

SEROLOJİK TANI

Celali KURT*

Enfeksiyon hastalıkları günümüzde hala en sık görülen ve en sık ölüme yol açan hastalıklardan olmaya devam etmektedir. Yeni ortaya çıkan veya yeniden önem kazanan etkenler nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının dünya gündemindeki yeri ne yazık ki hiç gerilememektedir. Ölüme neden olabilmeleri, salgınlar yapabilmeleri ve çoğunlukla da tamamen tedavi edilebilir olmaları nedeniyle hızlı ve doğru tanıya en çok ihtiyaç duyan hastalıklardır.

Mikroorganizmalarla gelişen hastalıklarda tanının esaslarını etkenin görülmesi (mikroskopik yöntemler), etkenin üretilmesi (kültür yöntemleri), etkenin antijenik yapısının veya ona karşı oluşmuş konak antikorlarının saptanması (serolojik yöntemler) ve etkenin genetik materyalinin konak doku ve sıvılarında gösterilmesi (moleküler yöntemler) oluşturur. Ancak bu yöntemlerin hepsi tüm mikroorganizma gruplarında aynı pratiklik ve başarı oranlarıyla kullanılamamaktadır. Örneğin kültür yöntemleri birçok bakteriyel ve fungal hastalığın tanısında başarıyla kullanılırken, virüslerin kültürü zaman ve donanım gerektirdiği için yapması zor ve günlük uygulamada yeri çok sınırlı olan bir yöntemdir. Bu nedenle virüs hastalıklarının tanısında da ha çok serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

Bazı mikroorganizmaların yapısal özelliklerinden dolayı kültürlerde ürememeleri veya çok geç ve güç üremeleri, virüslerin ışık mikroskopunda görülememeleri nedeniyle her enfeksiyon hastalığında tüm tanı yöntemleri kullanılamamaktadır. Serolojik yöntemlerin ise saatler hatta dakikalar içerisinde güvenilir sonuçlar verebilmeleri, kolay tekrarlanabilir ve ucuz olmaları nedeniyle kullanımları oldukça yaygındır. Ancak uzun yıllardır kullanılan bazı serolojik tanı yöntemlerinin yanlış kullanılması ve yanlış yorumlanması sık görülen bir durum olup yanlış tanılara ve gereksiz birçok tedavi uygulamalarına neden olmaktadır. Bu nedenle serolojinin ve immünolojinin temel kavramları, mekanizmaları, uygulama alanları ve yorum ilkeleri konusunda tüm branştan hekimlerimizin bilgi sahibi olması gerekmektedir. Son yıllarda teknolojik gelişmelerin yansıması ile enfeksiyon hastalıklarının tanısında büyük gelişmeler yaşanmakta ve bu gelişmelerden serolojik yöntemler de nasibini almaktadır. Ancak bu yeni yöntemlerle birlikte

yeni yanlışların da günlük pratik hekimliğe yerleşmesi engellenmelidir.

Serolojik yöntemlerden elde edilen sonuçlar aşağıdaki amaçlar doğrultusunda kullanılarak çok değerli bilgiler verebilir :

- 1- Bir enfeksiyon hastalığının etkenini tanımlamak bazen sadece serolojik testlerle mümkündür.
- 2- Klinik tanı veya diğer laboratuvar testleriyle tanısı konan hastalıklarda serolojik testler doğrulama amacıyla kullanılabilir.
- 3- Hastalığın gidişi, prognozu ve tedavisi serolojik testlerle izlenebilir.
- 4- Bir kişinin veya toplumun bağışıklık durumunu saptamak için kullanılır.
- 5- Etken mikroorganizmanın serogrup, serotip ve immünotip tayini yapılabilir.

İmmünolojide Temel Kavramlar

İmmunoloji laboratuvarında kullanılan pek çok serolojik yöntemin prensibi antijen antikor birleşmesinin tespitine dayalıdır.

