

Laboratuvarımızda Hazırladığımız Enzim-Bağlı-İmmün Assay (ELISA) Kitleri ile Tüberkülozda IgG Yanıtının Araştırılması

F. Nur Eriş¹, Nuran Yuluğ², Selma Öztürk³

¹ İzmir Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi, Bakteriyoloji Laboratuvarı, İzmir

² Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

³ TÜBİTAK-MAM, Moleküler Biyoloji ve İmmünoloji, Gebze, Kocaeli

ÖZET

ELISA tekniği güvenilir, basit ve tekrarlanabilir tanı yöntemi olarak serolojide yerini almıştır. Bu tekniğin tüberkülozun serolojik tanısında ne oranda etkili olabileceğini kendi laboratuvar koşullarımızda hazırladığımız kitler ile 3 ayrı antijen (BCG,PPD, Sonikat) kullanarak saptamaya çalıştık.

Çalışmada deney grubu olarak akciğer tüberkülozu tanısı konmuş 68 hastadan elde edilen serum örnekleri kullanıldı. Kontrol olarak 20'si gönüllülerden 10'u kordon kanından olmak üzere PPD(+) ve PPD(-) 2 grup deneye alınmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarının IgG düzeylerinin ortalama absorbans değerleri arasında anlamlı fark tespit edildi. ELISA testlerimizin ortalama duyarlılığı %65, özgüllüğü ise %95 olarak saptandı. Her üç antijenle de olgular arasında, antikor yanıtı açısından korelasyon gözlemlense de ayırım çizgisinin üstünde kalan olgularda kullanılan antijene göre farklılıklar gözlenmektedir. Oranlar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde olduğu saptandı (P<0.05).

Sonuçlar ELISA'nın duyarlılığı, özgüllüğü, basitliği ve hızı nedeni ile tüberkülozun tanısında yardımcı olarak kullanılabileceğini, ayrıca kullandığımız üç antijenin ortak dominant epitoplar içerdiğini düşündürmektedir. Çalışmada kullandığımız tüberküloz antijenlerinin ortak yapısının açıklaması ise ileri çalışmaları gerektirmektedir.

Toraks Dergisi, 2000;1:35-40

Anahtar sözcükler: Tüberküloz, enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), humoral yanıt, sodyum dodecil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE)

ABSTRACT

The Investigation of IgG Response by Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) Kits Prepared in Our Laboratory in the Patients with Tuberculosis

ELISA has become an important technique in serology since its simple, reliable and reproducible method. We tried to detect the efficiency of ELISA in the diagnosis of tuberculosis and applied the kits which were prepared in our laboratory by using 3 different tuberculosis antigens (BCG, PPD, Sonicate).

We used the sera of 68 pulmoner tuberculosis patients. We had two control group as PPD(+) and PPD (-) with 20 volunteer participants and 10 cord blood sera.

There was significant difference between mean absorbance values of IgG levels of the patient and control groups. The correlation between cases was seen, but the number of case above cut-off levels varied with different kinds of antigens. The average sensitivity of the tests were found between 65%, the specificity as 95%. The difference between these rates were statistically significant (P<0.05)

Our results indicate ELISA can be used in diagnosis of tuberculosis as a supplementary tool because of its sensitivity, specificity, simplicity and rapidity and that all three antigens share dominant epitopes which need further investigation and evaluation.

Key words: Tuberculosis, enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), humoral response, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Yazışma adresi: Dr. F. Nur Eriş, PhD
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı
Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Hastanesi, Bakteriyoloji Laboratuvarı Yenisehir/ İzmir; Tel: 0.232.4333333/137; Faks: 0.232.2587262 (iş)
E-posta: nureris@usa.net
Faks: 0.232.2480044 (ev)

GİRİŞ

Tüberküloz (TB) tanısında, doğrudan yapılan mikroskopla inceleme az sayıda basil içeren muayene maddelerinde olumsuz sonuç vermekte, kültür işlemi de uzun zaman almakta ve her zaman olumlu sonuç vermemektedir. Bunun dışında, tüberkülozla ilgili moleküler tekniklerin pek çoğu ülkemizde düzenli bir şekilde uygulamaya girebilecek kolaylıkta olmayıp bir kısmı oldukça pahalı ve karmaşık teknik gerektirmektedir. Bu nedenle, bütün olumsuzluklara rağmen bu hastalığın tanısında da serolojiye gereksinim olduğu düşüncesi ile öteden beri bu yönde araştırmalara yön verilmiştir [1-4].

