

## TÜBERKÜLİNİN PÜRİFİYE PROTEİN DERİVESİ

### PURIFIED PROTEIN DERIVATIVE OF TUBERCULIN

Berrin GENÇER<sup>1</sup>

#### GİRİŞ

“Purified Protein Derivative of Tuberculin” (PPD Tüberkulin); kültürde üretilmiş olan bir veya daha fazla *Mycobacterium tuberculosis* suşunun ısıtılarak parçalanması ile elde edilen, suda eriyen protein yapısındaki ürünlerden sağlanan bir preparattır. Bu preparat aynı tür mikroorganizma ile duyarlı hale getirilmiş bir konağa intradermal olarak verildiğinde gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu meydana getirmektedir (1). PPD tüberkulin deri testi (Mantoux testi) tüberküloz enfeksiyonunu saptamak amacıyla bir asırdan fazla süredir kullanılan bir yöntemdir (2).

İlk kez 1890 yılında Koch tarafından bulunan “Old Tuberculin” kaynatılmış basil kültürlerinin bir özütüydü ve 1930 yılına kadar sağlıklı bireylerde *M.tuberculosis* varlığını araştırmada kullanıldı (2,3). “Old Tuberculin” ile yapılan çalışmalar; tüberküloz enfeksiyonlarını saptamak için daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip standart bir tüberkiline ihtiyaç olduğunu gösterdi. 1932’de Seibert; “Old Tuberculin”i önce triklor asetik asit ile çöktürerek daha saf bir ürün olan PPD tüberkulin’i elde etti. Daha sonra bu amaçla amonyum sülfatı kullanarak nükleik asit ve polisakkarit içeriğinin daha da azalmasını sağladı. Seibert ve Glen tarafından hazırlanan PPD tüberkulin 1941 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından “Standart Tüberkulin” (PPD-S) olarak kabul edildi (4).

1952 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün de onay vermesi ile, tüm tüberkulinler PPD-S’e

göre standardize edildi (5). 1961’de, tüberkulinin içinde saklandığı cam veya plastik kapların çepeline yapışmasını önlemek amacıyla tüberkulin solüsyonlarına stabilizatör olarak Tween 80 eklendi (6). 1968 yılında DSÖ bugün de geçerli olan “Tüberkulin Ünitesi”ni (TU) tanımladı ve gerektiğinde PPD tüberkulin ile ilgili standartları güncelleştirdi (3,7).

Bugün PPD tüberkulin deri testi:

- 1.Tüberkülozda tanı amacıyla,
- 2.BCG aşısı ve kemoprofilaksinin etkinliğini belirlemek için,
- 3.BCG aşısı ve BCG aşılama prosedürlerinin kontrolü için,
- 4.Epidemiyolojik çalışmalarda bir araç olarak (örneğin; bazı coğrafi bölgelerde düşük düzeydeki tüberkulin duyarlılığının araştırılması),
- 5.Kemoprofilaksiye ihtiyaç duyan bebek ve çocukların belirlenmesinde,
- 6.Tüberküloz dışındaki bazı hastalıkları olan kişilerin immün durumlarındaki değişikliği gözlemek için kullanılmaktadır (3).

*PPD Tüberkulin Preparatının Hazırlanışı ve Özellikleri*

PPD tüberkulin; sentetik sıvı besiyerinde üretilen tüberküloz basil kültürünün öldürülmüş, saflaştırılmış ve steril hale getirilmiş türevidir (8). Düşük ve orta molekül ağırlıklı bir çok molekül içermektedir. “Old Tuberculin”e göre daha az karbonhidrat içerdiği için özgül olmayan reaksiyonlar daha az ortaya çıkmaktadır. Hazırlanan tüm PPD

<sup>1</sup>Refik Saydam Hifzısıhha Merkez Başkanlığı, Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara.

