

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

SİFİLİZ TANISINDA MİKROKOMPLEMAN  
YÖNTEMİNİN KULLANILMASI VE  
BUNUN DİĞER SEROLOJİK  
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI


YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERDAR ÖZTUZCU

48154

Yürütücü: Prof.Dr. Selim BADUR

İSTANBUL-1996



## TESEKKÜR

Bu tezin gerekleŖmesinde emegi olan basta danıŖmanım Prof.Dr.Selim Badur'a, Do.Dr.Ali Ağafıdan'a teŖekkür ederim.

Ayrıca her yönden yardımını gördüğüm Kimyager Bayram Kıran ve Kimyager Senay Nasuf'a teŖekkürlerimi bor bilirim.

## İÇİNDEKİLER

1. ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2-16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17-25
4. BULGULAR.....	26-30
5. TARTIŞMA.....	30-33
6. KAYNAKLAR.....	34-37

## ÇALIŞMANIN AMACI

Bütün infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi, sifilizin mikrobiyolojik tanısında da etkenin doğrudan gösterilmesine dayanan direkt tanı yöntemleri ve organizmada oluşturduğu antikorları saptamak amacıyla kullanılan indirekt tanı yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

İndirekt tanı amacıyla sifiliz serolojisinde kullanılan testler nontreponemal testler ve treponemal testler olarak iki ana grupta toplanır. Nontreponemal serolojik reaksiyonlar ile fosfolipit antijenlere karşı antikorlar gösterilir. Treponemal serolojik reaksiyonlar ile Treponema pallidum'a karşı doğrudan yönelen antikorlar gösterilir. Her iki grubun serolojik reaksiyonları sifilizin çeşitli dönemlerinde farklı ve kısmen karakteristik davranışlar gösterdiklerinden birlikte yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızın amacı sifiliz tanısında kullanılan nontreponemal testlerden Kolmer Kompleman Birleşmesi Deneyini Mikrokompleman yöntemine adapte etmek ve elde edilen sonuçları diğer treponemal ve nontreponemal serolojik yöntemlerle karşılaştırmaktır.

# GENEL BİLGİLER

## ETYOLOJİ

Sifilizin etkeni *Treponema pallidum*, spiral şeklinde mikroorganizmadır. Etken ilk kez 1905 yılında Fritz Schaudinn ve Poul E. Hoffman tarafından bulunmuştur. *Treponema pallidum* ortalama 6-20  $\mu\text{m}$  boyunda, 0.15-0.30  $\mu\text{m}$  eninde olup, 6-14 (bazen 20 ve daha fazla) kıvrımı vardır. Bu kıvrımların derinliği 0,5-1  $\mu\text{m}$ , aralarındaki uzaklık ise yaklaşık 1  $\mu\text{m}$ 'dir. Kıvrımlar düzenli, sık ve dik olup, yükseklikleri uçlara doğru gittikçe azalır. Uçlar genel olarak sivri ve düzdür.

*Treponema pallidum* çok hareketlidir. Bu hareketlilik karanlık alan mikroskopunda çok net olarak görülür. Çevresi etrafında burğu gibi döner, çok fazla olmayan bir hareketle ileri geri yer değiştirebilir ya da bükülebilir. Her ne kadar kıvrımları sabit ise de, bazen düzelecek kadar uzayabilir veya uçları birbirine değecek kadar sıkışabilir.

*Treponema pallidum* enine ikiye bölünerek çoğalır. Adi anilin boyaları ile boyamak zordur. Giemsa boyası ile pembe ve soluk renkte boyanır ve bu yüzden de *pallida* adı verilmiştir. Ayrıca çini mürekkebi ve gümüşleme yöntemleri ile gösterilebilir. Etken en çabuk, kolay, net ve kesin bir şekilde karanlık alan mikroskopunda görülür.

*Treponema pallidum* cansız besiyerinde, doku kültüründe kültürü yapılamamıştır. Eldeki bazı kanıtlara göre bu spiroket mikroaerofildir, az miktarda oksijen almaktadır.

*Treponema pallidum* kuruluğa çok dayanıksızdır. Tuzlu su, buyyon gibi yerlerde çabuk ölür. Oksijen, saponin, distile su gliserin, sabun ve diğer kimyasal maddelerin etkisi ile hareketsiz kalır ve ölürler. Isıya karşı dayanıklı değildirler. 41,5 °C'de birkaç saatte ölür. 25 °C'de 4-7 gün, 37 °C'de 2 gün hareketli kalabilmektedir. Tavşan testisi dilimlerinde veya % 15 gliserin içinde 65 °C'de yıllarca canlı kalır ve labratuvarlarda böyle saklanır. Kanda 0-4 °C'de 2-3 günde ölür(Kan naklinde önemlidir). Dolayısıyla infeksiyöz olan taze bir kan ile frengi başkasına geçirilebilir.

Son yıllarda at serumundan yapılan besi yerlerinde *Treponema pallidum* üretildiği bildirilmiştir. Fakat burada üretilen suşun, virulan *Treponema pallidum*'dan önemli farkları oldukları görülmüştür (1,3,11,28).

## EPİDEMİYOLOJİ

İnfeksiyon genelde cinsel ilişkiyle, bu arada orogenital, anorektal ilişkiyle ve bazende öpüşmeyle ve yakın beden temasıyla bulaşır. İnfeksiyonu en fazla bulaştıranlar, tedavi edilmemiş erken sifiliz I. ve II. devir hastalarıdır. Erken dönem latent sifilizde bulaşma olasılığı çok yüksektir, geç dönem latent sifilizde ise bulaşmaz (11).

### SİFİLİZDE KLİNİK TABLO

Sifiliz klinik olarak aşağıdaki şekillerde sınıflandırılır :

#### I. Edinsel sifiliz

- a) Erken Sifiliz ( Sifiliz I. ve II. Devir )
- b) Latent Sifiliz ( Erken, Geç )
- c) Geç Sifiliz ( Sifiliz III. Devir )

#### II. Doğumsal sifiliz

- a) Erken Konjenital Sifiliz ( Syphilis Congenita Praecox) b) Geç Konjenital Sifiliz ( Syphilis Congenita Tarda )

## SİFİLİZDE IMMUNİTE

Birinci devre sifilizde, tanı açısından önemli olan nonimmünolojik humoral antikorların oluşmaya başlamasıdır. Antikorlar, in vitro olarak, çeşitli antijen spesifikliğinin yanı sıra çeşitli immünolojik reaksiyon davranışlarının da gösterirler. Sifilizde çok çeşitli antikorlar gösterildiği için, geliştirilen testlerde çok fazladır.

1. Nontreponemal testler
2. Treponemal (spesifik) testler

Nontreponemal serolojik reaksiyonlar ile fosfolipit antijenlere karşı antikorlar gösterilir. Bu lipoid antijenlerin yapısı tam olarak açıklık kazanmamıştır. Etkenin ana kısmının dokudaki devamlı antijenlerin, veya Treponemalar ile dokunun parçalanmasından dolayı serbestleşen haptelerin söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Buradaki lipoid antijenlere karşı yönelen antikorlar, reagin olarak isimlendirilir.

Treponemal serolojik reaksiyonlarda Treponema palliduma karşı doğrudan yönelen antikorlar gösterilir. Bu antitreponemal antikorlar yapılarını aynı şekilde heterojen olarak ve Treponema pallidumun çeşitli antijenik determinantlarına karşı yöneltirler. Bunlarla antijenik yakınlığı olan diğer Treponema suşları ile pozitif reaksiyon verirler. Treponemal serolojik reaksiyonlar için antijen substratı olarak Nichols suşu tipinde patojen Treponemaların ekstreleri kullanılır.

Her iki ana gurubun bazı serolojik reaksiyonları sifilizin çeşitli dönemlerinde farklı ve kısmen karakteristik davranışlar gösterir. İani gerek antikorların serum konsantrasyonu ve gerekse immunoglobulin sınıfları (IgG, IgM, veya IgA) hastalık dönemleri ve yapılan tedavi ile ilgili olarak değişir. Diğer infeksiyon hastalıklarındaki gibi sifilizde hastalığın erken dönemlerinde makro moleküller IgM sınıfı antikorlar oluşur. Daha geç olarak bu primer yanıt özellikle yüksek antijen spesifikliğine sahip IgG sınıfı antikorların oluşturduğu sekonder bir immün yanıt döner. IgM'den IgG sınıfına doğru olan bu dönüşüm, hem nonspesifik hemde Treponemaya ait antikorlarla ortaya çıkar.

