

## DİFTERİ

### AŞI TAKVİMİ

Türkiye'de difteri hastalığına karşı aşılanma ilk olarak 1937 yılında, tek doz aşı uygulaması ile başlatılmıştır. Aynı yıl Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı da difteri, boğmaca ve tetanoz aşılarının üretimini başlatmıştır. Bu aşuların, DBT üçlü karma aşı şeklinde kullanımına ise 1968 yılında geçilmiştir. Ülkemizin 1981'de DSÖ'nün Genişletilmiş Bağışıklama Programına dahil olmasının ardından, 1985 yılında Ulusal Aşı Kampanyası ile difteriye karşı bağışıklama da hız kazanmıştır ve üç doz DBT aşı uygulama oranı %20-30'lardan %83'e yükselmiştir. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü verilerine göre bu kampanya sayesinde, yaklaşık 3 milyon çocuk aşı ile önlenilebilir hastalıklardan korunmuş ve 30 000 kadar çocuk bu hastalıklar nedeniyle ölmekten kurtulmuştur. Bugün, Sağlık Bakanlığı çocukluk çağı aşılanma takvimine göre; difteri aşı uygulaması, bir yaş altında üç doz DBT aşısı (iki, üç ve dördüncü ayların sonunda), 16-24. aylarda bir doz DBT aşısı, temel eğitim döneminde iki doz Td aşısı (1. ve 5. sınıflarda) uygulaması şeklindedir (Ek-1). Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü 1999 yılı kayıtlarına göre, DBT bir, iki ve üç doz aşılanma oranları sırası ile Samsun için; %92, %91 ve %89, Türkiye geneli için; %85, %82 ve %79'dur (Ek-2).

### GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; difteriye karşı bağışıklık düzeyinin araştırılmasında metod olarak ELISA seçilmiş, doğrulama için toksin nötralizasyon prensibine dayalı hücre kültürü metodu (Cell Culture Method, CCM) kullanılmıştır.

**ELISA:** Bu çalışmada Laboratuvarımızda hazırlanan (in-house) ELISA kiti kullanılarak serum örneklerinde difteri toksoidine karşı IgG antikorları araştırılmıştır. Paralel line assay ile test referans serumunun titresini International Antitoxin Unit (IU) olarak saptamak için, 'Biological Standards and Control England' (NIBSC) referans antitoksini (1.5IU/ml) kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikropaklar (Greiner, Immuran 600, Germany), karbonat-bikarbonat tampon (pH 9.6) solüsyonunda 5µg/mL olacak şekilde sulandırılan saf difteri

toksoidinin (1200 Lf/mL, 3061 Lf/mg PN; Biken, Japan) 100µl'si ile kaplanmış ve bir gece buz-dolabında, nemli ortamda bekletilmiştir. Mikropaklar %0.05 Tween-20 içeren phosphate-buffered saline (PBS-T, pH 7.4) ile üç kez yıkanmış ve bu işlem her basamaktan sonra tekrar edilmiştir. Araştırma grubu serumları ve referans serumun çift kat sulandırılmaları %10 Block Ace (Daiichi Seiyaku, Japan) ile yapılmıştır. Bu ve bundan sonraki basamaklarda mikropaklar 22°C'de bir saat inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklara; PBS-T'de sulandırılmış, Fc-spesifik, alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş anti-human IgG (Seikagaku Kogyo; Japan) eklenmiştir. Bir saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklara diethanolamine tamponda (DEA, pH 9.8) 1mg/mL konsantrasyonda hazırlanan p-nitrophenyl-phosphate'tan (Wako Junyaku; Japan) 200 µl eklenmiştir. Bir saat inkübasyondan sonra 3N NaOH (%12 w/v) solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve A<sub>405/630</sub>'da ELISA okuyucu ile (Labsystem, Multi Skan EX) okunmuştur.

Araştırma grubuna ait serum örneklerinin antikor titreleri, referans serumun titresine karşılaştırılmalı olarak ve *parallel line assay* kullanılarak saptanmıştır.