Geliş tarihi: 25.08.2000 Kabul edilmiş tarihi: 01.04.2001

Yazışma adresi: Dr.Berrin GENÇER, Refik Saydam Hifzısıhha Merk. Başk. TB Referans Lab., Ankara

tüberkulin preparatlarının etkinliği "Tüberkulin Ünitesi" (TU) ile ifade edilmektedir. Bir TU'si 0.00002 mg PPD-S içeren birim olarak kabul edilmiştir. PPD tüberkulinin standart test dozu 5 TU'dir. Buna göre 5 TU içeren 0.1 ml'lik PPD tüberkulin solüsyonu; 0.0001 mg PPD-S proteinine eşdeğerdir (3,4).

Kullanım amacına yönelik olarak *M.tubercu-losis*, *M.bovis* ve *M.avium* PPD tüberkulin üretiminde kullanılmaktadır. Bunlar dışında diğer mikobakteriler için de benzer yöntemlerle hazırlanmış tüberkulinler mevcuttur. Bunların başlıcaları; PPD-B (*M.intracellulare*), PPD-F (*M.fortium*), PPD-Y (*M.kansasii*), PPD-Platy (*M.marinum*), PPD-G (*M.sucrofulosum*) ve PPD-C (*M.chelonei* subs. *abcessus*)'dir (9).

Sentetik Sauton besiyeri PPD tüberkulin üretiminde kullanılan konvansiyonel sıvı kültür besiyeridir. İnorganik tuzlar, sitrik asit, asparajin ve gliserol içeren bu besiyerinde gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu belirtilerine neden olabilecek hiçbir materyal yoktur. Sıvı besiyeri yüzeyinde üreyen mikobakteriler suda eriyen protein yapısındaki antijenlerini besiyeri ortamına bırakırlar. Kültürler buharla sterilizasyonu takiben çift katlı gazlı bez veya filtre kağıdından süzülür, Berkefeld filtrasyon ile sterilize edilir ve son olarak ultrafiltrasyon ile konsantre edilir. Yoğun olarak protein içeren konsantre materyalin %2 triklor asetik asit ile presipite edilmesi, anhidroz eter ve aseton ile yıkanıp kurutulmasından sonra elde edilen bu antijenler PPD tüberkulin olarak adlandırılır (8). Havası alınmış ampullerde liyofilize halde veya stok solüsyon olarak saklanır (3,7). Liyofilize form için kullanılan diluent pH'sı 7.38 olan, %0.01 Chinisol ve %0.005 Tween 80 içeren fosfat tamponudur (6). Tween 80 bir tür deterjandır, stabilizatör olarak kullanılır ve tüberküloproteinin dilüent içinde çözündüğünde cam ve plastik yüzeylere yapışmasını azaltır. Ayrıca bu yapışmaya bağlı kaybı en aza indirmek için PPD tüberkulin asla bir kaptan diğerine transfer edilmemeli ve enjektöre çekildikten sonra bekletilmeden kullanılmalıdır. Bu sayede kontaminasyon da önlenmiş olacaktır. Sulandırılan preparat daima şişe içinde, aseptik şartlarda, buz-

dolabında (derin dondurucuda değil) ve karanlıkta saklanmalıdır (4).