Sifiliz infeksiyonunda en erken 14 gün sonra hastaların serumunda IgM sınıfından antitreponemal antikolar saptanır. İnfeksiyondan 3-4 hafta sonra (primer lezyonun ortaya çıkışı ile veya kısa bir süre sonra) IgG sınıfı anti treponemal antikolar oluşur. Bunlar B lenfositler tarafından sentez edilir. Nonspesifik lipoid antijenler başta veya biraz daha geç olarak gösterilebilir (lipoid IgM antikolar infeksiyondan 5 hafta sonra ; lipoid IgG antikolar infeksiyondan 6 hafta sonra). Treponemaya özgü immobilize antikoların özel bir yeri vardır. Bu antikolar özellikle IgG sınıfından antikolardır ve Treponema pallidum (TPI) testi ile gösterilebilir. Ancak birinci devre sonunda ve ikinci devreye geçişte, yani infeksiyonun başlangıcından 8 hafta sonra ortaya çıkar. Tedavi edilmemiş sifilizde kural olarak IgG antikolar yaşam boyu gösterilebilir. IgG antikolarına oranla IgM antikolarının devamlı oluşumunda, plazma hücrelerinin rollerinin bulunduğu, devamlı antijen stimülasyonunu da dokudaki Treponema pallidum'ların sağladığı düşünülmektedir. Kanda dolaşan antikoların belirli bir titrasyon düşüşü, yalnızca sifilizin birinci devrelerinde veya erken ikinci evrede uygun tedavi yapılmış hastalarda gerçekleşir. Geç yapılmış bir tedavi sonunda Treponemaya spesifik IgG antikoları, hastalığın iyileşmesi veya iyileşmemesine bağlı olmaksızın hayat boyu yüksek serum dilüsyonlarında gösterilir (sero-rezistan serolojik reaksiyonlar). İlanızca nonspesifik lipoid antikoların titrasyonu, serolojik olarak gösterilebilme sınırlarının altında olabilir. Sifiliz etkenin tuttuğu organizmadan uygun bir tedaviden sonra kaybolduğu kabul edildiği için neden geç primer sifilizde, sekonder sifilizde ve geç sifilizde yeterli gelen tedavilerden sonra da spesifik sifiliz testlerinin reaktif kaldığı çok güç açıklanabilmektedir. Göz kamarası suyu, lenf nodülleri veya omurilik sıvısı gibi Treponemaların çok fazla patojen olmadığı yerlerde tek bir etkenin veya parçanın sebat etmesi üzerine tartışmalar olmuştur. Ancak devamlı olarak antijenik açıdan aktif kalırlar. Viral veya bakteriyel infeksiyonlardan sonra allerjik kontakt duyarlılıktan sonra olan şekilde benzeyen şekilde, kesin hücre kolonilerinin yaşam boyunca hatırlanma yetneğinede sahip olduğu düşünülebilir. Bunlar negatifleşmeyen serolojik reaksiyonlar olarak yaşam boyu serumda kanıtlanabilir.



Treponema pallidumun ilk girdiği yerde lokal çoğalmasından sonra, etken lenfatik yolla ve kan yoluyla konağın bütün organlarına ulaşır. Hümorale immun yanıtın başlamasından sonra Treponema antikör kompleksleri in vivo meydana gelir. Bu kompleksler kompleman sistemini aktive eder. Kompleman faktörleri Treponema duvarına yapışır. Bakterilerin duvarında iyi bilinen delikler vardır. Lizozim bu delikler yoluyla geçebilir ve Treponemaların substratına ulaşır. Eğer etken miktarı azalmış ve aynı zamanda biyolojik defans mekanizması kuvvetli ise bu in vivo reaksiyonu Treponemanın ölümü izler. Biyolojik sonuç spontan iyileşmedir. Bu durum serolojik testler ile anlaşılabilir. O takdirde Treponemaya özgü IgM'nin yokluğu ve düşük titrede spesifik IgG antikörlerinin varlığı saptanır. Eğer infeksiyonda Treponema pallidum çok ise ve immun yanıt düşük ise, infeksiyon, hastalığın tipik belirtilerinin yardımıyla klinik olarak saptanabilir. Bu durum ayrıca IgG antikörlerinin olduğu kadar Treponemaya özgü IgM'nin görülmesiyle de serolojik olarak tanınabilir. Infeksiyonun sonraki seyrinde IgG antikörlerinin titresi, IgM sınıfındakileri aşar. Müköz membranın veya derinin primer infeksiyonundan sonra bölgesel lenf nodülleri de infeksiyon etkeni tarafından tutulur. Olasılıkla lenf nodülleri hücrelerinden (inflamasyon yolu ile tıkanan) lipid içeren mitokondriler kan içine alınmaktadır. Infekte olan organizma normal intraselüler mitokondriyal yapıları kendisinin bir parçası gibi algılayamaması nedeniyle bunları antijen olarak kabul eder. Bu durum antilipoidal antikörlerin gösterilmesi ile serolojik olarak tanınabilir. Bu yüzden antilipoidal antikörlerin oluşturulduğu ve bunların Treponemaya özgü olanlardan önce hasta serumunda görülebileceğini düşünmek hatalı olur.

Sifilizde iki türlü antikör sentez edilir: Treponemaya özgü IgM ve IgG, antilipoidal IgM ve IgG. Hastalık yeterli bir şekilde tedavi edildiğinde organizma Treponemaya özgü IgM antikörlerinin üretimini durdurur. Bu durum bilindiği gibi diğer infeksiyon hastalıklarında görülmektedir. Eğer antikörlerin bu tipi bir yıldan daha fazla görülürse, ya tedavinin yetersiz olduğu yada bu süre içinde hastada yeni bir infeksiyonun meydana geldiği düşünülmelidir.

Bu gözlemler izole IgM antikorlarının gösterilmesinin ne kadar önemli olduğunu gösterir. Treponemal ve antilipoidal antikorlar infeksiyonun geçmesinden sonra daha uzun bir süre kalabilirler. B lenfositleri tarafından gerçekleştirilen lipoidal IgG sentezi, lenf nodüllerinin inflamasyonunun ancak yıllar sonra ortadan kaldırılması ile ortadan kalkar. Bu durum Venereal Disease Research Laboratories (VDRL) testinin reaktiften nonreaktife dönüşmesi ile serolojik olarak anlaşılabilir. Bununla birlikte böyle bir gözlemden Treponemal infeksiyonun iyileştiği ileri sürülemez. Çünkü nonreaktif VDRL'li, ancak aktif infeksiyonun klinik belirtilerini gösteren ve reaktif Treponemaya özgü IgM antikorları bulunan ve tedaviye gereksinim gösteren olguların bulunacağı bilinmelidir. Geç latent sifilizde Treponemal IgG antikorlarının titresi çok yüksek değerlere ulaşır. Aynı zamanda IgM antikorları, deneysel immunoloji sayesinde iyi bilinen feed-back mekanizmaya bağlı olarak azalır. Bu koşullar altında aktif infeksiyonlu hastalarda biyolojik olarak yalancı nonreaktif IgM testini gözleme olanağı vardır. Treponema pallidum ile ikinci veya multipl infeksiyonun immunolojik seyri, primer infeksiyonunkinden çok daha farklıdır. Aynı antijen kompleksi ile yineleyen bir temas, önceden olmuş IgG antikorlarına karşı şiddetli bir reaksiyon doğurur. Reaksiyon lenfositlerde spesifik IgM antikorlarının salınımı üzerindeki feed-back etki ile kombine edilir. Bu nedenle değişik Treponemal infeksiyonları geçiren hastalarda IgM antikorlarının sentezi hemen olmamaktadır. Dolayısıyla antikorun bu tipinin görülmesinde gecikir. Sifilizde kompleks immunolojik mekanizmalar dikkate alınır, birçok durumda serolojik tanı elde bulunan testler ile çabuk ve doğru bir şekilde sağlanabilir. Sifiliz infeksiyonlarına karşı doğal bir immünite bulunmaz. Primer sifiliz sırasında bile bir immünite durumu ortaya çıkar. Böylece o anda bile sürmekte olan sifiliz infeksiyonu, hastalığa yakalanmış organizmayı bir süper infeksiyondan korur. İeterli bir infeksiyon immünitesi bulunuyorsa yeni bir inokülasyon bölgesinde hiçbir primer etki oluşmaz. Sifiliz uygun bir tedavi ile yada spontan olarak iyileşmiş ise, infeksiyon immüniteside kaybolur. Vücut daha sonra yeni bir sifiliz infeksiyonu için yeniden duyarlı bir duruma gelir. Etken tekrar alındığında yeni bir sifiliz infeksiyonu ortaya çıkar (1,28,30,31).

