

# ELISA ile Belirlenen Antitreponemal IgG ve IgM Antikorlarının Sifilis Tanısındaki Yeri

Feza Otağ<sup>1</sup>, Nilgün Yılmaz<sup>2</sup>, Gaye Ünal<sup>3</sup>

**Özet:** Konvansiyonel tarama testlerinin sonuçlarını gözden geçirerek antitreponemal IgG ve IgM antikorlarının ELISA ile taramanın tanıdaki değerini saptamayı amaçladık.

**Anahtar Sözcükler:** Antitreponemal antikorlar; sifilis.

**Summary:** Antitreponemal antibodies detected by ELISA for serodiagnosis of syphilis. To review the performance of the conventional tests we aimed to provide a baseline for assessing screening by antitreponemal EIA IgG and IgM.

**Key Words:** Antitreponemal antibodies, syphilis.

## Giriş

Sifilis, *Treponema pallidum*'un neden olduğu bir infeksiyondur. Bu infeksiyon canlı organizmada birçok antikorun üretilmesine yol açar. Sifilis tanısında kullanılan serolojik testler hastalığın tüm evrelerinin doğru tanımlanmasında ve tedavi seçiminde son derece önemli olmaktadır. Bu testler antikorlara yönelik olduğu oranda özgüllüğe sahiptirler (1,2).

Sifilisin serolojik tanısı, patojen organizma *T.pallidum*'a karşı oluşmuş antikorların veya kardiyolipinlerin varlığının ortaya konmasıyla olur. Buna göre serolojik testler spesifik ve nonspesifik olarak iki gruba ayrılır.

Nonspesifik testlerde antijen olarak kardiyolipin-lesitin-kolesterolin karışımı kullanılır ya da Rapid Plasma Reagin (RPR) testinde olduğu gibi hasta serumu karbonlu kardiyolipin antijeni ile reaksiyona girer.

RPR ve Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) testi ile birlikte, tedavi öncesi ve tedavi sonrasında en sık kullanılan tarama testi olan *Treponema Pallidum* Hemagglutination (TPHA)'da ise koyun eritrositlerine yüklenmiş olan *T.pallidum* suşu, serumda bulunan spesifik antikorla hemagglütinasyona yol açar. Çok duyarlı, kalitatif ve kantitatif bir testtir (1-3).

Bir doğrulama testi olan Fluorescent Treponemal Antibody Absorption (FTA-Abs) testinde antijen olarak tavşan testis dokusunda kültürlü yapılan *T.pallidum*'un Nichols suşu kullanılmaktadır. Fluoresan işaretli antihuman globülin, hasta serumundaki antikorların antijenle reaksiyona girmesiyle görünür hale gelir. Sifilisin çok erken ve çok geç evrelerinde bugün için en duyarlı testtir (1,2).

Sifilisin laboratuvar araştırmasında kolay ve hızlı yapılabilen, sonuçları objektif değerlendirilebilen, otomasyona elverişli bir teste gereksinim duyularak ELISA çalışmaları yapılmıştır (4-9). İlk kez 1975'te Veldkamp ve Visser sifilis tanısı için ELISA testini kullanmışlardır. 1983'ten sonra Radolf ve arkadaşları sifilis IgG ve IgM antikorlarının tayinine dayanan ELISA yöntemini geliştirmişlerdir (5).

Sunulan bu çalışmada, konvansiyonel sifilis testleri uygulanmış serum örneklerinde enzim immünessey (EIA) yöntemiyle

ile çalışarak antitreponemal IgG ve IgM antikorlarını saptamayı ve bu yöntemin sifilisin serolojik tanısındaki yerini araştırmayı amaçladık.

## Yöntemler

1993 ve 1994 yılları arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ve Haydarpaşa Numune Hastanesi Dermatoloji Kliniklerine başvuran kişiler arasından rastlantısal olarak seçilmiş 184 serum örneği toplanmıştır. Rutin olarak RPR ve 1/160 dilüsyona kadar TPHA testleri çalışılmıştır. ELISA araştırması için serumlar -30°C'de bekletilmiştir. Daha sonra Captia Sy EIA IgG ve EIA IgM testleri bir arada çalışılmıştır. Ayrıca herhangi bir testi pozitif bulunan serum örneklerine FTA-Abs doğrulama testi uygulanmıştır.