TB’de serolojik yöntemlerin kullanılmasını kısıtlayan en önemli etken bu testlerin özgüllüklerinin düşük olmasıdır. Bunun en önemli nedeninin de çevrede yaygın mikobakterilerin çapraz reaksiyon vermesi olduğu bildirilmektedir [3,4]. TB serolojisi ile ilgili anlamlı ilerlemeler 1980’li yıllarda kaydedilmiştir [4-6]. Son 15 yılda değişik antijenler, özellikle enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak denenmiştir. Genellikle testin tüberkülozda duyarlılığı %60’ın, özgüllüğü %90’ın üzerinde bildirilmektedir [3-8]. Ülkemizde çok sayıdaki tüberkülozlu hastaya karşılık, TB’de bağışık yanıt ile ilgili yapılan deneysel çalışmalar çok sayıda görülmemekte, ancak TB serolojisi ile ilgili yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır [7-13]. Çalışmamızda, farklı dönemlerde TB’li olgularda, 3 ayrı antijenle kendi laboratuvar koşullarımızda hazırladığımız ELISA ile spesifik IgG aramayı ve ulaşılan değerleri kontrollerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bakteriyojik yöntemlerle karşılaştırıldığında ELISA’nın daha kolay ve çabuk olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda ELISA’nın tüberküloz tanısına ne oranda katkısı olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Mikrobiyolojide immunoblot yöntemleri ile gözlenen antikor profilleri birçok hastalığın tanısını koymada ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Proteinleri nitrosellüloz membrana transfer etmeden önce poliakrilamid jelde yürütmek ve ayırmak, bundan sonra transfer etmek uygun bir yöntemdir [14,15]. Çalışmamızda bu nedenle kullandığımız ham antijenlerin protein bantlarını incelenmiş karışım halinde bulunan proteinlerin birbirinden ayrılabilmesi için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Böylece kullandığımız 3 antijenin birbirine benzerliğini göstermek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve kontrol serumları

Bu çalışmamız, Mayıs 1998-Ocak 1999 tarihleri arasında yapılmıştır. Hastalarımız yeni tanı almış, 3 aylık, kronik, es-

ki hasta grubu olmak üzere olmak üzere seçilmiş ve araştırmamız toplam 68 hasta ve 30 kişilik kontrol grubu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Olgularımızın 26’sı kadın (%38) 42 ‘si (%62) erkek olup yaşları 18-68 arasında (ortalama 54) dır. Çalışmada kullandığımız kan örneklerimiz, Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Göğüs Hastalıkları Kliniği ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı tarafından kesin akciğer tüberkülozu tanısı konmuş kişiler ile başta Kahramanlar Dispanseri olmak üzere Bornova, Konak ve Balçova Dispanserlerinde takip edilen olgulardan ve sağlıklı kişilerden 10’ar ml düz tüple alınmıştır. Kontrol grubu 15 PPD pozitif, 15 PPD negatif olgulardan oluşturulmuştur. İzmir Konak Doğumevinde normal doğum yapan kadınların doğum sırasında kordon kanlarından elde edilen 10 olgunun serumları PPD negatif grup içinde kullanılmıştır.

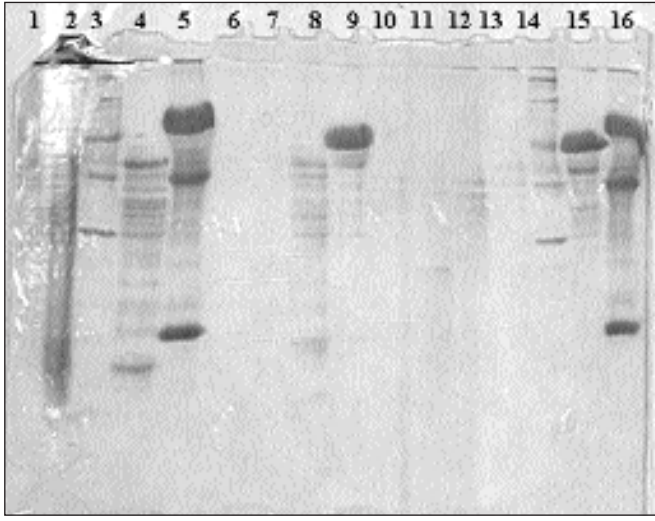
Antijen Hazırlanışı

ELISA plakları BCG (aşı flakonu), PPD (deri testi flakonu), standart kültür bakterisi sonikat antijeni (M.tuberculosis’nin H37Rv -ATCC 27294 suşundan sonifikatör(Vibra cell TM) ile elde edilen antijen) olmak üzere 3 çeşit antijenle kaplanmıştır. Farklı antijenlerle kaplı plaklar eş zamanlı çalışılmıştır.