## KOMPLEMAN SİSTEMİ

Kompleman, doğal direnci oluşturan hümmoral fazdaki komponentlerden birisidir. Pfeiffer 1894'de kobayları kolera vibriyonuna karşı bağışıklamış, bu bağışık kobayların peritonuna kolera vibriyosu kültürü enjekte etmiştir. Belli aralıklarla aldığı periton sıvısı örneklerini incelediğinde vibriyoların önce hareketlerini kaybettiklerini, sonra şişerek deforme oldukları ve en sonunda parçalanarak eridiklerini gözlemiştir. Görüldüğü gibi bakteri dışında bakteriyoliz olaylarında rol alan en az iki madde söz konusudur. Birisi deneye sokulan bakteriye özel bağışık serum (yani antikor) diğeri de taze serum (yani kompleman olarak isimlendirilen proteinler). Taze serumun memeli hayvanlardan birisine ait olması yeterlidir. Bu taze serumlardan lizozimin etkisi kaldırılırsa bakteriyolitik etki kaybolmaz. Bağışık serumda bulunan etmen ise antikordur. Taze serumda bulunan beklemekle ya da 56 C'de 30 dakika ısıtılmakla etkisizleşen antikor dışında ve bağışıklıkla ilgisi olmayan bir etkenin bulunduğu bu deneylerle ortaya çıkmış oluyor. Bu etkiyi yapan maddeye adeta yarım kalan öldürme işlemi tamamlayan anlamında kompleman adı verilmektedir. Ehrlich bu faktörü kırılğan olarak nitelemiştir. Bu gelişmelerden sonra Bordet (1898) hayvanları bakteriler yerine yabancı eritrositler ile bağışıklayarak elde ettiği bağışık serumu, eritrosit suspansiyonları ve taze serumla karıştırınca bu kez eritrositlerin hemoliz olduğunu göstermiştir. Bağışık serumun kullanıldığı bu olay komplemanın "Klasik aktivasyon yolu" olarak isimlendirilir. Bu deneyde tavşan eritrositlerinin kullanılması durumunda litik etki için bağışık serumu ihtiyaç kalmayacak ve eritrositler sadece taze serum ile lize edilebilecektir. Antikora gerek duyulmayan bu hemoliz olayı ise komplemanın " Alternatif aktivasyon yolu" denmektedir (10,13,14).

Dolayısıyla kompleman iki değişik mekanizma ile hedef hücreye ulaşmakta ve yeterli olduğunda, onu öldürebilmektedir. Birinci klasik, ikincisi ise alternatif öldürme yolu olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli aktivatörlerin stimülasyonu ile başlayan kompleman aktivasyonu, klasik ve alternatif denilen farklı yollardan C5 komponentine kadar gelir. Buraya kadar enzimatik bir kaskad söz konusudur. Daha sonra nonenzimatik bir kaskad ile hedef membranına gömülü bir kompleks (MAC) olarak biter. Bu kaskadın deşarjı aşağıdaki basamaklardan oluşur.

**a) Klasik aktivasyon yolu ( enzimatik ) :**

Çoğunlukla IgM ve IgG1, IgG2'den oluşan antijen antikor komplekslerinin CH3 ve CH2 domentlerine C1q'nun altı parçadan oluşan non-kovalen bağ yaparlar. Membran yüzeyinde olan bu iç hareket, Ca<sup>2+</sup> iyonları ile stabil olan C1q-C1r2-C1s2 kompleksinde C1q'nun konformasyon değişikliği ile C1r esteraz aktiviteleri dolayısı ile C1s enzimatik aktivite kazandırır. C1s'de serbest halde bulunan üç polipeptit zincirli C4'ü C4a C4b'ye ayırır. C4b membranın bir başka yüzüne bağlanır. C2 proenzimi Mg<sup>2+</sup> iyonları katalizörlüğünde C4b ile C1s'e hassas bir kompleks haline gelir ve C2, C2a ve C2b'ye parçalanır. Membran üzerinde C4b2aC3 konvertaz kompleksi oluşur. Bu komplekse C3 bağlanır ve C3a plazmaya atılır, C3b ise bağlı kalır. Bu ise C5-konvertaz olan C4b2aC3b kompleksinin oluşmasına yol açar (15,16,17).

**b) Alternatif aktivasyon yolu ( enzimatik ) :**

C3 molekülü kendiliğinden su molekülleri ile C3 (H<sub>2</sub>O) kompleksini oluşturur. Bununla birleşen faktör B faktör D'nin hedefi haline gelir ve inisiyasyon (başlangıç) faktörü denen C3 konvertaz oluşur. Burada pazitif geri beslenme vardır. Hızlı bir C3 amplikasyonu söz konusudur. Eğer bu konvertaz properdin faktörü ile asosiyel olursa yarı ömrü 20 dakika olan bir C3 konvertaz, C3bPBb, oluşurki bu da C3 moleküllerinin parçalanmasını artırır. Bu kompleks ilave bir C3b ile birleşir ise o zaman kompleks molekül C5'i parçalama potansiyeline sahip, C3bPBbC3b olan, C5 konvertaz oluşur (15,16,17).

**c) Litik yol ( non-enzimatik ) :**

C5 komponenti C4bC2aC3b kompleksine yapışır. Bağlantı C3b ve C2b ile yapılır ve C5a fragmanı plazmaya difüze olur. C5b ise ayrı bir membran yüzeyine yapışır. Artık bu fragman, C6 ve sonra C7 reseptörü haline gelmiştir. C7-konformasyonel yapısını değiştirir, hidrofobik bölgelerini gizleyemez, plazma membranı lipid çift katmanına ( lipidbilayer ) dolar. Bu kompleksine C8 komponentide non-kovalen bağlarla bağlandığında hidrofobik bölgeleri açığa çıkar. C8 fragmanı, hidrofobik zinciriyle membran yüzeyine yayılır, hidrofilik zinciri ile membrana dalarak, lipid katmana 10 nm'lik bir delik açar.

Daha sonra bu durumda olan C5b-8 kompleksine C9 proteini bağlanır. Bu bağlanma ile 12-19 tane alt C9 ünitesi bu küçük deliğin çevresinde polimerize olur. Bunun sonucunda da "hidrofilik-amfifilik" dönüşüm olur. Hidrofobik kısım dış yüzeyde kalır, hidrofilik kısım ise iç yüzeye dalar. Neticede membranda 100-110 nm'lik por oluşur. Bu porları oluşturan komplekse "membran atak kompleksi" ( MAC ) denir. Daha sonra hücreye kalsiyum girişiyle enerjinin bitişi ve membran potansiyelinin kırılışı ile de, Na<sup>+</sup> girişi ve K<sup>+</sup> çıkışı artar. Bu aşırı sızma ya por içinden ya da MAC ile hücre duvarı arasından olmaktadır. Hücre içi yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin yoğunluğundan dolayı mikro çevredeki su osmotik basınç ile porlardan içeri girer, hücre şişer ve geçirgenlik bozulur. Sonuçta hücre lize olur (14).

## SİFİLİZİN LABORATUAR TANISINDA KULLANILAN TESTLER

### NONTREPONEMAL TESTLER

1901'de Bordet ve Gengun sifiliz için serolojik testleri geliştirdiler. Daha sonra 1906'da Wasserman kompleman fiksasyon testlerini buldu. Bu test için Wasserman'ın kullandığı antijen, konjenital sifilisten ölmüş yeni doğan karaciğer ekstraktlarıydı. Wasserman antijenlerinin spesifik olduğunu düşünmüştü. Fakat daha sonra Landsteiner diğer dokularda, özellikle alkolde ekstre edilen sığır kalbinin bu antijen kadar iyi olduğunu gösterdi. Ayrıca kolesterol ve lesitin ekleyerek antijenin hassasiyetini arttırdı. Kompleman fiksasyon testleri sifiliz tanısı için çok yardımcı olmasına rağmen, fazla antijen gerektiren ve yapılması komplike testlerdi. 1907'de Michaelis sifilitik karaciğerin sulu ekstraktlarını kullanmış 1917'de Meinicke karaciğerin sodyum klorürlü veya distile sulu ekstraktlarını kullanmış, kompleman gerektirmeyen ilk presipitasyon testlerini sonuçlandırmıştı. 1922 Kahn birkaç saatte makroskopik olarak sonuç alınan flokülasyon testlerini buldu. Kahn testinin birçok değişik modelleri çeşitli araştırmacılar tarafından, hassasiyeti ve spesifikliği fazla modelleri ortaya çıkartıldı. Tüm bu testlerin sakıncası, antijenin farklı dokulardan ekstre edilmesiydi. İani testlerin standardizasyonu farklıydı. Toplanmış serum örnekleri ve test antijenlerinin duyarlılık, özgüllük ve tayin farklılıkları için kontrol antijenler gerekliydi. 1941'de Pangborn, fosfolipit yapıdaki sığır kalbi aktive antijenik komponenti olan kardiolipini izole etti. Kardiolipin, lesitin ve kolesterol birlikte sifilitik antikörlerin tayini için serolojik aktive antijenlerdir. Ham dokudan elde edilen antijenin aksine kardiolipin, lesitin, kolesterol antijenleri serolojik olduğu kadar kimyasal olarakta standardize edilebildi. Bu testler, Treponemaya ait bir kaynak kullanılmadığından non-Treponemal testler olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemle tespit edilen antikörler bazı çalışmacılar tarafından reagin diye isimlendirilmiştir. Gerçekte bu yöntemle tespit edilen antikörler IgG ve IgM sınıfı antikörlerdir. Bu antikörler lipoidal antijenlere karşı ortaya çıkmaktadır. Bu antijenler Treponemaların konak dokularla etkileşimi sırasında ve bizzat Treponemaların kendilerinden kaynaklanabilmektedir.

Antilipoidal antikorlar nonspesifik antikorlardır. Sifilizde ortaya çıktığı gibi sifiliz dışındaki hastalıklardada ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Bu yeni elde edilen antijenler VDRL gibi mikroflokülasyon testlerinin geliştirilmesini sağladı. VDRL antijenlerine kolin klorid ve EDTA eklenmesi antijen suspansiyonu ve test reaktivitesini arttırdı (4,6,9,28).