#### PPD Tüberkulin Preparatının Kalite Kontrolü

Tüberkulin üretimi DSÖ'nün belirlediği standartlara göre kontrol edilmelidir (3). Üretimin belirli aşamalarında yapılması gereken belirli kontroller vardır. Başlangıç aşamasında, kullanılacak olan mikobakteri suşu tanımlanmalı ve özellikleri belirlenmelidir. Kullanılacak olan besiyeri insan ve hayvanlarda allerjik ve toksik reaksiyonlara neden olduğu bilinen maddeler içermemeli ve tüberkulin üretimi için yeterli kapasiteye sahip olmalıdır. Üretim sırasında alınması gereken önlemlere dikkat edilmeli; üretim alanına sadece tüberkulin üretimi ile ilgilenen personelin girmesine izin verilmelidir. Farklı mikobakterilerle hazırlanan tüberkulin preparatları ayrı ayrı yerlerde işlenmelidir. Ekim yapılmış olan besiyerleri inkübasyon süresince belirli aralıklarla kontrol edilmeli ve anormal bir üreme belirtisi görülürse çıkarılmalıdır. Farklı zamanlarda ekilmiş olan aynı bakteri türleri aynı etüvde tutuluyorsa inkübasyon süresi sonunda etüvden ekim tarihlerine dikkat edilerek çıkarılmalıdır. Inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra kültürler en az 60 dakika 100°C'den az olmayan buharla sterilize edilmeli veya 120°C'de 30 dakika otoklavlanmalıdır. Bu şekilde öldürülmüş olan mikobakteriler filtrasyon işlemi ile uzaklaştırılır. Filtre edilen materyale konsantrasyon işlemleri uygulanır. Elde edilen solüsyonun içinde canlı mikobakterilerin olmadığı gösterilmelidir. Bu amaçla, ağırlığı 250-400g arasında olan en az iki kobaya hazırlanan solüsyondan beşer ml intraplevral olarak veya cilt altına inokule edilir. Hayvanlar ölüm veya hastalık bulguları açısından 42 gün gözlem altında tutulur. Eğer hayvanlar bu süre sonunda canlı ve sağlıklı ise test başarılıdır. Eğer tüberküloz dışında bir nedenle hayvanların herhangi birinde ölüm olursa test tekrarlanmalıdır. Solüsyon diğer bakteriler ve mantarlar yönünden steril olduğu görüldükten sonra ml'sinde 1mg olacak şekilde kurutulup şişelere dağıtım yapılarak son ürün elde edilmiş olur. Son ürüne potens testi yapılır. Potens testi; ağırlığı en az 400 g olan altı kobay kullanılarak daha önce kalibrasyonu yapılmış referans preparata göre yapılır. Kobay-

lara verilen tüberkulin dozu ve oluşan reaksiyonların çapları kullanılarak yapılan istatistiksel hesaplamalarla göreceli potens ve güvenlik sınırı hesaplanır (3). Son ürün; sterilise, tahmini potensi %67-150 arasında ise ve tahmin edilen bu potens için güvenlik sınırı %64-156 arasında ise kullanım amacıyla dağıtıma verilir. Tüberkulin preparatları ışıktan korunmalı ve 2-8°C'de saklanmalıdır. Kuru preparatlar daha yüksek sıcaklıklarda (25°C'yi geçmeyen) saklanabilir. Son kullanma tarihi en son yapılan başarılı potens testinden itibaren 1-2 yıldır (7).

#### *PPD Tüberkulin Deri Testinin Mekanizması*

PPD tüberkulin deri testi tüberküloz enfeksiyonu sonucu oluşan bağışıklığı gösteren geç ve hücresel tipteki aşırı duyarlılığı belirlemek için kullanılan bir testtir. Mikobakterilerle enfekte olan kişilerde duyarlı hale gelen T lenfositleri bölgesel lenf düğümlerinde çoğalarak 6-8 hafta içinde dolaşıma girer. Deriye tüberkulin enjeksiyonu bu lenfositleri uyarır ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunu başlatır. Gözlenen yanıt lenfosit, monosit, bazofil ve nötrofil hücre infiltrasyonu, vazodilatasyon ve ödemdir. Antijenle uyarılan T lenfositler çoğalmakta ve sitokinler üreterek birçok hücrenin enjeksiyon yerinde toplanmasını sağlamaktadır. Tüberkulin verildikten 24-48 saat sonra oluşan immün yanıt görülür hale gelir. 48-72 saat sonra en yüksek düzeyde yanıt elde edilmektedir. Testin okunmasında oluşan endürasyonun büyüklüğü değerlendirilir. Enjeksiyon yerinde oluşan kızarıklık (eritem) ise PPD tüberkulinine karşı gelişen akut inflamatuvar yanıtı göstermektedir; vazodilatasyon ve kapiller konjesyon sonucu oluşur, pozitif reaksiyonu göstermez, testin değerlendirilmesinde dikkate alınmaz (4,10).