Antijenlerden BCG doğrudan buna karşılık kültür bakterisi antijenini sonifikasyona, PPD’i ise liyofilize edildikten sonra kullanılmıştır. Protein değerleri Folin-Lowry yöntemi ile saptanmıştır [16-19]. Sonikat antijen ve BCG ölçülebilir değerlerin üstünde ve PPD de istenilen değer altında bulunduğu için dilüsyon ve konsantrasyon (PPD için liyofilizasyon- Snijders 2040) işlemlerinden sonra tekrar protein değerlerine bakıldı.

SDS-PAGE

İlk sonifikasyon işlemlerinden sonra ve PPD için liyofilizasyon işlemini gerçekleştirilmeden önce eldeki ham malzeme ile ilk SDS-PAGE yapıldı (Resim 1). Daha sonra liyofilizasyon, sonifikasyon ve uygun dilüsyon ve konsantrasyon işlemleri tamamlanıp plak kaplanacak antijenler ile ikinci SDS-PAGE yapıldı (Resim 2). SDS-PAGE’de kilodalton (kDa) cinsinden molekül ağırlıkları bilinen standartlar kullanıldı. 78 kDa transferin, 13.7 kDa ribonükleaz A, 45kDa ovalbümin, 29kDa karbonik anhidraz, 67 kDa sığır serum albumin belirleyici proteinler olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, genelde kullanılan iki farklı akrilamid konsantrasyonu içeren sistem kullanılmış [16] ve antijenlerimizin protein bantları görüntülenmiştir (Resim 2). Her bir şeritte 30 µg ve tüm blokta 150 µg olacak şekilde örnekler sulandırılmış ve boya ilavesi ile görüntü gerçekleştirilmiştir (Resim 2).



Resim 1. Tüberküloz antijenlerinin protein bantları görülmektedir

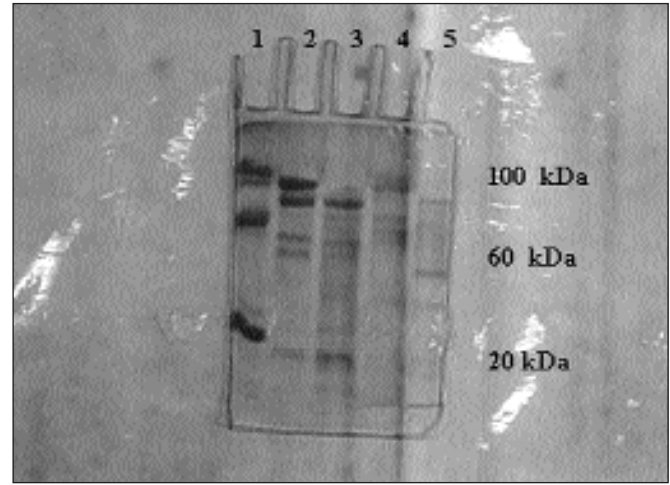
ELISA

ELISA deneyimiz için sonifiye antiyeni, liyofilize PPD ve BCG dietanolaminsodyum karbonat tamponu (DEAB) ile (pH=9.6) 10 l/ml miktarında sulandırılmıştır. Optimal miktarlarda sulandırılan antijenler polystiren ELISA plaklarına 100 l/ml dağıtılıp 37 C° 1 saat bekletildikten sonra +4 C° 48 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda yıkama solüsyonu (0.1 M fosfat tamponlu su (PBS) pH=7.2+ %0.5 Tween 20) ile 5 kez yıkanmıştır. Antijen kaplı plaklara PBS'de %5 sığır serum albümini konup oda ısısında 1 saat bekletilip tekrar 5 kez yıkanmıştır. Enzimli anti-immunoglobulin olarak alkalen fosfataz işaretli Sigma marka anti-insan IgG, PBS+%0.5 BSA+%0.5 Tween 20 solüsyonunda 1:2000 oranında DEAB ile sulandırılıp 100 l miktarında plaklara konulup oda ısısında 2 saat bekletilmiştir. Tekrar 5 kez yıkanmanın ardından substrat olarak %10 dietanolamin tamponu ile 1 mg/ml miktarında sulandırılan 4-p-nitrophenyl phosphate 100 l/ml konulmuştur. 37 derecede yarım saat inkübas-yondan sonra 2N NaOH'den 50 l konularak reaksiyon durdurulmuştur. Sonuçlar ELISA spektrofotometresinde(SO-RIN) 405 nm'de okutulmuştur [8,9, 19-25].