**VDRL**, Veneral Disease Research Laboratories'in kısaltılmış ismidir. Kardiolipin-kolesterol-lesitinden oluşmuş antijen ve ısıtılmış serum birer damla lamın üzerine konur ve karıştırıldıktan sonra mikroskopta flokülasyon izlenir. Flokülasyon birbirine yapışmak demektir. Antikor antijen kompleksi bu testte kısa bir süre sonra antijenin özelliğine bağlı olarak pıhtıya benzer bir agregat oluşturur. Sonuçlar reaktif, zayıf reaktif, yada nonreaktif olarak adlandırılır. VDRL mutlaka titrasyon belirtilerek rapor edilmelidir (1,5,28).

**RPR**, Rapid Plasma Reagin testi, çok sayıda örneğin hızlı bir şekilde çalışıldığı, bir alan izleme prosedürü olarak geliştirildi. RPR, yüksek reaktiviteye sahiptir ve plazmanın istenilen hacimlerinde yapılan bir testir. Teardrop kart kullanılır, taramaya uygundur, kömür emdirilmiş antijen kullanılır. RPR testi özel labratuvar elamanları gerektirmeden kolayca uygulanabilir. Bütün gerekli malzemeler kit içinde kullanılıp atılabilir. Sonuçlar makroskopik olarak pozitif veya negatif olarak gözlenir. Dilüsyon yapılarak, VDRL yerine RPR çalışıldığında aynı titrasyon sonucu alınamayacağından kantitatif VDRL çalışmak daha güvenilirdir, üstelikte dilüsyon yapıldığı için prozone olayı engellenmiş olur.

**PCT**, Plazmokrit test, RPR testine benzerdir. Bu test için mikrohemotokrit çalışmasından kalan plazma kullanılabilir. Bunun için ven ponksiyonu gerekli değildir. Bu test yeni doğanlarda kolayca uygulanabilir.

**RST**, Reagin Screen Test, lipide çözülebilen Sudan Black B kullanılarak yapılır ve ısıtılmamış serum kullanılır. Antikor antijen kompleksinin oluşumu sırasında antijenin bu boya ile reaksiyonuna dayanır. Tanı değeri olan bir testtir.

**Kolmer Kompleman Birleşmesi Deneyi;** bir antijen kendi antikoru ile birleştikten sonra, oluşan bu bileşik, ortama katılan kompleman ile birleşerek onu bağlar. İşte bu serolojik deneyle tarafımızdan katılan komplemanın izlenmesi ile, elde bilinen bir antijen var iken serum yada vucut sıvılarında ona uygun antikorun, yada elde bilinen antikorları içeren bağışık serum varken, bunlara uygun antijenin varlıklarının araştırılması olanaklı olur. Elektrolitli ortamda kendi antikorları ile bir arada kalan koyun eritrositleri, komplemana karşı duyarlılaşırlar. Bu karışıma hemolitik sistem adı verilir. Kolmer kompleman birleşmesi deneyi bilinen kardiolipin antijenleri kullanılarak hasta serumlarında Nontreponemal antikorları ortaya çıkararak hastalık tanısı koymak amaçlarıyla kullanılır (2).

Sifiliz hastalarının çoğunda nontreponemal serolojik testler erken primer sifilizde yani lezyonun görülmeye başladığı 4-7 gün sonra pozitif olmaya başlar. Herşeye rağmen primer sifilizde nontreponemal testler %13 ila %41 hastada negatif çıkabilir. Bu yüzden testin reaksiyon vermemesi, yani non reaktif olmaması, her zaman hastalığın olmadığı anlamına gelmez. Sekonder sifilizde bu testler her zaman pozitifdir. Sadece çok yüksek antikor titrasyonlarında prozon olmakta ve test negatif sonuç vermektedir. Serumun sulandırılması ile burada ortaya çıkan prozon reaksiyonun önüne geçilebilir.

Antikor titrasyonu genellikle ya sekonder, yada erken latent evrede en yüksek düzeylerine erişmektedir. Bazen hasta tedavi edilmese bile, hastalığın ilerlemesi ile antikor düzeyleri azalmaya başlamakta nonreaktif olabilmektedir. Tedavi ile hastaların büyük bir çoğunluğunda 3 ila 12 ayda non-Treponemal antikorlar negatif olur ve ancak çok az bir kısmında düşük titrasyonda pozitif sonuçlar alınabilir.



Nontreponemal serolojik testler birçok nedenle rahatlıkla pozitif sonuçlar verebilmektedir. Bunlardan başlıcaları olarak pnömokok pnömoniler, bakteriyel endokardit, ulkus molle, kızıl, sıtma, tüberküloz, lepra, riketsiyozlar, mikoplazma pnömonisi, lenfogranüloma venereum, psittakozis, tripanozomiyasis, borelyozisler, leptospirosis, çiçek yada çiçek aşılması yapılması, kızamık, su çiçeği, infeksiyöz mononükleoz, viral hepatit, gebelik, intravenöz uyuşturucu verilmesi, bağ dokusu hastalıkları, yaşlılık, kronik karaciğer hastalıkları, multipl myelom, birden fazla kan transfüzyonu, ilerlemiş kanser sayılabilir.

Nontreponemal testlerin pozitif çıktığı durumlarda Treponemal testlere geçilmelidir.

## TREPONEMAL TESTLER

Nontreponemal testlerde, infeksiyonla doku hasarı, immünizasyon veya otoimmün hastalıklar gibi birçok sebepten dolayı nonspesifik veya yalancı pozitif sonuçlar alınabilir. Önceleri Treponema'lerden elde edilen ajanlar kullanarak bazı testler geliştirilmeye çalışıldı. Fakat 1949'a kadar başarılı olunamadı. Nelson ve Mayer ilk Treponemal antikor testi olan TPI testini buldular. TPI testinde antijen olarak tavşan testisinde üretilen Treponema pallidum'lar kullanıldı. Bu test için immobilize canlı Treponema'ların, hasta antikor ve komplemanı ile etkileşimi temeldir. TPI testi hızla sifiliz için spesifik test olarak kabul edildi. Bununla birlikte TPI testinin, teknik farklılıklar, zaman kaybı ve pahalıya yapılması gibi nedenlerden dolayı benzer yöntemler arandı. Bugün TPI testi sadece laboratuvar araştırmalarında kullanılmaktadır. 1957'de Fluoresent Treponemal Antibody (FTA) test geliştirildi. Orjinal FTA yönteminde tuz solüsyonunda 1:5 dilüe edilen hasta serumu ile ölü Treponema suspansiyonu reaksiyonu kullanılır. Konjugat olarak florasan işaretli anti-human immunglobulin kullanıldı ve test U.V. ışıklı mikroskopta okundu.

Fluorasanlı bileşik, fluorasan izotiyonat (FITC) işaretli anti-human globulin konjugat kullanıldığı zaman nonspesifik reaksiyonlar normal serumlu örneklerin yaklaşık %25'inde rastlandı. Bu hatalı pozitif reaksiyonları ortadan kaldırmak için hasta serumları 1:200 sulandırıldı. (FTA-200) FTA-200 testi yüksek özgüllüğe sahip olmasına rağmen çok duyarlı değildi. FTA testinin nonspesifik reaksiyon vermesinin sebebi Treponema pallidumun çok fazla antijenlerinin varlığı ve nonpatojen Treponemaların bulunmasıydı. Deacon ve Hunter absorpsiyon ile yaygın antijenleri uzaklaştırdılar. Onların bu buluşu daha spesifik ve sensitif FTA absorpsiyon testi FTA-ABS'nin geliştirilmesine sebep oldu (4,9,28).

**FTA-ABS**, Testin yapılışı aynen FTA testi gibidir. Ondan daha duyarlı olduğu için bugün FTA testi yerine FTA-ABS testi kullanılmaktadır. Hasta serumu, sifilizin nonspesifik grup antijenlerini uzaklaştırmak için ultrasonografik fragmente edilen Reiter türü Treponemaların ekstraktları ile absorbe edilir. Böylece FTA testi, spesifikliği daha geliştirilmiş olan FTA-ABS testi şeklinde yapılmış olur (1,4,9,8).

**TPHA**, Treponema pallidum hemaglitünasyon test, spesifik olmayan antikolar absorpsiyona uğradıkları için, ileri derecede duyarlık kazanmaktadır. Bu test ile IgM ve aynı zamanda IgG antikoları saptanmakta olduğundan, sifilizin tanısında önemli bir yeri vardır. Yapılması kolay olup, titrede edilebildiğinden tercih edilmektedir (1,8,28).

**HATTS**, Hemaglitünasyon Treponemal Test for Syphilis, testinde kuş eritrositleri kullanılmakta diğer prensipler TPHA ile benzerdir (1,7).

**MHA-TP**, Mikro Hemaglutination Assay-Treponema pallidum, TPHA'ya benzer prensibe dayanır. Fakat daha az reaktif ve serumla çalışan mikro testtir.

**ELİZA** test sistemi ile Treponema pallidum spesifik IgG yada IgM testlerinin ayrı ayrı yapılması bu testlere ek bir avantaj getirmektedir (1,37).