Antijen: Organizmaya girdiğinde kendilerine karşı bağışık yanıt oluşmasına yol açan, bu yanıt sonucunda ortaya çıkan ürünlere (antikorlar ve duyarlı hücrelerin reseptörleri) özgül olarak birleşme özelliğinde olan, organizmanın kalıtsal yapısına yabancı maddelerdir.

Antikor: Antijenlere karşı hüморal (sıvısal) bağışık yanıt sonucunda plazma hücreleri ve dolayısıyla duyarlı B lenfositleri tarafından oluşturulan ve antijenleri ile özgül olarak birleşme özelliğinde olan özgül globulinlerdir. Oluşan antikorlar başta serum olmak üzere tükürük, beyin omurilik sıvısı, dışkı, burun salgısı, gözyaşı ve bunun gibi vücut salgılarında bulunur.

İmmünglobulin (Ig) yapısındaki antikorlar birbirine disülfid bağıyla bağlanmış iki adet ağır zincir ve iki adet hafif zincirden oluşmuştur. Yapısal (ağır zincir yapılarına göre) ve fonksiyonel özelliklerine göre IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere beş sınıfa ayrılırlar. IgG serumda en fazla (%80) bulunan antikordur. IgM immün cevapta ilk

* Sağlık Bakanlığı, Şırnak Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı

üretilenantikor olup, ilk antijenik uyarıda çok fazla sentezlendiği halde sonradan miktarı azalır. Bu nedenle tek bir serum örneğinde bile yüksek titrede saptanması akut enfeksiyonu göstermektedir. IgG molekülü plasentayı geçebilirken IgM geçemez. Bu nedenle bir bebekte IgM saptanır- sa bu bir enfeksiyonu düşündürmelidir. IgA serumda bulunmasına (%10'dan az) rağmen epitelial bariyeri geçip süt, tükürük, idrar, ter, göz yaşı, barsak sekresyonları ve solunum sekresyonlarında bulunur. IgD asıl olarak B hücre farklılaşmasında rol oynar. IgE ise allerjik reaksiyonlarda rol oynar ve helmantik enfeksiyonlarda artar.

Antijen ve antikor araştırmalarında aşağıdaki temel mekanizmalar çerçevesinde incelemeler yapılabilir:

- 1- Elimizdeki bilinen bir mikroorganizma antijenlerini kullanarak insan serum ve diğer vücut sıvılarında antikor araştırmak.
- 2- Elimizdeki belirli antikorları içeren bağışık serumlardan yararlanarak klinik örneklerde mikroorganizmalara ait antijenleri araştırmak.
- 3- Elimizdeki bilinen antikorları içeren bağışık serumları kullanarak mikroorganizmaların antijen yapısını incelemek, bu yapıyı ortaya koyarak mikroorganizmaları tanımak.

Antijen-antikor birleşmesinde başlıca kurallar:

- 1- Birleşme özgüdür, geriye dönüşümlüdür ve genelde nonkovalan bağlarla birleşme olur. Bu özgüllük elde ikisinden birinin varlığında, onu bir ayıraç olarak kullanarak diğerini araştırmak, saptamak ve tanımak olanığı verir.
- 2- Antijenlerin kendi antikorlarına özgüllüğünü belirleyen özel kimyasal gruplardır. Belirtici gruplar (epitoplar) adını alan bu gruplar, antikorların birleşme yanı (paratoplar) ile özgül olarak birleşirler.
- 3- Antijen yapısındaki maddelerde çoğu kez birden fazla belirtici grup bulunduğundan bunlar birden çok antikor molükülünü bağlamak yeteneğinde yani multivalentlerdir. Bir antijen molekülündeki belirtici grupların hepsi aynı kimyasal yapıda olabildikleri gibi değişik kimyasal yapıda da olabilirler. Bu durumda aynı antijen molekülüne değişik yapı ve özellikteki antikorlar bağlanabilir.
- 4- Antijen-antikor birleşmesi olayı iki basamaklıdır. Birinci basamakta uygun epitop uygun paratopla birleşir. Bu basamakta enerji açığa çıkar. İkinci basamak, birinci basamağın oluşmasından sonra antikor molekülünde harekete geçen bazı biyolojik etkinliklerin sonucudur. Olaylar daha yavaş ilerler. Ortaya çıkması için antijenlerin çok valanslı, antikorların da tam antikor niteliğinde Fab ve Fc kısımlarının tamam olması gerekir. Ayrıca ortamda elektrolitlerin olması gereklidir.