#### *PPD Tüberkulin Deri Testinin Uygulanma Şekli ve Yorumlanması*

5 TU PPD tüberkulin ön kolun dış veya iç yüzüne, deri içine, 26-27 kalibreli platin iğne veya özel tüberkulin enjektörü (dereceli, 1ml'lik) kullanılarak uygulanır. 0.1 ml solüsyon verildiğinde deride 6-10 mm çapında bir kabarıklığın oluşup oluşmadığına dikkat edilmelidir. Eğer bu çapta bir kabarıklık yoksa solüsyon deri içine değil deri

altına verilmiş demektir. Bu durumda ilk enjeksiyondan farklı bir yerde test tekrarlanmalıdır. Testin uygulandığı yerde oluşan reaksiyon 48-72 saat sonra okunmalıdır. Oluşan reaksiyon genellikle yedi gün boyunca önemli bir değişiklik göstermez (5).

Tüberküloz enfeksiyonunun ve BCG uygulamalarının yaygın olduğu ülkelerde PPD tüberkulin pozitifliği yetişkin insanlara tanı koymak için uygun görülmemektedir. Ancak bu test; kaynak olgu ile temas edenler arasında enfekte olanları saptamak (özellikle küçük çocukları) ve hastalık gelişme riski yüksek kişileri ilaçla korumaya almak, çocuklarda yapılan taramalarda ise PPD tüberkulin pozitif olanların yakınlarını (özellikle aile çevresini) araştırarak kaynak vakayı bulmak için kullanılmaktadır (11). Türkiye gibi atipik mikobakteri enfeksiyonunun az görüldüğü buna karşılık *M.tuberculosis* enfeksiyonunun yaygın olduğu ülkelerde 10 mm'den küçük reaksiyonların negatif kabul edilmesi önerilmektedir. 5-10 mm arasındaki PPD tüberkulin reaksiyonu BCG ile aşılama, atipik mikobakterilerle çapraz reaksiyona veya yanlış negatifliğe bağlı olabilir (10). BCG aşılama sonrasında yapılan PPD tüberkulin testinin reaktivitesi BCG aşısının dozuna, aşırı üreten firmaya, aşılama yaşına ve BCG ile PPD tüberkulin testi arasındaki süreye göre değişebilmektedir. Aşılama yaşı PPD tüberkulin reaktivitesi açısından en önemli kriterdir. BCG sonrası oluşan PPD tüberkulin reaktivitesi beş yıl içinde kaybolur. Bebeklik döneminde aşılama bireylerde 10-15 mm olan PPD tüberkulin reaksiyonları aşırıya bağlanmamalıdır (12). BCG ile aşılama çocuklarda yaş arttıkça reaksiyon daha belirgin olmaktadır. Aşılama bir çocukta 15 mm ve üstü reaksiyonun pozitif kabul edilmesi önerilmektedir. BCG ile aşılama çok yeni değil ise 10 mm ve üstü reaksiyonlar BCG'ye bağlanmamalıdır (10,12). BCG ile aşılama yapılmamış çocuk ve yetişkinlerde ise 10 mm ve daha üstü reaksiyonlar pozitif kabul edilir. 10-15 mm arasında olan PPD tüberkulin reaksiyonları birkaç ay takip edilmeli ve tedavi uygulanmasına karar vermeden önce test tekrarlanmalıdır (13).

