
Sağlık Çalışanlarında Tüberkülin Deri Testi ve RD1-ELISPOT T-Hücre Yanıtlarının Karşılaştırılması

Ahmet SOYSAL*, Ayşegül YAĞCI**, Mustafa BAKIR*

* Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı,

** Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Sağlık çalışanlarında normal popülasyona oranla daha yüksek tüberküloz enfeksiyonu geliştirme riski olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, sağlık çalışanlarında tüberküloz enfeksiyonu tanısını tüberkülin deri testi (TDT) ve RD1-ELISPOT testine dayanarak araştırdık. Yirmi sağlık çalışanının 12'sinde TDT pozitif bulunurken, bunların ikisinde RD1-ELISPOT testi negatif olarak saptandı. TDT negatif bulunan sekiz sağlık çalışanının hepsinde RD1-ELISPOT testi de negatif olarak bulundu. Yalancı pozitiflik sonuç verebilen TDT'nin yerine sağlık çalışanlarında tüberküloz hastalığı ve enfeksiyonun belirlenmesinde RD1-ELISPOT testinin kullanılmasının gereksiz antimikrobiyal profilaksi kullanımını önleyeceği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Tüberküloz enfeksiyonu, Tüberkülin deri testi, RD1-ELISPOT testi, Sağlık çalışanı

SUMMARY

Comparison of Tuberculin Skin Test and RD1-ELISPOT Assay in Health Care Workers

Health care worker (HCW)s carry a higher burden of tuberculosis infection than that of the general public. In this study we compared tuberculin skin test (TST) with RD1-ELISPOT assay in detection of tuberculosis infection in HCWs. Twenty HCWs were investigated, among them 12 had a positive and eight had a negative TST result. RD1-ELISPOT assay was negative in all TST negative ones. Among TST positive ones, two subjects had a negative RD1-ELISPOT assay result. Use of RD1-ELISPOT assay in detection of tuberculosis infection may avoid unnecessary antimicrobial prophylaxis.

Key Words: Tuberculosis, Tuberculin test, RD1-ELISPOT assay, Health care worker

İnfeksiyon etkenlerinin hastalardan bulaşması sağlık çalışanlarının maruz kaldığı potansiyel tehlikelerden biridir. Sağlık çalışanlarının normal popülasyona oranla daha yüksek tüberküloz (TB) enfeksiyonu riski olduğu bilinmektedir^[1,2]. TB basili bronkoskopi, entübasyon, aspirasyon, otopsi, balgam indüksiyonu ve aerosol tedavi uygulamaları sırasında sağ-

lık personeline bulaşabilir^[3-6]. Bakteriyoloji laboratuvarlarının ve hastane servislerinin izolasyon olanaklarının yetersiz olduğu ülkemizde sağlık çalışanlarının TB basili ile infekte olup olmadıklarının doğru bir biçimde belirlenmesi, bireysel profilaksi uygulanması açısından önem taşımaktadır. TB enfeksiyonu tanısında yüzyıllardır kullanılan tek test saflaştırılmış pro-

tein derivesi (PPD)'nin intradermal olarak inoküle edilmesi sonucunda gelişen gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunun ölçülmesi ilkesine dayanan tüberkülin deri testidir (TDT). İkiyüzden fazla antijen içeren PPD *Mycobacterium tuberculosis* kültür süpernatantından elde edilir. PPD, geniş antijenik çapraz paylaşımından dolayı TB enfeksiyonu tanısında düşük duyarlılığa sahiptir. Yanlış pozitif reaksiyon BCG aşılması, çevresel mikobakterilere maruz kalma ve rapel (booster) etkisine bağlı olarak görülebilir^[7-9]. Bunun yanında TDT disemine TB hastalığında, viral, bakteriyel, fungal enfeksiyon varlığında, canlı virüs ile aşılanmada ve immün sistemin baskılandığı durumlarda yanlış negatif sonuç verebilir^[10]. Ayrıca, TDT'nin aktif TB hastalığı tanısında duyarlılığı %75-90 arasında iken, disemine hastalıkta %50'den azdır^[10].