Serolojik olarak kesin tanı koydurucu kriterler şöyle sıralanabilir:

- 1- Akut hastalık dönemi ile nekahat dönemi serumları arasında antikor titresinde 4 kat artış saptanması geçirilmekte olan enfeksiyonu gösterir. İlk serum örneği hastalık başlar başlamaz, ikincisi ise 1-2 hafta sonra alınmalıdır. Bu çift serum örneği eş zamanlı ve aynı yöntemle test edildiğinde yararlı sonuçlar verebilir. Ancak bu şekildeki bir tanı yönteminin hastanın tedavisinde gecikmeye neden olmaması sağlanmalıdır.
- 2- Tek bir serum örneğinde yüksek titrede etkene özgül IgM varlığının saptanması akut enfeksiyon için tanı koydurucudur. IgM ve IgG'den hiçbirinin saptanmaması, kişinin şüphelenilen etkenle hiç karşılaşmadığını veya testin hastalığın çok erken döneminde yapıldığını gösterir. Eğer sadece IgG saptanmışsa hasta o mikroorganizmayla karşılaşmıştır ancak bu yeni bir enfeksiyon olmayabilir. Bu durumda akut enfeksiyon tanısı koyabilmek için ikinci serum örneğinde özgül IgG titresinde 4 kat artışı göstermek gerekir.
- 3- Hastalığa neden olan etken çok nadir görülen bir organizma ise ve kişinin bu hastalığı geçirmeden herhangi bir bağışık yanıt oluşturması olası değilse tek serum örneğinde özgül antikor varlığı tanı koydurucudur.

Günümüzde serolojik testler AIDS, rotavirüs, adenovirüs, sitomegalovirüs (CMV) ve herpes virüs enfeksiyonları, viral hepatitler, infeksiyöz mononükleoz, kızamık, kızamıkçık gibi viral enfeksiyonlarda, bruselloz, tifo, sifiliz, leptospiroz, riketsiyoz ve tularemi gibi bakteriyel enfeksiyonlarda, amebiazis ve toksoplazmoz gibi protozoal enfeksiyonlarda ve kriptokokkoz, aspergilloz ve kandidiyoz gibi mantar enfeksiyonlarında tanı aracı olarak kullanılmaktadır. Bunların bir kısmında kesin tanıyı göstermelerine karşın bir kısmında da tanıya yardımcı testler olarak kullanılmaktadır.

Kullanılan temel serolojik test yöntemleri

Presipitasyon testleri: Suda erimiş durumda bulunan antijenlerin elektrolitli ortamda özgül antikorları ile birleşerek önce bulanıklık sonra da ince granüllü bir çökme oluşturmalarına presipitasyon denir. Tüpte halkalı presipitasyon, jel içerisinde yayılımla presipitasyon ve elektro-immuno diffüzyon tekniğine bağlı presipitasyon yöntemleriyle hem antijen hem de antikor araştırılabilir.

Aglutinasyon testleri: Doğal olarak antijen taşıyan bakteriler, eritrositler, lökositler gibi hücreler veya yüzeylerine yapay olarak çeşitli antijenler kaplanmış eritrositler, lateks, bentonit, polistiren gibi sentetik parçacıklar, elektrolitli süspansiyon halinde iken, taşıdıkları antijenlere karşı antikor içeren bağışık serumlarla karşılaştırıldıklarında, birbirlerine yapışarak gözle görülebilecek büyüklükteki parçacıklar halinde çökerler. Bu olaya agglutinasyon adı verilir.

