

ESAT-6/CFP-10 BAZLI ELISPOT TEKNİĞİNİN TUBERKÜLOZ TANISINDAKİ YERİ

Prof. Dr. Ayşegül YAĞCI

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Dünya Sağlık Örgütü 2002 yılı raporunda , 2000 yılı için tuberküloz basiliyle infekte 3.6 milyon yeni olgu bildirmektedir ve olguların 1.5 milyonu yayma pozitifdir, yani çevrelerindeki diğer kişileri infekte etme ihtimalleri yüksektir(1). Dünyada tuberküloz hastalarının %80' i 22 ülkede barınmaktadır ve insidansın en yüksek olduğu ülkeler Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika' dır (2). Dünya nüfusunun üçte birini infekte eden bu bakteri , yılda yaklaşık 2 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda yüzbinde 20' den az iken , Türkiye' deki hastalık insidansı 2000 yılında Verem Savaş Dispanserlerine kayıtlı hastalara göre hesaplanıldığında yüzbinde 27' dir(2). Tuberkülozla infekte hastadan sağlam kişilere M. tuberculosis hava aracılığıyla yayılmaktadır ve hasta ile yakın ve uzun süreli teması olanlarda daha yüksek oranda bulaşma görülmektedir. Kesin tanı için uygun mikrobiyolojik yöntemlerle etkeni saptamak gerekir. Tanıda en hızlı, en ucuz yöntem basilin mikroskop ile saptanması, altın standart ise kültürde üretilmesidir. M. tuberculosis ile infekte bireylerin çoğunda infeksiyonun latent kaldığı ve bu bireylerin %10 'unda aktif hastalık gelişebileceği bilinmektedir(3). Dünya nüfusunun üçte birinin latent olarak infekte olduğu düşünülürse , bu durumun yeni olgular için ne büyüklükte bir kaynak oluşturabileceği tahmin edilebilir. Bu bireylerin hangilerinin ve ne zaman hastalık geliştireceğinin tahmini ise güçtür. Robert Koch'un 1800'lü yıllarda M. tuberculosis kültür filtratını ısı ile inaktive ederek elde ettiği tuberkülini deri içine uygulayarak geliştirdiği PPD(purified protein derivatives) deri testi halen infeksiyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan tek testtir. PPD içinde yer alan proteinler molekül ağırlığı 10.000 daltonu geçmeyen düşük molekül ağırlıklı proteinler olup, mikobakteri ile infekte olmayan bireylerde reaksiyon oluşmamaktadır. PPD antijenlerinin verilmesi gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmaktadır. Yoğunluğu 0.1mg / 0.1 ml, 5 standart tuberkülin ünitesinin deri içine enjeksiyonu sonrası, önceden duyarlılaşmış T lenfositleri varlığında enjeksiyon yerinde salınan lenfokinler, antijen enjekte