Son yıllarda *M. tuberculosis* genomu ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda *M. tuberculosis* kompleksinde bulunan fakat *Mycobacterium bovis* BCG suşunda ve birçok çevresel mikobakteri suşunda bulunmayan RD1 gen segmenti tespit edilmiştir. Bu genomik segment "early secretory antigenic target-6 kilodalton (ESAT-6)" ve "culture filtrate protein-10 kilodalton (CFP-10)" adlı proteinleri kodlar. Bu proteinlerin yapılan hayvan çalışmalarında ve TB hastalarında immünojenik olduğu gösterilmiştir^[11-14]. "Ex vivo enzyme-linked immunospot (ELISPOT)" testi, kişinin periferik mononükleer hücrelerinin in vitro şartlarda ESAT-6 ile uyarılıp daha sonra oluşan IFN- γ yanıtının çift sandviç ELISA yöntemi ile belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar RD1-ELISPOT testinin hastalığı ve enfeksiyonu belirtmede duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olduğunu göstermektedir^[15-19]. Bu çalışmada bir üniversite hastanesinde çalışan bir grup sağlık personelinde TDT ve RD1-ELISPOT test sonuçlarını karşılaştırdık.

MATERYAL ve METOD

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çalışan 20 sağlık personeli çalışmaya alındı. Tüm olgulara TDT Mantoux yöntemi ile uygulandı. TDT için 2 IU PPD (Tuberculin PPD RT 23 SSI, Statens Serum Institut, Denmark, 5 PPD-S tüberkülin aktivitesinde) kullanıldı. PPD tüm olguların kollarının volar yüzeyine intradermal olarak uygulandı ve test 48-72 saat sonra değerlendirildi. BCG skarı olanlarda 15 mm ve üstü, BCG skarı olmayanlarda 10 mm ve üstündeki endürasyon çapları pozitif TDT olarak kabul edildi. Tüm olgulardan RD-1 ELISPOT testi için alınan 5 cc heparinli venöz kan steril falkon

tüp içinde RPMI ile (Sigma) sulandırıldı ve 22 dakika süre ile santrifüj edildi. Daha sonra bu kan fikal üzerine yayıldı, fikal-gradient santrifüj yöntemi ile ayrıştırıldı ve fikal içindeki periferik kan mononükleer hücreleri pastör pipet ile toplandı. Daha sonra bu hücreleri içeren falkon tüpü üzerine RPMI'dan oluşan R10 hücre medyumuna eklendi. Daha sonra anti-IFN- γ antikora kaplanmış ELISPOT plağı (Mabtech, Stockholm, Sweden) kuyucuğuna 250.000/mL periferik mononükleer hücre konuldu. Daha sonra hücreler rESAT-6 (VLA, Addlestone, UK), rCFP10 (Lionex GmbH 03-2, UK), fitohemaglutinin (ICN Biomedicals, Aurora, OH) (pozitif kontrol) ile 16-18 saat süre ile 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ etüvünde inkübe edildi. Negatif kontrol olan iki kuyucuğa herhangi bir antijen eklenmedi. Ertesi sabah PBS Tween (Sigma) ile altı kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 1 μ g/mL anti-interferon monoklonal antikor (Mabtech, Sweden) eklenip 1.5 saat oda ısısında inkübe edildi. Plak PBS-Tween ile altı kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 50 μ L kromojen alkalin fosfat substrat (Moss Inc) ilave edildi, 10-15 dakika sonra plaklar musluk suyu ile yıkanıp kurumaya bırakıldı. Kuyucuklarda oluşan noktacıklar otomatik optik ELISPOT plak okuyucusu (AIDGmbH, Strassberg, Germany) ile Oxford Üniversitesi İnfeksiyon Hastalıkları araştırma laboratuvarı'nda sayıldı^[15].

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 20 olgunun 11'i mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan teknisyen, sekizi doktor ve biri hemşire idi. Olguların TDT endürasyon çapları, TDT sonuçları ve RD1-ELISPOT test sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur. TDT pozitif bulunan 12 olgunun ikisinde RD1-ELISPOT test yanıtları negatif bulundu. TDT negatif bulunan sekiz olgunun ise hepsinde RD1-ELISPOT test yanıtları negatif idi. Resim 1'de RD1-ELISPOT yanıtı pozitif olan bir olgunun test plağı görülmektedir.