Dolaysız aglutinasyon: Antijen veya antikorların herhangi bir taşıyıcı aracılığı olmadan direkt olarak araştırılmasıdır. Özgül antikorların varlığında mikroorganizma antijenlerinin kümelenmesini içerir. Riketsiyoz tanısında kullanılan Weil-Felix testi, tifo tanısında kullanılan Gruber-Widal testi ve bruselloz tanısında kullanılan Rose Bengal ve Wright testleri bu şekilde çalışan testlerdir.

Dolaylı aglutinasyon (Taşıyıcı parçacıklı aglutinasyon): Bu yöntemde çözünebilir antijen eritrosit ve lateks parçacıkları gibi partiküler yapıdaki taşıyıcılara bağlanmaktadır. Bu sayede antijene partiküler bir yapı kazandırılmış olur. Böylece, eğer incelenen örnekte özgül antikor varsa gözle görülebilir bir çökme elde edilir. Bu taşıyıcı parçacıklara antikor bağlanarak antijen aranması da yapılabilmektedir.

Taşıyıcı partikül olarak eritrositlerin kullanıldığı reaksiyona hemaglutinasyon adı verilir. Lateks parçacıklarının antijen veya antikorla bağlanması sonucunda klinik örneklerde antijen veya antikor arama yöntemine ise lateks aglutinasyon denir. Ayrıca *Staphylococcus aureus*'un Cowan 1 kökeninin protein A denen yüzey proteinine, antikorların Fc kısımlarından tutunmaları sağlanarak, boşta kalan iki adet Fab kısımları ile de klinik örneklerde antijen arama yöntemine koaglutinasyon denmektedir. Bu yöntemde de *S.aureus* bakterisi taşıyıcı partikül olarak kullanılmaktadır. Hemaglutinasyon yöntemiyle *Varicella Zoster virüs (VZV)*, *CMV*, *rubella* ve *Toxoplazma gondii* antijenlerini araştırmak için çeşitli ticari kitler bulunmaktadır. Protein antijenle kaplı eritrositler kullanılarak difteri ve tetanoz toksinlerine karşı antikorlar da araştırılabilmektedir. Ayrıca *treponemal* antikorları ara- mak için kullanılan yöntemlerden birisi de mikrohemaglutinasyondur. Lateks aglutinasyonla özellikle serum, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve idrarda polisakkarit yapıdaki bakteri antijenleri saptanmaktadır. Menenjitli hastaların BOS örneklerinde *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tip b, *Cryptococcus neoformans* ve grup B streptokok antijenleri aranabilmektedir.

Kompleman birleşme testleri: Antijen antikor birleşmesinin komplemanı bağlayıp aktive etmesi, aktive olan komplemanın sistemde antijen olarak kullanılan bakteri, eritrosit gibi hücrelerde sitolize neden olması esasına dayanan uygulaması zor ve zahmetli olan bir testtir. Günümüzde yerini daha kolay uygulanabilir ve daha duyarlı serolojik test yöntemlerine bıraksa da hala bazı viral, riketsiyal ve fungal hastalıkta önemli bir tanı aracı olmaya devam etmektedir.