edilmesinden en erken 24 saat sonra zirve yapan endürasyon, vezikülasyon ile karakterize deri reaksiyonuna neden olurlar. Deri testi eğitimli sağlık çalışanları tarafından 48 - 72 saat sonra değerlendirilerek reaksiyon yerinde oluşan endürasyon ölçülür. Maliyetin düşüklüğü ve özel ekipman gerektirmemesi nedeniyle PPD testi epidemiyolojik olarak latent *M. tuberculosis* infeksiyonunun taranması ve kliniklerde aktif tuberküloz infeksiyonunun tanısında kullanılmaktadır. PPD testinin en büyük dezavantajı PPD antijenlerinin *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG ve tuberküloz dışı mikobakterilerle ortak antijenler içermesi ve BCG aşı uygulamasının ve tuberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonlarının yaygın olduğu yerlerde özgüllüğünün azalmasıdır(3,4). Aktif tuberkülozlu hastalarda %75- 90 duyarlılık gösteren testin duyarlılığı yaygın hastalıkta %50' ye inmektedir. Dünya nüfusunun çoğu BCG ile aşılandır ve BCG etkisi aşından 15 yıl sonra devam edebilmektedir (5). Bu nedenlerle BCG ile çapraz reaksiyon vermeyecek antijenlerin arayışına gidilmiştir. Latent *M. tuberculosis* infeksiyonunda humoral immun cevap genellikle zayıf olduğundan, hücrel immun cevabın hedefi olabilecek antijenler araştırılmıştır. *M. tuberculosis* H37Rv ,*M. bovis* ve BCG suşlarının genomlarının kıyaslanmasıyla region of difference(RD) adıyla tanımlanan 16 ayrı bölge belirlenmiştir . *M. bovis*' de RD1 bölgesi 1921' de in vitro kültürlerde kaybolmuş olup, BCG aşı suşlarında ve çevresel mikobakterilerde bulunmamakta, *M. tuberculosis* kompleksinde bulunmaktadır(6). Andersen ve ark tarafından tanımlanan iki düşük molekül ağırlıklı antijen ESAT-6 (early secretory antigenic target) ve CFP-10(culture filtrate protein) RD1 bölgesinde kodlanmaktadır. Bu antijenler *M. tuberculosis* kültür filtratlarından saflaştırılmış olup *M. tuberculosis* kompleksi (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) ve bazı atipik mikobakterilerde (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens*, *M. marinum*) suşlarında eksprese edilmekte, ancak *M. bovis* BCG suşlarında ve çevreden izole edilen mikobakterilerin çoğunda bulunmamaktadır (7,8). Tuberküloz oluşturulmuş hayvan modellerinde interferon - salgılayan CD4+ T hücrelerinin hedefinin ESAT-6 proteini olduğu gösterilmiş ve tuberkülozlu hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinin ESAT-6 ile uyarılması ile ELISA ile saptanabilen interferon - düzeyleri tespit edilmiştir(9-11). Bu veriler kanda dolaşan ESAT-6' ya özgül T hücrelerinin *M. tuberculosis* infeksiyonunu işaret edebileceğini düşündürmüş ve ELISPOT (enzim-bağılı immunospot) yöntemi ile perifer kanından interferon - salgılayan T hücrelerinin sayısının belirlenmesinin tuberkülozda tanı koydurucu olabileceği hipotezi

geliştirilmiştir. Dr. Lalvani ve ekibinin gerçekleştirdiği bu öncü çalışmada aktif tuberkülozlu hastaların %96'sında ELISPOT pozitif bulunurken, kontrol gurubunun %92' sinde negatif bulunmuş ve BCG ile aşıllı kontrol gurubunda ELISPOT pozitifliği gösterilmediğinden M. tuberculosis enfeksiyonu ile BCG aşılmasını ayırdetmek için kullanılabilecek bir yöntem olduğu bildirilmiştir(12).

Ticari olarak 2 interferon - testi bulunmaktadır; Quantiferon- TB testi(Cellestis Limited, Victoria, Avusturalya) ve T SPOT-TB testi (Oxford Immunotec, Oxford, İngiltere). Bu yöntemlerde ELISA ve ELISPOT (enzim-bağılı immunospot) teknikleriyle T hücrelerinden salınan interferon - ölçülerek hücrel bağışıklık değerlendirilmektedir. Yeni kuşak Quantiferon-TB gold testi ile tam kanda ESAT-6 ve CFP-10 antijenleri kullanılarak interferon - yanıtı ölçülmekte, ELISPOT testinde de aynı antijenler kullanılmakta, ancak test için tam kan değil periferik kan mononükleer hücreleri gerekmekte ve interferon - üreten T hücrelerinin sayısı belirlenmektedir. T-SPOT testi şu şekilde gerçekleştirilmektedir:

- Hasta kanı santrifüj edilerek periferik kan mononükleer hücreler ayrılır.
- Sıvı besiyerinde yıkanan mononükleer hücreler (2.5×10^5 /çukur) 96- çukurlu plaklara dağıtılır. Plaklar efektör T hücrelerinin özgül antijenle temasında salınacak olan interferon - 'ya karşı antikorla kaplıdır.
- Çukurlara ESAT-6 , CFP-10, fitohemaglütinin(pozitif kontrol), ve 6 ayrı peptid, eklenir ve plak bir gece 37C' de CO₂ ' li etüvde inkübe edilir. Negatif kontrol çukuruna antijen eklenmez.
- Ertesi gün plaklar iyice yıkanır ve enzim-işaretli ikinci antikor eklenir.
- Takiben kolorimetrik substrat eklenir ve oluşan noktalar sayılır. Gözle görülen her nokta antijenle etkileşen bir T hücresi anlamına gelmektedir.Negatif kontrol kuyucuğuna kıyasla >6 nokta sayılması İNFEKSİYON olarak değerlendirilir.