## **Treponema pallidum'un Direkt Tayin Yöntemleri**

### **Hayvan Deneylei**

Treponema pallidum infeksiyonu tayininde en eski method hayvan infektivite testleridir. Hamsterden şempazeye kadar bir çok hayvan hem Treponema hemde infektivite tayininde kullanıldı. Fakat çoğu hayvanda infeksiyon belirtisi ve reaktif serolojik testler geliştirilemedi. Tavşan bu konuda en pratik hayvandır. Çünkü inokülasyon bölgesinde lokal bir lezyon yapılabilir. Dokular hayvanın yaşamı boyunca infekte kalır, infeksiyon bir hayvandan diğerine geçirilebilir ve sifilizin serolojik testleri reaktif bulunabilir. İnfekte olduğundan şüphelenilen örneklerin inokülasyonu genellikle intratestiküler veya intradermaldır. Bunun yanında tavşanlar, oküler veya intravenöz olarakda infekte edilebilir.

### **Karanlık Alan Mikroskopisi**

Lezyonlar başladığı zaman en spesifik ve erken sifiliz tanısı, organizmanın direkt tayini ile yapılır. Karanlık alan mikroskopisi ve DFA testleri treponema pallidum tayininde yaygın olarak kullanılır. Karanlık saha mikroskopisi henüz kurumamış lezyonlardan (şankr, kondiloma lata, müköz plaklar) alınan örneklere uygulandığında doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Dolayısı ile primer, sekonder, infeksiyöz nüks yada konjenital sifilizde ıslak lezyonlar görüldüğünde ilk seçilecek yöntemdir.

### **İmmunofluoresan Mikroskopisi**

Lezyon eksüdalari, trakeobronşial sekresyonlar, serebrosipinal sıvı, oküler sıvı, biopsi yada otopsi örneklerinde çalışmaya uygun bu yöntem karanlık saha mikroskopisi olmayan yerlerde yada örneğin transfer edildiği durumlarda yararlıdır. Örnek lama tespit edildikten sonra anti subspecies pallidum antikorları ve bu antikora karşı hazırlanmış FITC ( Fluoresein izotiosyanat ) ile işaretlenmiş ikinci antikorla treponemalar boyanır ve fluorasen mikroskopta izlenir (1,4,9).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hastalık tanısı amacı ile Kompleman Birleşmesi Deneyleri

Amaç eldeki belirli antijenlere karşı, hasta serumunda antikor araştırılarak hastalık tanısı koymaktır. Kompleman birleşmesi deneyleri çeşitli hastalıkların tanısı amacıyla yönelik uygulanmıştır. Bunlardan en çok kullanılan yöntemler Kolmer tekniği ve Laboratory Branch of the Center for Disease tarafından standardize edilen yöntemlerdir (2,19,20).

**Kompleman birleşmesi deneylerinde genel ilkeler:**

### HASTA SERUMLARI

Kandan ayrılan serumların, berrak hemolizsiz olmaları ve bakteriler ile kontamine olmamaları gerekir. Hasta serumları deney gününde 56°C'de 30 dakika tutularak inaktive edilmiş ve soğukta bekletilmiştir. Daha önceleri inaktive edilmiş ve bir günden daha uzun süre soğukta bekletilmiş serumlar, deney gününde yine 10 dakika inaktive edilmiştir (22).

### KOYUN ERİTROSİTLERİNİN (E) HAZIRLANMASI

Koyun kanı ya hayvanın vena jugularis'inden tekniğine uygun olarak içinde %10 sodium sitrat eriğinden, alınacak kan hacminin 1/10'u kadar bulunan, yada içerisinde boncuk bulunan bir şişeye alınmıştır. Sitratlı kaplarda kan ile sitrat eriği karışmaya kadar, boncuklu şişede kan defibrine oluncaya kadar çevirme hareketleri ile karıştırılarak pıhtılaşması önlenir. Kullanmadan önce stabilizasyon için en az bir hafta 4°C bekletilmiştir. Defibrine kan  $10^{10}$  eritrosit/ml içerir.

Defibrine kan süzgeçten geçirilmiş, üzerine kan hacminin onda biri kadar 100 mM EDTA damlatılmış (10 mM), 5 dakika 37 C'de su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra kan en az üç kez olmak üzere 10 hacim serum fizyolojik ve Jelatinli Veronal Buffer Solüsyon (JVBS++) ile soğukta yıkanmıştır. Son yıkama JVBS++ ile yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra deneyler sona erinceye kadar eritrositler hep buzdolabında bekletilmiştir. İıkama 2500 rpm, 5 dakika santrifüjle yapılmıştır. İıkamada hedef üst sıvının renksiz olmasıdır.

#### **E (koyun eritrositlerinin) hazırlanması ve sayımı:**

0.5x10E/ml	1/25 sulandırıldığında	412 nm'de 0.56 OD
1x10 E/ml	1/25 sulandırıldığında	541 nm'de 0.42 OD
1x10 E/ml	1/15 sulandırıldığında	541 nm'de 0.7 OD

Mikroplate'lerdeki eritrositler ELISA okuyucusunda:

1x10 E/ml	1/25 sulandırıldığında	541 nm'de 0.250 OD	vermelidir.
-----------	------------------------	--------------------	-------------

#### **ANTİJEN**

Kompleman birleşmesi deneylerinde antijen olarak Behring firmasından temin edilen Kardiolipin antijen kullanılmıştır. Üzerinde kullanılacak yöntem ile bu yöntem uygun titrasyonları yazılıdır. Bununla beraber laboratuvar koşullarına göre antijen titrasyonu en az bir kere yapılmıştır.

**Antijen titrasyonu:** Antijenler kendilerine karşı antikor içeren kuvvetli olumlu serumlarla titre edilmiştir. En iyi yöntem antijenin çeşitli sulandırımları ile olumlu serumun çeşitli sulandırımlarının çaprazlama olarak karşılaştırılmaları ile yapılan titrasyondur. Kullanılan her yöntemde birim hacimler süreler ve bekletilme sıcaklıkları arasında ayrımlar olmakla birlikte temel ilkeler aynıdır.

## KOMPLEMAN

En standart ve en etkili kompleman kobay serumunda bulunduğundan kompleman birleşmesi deneylerinde kompleman olarak bu hayvanların serumları kullanılmıştır. Ancak bazı kobay serumları nadiren koyun eritrositlerine karşı hemolitik etki gösterebilirler. Bunların aynı miktar koyun eritrositleri ile bir gece +4 °C'de bekletilip absorbe edilmeleri, sonra santrifüjlenerek ayrılan kobay serumu kompleman olarak kullanılmalıdır. Ayrıca birkaç kobaydan alınan serumlar karıştırılarak kullanılmıştır. Deney gününde kompleman titre edilmiş ve titresine uygun olarak kullanılmıştır (2,21).

## KOMPLEMAN TİTRASYONU

### Mikroyöntem ile Kompleman Titrasyonu

Mikroyöntemin referans yönteme karşı standardize edilmesi için, ayıraç oranları sabit kalmak şartıyla, değişen total hacimlerle deneyler yapılmıştır. Bu hacim değerleri 200-300 um arasında değişmiştir.

Deney şöyle yürütülmüştür. Kobaydan alınan serum genelde 7kuyucuk içinde 1/1024'e kadar seri seyreltilmiştir. Bir saat +4 °C'de inkübe edilmiştir. Zaman kaybetmeden EA katılmıştır. Ardından yarım saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Hemen soğuğa alınan plaklar 400 Xg'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılırken, dipteki hücreler üzerine 0.240 ml distile su eklemiştir. Hafifçe çalkalanıp eritrositleri lize edilen kuyu içeriğinin bir saat içinde 550 nm dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Değerlendirme kompleman titrasyonu formülü kullanılarak yapılmıştır (12,20,21).

Deneyin iki kontrolü vardır. Bunlardan biri spontan eritrosit hemolizini saptamak maksadıyla deneye katılır, ve %OT olarak adlandırılır. Bu kuyucuklara serum yerine JVBS++ konmuş ve kuyucuklar inkübasyon süresince aynı şartlara tabii tutulmuştur. Diğer kontrol ise, tüm eritrositlerin patlaması durumunda ortaya çıkacak optik densiteyi bulmak maksadıyla hazırlanmıştır. Burada eritrositler doğrudan suyun içine alınmıştır.

KUYU NO	1	2	3	4	5	6	7
kobay serumu seyreltme oranları (50 ul)	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
soguk J-VBS++	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
-----							
1 saat +4 °C'de bir saat inkübasyon							
-----							
J-VBS+	135.5 µl	135.5 µl	135.5 µl	135.5 µl	135.5 µl	135.5 µl	135.5 µl
EA (0.3x10 <sup>6</sup> hücre/ml)	55.5 µl	55.5 µl	55.5 µl	55.5 µl	55.5 µl	55.5 µl	55.5 µl
-----							
37 °C'de yarım saat inkübasyon							

Tablo 1. Kompleman titrasyonunda ayırıcı dağılımı  
(mikroplak ile)

## Kompleman titrasyonun hesaplanması

Deney sonucunda elde ettiğimiz optik dansite (OD) değerleri kullanarak deneyin aktivasyon değeri CH50/ml ünitesi şeklinde hesaplanır.