İmmunofloresans assay (IFA): Bazı floresanlı boyalar özel yöntemlerle antikorlara bağlanabilmektedir. Bu bağlanma antikorun özgül antijenine ilgisini pek az etkiler. Bu şekilde floresanlanmış antikorlar, lamlardaki preparatlarda bulunan antijenleri ile birleştiklerinde floresan mikroskopunda floresan vererek görünür hale gelirler. İncelenecek materyel doku kesiti, içlerinde bakteri, mantar, virüs veya an-

tijenlerinin bulunduğu kültürler ya da hastalık materyali olabilir. Çeşitli direkt ve indirekt floresanlı antikor testi yöntemleriyle klinik örneklerde antijen veya antikor aranabilmektedir. Bir iki saat gibi kısa bir sürede sonuç verebilmesi testin önemli bir avantajıdır. Bunun yanında özel ekipman ve deneyimli personel gerektirmesi, dikkat edilmezse nonspesifik sonuçların yanlış yorumlanabilmesi gibi olumsuzlukları da vardır. Sifiliz tanısında kullanılan floresanlı *treponemal* antikor absorpsiyon testi (FTA-ABS), indirekt floresanlı antikor testinin klasik bir örneği olarak söylenebilir. Ayrıca birçok viral ve bakteriyel (*CMV*, *VZV*, adenovirüs, influenza virüsleri, klamidya, *legionella* türleri vb.) enfeksiyonun tanısında da direkt veya indirekt floresanlı antikor testleri kullanılmaktadır.

ELİSA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay) veya EIA (Enzyme immunoassay): Enzimli immun deney, antijen-antikor ilişkisini antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırma temelini dayanır. Kullanılan başlıca enzimler peroksidaz, alkalen fosfataz ve beta galaktosidaz'dır. Hepatit virüsleri, Rotavirus, EBV, Adenovirus, Herpes virüsler, *CMV*, human Immunodeficiency virus (HIV), Rubella, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Entamoeba histolytica*, *T. gondii* ...gibi pek çok bakteriyel, viral ve protozoal hastalıkta antijen arama, antikor arama ve bunları kantite etmek amaçlı kullanılmaktadır. Uygulanması kolay, güvenilirliği yüksek, hızlı sonuç verebilen testler olduğu için enzimli deneyler oldukça yaygın ve çok sık kullanılmaktadır. Testin temel mekanizmasını biraz daha açıklamak için antijen ve antikor arama yöntemlerinin ana basamaklarından bahsetmek gerekir :

Antikor aranırken :

- Bilinen antijen plastik bir yüzeye (ELİSA kuyucuklarının iç yüzeyine) bağlanır.
- Antikor aranacak serum buna eklenir. Serumda antijene uygun antikor varsa antijene bağlanır ve yıkama ile gitmez.
- Bir enzim ile (örneğin yaban turbu peroksidaz enzimi) işaretlenmiş insan globulini antiserumu eklenir. Antijene uygun antikor varsa antijene yani yüzeye yapışmış olacağından bu son eklenen ve enzim ile işaretlenmiş insan antiglobulini tutacak ve yıkama ile bırakmayacaktır. Böylece yüzeyde antijen + antikor + enzimli insan antiglobulini yapışmış durumdadır.
- Ortama enzime uygun, renk verebilen bir substrat eklenir.
- Sisteme yapışmış enzim bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik ölçümlerle saptanır.

Antijen aranırken :

- Bu defa plastik yüzey bilinen antikor ile kaplanır.
- Antijen aranan materyal konur ve yıkanır.
- Enzim işaretli antikor konur.
- İşaretli enzime uygun substrat eklenerek renk gözlenir.

ELİSA'nın direkt, indirekt, kompetitif, non kompetitif ve capture ELİSA gibi bir çok yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemlere göre, temel mekanizmaların basamakları değişiklik gösterebilmekte olup bu yöntemlerle IgM ve IgG tipindeki antikorlar ayrı ayrı saptanabilmektedir. Dışkıda Clostridium difficile toksini de bu yöntemle saptanabilmektedir.