**Toksin Nötralizasyon Metodu (Cell Culture Method-CCM):** Bu teknik; serumdaki antitoksik antikorların, difteri toksinine karşı duyarlı Vero hücrelerinde, toksinin sitopatik etkisini önlemesi prensibine dayalı olup, Japonya Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü laboratuvar prosedürüne göre uygulanmıştır (1).

96 kuyucuklu mikropaklarda (Falcon 3072, F-bottom, USA) test serumlarının (50 µl) 1:1 ve 1:5'den başlayarak iki sıra halinde çift kat sulandırılmaları yapılmıştır. Dilüent olarak %7 newborn calf serum içeren Dulbecco's MEM (Sigma, D5280) kullanılmıştır. Kuyucuklara, 640 CD<sub>50</sub>/mL sulandırımında 25µl difteri standart test toksini (Lot.M59, 1.6X10<sup>5</sup> CD<sub>50</sub>/vial, Japan) ilave edilmiş, 37°C'de 30 dk. inkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl Vero hücresi (3x10<sup>5</sup> hücre/mL) eklenmiştir. Standart test toksin ve standart antitoksinin (ST-AT Lot.9, 1060 IU/Amp., Japan)

titrasyonları yapılmıştır. Hücre, besiyeri ve her bir test örneği için kontrol kuyucukları hazırlanmıştır. Mikroplaklar %5 CO<sub>2</sub> etüvde 37°C'de 4-5 gün inkübe edilmiştir. Toksinin hücrelerdeki aktivitesinin bir indikatörü olarak, fenol kırmızısına bağlı renk değişikliği makroskopik olarak incelenmiş; sitopatik etki mikroskopik incelemeyle doğrulanmıştır. Araştırma grubunun serum örneklerine ait antitoksin düzeyleri, IU/mL olarak, standart antitoksin titrasyonuna göre hesaplanmıştır.

*İstatistik analiz:* ELISA ve CCM ile elde edilen sonuçların karşılaştırması korelasyon katsayısı analizi ile yapılmıştır.

Test sonuçlarına göre bireylerin difteriye karşı korunup korunmadığı; difteriye karşı antitoksin düzeyleri için kabul edilmiş değerlere göre saptanmıştır. Antitoksin düzeyi <0.01 IU/mL ise bireyin enfeksiyona duyarlı olduğu; 0.01-0.09 IU/mL ise kısmen koruma sağlandığı; ≥0.1 IU/mL ise bireyin enfeksiyondan korunduğu ifade edilmektedir (4). Ek olarak; antitoksin düzeyi ≥1.0 IU/mL olduğunda, uzun-dönem koruyuculuktan söz edilmektedir (4).

## BULGULAR

### Difteri Antikor Düzeylerinin Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Difteri antitoksin düzeyleri, araştırmaya

katılan 343 bireyin 322'sinin serum örneğinde değerlendirilmiştir.

Şekil 2-a'da ELISA ile ölçülen difteri antitoksin düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı verilmiştir. ≥0.1 IU/mL koruyucu antitoksin düzeyi çocuklarda yetişkinlerden daha yüksek oranda bulunmuştur. Buna göre; ≥0.1 IU/mL üzeri değerler 4-5 yaş grubu hariç 20 yaş altı gruplarda %75'in üzerindedir. Antikorların koruyucu düzeylerde olduğu bireylerin oranı 20'li ve 30'lu yaş gruplarında sırası ile %43.7 ve %54.3'e düşmektedir. Erişkin yaş gruplarında antitoksin düzeyleri ≥0.1 olan bireyler için geometrik ortalamalar en fazla 20'li yaşlarda olmak üzere belirgin bir düşüş gözlenmekte ve ileri yaş grubunda 30'lu yaş gruplarına benzer geometrik ortalama değerleri ile tekrar artış izlenmektedir (Tablo 2-a).

CCM ile elde edilen değerler Şekil 2-b'de gösterilmiştir. Bu testin sonuçları ≥0.1 IU/mL için ELISA metodu ile hemen hemen aynı bulunmuştur. CCM ile 0.01 IU/mL ve altındaki antitoksin düzeyleri de yüksek duyarlılıkla ölçülebildiği için, Şekil 2-b'de bir değer kategorisi olarak ≥0.01 IU/mL antitoksin düzeyine sahip olanların oranları da yer almaktadır. ≥0.01 IU/mL antitoksin değerleri 20-29 ve 30-39 yaş grupları (sırası ile %68.7, %68.6) hariç tüm yaş gruplarında %90'ın üzerinde bulunmuştur.