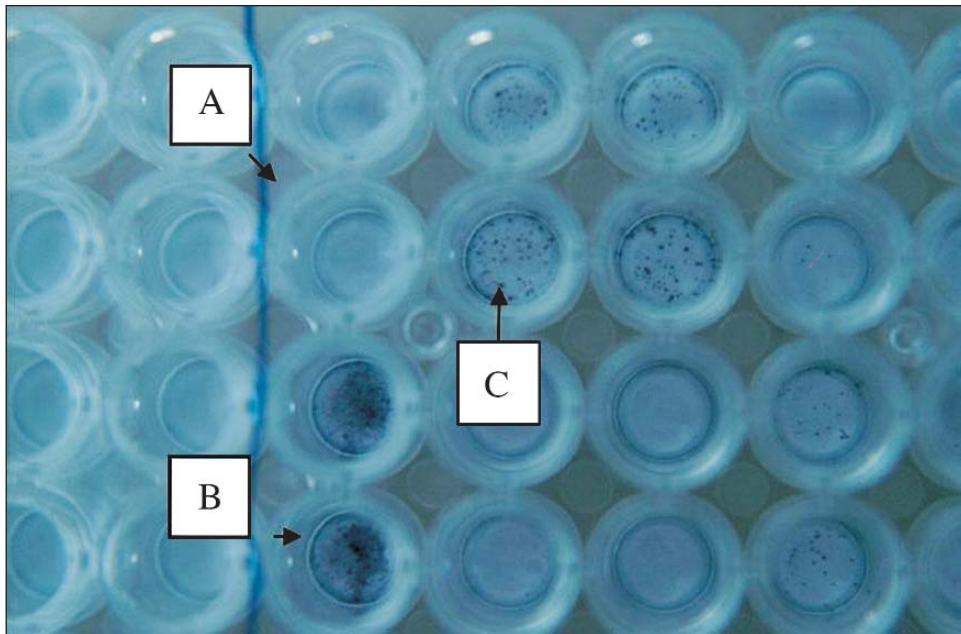
TARTIŞMA

Sağlık çalışanlarının normal popülasyona oranla daha yüksek oranda TB enfeksiyonu riski olduğu bilinmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Çuhadaroğlu ve arkadaşları sağlık çalışanlarında TB insidansının genel popülasyon ile karşılaştırıldığında üç kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır^[20]. "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" *M. tuberculosis*'in sağlık alanlarında yayılımını önlemek için kılavuz yayınlamıştır^[21]. Bu kılavuz sağlık çalışanlarına rutin olarak TDT uygulanması ve latent enfeksiyonu olan bireylerin tedavisini önermekte, sağlık çalışanlarında TB hastalığının erken tespit edilip

Tablo 1. Olguların TDT ve RD1-ELISPOT sonuçları

Olgu no	Meslek	TDT endürasyonu (mm)	TDT	RD1-ELISPOT
1	MT	12	-	-
2	MT	16	+	-
3	MT	16	+	+
4	MT	18	+	-
5	MT	20	+	+
6	MT	20	+	+
7	MT	21	+	+
8	MT	27	+	+
9	MT	35	+	+
10	D	0	-	-
11	D	5	-	-
12	D	12	-	-
13	D	23	+	+
14	D	24	+	+
15	H	7	-	-
16	MT	32	+	+
17	MT	9	-	-
18	D	0	-	-
19	D	0	-	-
20	D	18	+	+

MT: Mikrobiyoloji teknisyeni, D: Doktor, H: Hemşire, +: Pozitif, -: Negatif.