RİA (Radioimmunoassay): RİA aslında ELİSA dan daha önce kullanılmaya başlanmış olmasına rağmen kısa ömürlü radyoizotopların kullanılması, çevreye ve toplum sağlığına zararlı radyoaktif madde kullanılması testin kullanımının özellikle diğer serolojik metodlarla araştırılmaları zor olan hormon ve ilaçların serum seviyelerinin belirlenmesiyle kısıtlı kalmasına neden olmuştur. Bu testte antikorları işaretleyici olarak radyoizotoplar kullanılır ve antijen antikor birleşmesi olmuşsa ortamda kalan radyoaktivite dedektörler ile ölçülür. Bu yöntemle de klinik örneklerde antijen veya antikor aranabilir.

Avidite testlerinin klinikte kullanımı

Bir çok araştırmacı, toksoplazmoz, CMV, EBV ve rubella başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarda, farklı hasta gruplarında ve bazı aşılar sonrası immun yanıtı değerlendirmede, spesifik IgG antikorlarının matürasyonunu incelemiştir. Gebelikte konjenital enfeksiyonlara neden olan toksoplazmoz, CMV, rubella gibi enfeksiyonlarda primer enfeksiyon, re-enfeksiyon veya reaktivasyon ayrımında sıklıkla başvurulmaktadır. Toksoplazmoz, IgG avidite testinin en çok yapıldığı enfeksiyonlardan biridir. Hastaların birçoğunda düşük aviditeli antikorların yüksek aviditeli antikorlara dönüşümü altı ay içinde olmaktadır. Günümüzde bu testin en yararlı olduğu yer, gebeliğin erken dönemlerinde yüksek aviditeli antikorların yüksek oranda saptanmasıdır. Gerçekte yüksek aviditeli antikorlar primer enfeksiyonun son beş aydan daha önce meydana geldiğini göstermektedir. IgM antikor testlerinin doğrulanmasında, avidite testi erken gebelik döneminde yararlı bir testtir. Ancak gebeliğin geç döneminde yüksek aviditeli antikorlar saptanması, gebeliğin erken dönemlerinde oluşan akut enfeksiyonu ekarte edemez. Organ transplantasyonlu veya immünsuprese hastalarda CMV, EBV, toksoplazmoz, Human Herpes Virüs 6 (HH6) primer veya rekürren enfeksiyonların ayrımında kullanılmaktadır. İmmünsuprese hastalarda primer enfeksiyondan sonra antikorların maturasyonu, daha uzun sürede olmaktadır. Örneğin, CMV enfeksiyonunda yüksek aviditeli antikorlar, normalde iki-altı ayda oluşurken, immünsuprese hastalarda ise, en az bir yıl sonra oluşmaktadır. Avidite testleri ayrıca Hepatit C virus enfeksiyonunda primer, kronik veya geçirilmiş enfeksiyon tanısında ve primer özgül antikor yanıtı ile pasif kazanılmış yanıtın ayrımında da kullanılmaktadır. Avidite, antijen üzerinde yer alan çok sayıda epitop ile antikor moleküllerinin bağlanma bölgeleri arasındaki bağlanma gücüdür. Antikorların antijenlere olan afinitesi başlangıçta düşüken, ilerleyen hafta ve aylarda artmaktadır. Avidite sap-

tanırken antijen ve antikor arasındaki bağlar, üre gibi proteinleri denatüre edebilecek maddelere tabi tutulmakta ve bağların gücü denenmektedir. Bağlar ne kadar kuvvetliyse denatüre edici maddelere o kadar çok dayanmakta ve sonuçta yüksek avidite değeri çıkmaktadır. Eğer antijen ve antikor arasındaki bağlar daha yeni oluşmuşsa, denatüre edici ajanlara dayanmamakta, bağlar kopmakta ve düşük avidite değeri çıkmaktadır. Avidite değeri, aynı serum örneğinin üreye tabi tutulması ile tutulmayan arasındaki orandır. Kullanılan yöntemle göre değişmekle birlikte, yüksek avidite değerine sahip olan bir kişinin enfeksiyonu en az 3-5 ay önce aldığı söylenebilir. Reaktivasyon ya da re-enfeksiyon gibi sekonder immun yanıt durumlarında da, yine yüksek aviditeli antikorlar tabloya egemendir. Bu durumda tek bir serum örneğinde spesifik IgG aviditesinin hesaplanması enfeksiyon hastalıklarının tanısına yardımcı olacak bir yaklaşımdır. Yüksek avidite değeri eski bir enfeksiyonun, düşük avidite değeri ise yeni bir enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilirken, düşük aviditeli antikorlar serumda aylarca kalabileceğinden düşük avidite değeri çıkmış bir sonuç her zaman yeni kazanılmış bir enfeksiyon anlamına gelmez. Bu açıdan bakıldığında yüksek avidite değerine sahip bir sonucun daha değerli olduğu görülmektedir.