Sonuçların Değerlendirilmesi

Ayrım değeri (Kritik değer-cut-off) : Kontrol grubunun ortalama optik dansite değeri $\pm 2SS$ (standart sapma) şeklinde hesaplandı. Bu değerin altındakiler negatif, üstündekiler pozitif olarak değerlendirildi. Ayrıca deney sonuçları görsel olarak da kontrol edildi.

Çalışmamızda verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümünde yapıldı. Verilerin analizi için SPSS(Statistical Package for Social Science) for Windows 6.0 yazılı-



Resim 2. BCG, PPD ve Sonikat antijenleri protein bantları görülmektedir.

mı kullanıldı. İstatistik analizlerimizde $\alpha=0.05$ anlam düzeyinde korelasyon ve sonrasında regresyon analizi uygulandı. Gruplar arasında ortalama düzeyler tek yönlü varyans analizi ile ve sonrasında Scheffe testi ile yapıldı.

BULGULAR

SDS-PAGE

ELISA mikropalaklarının kaplanması için kullanılan antijenler %12'lik poliakrilamid-SDS jel elektroforezinde yürütüldükten sonra her üç antijende hakim bantlar belirlendi.

SDS-PAGE ile edilen protein bantları Resim 1 ve Resim 2'de görülmektedir. Resim 1'de gözlenen SDS-PAGE'de üç ayrı protein standart kompleksi ikişer kez kullanılmıştır. Birinci şeritte 78, 45, 13,7 kDa ağırlığında belirteç, daha sonra sırasıyla 10 g protein antijen+10 µg tampon+10 µg fosfat tampon ile hazırlanmış PPD, sonikat, BCG gözlenmektedir. Protein standartları sırasıyla 13.7-45-78 kDa, 29-67 kDa, 205-116-97-67-45-29 kDa bantları içermektedir. (1,2,3). Protein bantları ile 12,13,14. bantlar standart olarak kullanılmıştır. Resim 1'de gözlenen 10, 11 bantlar PPD bantları olup liyofilizasyondan önce düşük konsantrasyonda oldukları için silik görüntü vermiştir. Sonikat bantları olan 6 ve 7. bantlar yine düşük konsantrasyonlarda silik gözlenmektedir.

Her 3 antijenin (BCG PPD ve sonikat) de %10 poliakrilamid-SDS jel elektroforezinde birbirine benzer moleküler ağırlıkta protein bantları oluşturdukları saptanmıştır.

Ayrım değeri çizgileri BCG, PPD ve sonikat antijen ile sırasıyla 0.852, 0.304, 0.783 optik dansite (O.D.) olarak belirlenmiştir. Hasta spesifik IgG ortalaması 0.803 ile 0.922 O.D. arasında gözlenirken aynı işlemlerin sonucunda kont-

Tablo 1. TB-IgG yanıtı (405 O.D)

	Sayı	BCG-ELISA IgG-Ortalama	PPD-ELISA IgG-Ortalama	SonikatELISA IgG-Ortalama
Yeni olgu	20	0.765	0.636	0.903
3 aylık olgu	18	0.861	0.607	0.947
Kronik	24	0.828	0.691	1.215
Eski TB	6	0.757	0.230	0.621
Hasta ort.	68	0.803	0.541	0.922
Kontrol PPD+	15	0.481	0.217	0.373
Kontrol PPD-	15	0.273	0.158	0.258
Kontrol Ort.	30	0.377	0.188	0.316

rol grubunu IgG yanıtı 0.188- 0.377 O.D. değerlerinde olduğu görülmektedir (Tablo 1).