Seçilen OD değerlerinin herbiri şu formülle birer Z değerine çevrilir:

$$Z = \frac{\text{OD \%OT} - \text{OD denek}}{\text{OD denek}}$$

Absisi  $\mu\text{l}$  ünitesinden serum miktarı, ordinatı Z olan Log-Log grafik kağıdı hesaplama için kullanılır. Bu grafik üzerinde bulunacak iki noktadan geçen eğri çizilir. Bu eğriden  $Z=1$ 'e karşı gelen serum  $\mu\text{l}$  değeri bulunur. Bu  $\mu\text{l}$  değerinin ismi 1/3 CH50'dir. Orantı ile 1 ml'ye karşı gelen CH50 değeri bulunur. Bulunan yeni değer ünitesi CH50/ml'dir. Deney sonucunda elde ettiğimiz OD değeri kullanılarak 2.5 CH50 değeri bulunur. Bu değer esas değer kalibrasyonunda kullanılır. Bu hesapları yapmadan önce şu şartın deney esnasında gerçekleşmesi gerekir:

%OT'nin değeri %100'ün değerinden en fazla %5'i kadar eksik olmamalıdır. Bu şart hemolizin deney sonuçlarını bozmayacak kadar önemsiz olduğu öngörülür. Bu şart sağlanmış ise bulacağımız değer sağlıklı demektir.

Hesaplama, önce 1 CH50 bundan da 2.5 CH50 değerinin bulunması ile sona erer. 2.5 CH50 değerine tekabül eden bu  $\mu\text{l}$  serum hacmi, deney protokolünde denek tüplerine R1 isimli kalibratör tüpüne konur. Başka bir deyişle, 500  $\mu\text{l}$  kompleman ayırıcının içindeki kobay serumunun miktarı bu hacimdir (12,21,33).

R1 ve bundan türetilen R1/2 ve R1/3 kalibratör serisi idealde şu özellikleri taşır:

	CH50	Z	Lize olan % EA
R1	2.5	6.5	%88
R2	1.25	1	%47
R3	0.83	0.5	%32



## Hemolitik sistem

Hemolitik sistem titrasyonu deney gününde yapılmış ve ona uygun titrasyonunda kullanılmıştır. Hemolitik sistem Sigma firmasından Anti-Sheep Rabit İmmunglobilin (Hemolizin) ticari adı ile alınmıştır.

## KOLMER KOMPLEMAN BİRLEŞMESİ DENEYİ

### Reaktifler

1. %2'lik koyun eritrosit süspansiyonu
2. 1/10 ve 1/15'lik kompleman
3. 1/100, 1/150, 1/1000'lik amboseptör (Hemolizin)
4. 1/150'lik antijen

Deneyde kullanılan amboseptör ve komplemanın aktiviteleri titrasyon yapılarak tayin edilmiştir. Deneye başlamadan önce hasta serumları 56 °C'de 30 dakika benmaride inaktive edilmiştir. Her hasta serumu için çift tüp kullanılmış, öndeki sıra tanı tüpü, arkadaki sıra ise serum kontrol tüpü olarak değerlendirilmiştir. Kontrol tüpüne 0.2 ml hasta serumu, 0.5 ml serum fizyolojik (tuzlu su); tanı tüpüne 0.2 ml hasta serumu, 0.5 ml antijen ve her iki tüpe birden kompleman titrasyonuna göre sulandırılan komplemandan 1 ml ilave edilmiştir. Tüpler 37°C'de 1 saat su banyosunda bekletildikten sonra her iki tüpe 0.5 ml amboseptör titrasyonuna göre hazırlanan hemolitik serumdan ve %2 koyun eritrositi süspansiyonundan ilave edilmiştir. Tüpler tekrar 37 C'lik su banyosuna koyulmuş, 1 saat içerisinde okunarak pozitif, negatif ve antikomplemanter olarak değerlendirilmiştir (2,37).

## MİKROKOMPLEMAN YÖNTEMİ

Koyun kanından elde edilmiş eritrositler (E) önceden titrasyonu yapılmış hemolitik serum ile duyarlılaştırılmıştır (EA). Deneyde U tipi ELISA plakları kullanılmıştır. Her hasta için arka (1 nolu sıra), ön (2 nolu sıra) ve dilüsyon sıralarına göre (1/2, 1/4, 1/8, 1/16,... oranlarında) kuyucuklar ayrılmıştır. Arka kuyulara J-VBS++, hasta serumu, kompleman titrasyonuna göre seyreltilmiş kompleman koyulmuştur. Ön kuyu ve dilüsyon kuyularına J-VBS++, kompleman titrasyonuna göre seyreltilmiş kompleman, titresine göre seyreltilmiş kardiolipin antijen koyulur. Deneyde üç kuyu kontrol olarak ayrılmıştır. Eritrosit kontrol tüpüne, J-VBS++, EA; antijen kontrol tüpüne, Antijen, kompleman, J-VBS++, EA; sistem kontrol tüpüne, kompleman, J-VBS++, EA koyulmuştur. Bir saat 4 C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüm kuyulara EA koyulmuştur. 30 dakika 37°C'de inkübasyonda bekletilmiştir. Sonuçlar makroskobik olarak okunmuştur.

Deneyde arka kuyuların hepsinde hemoliz gözlenir. Ön kuyularda, negatif hastalarda hemoliz vardır. Pozitif kuyularda özellikle küçük dilüsyonlarda hemoliz gözlenmez. Ön kuyuların tümünde kuvvetli hemoliz varsa hasta serum dilüsyonu arttırarak deney tekrarlanır. Eğer hastada arka kuyuda hemoliz gözlenmez ise o hastanın serumu antikomplemanterdir.

Eritrosit kontrol kuyusunda, hemoliz olmamalıdır. Olmuşsa VBS++ izotonik hazırlanmamıştır yada eritrositler dayanıksızdır. Deney geçersizdir.

Sistem hemolitik kuyusunda, hemoliz olmuş olmalıdır. Olmamış ise kompleman yada sistemde bir aksaklık vardır. Deney geçersizdir. Antijen kontrol kuyusunda, hemoliz olmalıdır. Olmamış ise antijende antikomplemanterlik vardır. Yeniden titre edilmelidir.

Kuyu No	1	2	3	4	5	6
JVBS++	35 ml	-	14µl	14µl	14 µl	14µl
hasta serumu	14µl	14µl	1/2	1/4	1/8	1/16
Antijen	-	35µl	35µl	35µl	35µl	35µl
Kompleman	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl
1 saat +4 °C' de inkübasyon						
EA	35 µl	35 µl	35 µl	35 µl	35 µl	35 µl
30 dakika 37 °C' de inkübasyon						

Tablo 2. Mikrokompleman yöntemi ayıraç dağılımı

### Kullanılan çözeltiler

VBS++..... : 1.45 M NaCl:3.75 g/l Na-Barbital çözeltisi ile 5.750 g H-Barbital karışımlarından alınmış çözeltidir. (OH=7.3; i.s.=0.147; kondüktans=8.17 mohms). son konsantrasyon 0.15 mM CaCl<sub>2</sub> ve 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> olacak şekilde kullanılır (29).

MgCl<sub>2</sub>..... : 1 M (95.3 g/mol)çözeltisi hazırlanır. Otoklavlanarak saklanır.

CaCl<sub>2</sub>..... : 0.5 M (111g/mol)çözeltisi hazırlanır. Otoklavlanarak saklanır.

J-VBS++.... : 5xVBS++ çözeltileri 1xVBS++ yapılır ve %0.1 Jelatin katılarak kullanılır.

EDTA çözeltisi.... : Etilen Diamin Tetra asetik asit maddesinin 0.25 molar konsantrasyonundaki maddesidir.

## BULGULAR

Bu alışma, İstanbul Tıp Fakóltesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul Tıp Fakóltesi Dermatoloji Anabilim Dalı ve Pakize İ. Tarzi laboratuvarlarına sifiliz tanı amacıyla gelen 83 serum üzerinde yapılmıştır.