**Tablo 2-a:** Araştırma grubunda ELISA metodu ile elde edilen difteri antikor düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı; Samsun, Şubat-2000

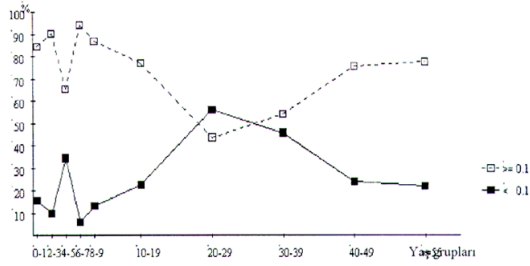
Yaş grupları	ELISA ile difteri antikor düzeyi								G.O.* Log.10	Toplam	
	<0.01		0.01-0.09		0.1- 4		≥5			S	%
	S	%	S	%	S	%	S	%			
0-1	4	12.50	1	3.1	22	68.8	5	15.6	-0.4	32	9.9
2-3	2	6.50	1	3.2	26	83.9	2	6.5	-0.2	31	9.6
4-5	3	10.30	7	24.1	18	62.1	1	3.4	-0.6	29	9.0
6-7	2	5.70	0	0.0	28	80.0	5	14.3	-0.1	35	10.9
8-9	1	4.30	2	8.7	17	73.9	3	13.0	-0.04	23	7.1
10-19	3	9.70	4	12.9	21	67.7	3	9.7	-0.5	31	9.6
20-29	10	31.25	8	25.0	14	43.8	0	0.0	-1.4	32	9.9
30-39	9	25.70	7	20.0	18	51.4	1	2.9	-1.3	35	10.9
40-49	2	6.90	5	17.4	22	75.9	0	0.0	-0.7	29	9.0
50+	7	15.60	3	6.7	35	77.8	0	0.0	-0.9	45	14.0
Toplam	43	13.40	38	11.8	221	68.6	20	6.2	-0.7	322	100.0

\* Geometrik ortalamalar yalnızca koruyucu değerlerdeki antikor titrelerini içermektedir.

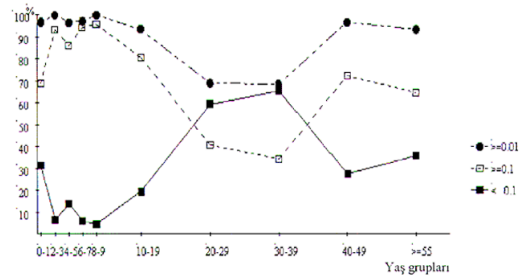
**Tablo 2-b:** Araştırma grubunda toksin nötralizasyon metodu (Cell Culture Method, CCM) ile elde edilen difteri antitoksin düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı; Samsun, Şubat-2000

Yaş grupları	CCM ile difteri antitoksin düzeyi								G.O.* Log.10	Toplam	
	<0.01		0.01-0.09		0.1- 4		≥5			S	%
	S	%	S	%	S	%	S	%			
0-1	1	3.1	9	28.1	17	53.1	5	15.6	-0.4	32	9.9
2-3	0	0.0	2	6.5	27	87.1	2	6.5	0.1	31	9.6
4-5	1	3.4	3	10.3	24	82.8	1	3.4	-0.4	29	9.0
6-7	1	2.9	1	2.9	28	80.0	5	14.3	0.3	35	10.9
8-9	0	0.0	1	4.3	19	82.6	3	13.0	0.2	23	7.1
10-19	2	6.5	4	12.9	22	71.0	3	9.7	-0.1	31	9.6
20-29	10	31.3	9	28.1	13	40.6	0	0.0	-0.9	32	9.9
30-39	11	31.4	12	34.3	11	31.4	1	2.9	-0.9	35	10.9
40-49	1	3.4	7	24.1	21	72.4	0	0.0	-0.7	29	9.0
50+	3	6.7	13	28.9	29	64.4	0	0.0	-0.8	45	14.0
<b>Toplam</b>	<b>30</b>	<b>9.3</b>	<b>61</b>	<b>18.9</b>	<b>211</b>	<b>65.5</b>	<b>20</b>	<b>6.2</b>	<b>-0.4</b>	<b>322</b>	<b>100.0</b>

\* Geometrik ortalamalar yalnızca koruyucu değerlerdeki antitoksin titrelerini içermektedir.