İnterferon - yanıtı ölçen testler invitro ortamda gerçekleştirilmektedir, derideki endürasyonun ölçümü gibi subjektif değildir ve hastanın bir kez gelmesi yeterli olmaktadır. Bu testlerin kullanım amaçlarını inceleyen çalışmalar değerlendirildiğinde testin kullanım alanları şöyle sıralanabilir:

1. Aktif tuberkuloz tanısında ve M. tuberculosis infeksiyonunun BCG aşılamaından ayırt edilmesinde

Aktif tuberkulozlu (yayma veya kültürle bakteriyolojik olarak doğrulanan) hastalarda duyarlılık yani aktif hastalığı olup da interferon - testi pozitif olan hastalar değeriendirildiğinde testin duyarlılığının %66 ile %96 arasında değıştiğı gözlenmektedir(12,13). PPD' nin antigen olarak kullanıldığı testlerde duyarlılık ESAT-6 ve CFP-10 un tek başına kullanıldığı testlere göre yüksek iken bu iki antijenin birlikte kullanılması durumunda duyarlılık daha da yükselmektedir. Tedavi altındaki hastalarda duyarlılık tedavi görmeyenlerden yüksektir. Aktif tuberkulozu olmayanlarda testin özgüllüğü yani hasta olmayıp, interferon - testi negatif olanlar araştırıldığında genellikle düşük tuberkuloz insidansı olan bölgelerde yaşayan,tuberkuloz öyküsü ya da tuberkuloz teması olmayan sağlıklı bireyler değeriendirilmiş olup özgüllüğün %95-100 oranında seyrettiğı görölmektedir. Endemik bölgelerdeki sağlıklı bireylerde latent infeksiyonun takibi açısından değeriendirildiğinde Hindistan gibi 1 milyar nüfusu olan ve her yıl yaklaşık 2 milyon yeni tuberkuloz olgusu bildirilen bir ölkede ELISPOT testi 100 bireyin 80'inde pozitif bulunmuş olup, popölasyonun %80'inin latent olarak infekte olduğı bildirilmiştir(14). ELISPOT testinin PPD ile karşılaştırıldığı çalışmalarda iki test arasındaki uyumun %66-82 oranında olduğı görölmektedir. İngiltere' de bir indeks olgudan kaynaklanan okul salgını çerçevesinde 535 öğrenci taranmış ve BCG ile aşılanmış çocuklarda PPD testi pozitifliğinin daha yüksek olduğı, ELISPOT test sonuçlarının ise BCG uygulanmasından etkilenmediğı, ELISPOT testinin tek başına pozitifliğinin M. tuberculosis ile teması gösterirken, tek başına PPD pozitifliğinin aynı şekilde yorumlanamayacağı saptanmıştır (15). İstanbul 'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise yayma pozitif 414 erişkin tuberkuloz hastasıyla temas eden 979 çocuk takip edilmiş ve PPD testi ile ELISPOT testi arasında %84 uyum bulunmuştur(16). Bu çalışmanın en çarpıcı bulgusu BCG aşısının çocukları tuberkuloz infeksiyonundan koruduğunun gösterilmesidir.

2. Tuberkuloz dışı mikobakteri infeksiyonlarının M. tuberculosis infeksiyonlarından ayırt edilmesi:

M. avium ile infekte hastalarda ESAT-6 testinin özgüllüğü %100 iken(hiçbir hastada pozitif sonuç saptanmamıştır), PPD testinin özgüllüğü %60'larda kalmıştır(17). M. marinum ve M. kansasii ile infekte hastalarda ise

ESAT-6, CFP-10 testi pozitifliği %70' lere inerken, PPD pozitifliği %90'a çıkmıştır(18). Bu antijenlerin *M. tuberculosis* kültür filtratlarından saflaştırılmış olup *M. tuberculosis* kompleksi (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) ve bazı atipik mikobakterilerde (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens*, *M. marinum*) suşlarında eksprese edilmesi nedeniyle bazı atipik mikobakteri infeksiyonlarında özgüllüğünün düştüğü söylenebilirse de bu infeksiyonların insidansının çok düşük olduğu da bilinmektedir.

3. Latent tuberküloz tanısı

M. tuberculosis ile temaslı, PPD testi pozitif, normal göğüs filmi olan, aktif hastalık belirtileri göstermeyen, semptomsuz bireylerde (ev teması, ya da salgın sırasında temas,vb) duyarlılık %80' lerde seyretmektedir(12, 14). Tuberküloz hastalarıyla teması olan 24 sağlıklı kişinin 2 yıl boyunca takip edildiği bir çalışmada aktif tuberküloz gelişen 7 kişinin 6'sı (%86) ESAT-6 testi pozitif bulunurken, tuberküloz gelişmeyenlerde bu oran (%18) olarak saptanmıştır(19). Bu çalışmada , hasta sayısı az olmasına rağmen, ESAT-6 testi pozitifliğinin aktif tuberküloz gelişmesiyle ilişkili olduğu savunulmaktadır.