Captia EIA Sy IgG indirekt bir yöntem olup mikroplak kuyuları *T.pallidum*'un Nichols suşunun sonik ekstresi ile kaplıdır. Captia Sy EIA IgM ise bir "immune capture" yöntemidir. Mikroplak kuyuları antihuman IgM ile kaplıdır ve ayrıca RFye bağlı olabilecek yalancı pozitifliklerin önlenmesi amacıyla IgG sınıfı bir konjugat yerine "tracer complex" kullanılmıştır.

Testler üretici firmanın önerisine uygun şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda bir otomatik mikroplak okuyucuda okunmuş ve değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca teste kromojenik substratın kullanılıyor olmasından dolayı reaktif kuyularda, *T.pallidum*'a özgü antikorların miktarlarıyla orantılı bir renklenme gözlenmiştir.

## Sonuçlar

Çalışma kapsamındaki 184 serum örneğinin 120'sinde tüm testler negatif bulunmuştur. Altı serum örneğinde sadece RPR testi pozitif bulunmuştur. 26 serum örneğinde RPR, TPHA, EIA Sy IgG ve IgM ve FTA-Abs testleri pozitif bulunmuştur. 24 serum örneğinde ise EIA IgM hariç diğer testler pozitif bulunmuştur. İki serum örneğinin EIA IgG ve FTA-Abs testleri pozitif sonuçlanırken diğer testleri negatif kalmıştır. Üç olguda sadece IgG pozitifliğine, bir olguda ise sadece IgG negatifliğine rastlanmıştır. Diğer bir olguda EIA IgM ve RPR testleri negatif iken TPHA, EIA IgG ve FTA-Abs testleri pozitif sonuçlanmıştır. Sadece TPHA testi pozitif bulunan bir serum örneğine rastlanmıştır (Tablo 1).

## İrdeleme

Sifilis infeksiyonunun her evresinde erken ve kesin tanıda

- (1) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, Cerrahpaşa-İstanbul
- (2) Haydarpaşa Numune Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Haydarpaşa-İstanbul
- (3) SSK Göztepe Hastanesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Servisi, Kadıköy-İstanbul

**Tablo 1. 184 Serum Örneğinin Laboratuvar Sonuçlarına Göre Dağılımı ve Yorumu**

Toplam Olgu	RPR	TPHA	EIA Sy Ig G	EIA Sy Ig M	FTA-ABS	Yorum
120	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Sy değil
6	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Sy değil, yalancı (+) RPR
26	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Erken sy
24	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Tedavi gören sy
1	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Tedavi olmuş sy
2	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Tedavi olmuş sy
3	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Tedavi olmuş sy
1	Negatif Prozon?	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Tedavi gören sy
1	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	EIA IgG duyarsızlığı

test olarak düşünülse de ve duyarlılığı birçok araştırmada TPHA ve FTA-ABS testlerine yakın bulunsun da tedavi izleminde IgG antikorlarının uzun yıllar pozitif kalması nedeniyle uygun bir yöntem olarak gözükmemektedir. Ancak yüksek duyarlılık ve özgüllüğünden dolayı daha önce nonspesifik seroloji yapılarak seçilmiş serum örneklerinin treponemal durumlarının doğrulanması için ideal bir testtir.

Sadece TPHA testi pozitif bulunan bir serum örneğinin tedavi edilmiş, ancak tedaviye gereksinimi açısından irdelenmesi gereken bir olguya ait olabileceği düşünülmüştür. EIA IgG testi negatif bulduysa da tedavi gereksinimi bakımından 19S FTA-ABS ile test edilmesinin uygun olacağını söyleyebiliriz.