Resim 1. Pozitif test yanıtı olan olgunun RD1-ELISPOT plağının görünümü. A: Negatif kontrol çukurcuğu, B: Pozitif kontrol çukurcuğu, C: ESAT-6 çukurcuğu.

erken dönemde tedavi edilmesinin yanında latent enfeksiyonu olan sağlık çalışanlarının belirlenmesi ve aktif enfeksiyon gelişmesinin önlenmesi için tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. Bunun yanında yapılan çalışmalarda sağlık çalışanlarının TB kontrol yöntemlerine uyum göstermediği, TDT uygulanması ve değerlendirilmesine ve latent enfeksiyon tedavisine uyumlarının düşük olduğu gösterilmiştir. Barrett-Connor deri testi pozitif olan doktorların sadece %41'inin latent enfeksiyon tedavisine başladıklarını saptamıştır^[22]. Bunun yanında Camis ve arkadaşları sağlık çalışanlarının latent enfeksiyon tedavisini tamamlama oranının %55 olduğunu belirlemiştir^[23]. Yapılan diğer çalışmalarda sağlık çalışanlarında latent enfeksiyon tedavisine uyumun %8 ile 60 arasında değiştiği gösterilmiştir.^[23-25] Bu yüzden latent enfeksiyon tanısı ve tedavisine uyumun düşük olduğu sağlık çalışanlarında latent enfeksiyonun doğru olarak belirlenmesi önemlidir. Latent enfeksiyonun tanısı için günümüzde yaygın olarak kullanılan test TDT'dir. Bu test birçok durumda yanlış negatif ve yanlış pozitif yanıt verebilmektedir^[10]. RD1-ELISPOT testinin TB tanısında daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir^[15]. TB enfeksiyonu tanısında ise TDT'ye üstün olduğunu gösteren çalışmalar vardır^[16-19]. Bu testin TDT ile karşılaştırıldığı ilk klinik çalışma Lalvani ve arkadaşları tarafından yapılmıştır^[15]. Bu çalışmada araştırmacılar kültür ile doğrulanmış aktif TB hastalarında ve TB dışı hastalığı olan bireylerde RD1-ELISPOT testi ile TDT'yi karşılaştırmışlardır. Aktif TB hastalığı olan bireylerde ELISPOT testinin duyarlılığı %96 bulunurken, TDT'nin duyarlılığı %69 olarak saptanmıştır. ELISPOT testinin özgüllüğü bu çalışmada %92 olarak bulunmuştur. *M. tuberculosis* enfeksiyonu tanısında kullanılan altın standart bir test bulunmadığı için RD1-ELISPOT testinin *M. tuberculosis* enfeksiyonu tanısında duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi mümkün değildir. Bunun yanında İngiltere'de 2001 yılında bir okulda kaviter TB'li bir ortaokul öğrencisi ile temas olan öğrencilerde TB enfeksiyonunun belirlenmesi için yapılan bir salgın araştırmasında 1128 öğrencinin 69'unda TB hastalığı, 254'ünde ise TDT ile *M. tuberculosis* enfeksiyonu tespit edilmiş, incelenen 550 çocuğun 467 (%87.3)'sinin BCG aşı olduğu, 380 (%71.1)'inin TDT-negatif, 155 (%29.9)'inin TDT-pozitif olduğu gözlenmiştir. RD1-ELISPOT testi TDT ile karşılaştırıldığında indeks olguya yakınlık ve temas derecesi ilişkisini RD1-ELISPOT testinin daha iyi belirlediği bulunmuştur^[16]. Çalışmamızda sağlık çalışanlarında enfeksiyon sıklığı TDT ile %60 (20 kişinin 12'sinde), RD1-ELISPOT testi ile %50