Serolojik testlerin uygun kullanımı ve yorumundaki sorunlar

Bu serolojik test yöntemlerinin mikrobiyoloji uzmanları ve enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji uzmanları tarafından doğru kullanılması ve yorumlanması konusunda genel olarak bir sıkıntı yaşanmamaktadır. Ancak toplumda sık görülen, özgül olmayan belirti ve bulgularla seyreden hastalıklarda veya ilgili uzmanların bulunmadığı bölgelerde, bir çok pratisyen hekim veya değişik dal uzmanı hekimler enfeksiyon hastalıklarına tanı koymak ve tedavi etmek durumunda kalmaktadır. Bu durumlarda bazen serolojik test sonuçlarına yanlış yorumlar yapılmaktadır ve dolayısıyla bunu tedavi yanıtları izlemektedir. Bir serolojik testin doğru kullanılması için hekimin testi ne amaçla istediğini ve bu amaca uygun olan testi bilmesi gerekmektedir. Akut bir hastalığa tanı konulmaya çalışırken istenmesi gereken testlerle, kişinin o hastalığa karşı bağışıklık durumu araştırılırken istenmesi gereken testler farklıdır. Örneğin klinik ve biyokimyasal bulguları hepatit düşündürmeyen, Hepatit B virüsüne karşı immünite durumu araştırılan bir kişiden sadece Hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) ve buna karşı antikor (Anti-Hbs) testlerini istemek yeterlidir. Ancak akut hepatit geçiren bir hastada viral etyoloji belirlenmek isteniyorsa bu testlere Hepatit B virüsünün çekirdek antijenine karşı oluşan IgM tipindeki antikorları (Anti-HbcIgM) da eklemek gereklidir. Aksi durumda pençere dönemindeki bir akut Hepatit B tanısı atlanabilir.

Elimize gelen bir test sonucuna ne kadar güvenebileceğimizi bilmek için testin hangi yöntemle yapıldığının, bu test yönteminin hastalığın bu dönemindeki duyarlılığının, poziti-

tif sonucun bu hastalığa ne kadar özgül olduğunun, pozitif ve negatif tahmin değerinin, hangi durumlarda yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç verebileceğinin bilinmesi gerekmektedir. Bu kadar çok parametrenin bütün testler için değerlerinin akılda tutulmasına imkan olmadığı açıktır. Ancak temel kavramlar bilinirse ve çok sık kullanılan testler için kabaca bilgi sahibi olunursa yine de bir çok yanlış yorumun önüne geçilebilir.

Duyarlılık (sensitivite): Bir testin gerçek hastalar içinden hastaları bulma yeteneğidir. Yani hastalık varken testin pozitif çıkma olasılığıdır.

Özgüllük (Spesifite): Bir testin gerçek sağlamlar içinden sağlamları ayırma yeteneğidir. Yani hastalık yokken testin negatif çıkma olasılığıdır.

Pozitif prediktif değer: Test pozitif iken hastalığın bulunma olasılığıdır.

Negatif prediktif değer: Test negatif iken hastalığın bulunmama olasılığıdır.