BCG antijeni ile alınan sonuçlar

Bu grup ile ilgili veriler Tablo 1,2 ve Grafik 1,2'de verilmektedir. Burada 68 hastanın 20'si ile bir PPD (+) olgu ayırımı değerinin üstünde sonuç vermiştir. Bu şartlarda duyarlılık %28, özgüllük %97 olarak bulunmuştur.

PPD antijeni ile alınan sonuçlar

Bu grup ile ilgili veriler Tablo 1, 2 ve Grafik 1, 2'de verilmektedir. Burada 68 hastanın 62'si ile bir PPD (+) olgu ayırımı değerinin üstünde sonuç vermiştir. Bu şartlarda duyarlılık %95, özgüllük %97 olarak bulunmuştur.

Sonikat antijeni ile alınan sonuçlar

Bu grup ile ilgili veriler Tablo 1,2 ve Grafik 1,2'de verilmektedir. Burada 68 hastanın 46'sı ile iki PPD (+) kontrol olgu ayırımı değerinin üstünde sonuç vermiştir. Bu şartlarda duyarlılık %70, özgüllük %93 olarak bulunmuştur.

Hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel yönden anlamlı fark varken hasta gruplarının kendi arasında (eski hasta grubu dışında) ortalama absorban değerleri açısından istatistiksel yönden anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 1). Grafik 1'de hasta ve kontrol grupları karşılaştırılması görülmektedir. Genelde her iki (PPD+ ve PPD-) kontrol grubu

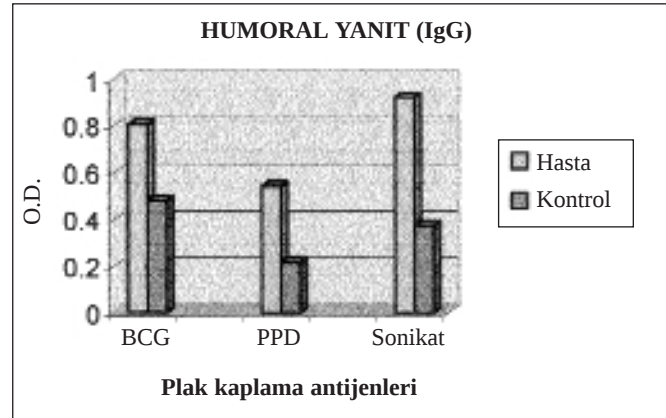
Tablo 2. TB ELISA duyarlılık ve özgüllük

	BCG-IgG	PPD-IgG	Sonikat-IgG
Ayırım çizgisi	0.852 O.D.	0.304 O.D.	0.783 O.D.
Duyarlılık	%28	%97	%70
Özgüllük	%97	%97	%93

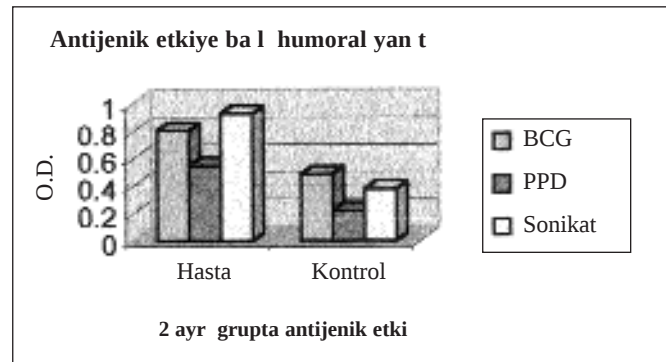
*Eski olgular değerlendirmeye alınmadı.

arasında absorban değerlerinde fark gözlenirse de bu BCG grubu dışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Ancak en yüksek absorban değer sapmaları kronik ve 3 aylık grupta gözlenmiştir. En fazla duyarlılık ve özgüllük (özgüllük: %97, duyarlılık: 97) PPD ile kaplı plaklarda gözlenmiştir. Tüm antijenler arasında karşılaştırıldığında testin duyarlılığı %28-97, seçiciliği ise %93-97 arasında değişmektedir (Tablo 2). BCG antijeni ile kaplı IgG -ELISA çalışmamızda her iki kontrol grubu istatistiksel yönden anlamlı olabilecek sonuçlar verdi. PPD IgG ile sonuçlarımızın gruplar arası karşılaştırılmasında, yeni, 3 aylık, kronik

olgu gruplarımızla kontrol ve eski hasta grubu arasında anlamlı farklılık ($P<0.05$) gözlemledik. Sonikat IgG ile sonuçlarımıza baktığımızda PPD IgG grubuna benzer şekilde kontrol grubu ile eski hasta olguları (6 olgu) dışında hasta olgular arasında anlamlı farklılık ($P<0.05$) bulunmuştur. Sonikat ve PPD-IgG'de eski hasta grubu kontrol grubuna benzer korelasyon göstermektedir. Grafik 2'de hasta grupları arası absorban farklılıkları görülmektedir.