HASTA NO	TPHA	VDRL	KOLMER	MIKRO KOMPLEMAN
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	+
24	+	+	+	+
25	+	+	+	+
26	+	+	+	+
27	+	+	+	+
28	+	+	+	+
29	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
32	+	-	-	-
33	+	-	-	-
34	+	-	-	-
35	+	-	-	-
36	+	-	-	-
37	+	-	-	-
38	+	-	-	-
39	+	-	-	-
40	+	-	-	-

Tablo 5. Genel bulgular

HASTA NO	TPHA	VDRL	KOLMER	MIKRO KOMPLEMAN
41	+	-	-	-
42	+	-	-	-
43	+	-	*	-
44	+	-	*	*
45	+	+	-	+
46	+	+	-	+
47	+	+	-	+
48	+	+	-	-
49	+	+	-	-
50	-	+	+	+
51	-	+	+	+
52	-	+	*	+
53	-	+	-	+
54	-	+	-	+
55	-	+	-	+
56	-	-	+	-
57	+	+	-	-
58	-	-	+	+
59	-	-	+	+
60	+	-	*	*
61	+	-	+	+
62	+	-	+	+
63	-	-	*	*
64	-	-	-	-
65	-	-	-	-
66	-	-	-	-
67	-	-	-	-
68	-	-	-	-
69	-	-	-	-
70	-	-	-	-
71	-	-	-	-
72	-	-	-	-
73	-	-	-	-
74	-	-	-	-
75	-	-	-	-
76	-	-	-	-
77	-	-	-	-
78	-	-	-	-
79	-	-	-	-
80	-	-	-	-
81	-	-	-	-
82	-	-	-	-
83	-	-	-	-

Tablo 6. Genel bulgular  
( \* antikomplemanter sonucu göstermektedir. )

	Pozitif	Negatif	Anti komplemanter
TPHA	53	30	-
VDRL	43	40	-
KOLMER	38	40	5
MIKRO KOMPLEMAN	44	36	3

Tablo 7. Genel değerlendirme

1. Kolmer kompleman birleşmesi yöntemi ile mikrokompleman yöntemi arasında yapılan  $X^2$  anlamlılık testine göre,  $X^2(1,0.05) = 0.616$  ;  $P > 0.05$  anlamlı bir fark yoktur.
2. TPHA yöntemi ile mikrokompleman yöntemi arasında yapılan  $X^2$  anlamlılık testine göre ,  $X^2(1,0.05) = 0.16$  ;  $P > 0.05$  anlamlı bir fark yoktur.
3. VDRL yöntemi ile mikrokompleman yöntemi arasında yapılan  $X^2$  anlamlılık testine göre,  $X^2(1,0.05) = 1.33$  ;  $P > 0.05$  anlamlı bir fark yoktur.
4. Çalışma sonucunda, 31 denek serumunda dört testde pozitif, 20 denek serumunda dört testde negatif bulunmuştur.



## TARTIŞMA

Bir biyolojik ölçüm tekniğinin araştırmalarda yaygın olarak kullanılması, özellikle tıbbi teşhis laboratuvarında kullanılabilmesi için belli bir kaç kriteri içermesi gerekir. Bunlar tekniğın ekonomik olması, kolaylıkla maniple edilebilir olması, uzmanlaşmış elemana mümkün mertebe ihtiyaç göstermemesi ve güvenilebilir sonuçlar vermesidir. Diğeri yandan enzim ile ilgili tekniklerin fazla pratik olmadığı bilinir. Enzimatik aktivasyon kullanılan tekniklerde, deneye alınan materyalin az sayıda olması ve böylece manuplasyonda az zaman kaybettirmesi önemli bir kuraldır. Bu tekniklerin tipik bir örneği, ard arda enzimatik reaksiyonlarla yürüyen kompleman sistemidir. Bu tip çalışma zorlukları çalışmacıları, özellikle enzimatik reaksiyonlarda, mikroteknikler geliştirerek zaman kazanmaya itmiştir. Mikrotekniğın zamanda tasarruf sağlama nedeni manuplasyonun basitliğidir. Mikrotekniğın diğeri bir avantajı, genellikle taze olması gereken ve bu nedenle temininde zaman zaman büyük güçlükler çekilen ayıraçlarının ekonomik bir şekilde kullanılabilmesidir.

Mikrotekniğın gelişimine yönelik çalışmalar oldukça yenidir. 1971 yılında Naymand ve ekibi trombositlerin tiplemesinde mikro tekniğe adepte ederek yeni bir metod geliştirmişlerdir. 1971 yılında Marucci ve arkadaşları ise kantitatif mikrokompleman fiksasyon testini gerçekleştirmişlerdir. 1971'de ise trombositler ile mikro kompleman kantitatif mikrokompleman üzerine çalışmalar yapmıştır. 1983 yılında Leong ve arkadaşları ortak insan melanoma membran antijenlerini mikrokompleman ve immunfloresans tekniği (IFA) ile serolojik yönden taramış ve sonuçta mikrotekniğın yumurta sarısından elde edilen antiviral antikorunu kullanarak kantitatif mikrokompleman fiksasyonunu yapmıştır (23,24,25,26,27).

Maxon Red ve Maxon-LR adlı iki araştırmacı mikrokompleman fiksasyonu için "protein değerlendirmesini kantitatif belirleyicisi" olarak nitelendirmişlerdir. Onu omurgalılar arasında evrimsel ilişkiadaki proteinleri tespit etmede kullanmışlar. Fakat yinede güçlü kompleman analiz testleri Mollness tarafından incelenmiş: HANE (Hereditör Angio Neurotic Eodema) şüphesinde, tekrarlayan neisserial enfeksiyonlarda ve bazı otoimmün hastalıklarda rutin amaçlı olarak kullanıldığını belirtmiştir (34,35,36).

Kompleman sistemi aktivasyonu, çok çabuk azaldığı için deneyin süratle yapılması gerekmektedir. Bu yüzden zaman kaybının en az süreye indirilmelidir. Mikrokompleman tekniğinde deneye katılacak ayıraç miktarı mikropipet düzeyinde olduğu için, çalışmada mikropipetler ve otomatik dağıtıcılar kullanılır. Bu sebepten dolayı ayıraç dağıtımı çok kısa zamanda tamamlanır. Böylece kompleman aktivasyon kaybı en az düzeye indirilmiş olur. Bu rutin çalışmalarda çok daha fazla hastanın aynı anda deneye alınmasını sağlar. Ayrıca deney için kullanılan antijen, antikor, kompleman gibi elde edilmesi zor ve pahalı olan ayıraçlar minimum düzeyde kullanılır. Aynı miktarda ayıraçla çok daha fazla çalışma yapma imkanı sağlanmış olur.

Sifiliz tanısında mikrotekniğe adepte ettiğimiz referans yöntem Kolmer Kompleman Birleşmesi deneyinde, orjinal yöntemde kompleman ilavesinden sonra bir gece +4 °C'de ve daha sonra 10 dakika 37°C'de inkübasyon vardır. Modifiye yöntemlerde ise bu süre 1 saat 37°C'de inkübasyon olarak yapılır. İaptığımız çeşitli denemelerden sonra gördük ki 1 saat 37°C'de inkübasyon kompleman aktivasyonunu hızla düşürmektedir. Bu sebepten dolayı azalmış kompleman aktivasyonu, yalancı pozitiflik görülmesini arttırmaktadır. Mikrokompleman yönteminde komplemanla inkübasyonu, 1 saat +4°C'de yaptık. Sonuç olarak kompleman aktivasyonu artmış yalancı pozitiflik oranı azalmıştır.

İstatiksel olarak verilerin değerlendirilmesi sonucu, anlamlı bir farkın bulunamaması Kolmer kompleman birleşmesi deneyi ile mikrokompleman yöntemi arasındaki uyumu göstermiştir. Bununla birlikte 6 vakada Kolmer kompleman birleşmesi deneyi negatif iken, VDRL ve TPHA ile uyumlu olarak mikrokompleman testinin pozitif bulunması mikrotekniğin daha iyi sonuç verdiğini göstermektedir.

Tanıda kullanılan testin yeterince özgül ve duyarlı olması tanı için oldukça önemlidir. Ayrıca kullanım şeklinin kolay olması, çok sayıda muayene maddesinin incelenmesine olanak sağlaması gerekmektedir. Ancak her testin kendine özgü bir takım olumlu ve olumsuz özellikleri vardır. Özellikle Treponema pallidum'un antijenik özelliğinin komplike olması ve vucutta meydana getirdiği patolojik olaylar sonucu oluşan antikorların diğer bir takım hastalıklarda da ortaya çıkması tanıda kullanılacak test sayısının artmasını gerektirir. Böylece test sonuçları karşılaştırılarak kesin tanının koyulması sağlanır.

Sifiliz hastalarının çoğunda nontreponemal serolojik testler erken primer sifilizde yani lezyonun görülmeye başlandığı 4-7 gün sonra pozitif olmaya başlar. Taze infeksiyonlarda titrasyon birkaç basamak yükselir ve tedavi edilmemiş sifilizde titrasyon bir hayli yüksektir. Nontreponemal testlerde titrasyon, taramanın yanında doğrulama testlerine yardımcı olarak ve tedavi sonrası kontrollerde kullanılır.

Nontreponemal testlerin belirgin bir titrasyon düşmesi aracılığı ile kantitatif değerlendirilmesi, bu testleri en önemli seyir kontrol testi yapmaktadır. Spesifik treponemal testler seyir kontrol testleri olarak uygun değildir.

Bundan dolayı sifiliz tedavisinde serolojik kontroller için kullanılmamaktadır. Bunlar kantitatif olarak değerlendirilmez ve olağan biçimde ikinci devir sifilizinden sonra pozitif kalırlar. Bu yüzden genellikle nontreponemal ve treponemal testler birlikte yapılır. Şüpheli durumlarda doğrulama reaksiyonları ve tedaviye gereksinme olup olmadığının belirlenmesi gereken durumlara karar verdiren nontreponemal testler kullanılır.