(20 kişinin 10'unda) olarak belirlenmiştir. Bu oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Bunun nedeni düşük olgu sayısı olabilir. Onbir mikrobiyoloji teknisyeninin dokuzunda TDT ile yedisinde RD1-ELISPOT testi ile enfeksiyon saptanması dikkat çekicidir. Bu durum hastanemiz laboratuvar koşullarının ülkemizin çoğu hastanesinde olduğu gibi TB korunma önlemleri açısından yeterli standartlara sahip olmaması ile açıklanabilir. Çalışmamızda ayrıca TDT ile RD1-ELISPOT sonuçları 20 kişinin 18'inde birbiriyle uyumlu bulunmuştur. TDT pozitif bulunan iki mikrobiyoloji teknisyeninin RD1-ELISPOT testi negatif bulunmuştur. TDT endüryasyon çapları sırasıyla 16 ve 18 mm olan bu kişilerde negatif RD1-ELISPOT reaksiyonu olması, bu kişilerin TDT reaksiyonlarının çevresel mikobakterilere bağlı yalancı pozitif bir reaksiyon olabileceğini düşündürmektedir. TB hastalığı ve latent TB enfeksiyonu tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü TDT'den daha yüksek olan RD1-ELISPOT testinin sağlık çalışanlarında latent enfeksiyonun belirlenmesinde üstünlüğü büyük olgu sayıları içeren çalışmalarla ortaya konulduğu takdirde gereksiz tedavi uygulamalarının önüne geçileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Barret-Connor E. The epidemiology of tuberculosis in physicians. JAMA 1979;241:33-8.
2. Sepkowitz KA. AIDS, tuberculosis and the health care worker. Clin Infect Dis 1995;20:232-42.
3. Kantor HS, Poblete R, Pusateri SL. Nosocomial transmission of tuberculosis from unsuspected disease. Am J Med 1988;84:833-8.
4. Michele TM, Cronin WA, Graham NM, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by a fiberoptic bronchoscope: Identification by DNA fingerprinting. JAMA 1997;278:1093-5.
5. Agerton T, Valway S, Gore B, et al. Transmission of a highly drug-resistant strain (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*: Community outbreak and nosocomial transmission via a contaminated bronchoscope. JAMA 1997;278:1073-77.
6. Catanzaro A. Nosocomial tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1982;125:559-62.
7. Fine PE, Bruce J, Ponnighaus JM, et al. Delayed-type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. Lancet 1994;344:1245-9.
8. Fine PE, Bruce J, Ponnighaus JM, et al. Tuberculin sensitivity: Conversion and reversions in a rural African population. Int J Tuberc Lung Dis 1999;3:962-75.
9. Kwamanga DO, Swai OB, Agwanda R, et al. Effect of non-tuberculous mycobacteria infection on tuberculin results among primary school children in Kenya. East Afr Med J 1995;72:222-7.
10. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993;17:968-75.

11. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, et al. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995;154:3359-72.
12. Brandt L, Oettinger T, Holm A, et al. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1996;157:3527-33.
13. Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun* 1997;65:2587-92.
14. Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 1997;175:1251-4.
15. Lalvani A, Pathan AA, McShane pH, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T-cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:824-8.
16. 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.
17. Lalvani A, Nagvenkar P, Udhwadia Z, et al. Enumeration of T-cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001;183:469-77.
18. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T-cells. *AIDS* 2002;16:2285-93.
19. Richeldi L, Ewer K, Losi M, et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:288-95.
20. Cuhadaroglu C, Erelel M, Tabak L, et al. Increased risk of tuberculosis in health care workers: A retrospective survey at a teaching hospital in Istanbul, Turkey. *BMC Infectious Diseases* 2002;2:14.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health care facilities. *MMWR* 1994;43(No. RR-13):1-32.
22. Barrett-Connor E. The epidemiology of tuberculosis in physicians. *JAMA* 1979;241:33-8.
23. Camis BC, Bock N, Watkins DL, et al. Acceptance of isoniazid preventive therapy by health care workers after tuberculin skin test conversion. *JAMA* 1996;275:1013-5.
24. Geiseler PJ, Nelson KE, Crispen RG. Tuberculosis in physicians: Compliance with preventive measures. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:3-9.
25. Vogeler DM, Burke JP. Tuberculosis screening for hospital employees: A five year experience in a large community hospital. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:227-232.

Yazışma Adresi:

Uzm. Dr. Ahmet SOYSAL
Marmara Üniversitesi Hastanesi
Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı
Tophanelioğlu Caddesi
Altunizade-İSTANBUL
e-mail: ahsoysal@yahoo.com

Makalenin Geliş Tarihi: 07.04.2005

Kabul Tarihi: 26.07.2005