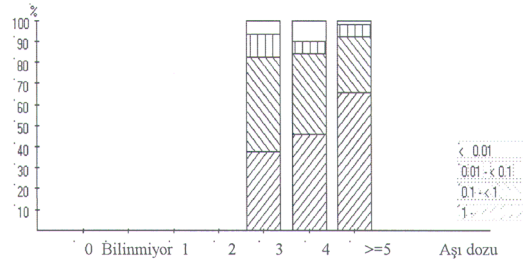
**Şekil 2-a:** Difteri için koruyucu kabul edilen antikor düzeylerinin (ELISA ile) üzerinde ve antında kalan değerlerin yaş gruplarına göre dağılımı; Samsun, Şubat-2000



**Şekil 2-b:** Difteri için koruyucu kabul edilen antikor düzeylerinin (toksin nötralizasyon metodu ile, CCM) üzerinde ve antında kalan değerlerin yaş gruplarına göre dağılımı; Samsun, Şubat-2000

### Difteri Antikor Düzeylerinin Aşı Öyküsüne Göre Dağılımı

Şekil 2-c, 0-15 yaş grubu çocuklarda aşı dozlarına göre difteri antitoksin değerlerini göstermektedir. Difteri için uygulanan tüm aşı formları (DBT, dT veya DT) değerlendirmeye dahil edilmiştir (Tablo 2-b ve c). Aşı dozuna paralel olarak koruyucu antitoksin düzeyleri artış göstermektedir. Buna göre;  $\geq 0.1$  IU/mL antitoksin değerlerinin üç, dört ve beş doz aşı için yüzde dağılımı sırası ile %82.2, % 84.3 ve %92.7 iken, aynı dozlarda ulaşılan  $\geq 1$  IU/mL antitoksin düzeyleri için dağılım sırası ile %37.8, %45.7 ve %68.3 olarak bulunmuştur (Tablo 2-c).



**Şekil 2-c:** Araştırma grubunda 0-15 yaş aralığında, difteri aşısı dozuna (DBT+dT veya DT) göre koruyucu, kısmen koruyucu ve koruyucu olmayan düzeyler için kabul edilen aralıklarda (ELISA ile) ölçülen difteri antitoksin düzeylerinin dağılımı, Samsun, Şubat-2000

**Tablo 2-c:** Araştırmaya grubunda 0-15 yaş aralığında, difteri aşısı dozuna (DBT+dT veya DT) göre koruyucu düzeylerin altında ve üzerinde (ELISA ile) ölçülen difteri antitoksin düzeylerinin dağılımı, Samsun, Şubat 2000

Antitoksin düzeyleri (IU/mL)	Difteri aşısı dozları										Toplam	
	2		3		4		5		6		S	%
	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%		
<0.1	0	0.0	8	17.8	11	15.7	3	7.3	1	9.1	23	13.7
0.1-0.9	0	0.0	20	44.4	27	38.6	10	24.4	4	36.4	61	36.3
≥1	1	100.0	17	37.8	32	45.7	28	68.3	6	54.5	84	50.0
Toplam	1	100.0	45	100.0	70	100.0	41	100.0	11	100.0	168	100.0

### TARTIŞMA

Sağlık Bakanlığı çocukluk çağı aşı takvimi çerçevesinde, kayıtlara ve hafızaya dayalı olarak saptanan verilere göre araştırma grubunda aşılama durumu; difteri için tüm dozlarda toplam %70.5, en az dört doz uygulamada %41.4 oranındadır. Laboratuvar sonuçlarına göre tüm yaş gruplarında elde edilen difteriye karşı koruyucu antikor düzeylerinin ( $\geq 0.1$  IU/mL) oranı ise ELISA ile %74.9, CCM ile %71.0 bulunmuştur. Bu veriler, incelenen popülasyonda mevcut durumun; hastalığın eliminasyonu için DSÖ'nün (4) öngördüğü bağışıklama hedefleri ( $> \%95$ ) ve toplumsal bağışıklık hedeflerinin ( $> \%90$ ) altında kaldığını göstermektedir.