18016 sayılı resmi gazetede yayınlanan Frengi savaş yönetmeliğinde sifiliz tanısı konulabilmesi için nontreponemal ve treponemal testlerin birlikte yapılması gerektiği ve elde edilen sonuçların karşılaştırmalı olarak yapılarak, kesin sonuca gidilmesi zorunlu kılınmıştır.

Özellikle Mikrokompleman yöntemine adapte ettiğimiz Kolmer kompleman birleşmesi deneyi sonucu titrasyonlu verdiği hastanın klinik takibinde önemlidir. Primer sifilizde zayıf pozitif, sekonder sifiliz ve ikinci devre sifilizde kuvvetli pozitif reaksiyon verir. Hastalık tedavisi olumlu sonuç verdiği titrasyon yavaş yavaş azalır ve sonuçta negatifleşir. Mikrokompleman yöntemi ile de pozitif reaksiyonlarda kolayca seri dilüsyonlar yapılır. Az malzeme kullanılarak ve kısa zamanda sonuç verilebilmek mümkün olur.

Sifilitik olmayan pozitif reaksiyon sonuçları için üç olasılık vardır. Birincisi teknik nedenlerle yalancı pozitif sonuçlardır. Hatalı ayıraçların kullanımı, antijenin yetersiz standardizasyonu, kontrollerin ve serumların karıştırılması gibi durumlar olabilir. İkincisi normalden sapmalardır. Az sayıda da olsa bazı sağlıklı insanlarda henüz bilinmeyen nedenlerden dolayı reaginlerin çok olması, yalancı pozitif reaksiyonlara neden olur. Fakat treponemal testler negatiftir. Üçüncüsü biyolojik yalancı pozitif sonuçlardır. Bunlar pratik olarak yalnızca nontreponemal testlerde görülür ve hem testin gidişi hem de sonuçları yanlış olduğu için biyolojik spesifik olmayan pozitif bulgular olarak adlandırılır. Nontreponemal serolojik reaksiyonlar pozitifdir, buna karşın treponemal serolojik reaksiyonlar negatiftir. Bazen bu bulgular haftalarca, aylarca veya yıllarca pozitif kalır, daha sonra spontan olarak negatifleşir. Bunlar doku parçalanması, lipoidlerin serbestleşmesi ve lipoid-otoantikörlerin oluşmasına neden olan hastalıklarda ve nontreponemal serolojik reaksiyonların yalancı pozitif sonuçlara yol açabilen patolojik serum proteinleri ile birlikte olan hastalıklarda siktir. Kızıl, akut sıtma krizi, akut hastalık fazında tifüs, infeksiyöz mononükleaz, eozinofilik akciğer infiltrasyonu, çeşitli pnomoni formları, ağır tüberküloz, lepra, kanserler, otoimmün hastalıklar grubu içindeki hastalıklar, ayrıca gebeliğin aylarındaki durumlarda, pinta ve frambözi gibi tropik hastalıklarda yalancı pozitiflik görülebilir (1,28).

## KAYNAKLAR

1. Tüzün İ, Katagyan A, Aydemir HA, Baransü O : **Dermatoloji**; Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, (1994).
2. Bilgehan H : **Klinik Mikrobiyolojik Tanı**; Fakülteler evi Barış yayınları, İzmir (1995).
3. King K Holmes : **Sexually Transmitted Diseases**; Mc GrawHill Book Company (1984).
4. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH : Laboratory Diagnosis and Interpretation of Test For Syphilis; **Clinical Mikrobiol Rev** 8: 1 (1995).
5. Bracero L, Warmser GP, Bottone EJ : Serolojik Tests For Syphilis, A Guide to Interpretation in Various Stages of Disease; **The Maunt Sinai Journal of Medicine** 46: 289 (1979)
6. Pedersen SN: Treponemal Antigens and Use in Syphilis Serolojical Tests; **Danish Medical Bulletin** 31: 227 (1984)
7. Mayer PN, Hudson JD, Hausler WL: Evoluation of the Hemagglutination Treponemal Test For Syphilis; **Journal of Clinical Microbiology** 19: 849 (1984).
8. Secuirea PJJ: Serolojical Diagnosis of Untreated Early Syphilis Importance of the Differences in THA, Tpha, and VDRL Test Titres; **Br Jin Vener Dis** 59: 145 (1983).
9. Ito F, Hunter F, George RW, Swisher BL, Larsen SA : Spesifik Immunofluorescence Staining of Treponema pallidum in Smears and Tissues; **Journal of Clinical Microbiology**, 29:444 (1991).
10. Magopian W, Lernmark A : Autoimmun Diabetes Mellitus; Rose NR, Mackay IR (ed): **The Autoimmun Disease II.**; California: 235 (1991).
11. Berkow R (Ed) : **The Merc Manuel of Diagnosis and Therapy**; Merk yayıncılık, İstanbul, (1983).

12. Kabat EA, Mayer M.M. (eds): **Experimental Immunochemistry**; Charles C. Thomas Puplicher, Canada, (1961).
13. Roitt IM, Brostoff J, Male D (eds): **Immunology**; Mosbylear book Europa Ltd, London, (1993).
14. Klein J(ed): **Complement In Immunology**; Blackwell Scientific Publication, England, (1990).
15. Kay PH, Dawkins RL : **Complement Genetics and Disease**; Whaley K (ed) : **Complement in Health and Disease**; MPT Press Limited, Lancaster, (1987).
16. İılmaz MT : Diabetes Mellitus'un tarihçesi, tanısı, tarama testleri ve testlerin değerlendirme kriterleri; **Klinik Gelisim dergisi 2** : 327 (1988).
17. Thai AC, Eisenbarth GS : **Natural History of IDDM**; **Diabetes Rewievs 1** : 1 (1993).
18. Rapp HJ, Borsos T (eds) : **Compleman Fixation**; **Moleculer Basis of Complement Action**, Appleton-Centry-Crafts, Education Division, Meredith Corporation, Newyork, (1971).
19. Perrot GSJ (ed): **Laboratory Branch Complement Fixation Metods (Part1)**; **Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Microtest**, US Goverment Printing Office, Washington, (1965).
20. Casey HL : **Adaptation of LBCF Method to Micro Tehcnicque**; Perrot GSJ (ed):**Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Microtest**, US Goverment Printing Office, Washington, (1965).
21. Klein MH, Siminovitch L : **Methods for Detecting Immun Complexes in Biological Fluids**; Weir DM (ed) : **Handbook Experimental Immunology**; **Application of Immunological Methods in Biomedical Scients**, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, (1986).

22. Ritchie RF, Rose NR, Friedman H, Fahey JL : **Manuel of Clinical Laboratory Immunology**; American Society for Microbiology, Washington, (1986).
23. Naymand GI, Jansen KG : Micro Complement Fixation Test For Typing of Platelets; **A New Method Vox Sang** 20 : 85 (1971).
24. Marucci A, Fuller IC : Quantitative Microcomplement Test; **Appl Microbiol** 21 : 260 (1971).
25. Cikes M : An Improved Quantitative Microcomplement Fixation Test; **J Immunol Methods** 8 : 89 (1975).
26. Leong SP, Cooperband SR, DEckers PJ, Sutherland CM : Serological Detection of Common Human Melanoma Membrane Antigens By Microcompleman Fixation and Immunoflourasance; **Oncology** 40 : 95 (1983).
27. Van-Regenmortel MH, Burckard J : Quantitative and Microcompleman Fixation tests using chicken Antiviral Antibody Extracted From Egg Iolk; **J Virol Methods** 11 : 217 (1985).
28. Neville JB : **Laboratory Immunology Serology**; WB Saunders Campany, Philadelphia, (1992).
29. Robert CW : **CRC Handbook of Chemistry and Physics**; CRC Press Inc Boca Raton, Florida, (1984).
30. Müftüoğlu E : **İmmünoloji**; Saray medikal yayıncılık, İzmir, (1993).
31. İeğin O. : **Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları**; Palme Yayın Dağıtım Ankara, (1990).
32. Liszewsl MK, Atkinson JP: The Complement System, **Fundamental Immunology**; Paul WE (ed), Raven Press Ltd, Newyork, (1993).
33. Haney MR : Tests for Circulating Immune Complex; Thompson RA (ed): **Techniques in Clinic Immunology**, Morrison Gibb Ltd, Oxford : 174 (1981).

34. Maxson RD, Maxon LR : Mikro-complement Fixation;A Quantitative Estimator of Protein Evolution, **Mol Biol Evol** 3 : 375 (1986).
35. Mollnes TE, Nielsen EW, Hogeson K, Mellbye OJ : **Complement Analysis Test**, Tidsskr nor Leageforen 113 : 211 (1993).
36. Kaufmann TS, Riccomi HA : A Modified Microcomplement Fixation Test for Antigen or Antibody Determination in Soluble Immun Complex; **Immun Commun** 13 : 269 (1984).
37. Aaçfıdan A: Sifilizli hastalarda spesifik IgM ve IgG antikorlarının, tedavinin izlenmesindeki önemi ve tanıda kullanılan diğer yöntemlerle karşılaştırılması; **Doktora tezi**, İstanbul Tıp Fakültesi Tez Bürosu, (1991).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