PPD tüberkulin deri testi konağın immünolojik

durumuna, aktif viral enfeksiyonlara, ilaç kullanımına, kullanılan tüberküline, uygulanan yöntem ve testi değerlendiren kişiye bağlı olarak yanlış negatif sonuçlar verebilir (4,11). Yanlış negatif tüberkülin deri testi sonuçlarının alınmasına yol açabilecek nedenler Tablo 1'de gösterilmiştir (4). Aktif tüberkülozlu hastaların %10-25'inde test sonuçları negatif bulunmaktadır. Tedaviye başlanmadan önce deri testleri negatif olan tüberkülozlu hastaların %21'inde iki haftalık tedavi ve uygun beslenme ile test sonuçları pozitifleştiği bildirilmiştir (10). Ağır dissemine tüberkülozlu hastalarda yanlış negatiflik oranı % 50'den fazla olabilmektedir. BCG ile aşılananlarda ve atipik mikobakterilerin yoğun olduğu bölgelerde yaşayanlarda ise mikobakteriyel antijenler arasındaki çapraz reaksiyonlar nedeniyle PPD tüberkülin deri testinde yanlış pozitiflik saptanmaktadır. Bu sebeple PPD tüberkülin test sonuçlarının yorumlanması için hem klinik değerlendirmeye hem de test özelliklerinin bilinmesine gereksinim olduğu belirtilmektedir (10,14).

Tüberküloza karşı koruyucu sağlık hizmetleri çerçevesinde yürütülen mücadeleye gereken önemin verilmemesi ve giderek yaygınlaşan HIV enfeksiyonları son yıllarda bütün dünyada tüberküloz hastalığının yaygınlaşma eğilimine girmesine neden olmaktadır. Ayrıca giderek artan sayıda *M.tuberculosis* suşunda çoklu ilaç direncine rastlanmaya başlanmıştır (18). Bu durum tüberküloz enfeksiyonunun özgül tanısı için kullanılan testleri yeniden gündeme getirmektedir. Çeşitli alternatif immünolojik özgül tanı yöntemleri geliştirilmeye çalışılmakla birlikte (19-22); PPD tüberkülin testi halen tüberküloz enfeksiyonunun özgül tanısı amacıyla kullanılan en etkin immünolojik test olarak görünmektedir. Ancak tarama testi olarak kullanıldığında, uygulanacak

toplumda tüberküloz hastalığı ve atipik mikobakteri enfeksiyonu görülme sıklığı ve BCG aşılama durumlarının; tanı amacıyla uygulandığında ise hastanın klinik bulgu, tıbbi geçmiş ve diğer laboratuvar bulgularının bilinmesi test sonuçlarının sağlıklı olarak değerlendirilebilmesi açısından son derece önemlidir.

**Tablo 1:** PPD tüberkülin deri testinin yanlış negatif sonuç verebildiği durumlar (4).

Test yapılan kişiye bağlı olan faktörler
Enfeksiyonlar: Viral enfeksiyonlar (kızamık, kabakulak, suçiçeği) Bakteriyel enfeksiyonlar (tifo, brusella, tifus, lepra, boğmaca, daha önce geçirilmiş tüberküloz, tüberküloz plörezi) Mantar enfeksiyonları (blastomikoz)
Canlı virüs aşıları (kızamık, kabakulak, polio)
Metabolik bozukluklar (kronik böbrek yetmezliği)
Nutrisyonel faktörler (ciddi protein eksiklikleri)
Lenfoid doku hastalıkları (Hodgkin lenfoma, kronik lenfositik lösemi, sarkoidoz)
İlaçlar (kortikosteroidler ve diğer immüno-supresif ajanlar)
Yaş (yenidoğanlar, yaşlı insanlar)
Stres (cerrahi, girişim yanıklar, psikiyatrik hastalıklar)
Kullanılan tüberkülin ile ilgili faktörler
Uyumsuz saklama koşulları (ısı ve ışığa maruz kalması)
Uyumsuz dilüsyonlar
Kimyasal denatürasyon
Kontaminasyon
Yapışma (Tween 80 kısmen önleyebilir)
Kullanılan yöntemle bağlı faktörler
Çok az miktarda antijen enjekte edilmesi
Enjeksiyonun çok derine enjekte edilmesi
Testin okunması ve kayıt edilmesine bağlı faktörler
Deneyimsiz okuyucu
Kayıt hatası

## KAYNAKLAR

- 1.Çavdar T. Tüberkülin testi. In: Kocabaş A (ed). Tüberküloz kliniği ve kontrolü. Ankara 1986; 227-231.
- 2.Comstock GW. Field trials of tuberculosis vaccines: How could we have done them better? Controlled Clinical Trials 1994; 15: 247-76.