4. Tedaviye yanıtın takibi

ESAT-6 pozitifliğinin tedaviyle ilişkisini inceleyen çalışmalar çelişkili sonuçlar ortaya koymuş olup tedavinin test pozitifliğini arttırdığı, azalttığı ya da etkilemediğini bildiren sonuçlar bulunmaktadır(11,14,20).

Sonuç olarak BCG aşılarında ve çevresel mikobakterilerle temas edenlerde yanlış pozitif çıkabilen, değerlendirmesi kişiye bağlı olup, aktif hastalıkta negatif çıkabilen, yaygın hastalıkta olguların sadece yarısını tanıyabilen PPD deri testine karşılık, ELISPOT testi duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, aktif hastalıkta yanlış negatif sonuç vermeyen bir testtir. Değerlendirme için ikinci kez gelmesine gerek kalmamakta, BCG aşılmasına bağlı yalancı negatif sonuçlar görülmemekte, gereksiz profilaksi ve buna bağlı toksisiteden hastaları korumaktadır. Latent infeksiyonun yaygın olduğu yüksek endemik ülkelerde, BCG aşılmasının yaygın olduğu ülkelerde ve tuberküloz dışı mikobakteri infeksiyonlarının yaygın olduğu ülkelerde yapılacak daha çok sayıda çalışmaya ihtiyacın olduğu da bir gerçektir.

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, çocuklarda, akciğer dışı ve çoklu ilaca dirençli tuberküloz olgularında, sağlık personeli gibi sık temas öyküsü olanlarda testin kullanılabilirliğinin detaylarıyla tanımlanması gerekmektedir. PPD deri testine göre ELISPOT testinin maliyeti yüksektir ve laboratuvar deneyimi gerektirmektedir. Ancak testin referans laboratuvarlarında çalışılması durumunda daha hızlı ve güvenilir sonuç alınması mümkün olduğu gibi, yanlış pozitif veya yanlış negatiflikleri ortadan kaldıran bir test tuberküloz gibi çok önemli bir sağlık probleminin tanısına büyük katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. WHO. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning,financing. Communicable diseases, World Healh organization, Geneva, 2002. WHO/CDS/TB/2002.295
2. WHO. Global DOTS plan. Progress in TB control in high burden countries, 2001. World Health Organization. WHO/CDS/TB/2001.11
3. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. N Eng J Med 2002; 347: 1860- 1866.
4. Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17: 968- 965.
5. Wang L, Turner M, Elwood R, Sculzer M, Fitzgerald J. A meta- analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test mesurements. Thorax 2002; 57: 804-809.
6. Behr M, Wilson M, Gill W, Salamon H, et al. Comperative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray. Science 1999, 284; 1520- 1523.
7. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of low molecular mass T cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1995; 63: 1710-1717.
8. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. Infect Immun 1996; 64: 16-22.
9. Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. J Infect Dis 1997; 175:1251-1254.

10. Brant L, Ottinger T, Holm A, Andersen AB, Andersen P. Key epitopes on ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1996; 157: 3527-3533.
11. Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1999; 179: 637-645.
12. Lalvani A, Pathan A, McShane H. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 824-828.
13. Cardoso FL, Antas PR, Milagres AS, et al. T- cell specific responses to *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients. *Infect Immun* 2002; 70: 6707-14.
14. Lalvani A, Nagvenkar P, Udwadia Z, et al. Enumeration of T cells specific for RD1 encoded antigen suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban indians. *J Infect Dis* 2001; 183: 469-477.
15. Eweer 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 scholl tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361: 1168- 1173.
16. Soysal A, Millington K, Bakir M, et al. Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community based story. *Lancet* 2005; 366: 1443-1451.
17. Mazurek GH, LaBue PA, Daley Cl,et al. Comparison of a whole blood interferon gama assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 2001; 286: 1740-1747.
18. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, et al. Tuberculin skin testing and invitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis* 2002; 186: 1797- 1807.
19. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contact of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 704-706.
20. Tulrichs T, Anding R, Kaufmann SH, Munk ME. Number of IFN-gamma producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 1181-1183.