EIA IgG, FTA-ABS ve TPHA testleri pozitif bulunan bir serum örneğinin tedavi uygulamasında bulunan bir sifilisi hastaya ait olabileceği düşünülmüştür. RPR testi negatifliği prozon reaksiyonu ile açıklanabilir. Literatürde erken evre sifilisi olgularının % 1-2'sinde prozon fenomenine rastlandığı bildirilmektedir. HIV enfeksiyonu olanlarda ve re-infekte sifilisi kişilerde antikor titresinin çok yük-

sek bulunması nedeniyle prozon fenomenine rastlanmaktadır (10).

IgG testi negatif, diğer testleri pozitif bulunan başka bir örneğin enfeksiyon taşıdığı ve tedaviye gereksinimi olduğu düşünülmüş ve EIA IgG testinin duyarsız kaldığı kanısına varılmıştır. Tek başına EIA IgG pozitifliği olan ve diğer testleri negatif bulunan üç serum örneğinin tedavi görmüş sifilisi olgularına ait olabileceği düşünülmüştür. Sadece ELISA ile pozitif sonuç bulunması *T. pallidum* antikorlarının varlığı ile açıklanırken, infekte veya tedavi hastalarda diğer testlerin negatifleşmesi veya erken sifilislilerde henüz pozitifleşmemesi şeklinde yorumlanabilir ya da testlerin çalışılması sırasındaki teknik hatadan şüphelenilebilir.

İki serum örneğinde EIA IgG ve FTA-ABS testleri pozitif bulunmuştur. Diğer testler negatif kalmıştır. Bu olguların da tedavi olmuş, ancak tedavi gereksinimi bakımından irdelenmesi gereken olgular olduğu kanısına varılmıştır. Tedavi görmüş hastalarda IgG antikorlarının uzun yıllar kalması EIA IgG testinin pozitif sonuçlanmasına yol açmaktadır.

Sifilisin erken tanısında, tedavi sonrası izlenmesinde ve konjenital sifiliste IgM antikorunun önemi bilinmektedir. Tedavisiz sifiliste pozitif EIA IgM testi aktif sifilisin kanıtıdır. IgM titrasyonunda herhangi bir düşüşün saptanması tedavinin başarısı anlamını taşır. Tedaviye yanıtın izlenmesinde EIA IgM, FTA-ABS testi kadar etkin kabul edilebilir. Treponemal IgM sağlıklı olarak 19S FTA-ABS testi ile saptanabilir. Bu bir referans metodudur (1,4).

Naot ve arkadaşları (11) ile Cerny ve arkadaşları (12)'nin bildirdikleri gibi IgM ile ilgili tüm çalışmalarda RF'e bağlı oluşabilecek yalancı pozitif reaksiyonlar daima göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle Captia Sy EIA IG M testinde IgG sınıfı bir konjugat yerine "tracer complex" kullanılarak RF'nin işe karışması engellenmiştir.

Sonuç olarak ELISA ile antitreponemal IgG ve IgM antikorlarının eşzamanlı çalışılması hem sifilis tanısının doğrulanmasında, hem de tedavi kararında klinisyene yardımcı olmakta, laboratuvara ise çalışma kolaylığı ve ergonomisi kazandırmakla beraber yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik olasılıklarını sınırlandırmaktadır (4,5).

Bu çalışmada serum örneklerinin rastlantısal seçilmiş olması, laboratuvar sonuçlarının klinik anlamlılık açısından değer-

**Tablo 2. Rutin Serolojik Testlerin ELISA IgG, IgM ve FTA-ABS Pozitiflikleriyle Karşılaştırılması**

	Örnek Sayısı	FTA-ABS	EIA IgG	EIA Ig M
		(+)	(+)	(+)
TPHA (+), RPR (+)	51	51	50	27
TPHA (+), RPR (-)	2	1	1	0
TPHA (-), RPR (-)	125	2	5	0
TPHA (-), RPR (+)	6	0	0	0
Toplam	184	54	56	27

serolojik testlerin önemi büyüktür. Ülkemizde hemen tüm merkezlerde serolojik tanı treponemal ve nontreponemal testler bir arada yapılarak bildirilmektedir. Reaktif çıkan örneklere ancak bazı laboratuvarlarda doğrulama testi olarak FTA-ABS testi uygulanabilmektedir (2,4).