Araştırma grubunda difteriye karşı immünitenin en belirgin olarak azaldığı dönem 20-40 yaş arasıdır; bu aralıktaki yaş gruplarında CCM ile koruyucu düzeyde antikorların saptanma oranlarının %40.6 ve %34.3 olduğu anlaşılmaktadır. Yine bu yaş aralığında aşılama öykülerine göre çocukluk aşılarının ağırlıklı olarak eksik veya yapılmamış olduğu gözlenmiştir. Aşılama durumuna ait gözlemler 40 yaş ve üzerinde de benzer olmakla birlikte; laboratuvar bulgularımıza göre bu gruplarda koruyucu düzeydeki antikorlar daha yüksek oranlardadır (40-49 yaş için %72.4; 50 ve üzeri yaş için %64.4).

Difteriye karşı bağışıklık durumunun araştırılmasında; difteri toksinini nötralize eden antikorların veya bir diğer ifadeyle serumdaki fonksiyonel antikorların gösterilmesinde en

güvenilir yöntemin deney hayvanlarında veya hücre kültürlerinde toksin nötralizasyon testi olduğu yaygın bir şekilde kabul edilmiştir (3,5). Bununla birlikte kapsamlı toplum taramalarında toksin nötralizasyon testlerinin uygulanmasında belirgin güçlükler vardır. Öyle ki, daha kolay ve kimi çalışmalarda toksin nötralizasyon testleri ile de iyi korelasyon gösterdiği saptanan ELISA gibi yöntemler yaygın uygulama alanı bulmuştur. ELISA yönteminin en önemli dezavantajı özellikle kısmen koruyucu ve koruyucu olmayan antitoksin değerlerinde ( $< 0.1$  IU/mL) korelasyon düşüklüğü; standart toksin nötralizasyon testleri ile ölçülebilen minimum düzeylere ( $\sim 0.001$  IU/mL) inilemeyiştir.

Bu çalışmada kullanılan difteri toksoidine karşı IgG antikorları için dizayn edilmiş ELISA metodu; büyük ölçekli toplum taraması pratiğine uygun olması ve aynı zamanda aynı test prosedürünün tümü ile tetanoz ve boğmaca antikorlarının araştırılmasına da uygulanabilir olması nedeniyle seçilmiştir. Bir *in-vitro* toksin nötralizasyon testi olan CCM yöntemi de bu çalışmada paralel olarak uygulanmış ve ELISA ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.  $\geq 0.1$  IU/mL antitoksin düzeyleri için ELISA ve CCM sonuçlarının iyi bir korelasyon gösterdiği gözlenmiştir ( $r=0.84$ ). Ancak serosürveyler için en kritik düzeyler olarak kabul edilen (5) koruyucu antitoksin değerlerinin altındaki ( $< 0.1$  IU/mL) titreler için bizim bulgularımız da CCM ile çalışmanın uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Determination of diphtheria antitoxin titer by the cell culture method (CCM) Laboratory of Bacterial Products III, Department of Bacterial and Blood Products. National Institute of Infectious Diseases, Japan.
2. von Hunolstein C, Aggerbeck H, Andrews N, et. al. European sero-epidemiology network: standardization of the results of diphtheria antitoxin assays. *Vaccine* 2000; 18 (28); 3287-96
3. Miyamura K, Nishio S, Ito A, et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. *J Biol. Stand* 1974; 2: 189-201.
4. Begg N. Diphtheria: Manuel for the management and control of diphtheria in the European Region. The expanded programme on immunization in the European Region of WHO. ICP/EPI 038 (B), Copenhagen, 1994.
5. Gupta RK, Griffin P.Jr, Xu J, Rivera R, Thompson C, Siber GR. Diphtheria antitoxin levels in US blood and plasma donors. *J Infect Dis* 1996; 173: 1493-7