Grafik 1. Hasta ve kontrol gruplarında IgG yanıtı



Grafik 2. Antijenik etkiye bağılı humoral yanıt

TARTIŞMA

TB-ELISA'nın özellikle balgam çıkaramayan akciğer TB'li ve akciğer dışı TB'li hastalarda yararlı bir tanı yöntemi olduğu düşünülmektedir. Ancak bugüne kadar TB-serolojisi ile yapılan çalışmalarla, serolojik tanıyı rutin kullanıma geçirecek duyarlılık ve özgüllük elde edilememiştir. Bu durum testte çapraz reaksiyonların varlığı, tüberküloz antijenlerinin çokluğu ve henüz hangi antijen veya antijenlerin daha doğru sonuç verdiğinin kesinlik kazanmamış olmasındandır. Ancak moleküler biyolojik teknikler kullanarak çok daha ileri adımlar atılmaya başlamıştır. Bunlardan en önemli bir tanesi de SDS-PAGE'dir. SDS-PAGE'nin kullanılması ile meydana gelen protein bantları spesifik proteinleri içermekte olup nitroselüloz bir membrana aktarılabilir. İzole edilen bu proteinler ELISA testi için kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda SDS-PAGE ile her üç antijenin 65 kDa ve 10 kDa'da daha belirgin olmak üzere ortak bantlar içerdiğini gözlemledik (Resim 2). Küçük bantların proliferasyon yanıtında, orta ve büyük protein bantlarının ise antikor oluşumunda önemli olduğu iddia edilmektedir [26].

Bu çalışma ile elde ettiğimiz sonuçlar ülkemizde [7-13], yabancı ülkelerde yapılan çalışmalarına uymaktadır [21-26]. Grupların ortalama absorbans değerleri incelendiğinde, kronik olgu grubunun absorbans değerinin ortalaması, yeni olgu ve 3 aydır sağaltım gören gruba göre daha yüksek görülmektedir. Buna da neden sıvısal immün yanıtın TB'de geç olarak ortaya çıkması olabilir. Bizim çalışmamızda eski hasta grubunda (2 yıldan önce sağaltım görmüş) antikor seviyesinin düştüğünü gözlemledik. BCG antijeni ile ise tüm hasta grupları ile her iki kontrol grubunun ayrı ayrı anlamlı ilişkisi vardır.

Bizim kullandığımız sonikat antijenimiz de Öztürk [8], Sümer [9] ve arkadaşlarının kullandığı gibi ham bir antijendir. Biz bu antijenle duyarlılığı %70, özgüllüğü %93 olarak bulduk. Sonikat antijen ile çalışan Öztürk ve arkadaşları IgG için duyarlılığı, ile %89.9; özgüllüğü %98.7, Sümer BSA ile duyarlılığı %96, özgüllüğü %93 jelatin bloklama ile sırasıyla %87, %81, Kıran ve ark.[5] %94, %88; Levy ve ark. [6] %70, %85 olarak bulmuşlardır. Rota ve Toksöz [7] ise Antijen 6 kullanarak akciğer tüberkülozunda ELISA ile duyarlılığı %73, özgüllüğü %85 bulmuşlardır. Aradaki farklar; antijenlerin elde ediliş yolu, kullanılan enzim ve substratların farklılığı, popülasyonun nispeten farklılığı ve istatistiksel yaklaşım ve kontrol grubunun seçimine yönelik farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bizim çalışmamız üç ayrı antijenle dört farklı hasta grubu ile çalışılması açısından önemlidir. Ayrıca duyarlılık ve özgüllük değerleri verilirken eski hasta grubu sayısının azlığı nedeniyle dikkate

alınmamıştır. Bu grupta (eski hasta) duyarlılık yüksek bulunmaktadır. ELISA'da kontrol edilmesi gereken değişkenler; katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan solüsyonlar ve reaksiyonların sonlandırma zamanıdır. Ayrıca hasta ile kontrol grubunun seçimi de sonuçları önemli oranda etkilemekte olup bu konuda asıl eksik olanın purifiye antijenden çok standardizasyonun gerçekleştirilememesi olduğu gözlenmektedir.

