in 1968. Infection 1993;21:80-2.
28. Sharma N, Trubuhovich R, Thomas MG. Tetanus in Auckland a preventable disease. New Zealand Medical Journal 1994;9:82-4.
29. Hood N, Chan MC, Maxwell SM, Familus JB, Hart CA. Placental transfer of tetanus toxoid antibodies in Nigerian mothers. Ann Trop Paediatr 1994;14:179-82.

YAZIŞMA ADRESİ:

Yard. Doç. Dr. Onur URAL
Mahmuriye mahallesi
Ferit Paşa sokak No: 197/1
42040 KONYA