## GENÇER. TÜBERKÜLİNİN PÜRİFİYE PROTEİN DERİVESİ

- 3.WHO Technical Report Series 1987, No:745, Annex I, p:31-59.
- 4.American Thoracic Society. The tuberculin skin test. Am Rev Respir Dis 1981; 124: 356-63.
- 5.Molina-Gamboa JD, Leon-Rosales SP, Rivera-Morales I. Evaluation of the sensitivity of RT-23 purified protein derivative for determining tuberculin reactivity in a group of health care workers. Clin Infect Dis 1994; 19: 784-6.
- 6.Magnusson M, Guld J, Magnus K. Diluents for stabilization of tuberculin. Bull WHO 1958; 19: 799-828.
- 7.WHO Technical Report Series 1968; 384: 14.
- 8.Nyabenda J, Bautens E, Borremans M. The production of mycobacterial antigens by homogeneous culture in a fermentor. J Biol Standard 1988; 16: 259-67.
- 9.Shigeto E, Tasaka H, Yamamoto M. Tuberculin sensitivity to purified protein derivatives from *Mycobacterium* other than tuberculosis (PPD-B, PPD-Y, PPD-F and PPD-C) and PPDs among patients with mycobacteriosis-cooperative study of research (Abstract). Kekkaku 1993; 68: 351-61.
- 10.Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri 1996; 396-443.
- 11.Gordin FM, Perez-Stable EJ, Reid M. Stability of positive tuberculin tests: are boosted reactions valid? Am Rev Respir Dis 1991; 144: 560-3.
- 12.Menzies R, Vissanjee B. Effect of Bacilli Calmette-Guerin vaccination on tuberculin reactivity. Am Rev Respir Dis 1992; 145: 621-5.
- 13.Nemir RL, Krasinski K. Tuberculosis in children and adolescent in the 1980s. Pediatr Infect Dis J 1988; 7: 375-9.
- 14.Gemicioğlu B. Tüberkülin testi. Klinik Gelişim 1998; 11: 608-10.
- 15.Alcaide J, Altet MN, Batalla J. Comparative study of human cutaneous sensitivity to 2 and 5 international units of the PPD RT-23 tuberculin with Tween 80. Med Clin (Barc) (Abstract) 1992; Oct 31; 99 (14): 525-8.
- 16.Kendig EL, Kirkpatrick BV, Carter WH. Underreading of the tuberculin skin test. Chest 1998; 113 (5): 1175-7.
- 17.Rose DN, Schechter CB, Adler JJ. Interpretation of the tuberculin skin test. J Gen Intern Med 1995; 10 (11): 635-642.
- 18.Pio A, Chaulet P. The increasing TB burden. In: Tuberculosis handbook, World Health Organization. 1998:
- 19.Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. Eur Respir J (Suppl) 1995; 20 (9): 676-88.
- 20.Amicosante M, Barnini S, Corsini V. Evaluation of a novel tuberculosis complex-specific 34 kDa protein in the serological diagnosis of tuberculosis. Eur Respir J 1995; 8 (12): 2008-14.
- 21.Pottumarthy S, Morris JM, Harrison AC. Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: Potential to replace the Mantoux skin test. J Clin Microbiol 1999; 37 (10): 3229-3232.
- 22.Pottumarthy S, Wells VJ, Morris JM. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 2000; 38 (6): 2227-2231.