Bütün bu teknik ayrıntıların ışığında, Türkiye'de tamamen dışa bağımlı ürünlerle çalışan klinik laboratuvarların bu bağımlılıklarını sürdürmeleri de, bundan kurtulmaları da iki ucu keskin bıçak gibi görünmektedir. Tüm deney sistemlerinde standardizasyon, insandan kaynaklanabilecek hatayı azaltır ve emek harcamalarından tasarruf sağlar. Bu durum TB- ELISA'da kendini önemle göstermektedir. Ülkemizde çok sayıda TB-ELISA çalışması yapılmıştır. Ancak bu konuda son nokta konmamıştır. Dünya ülkeleri ise görünüme bakılırsa, belki de moleküler tekniklerle alternatifleri çok olduğu halde bile bu konuda çalışmalara devam etmektedir [1,2,25-27].

TB'nin serolojik tanısında mutlaka birden fazla serolojik yöntemin uygulanması, sonucun sağlıklı değerlendirilmesinde gerekmektedir. Spesifik ajanlara göre çeşitli ELISA test sistemleri geliştirilmiştir. Konu *Mycobacterium tuberculosis* olunca, bu etiyolojik ajana göre her konuda olduğu gibi test sistemi geliştirmek de oldukça güç olmaktadır. *M. tuberculosis*'in genomunun aydınlanması, *E.coli*'ye göre 20 yıl sonra mümkün olabilmesi ile karşılaştırılırsa, serolojideki yerini almasındaki bu gecikme doğal karşılanabilir [28]. Bu metodun birçok sorunları olabilir, fakat her safhadaki sorunları giderecek uygulamaların yapılması ile doğru test sonuçları elde edilecektir.

Sonuç olarak,TB-ELISA'nın sınırları ortaya konduktan ve ancak asido-resistan boyama ve kültür yöntemlerinin de mevcut olduğu koşullarda tanıya yardımcı bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca hastaların aşı sayıları ile kontrol grubundan 20 kişi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.Aşının koruyucu etkinliğinin ise rapellere rağmen düşük olabileceği düşünülmüştür. Ülkemiz koşullarında yetişkin çağında PPD'nin çok değerli bir tanı aracı olamayacağını ancak tanıya yardımcı bir test olarak kullanılabileceğini bir kere daha gözlemlemiş olduk [27,29-32].