VDRL (veya RPR) ve TPHA testleri otomasyona elverişli değildir. FTA-ABS ise zaman alan ve pahalı bir araştırmadır. Ayrıca rutin serolojik testler bazı erken primer enfeksiyonları saptamada başarısız kalabilmektedir (6). Referans laboratuvarlarında sifilisin tüm evrelerinde duyarlı, ucuz ve kolay yapılabilen ve ayrıca otomasyona uygun bir teste gereksinim vardır (4-9).

Çalışmamızda ELISA yöntemi diğer rutin testlerle karşılaştırılmıştır. Rastlantısal olarak seçilmiş 184 serum örneğinin laboratuvar sonuçlarına göre yorumu Tablo 1'de gösterilmiştir. Tüm testlerin negatif bulunduğu 120 serum örneğinin nonsifilitik kişilere ait olduğu düşünülmüştür. Yine nonsifilitik kişilere ait olduğu düşünülen altı serum örneğinde tüm testler pozitif bulunmuş ve bu olgular tedavisiz sifilitik olguları şeklinde değerlendirilmiştir. 24 serum örneğinde EIA IgM negatif iken diğer testlerin pozitif sonuçlanmış olması, enfeksiyon taşıyan bu olguların tedavi aşamasında olduklarını düşündürmüştür.

Sy EIA IgG'nin treponemal testlere iyi bir alternatif olduğu söylenebilir. Tablo 2'ye bakıldığında TPHA ve RPR testleri pozitif olan 26'sı erken sifilis, 24'ü tedavisi süren sifilis olarak yorumlanan toplam 50 vakanın tümünde EIA IgG pozitif bulunmuştur. Duyarlılığı TPHA ve FTA-ABS testlerinininkine benzerdir. Her ne kadar EIA IgG, diğer spesifik testlere alternatif bir

lendirilmesini mümkün kılmamaktadır. Daha geniş laboratuvar çalışmalarında ELISA IgG ve IgM testlerinin duyarlılık ve özgüllük bakımından araştırılmasının uygun olacağı kanısındayız.

#### Kaynaklar

1. Kotoğyan A, Hekim N. Laboratuvar. In: Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir E, eds. *Dermatoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1994: 184-92
2. Bradford LL, Larsen AA. Serologic tests for syphilis. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Hermann KL, Isenberg HD, Shaomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1985: 910-20
3. Lukehart SA. Serolojik testing after therapy for syphilis: is there a test for cure? [Editorial]. *Ann Intern Med* 1991; 114:1057
4. Lefevre J C, Bertrand MA, Bauriaud R. Evaluation of the Captia enzyme immunoassays for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1704
5. Codd AA, Sportt MS, Narang HK, Crone PB, Turner RH. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J Med Microbiol* 1988; 26:153
6. Young H, Moyes A, McMillan A, Patterson J. Enzyme immunoassay antitreponemal IgG. Screening or confirmatory test? *Clin Pathol* 1992; 45:37
7. Pedersen NS, Sheller JP, Ratnam AV, Hira SK. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin M to nontreponemal and treponemal antigens for the diagnosis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1835
8. Ijsselmuiden OE, Schols LM, Stolz E, Aelbers GN, Agterberg CM, Top J, van Embden JDA. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and potential use of TMPA for assessing the effect of antibiotic therapy. *J Clin Microbiol* 1989; 27:152
9. Ijsselmuiden OE, Top J, Stolz E, van Eijk RVW. Development and evaluation of a monoclonal antibody inhibition enzyme linked immunosorbent assay to diagnose syphilis. *Genitourin Med* 1989; 65: 308
10. Spangler AS, Jackson JH, Fiumara NJ, Warthin TA. Syphilis with a negative blood test reaction. *JAMA* 1964; 187: 87
11. Naot YE, Barnett EV, Remington JS. Method for avoiding false-positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays due to presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 73-8
12. Cerny EH, Farshy CE, Hunter EF, Larsen SA. Rheumatoid factor in syphilis. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 89-94