TEŞEKKÜR : Bu çalışmamız sırasında yardım ve katkılarını esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Göğüs Hastalıkları ABD ile başta Kahramanlar Dispanseri olmak üzere diğer tüm dispanserlere teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Yoshikawa M, Yoneda T, Tsukaguchi K, Narita N. Diagnosis of mycobacterial disease by biochemical and immunological parameters. *Nippon Rinsho* 1998; 56: 3057-61.
- Kaustova J. Serological IgG, IgM and IgA diagnosis and prognosis of mycobacterial diseases in routine practice. *Eur J Med Res.* 1996; 1: 393-403.
- Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev Respir Dis.* 1987; 135:1137-1151.
- Saçılık S. Tüberkülozun serolojik tanısında son gelişmeler. *Mikrobiyol Bül* 1993; 27:85-8.
- Kıran U, Kumar R, Shrinivas A, Sharma A. Efficiency of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 1985; 66:187-90.
- Levy H, Feldman C, Wandee AA, Rabson AR. Differentiation of sarcoidosis from tuberculosis using ELISA. *Chest* 1988; 94: 1254.
- Rota S, Toksöz D. Pulmoner tüberküloz'un MTB sonike antijeni kullanarak ELISA ile serolojik tanısı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 1993; 23: 28-30.
- Sümer Z. Tüberkülozun sonike edilmiş antijeni ile laboratuvarımızda kendi geliştirdiğimiz kit ile TB'un serolojik çalışması. Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas; 1998.
- Öztürk R. Mikobakterilerin sonike edilmiş adsorbe antijeni ve purifiye protein derivesi kullanarak ELISA ile akciğer tüberkülozunun serolojik tanısı. *Enfeksiyon Derg* 1993; 23:84-90.
- Baran R, Kula Ö, Bayrak N. Tüberküloz plörezisinin tanısında mikobakteriyel Antijen60'ın Tanı değeri, *Enfeksiyon Derg.* 1995; 9: 103-106.
- Durupınar B, Yanbeyi S, Leblebicioğlu H. Tüberkülozun serolojik tanısında ELISA testinin önemi. *Mikrobiol Bül.* 1992; 26: 338-43.
- Dogan UB, Aksu HS. Serodiagnostic value of ELISA in pulmonary tuberculosis in Turkey where tuberculosis is highly prevalent. *Respiration* 1997; 64: 73-75.
- Saçılık S. Aktif akciğer tüberkülozu tanısında ELISA'nın önemi. *Enfeksiyon Dergisi*, 1991;5(1): 27-9.
- Akoğlu S, Sayan M, Uçan ES ve ark. A60'a karşı IgG, IgM ve IgA'nın tüberkülozun serolojik tanısındaki değeri. *Tüberküloz ve Toraks Derg* 1999;47:179-188.
- Wilson CM. Staining of proteins on gels, comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol* 1983; 91:236-247.
- Saçılık SC, Altanlar N, Çökmüş C. Mikrobiyolojide Protein blotting (Transfer) ve Uygulamaları. *Türk Mikrobiol Cem Derg* 1999; 29:11-16.
- Lowry OH. Lowry method, a modification of the Folin method based on the presence of tyrosine and tryptophan in proteins. *J Biol Chem* 1951;193: 265-6.
- Warburg O, Christian W. Ultraviolet absorption at 280/260 nm after removal of nonprotein by fractionation. *Biochem.* 1951;193: 384-5.
- Evenson MA. Photometry. In Burtis CA, Ashwood ER; eds. *Tietz Fundamental of Clinical Chemistry*, 4th ed. London: W.B. Saunders; 1996: 54-70.
- Daniel TM, Graciella LM, Sawyer JA, et al. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 124: 662-5.
- Thongkrajai P, Lulitanon V, Chamnanvanakit C, Improved ELISA with immunosorbent-purified antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1989; 30; 101-4.
- Alifano M, De Pascalis R, Sofia M, Faraone S et al. Detection of IgG and IgA against mycobacterial antigen A60 in patients with extrapulmonary tuberculosis. *Thorax* 1998; 53: 377-80.
- Al Hajjaj Ms, Gad-el-Rab, MO, Al-Orainey, IO, Al-Kassimi FA. Improved sensitivity for detection of tuberculosis cases by a modified And-TB ELISA test. *Microbiol* 1999; 79: 181-5.
- Khomenko AG. Serodiagnosis of tuberculosis, detection of mycobacterial antibodies and antigens. *Tubercle and Lung Disease* 1996;77:510-5.
- Basey EO, Life PF, Catty D. T cell response to mycobacterial proteins: a comparative study of tuberculous and control immunoblots of Mycobacterium tuberculosis and M.bovis BCG. *Tubercle and Lung Disease* 1996; 77: 146-53.
- Sieminska A, Wolska-Goszka L, Slominski JM. Evaluation of the correlation between the level of IgG antibodies against mycobacterial A60-antigen and tuberculin reactivity in persons without a history of tuberculosis and in active tuberculosis patients. *Pol Arch Med Wewn* 1998;100: 426-30.
- Cole ST, Broch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genom sequence. *Nature* 1998;393: 537-44.
- Levent E, Ekim NN, Nadirler F. Genç erişkinlerde akciğer tüberkülozuna karşı BCG aşısının koruyucu etkinliği. *Tüberküloz ve Toraks Derg.* 1999;47: 189-99.
- Lao LY, De Guia T, Tuberculin skin testing: determinants and reaction. *Respirology* 1999;4: 311-7.
- Öğüş C, Zebekoğlu E, Artvinli M. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencileri arasında tüberkülin testi taraması, *Tüberküloz ve Toraks* 1996; 44: 198-202.
- Saraç S, Sancı N, Yürten G, ve ark. PPD reaksiyonu ile serum protein düzeyinin akciğer tüberkülozunun yaygınlığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.1997; 3: 41-3.