Prediktif (tahmin,kestirim) değeri bir testin verdiği sonucun gerçeği yansıtmaya gücüdür. Duyarlılık ve özgüllük, gerçek hasta ve sağlamlar arasında testin hasta ve sağlamları ayıklama gücünü belirlerken, kestirim gücü testin hasta ya da sağlam dediklerinin ne oranda gerçek olduğunu ölçer. Kısaca pozitif kestirim değeri, pozitif sonuçla karşılaşan bir hekimin "bu hastanın gerçek bir hasta olma olasılığı nedir?" sorusunun yanıtını verir. Negatif kestirim değeri ise, aynı şekilde negatif test sonucu ile karşılaşıldığında, "bu kişinin gerçek bir sağlam olma olasılığı nedir?" sorusunun cevabını oluşturur.

Bu bilgiler ışığında yaygın ve sık görülen bazı enfeksiyon hastalıklarının tanısına sorunlarına ve bazı serolojik testlerin yanlış kullanımlarına değinmek gerekmektedir. Bunların başında bruselloz gelmektedir. Brusellozda kesin tanıyı kan veya kemik iliği kültürlerinde etkenin üretilmesi oluşturur ancak Brusella cinsi bakterilerin üretilmesi günlerce sürebilmektedir. Bu nedenle tanı genellikle serolojik olarak Rose Bengal lam aglutinasyon ve Wright tüp aglutinasyon yöntemleriyle konur. Rose Bengal testi oldukça duyarlı bir tarama testi olup pozitif veya negatif olarak sonuç verir. Pozitif sonuçların mutlaka Wright testi ile titre edilmesi gerekmektedir. Wright testinde 1/160 ve üzerindeki titrelerde aglutinasyon saptanması uygun klinik semptom ve bulguları olan hastalarda tanıyı genelde koydurur. Ancak yine de konunun bazı inceliklerini bilmek gereklidir. Örneğin pozitif çıkan Rose Bengal testi sonucunda Wright titresini 1/40 çıkabilir. Bu durumda aktif bir bruselloz hastalığı tanısı kesin değildir. Böyle bir durum tularemi, yersinyoz ve lenfoma gibi hastalıklara bağlı, düşük titrede bir yalancı pozitiflik olabilir. Veya hastalığın endemik olduğu bir bölgede bruselloz olmayan bir kişide saptanabilir. Veya

bir sene önce tanı konulup tedavi edilen bir bruselloz hastasından bu sonuç elde edilebilir. Ancak yine ince bir nüans olarak belirtmek gerekir ki bu sonuçlar hastalığı tamamen dışlatmaya da yetmez. Test hastalığın çok erken bir döneminde yapılmış olabilir ve bir hafta sonra bakılacak ikinci bir Wright testinde bu kez 1/320 gibi bir titre ile antikorlarda artış saptanabilir. Daha da ince nüanslara girecek olursak, hastada inkomplet tipte blokan antikorlar oluşmuş ve yapılan bu standart Wright tüp aglutinasyonu ile tespit edilememiş olabilir. Böyle bir durum varsa, Coombs antiserumuyla tekrarlanacak ikinci bir Wright testinde yine yüksek antikor titreleri saptanabilir. Bu durumu açıklayabilecek başka bir tablo ise prozon fenomenidir. Wright testinin son dilüsyonu 1/320 olarak yapılmış ve bu dilüsyonlarda negatif sonuçlar görülmüş olabilir. Gerçekten prozon olayı varsa, hasta serumunun 1/1280'e kadar sulandırıldığı bir Wright testinde belkide 1/640 ve 1/1280 dilüsyonlu tüplerde aglutinasyon saptanacaktır. Görüldüğü gibi bazen bir test sonucunun doğru yorumlanabilmesi için ne kadar da çok bilgiye ihtiyaç duyuluyor. Bruselloz konusunda en çok yapılan iki yanlış, sadece pozitif Rose Bengal sonucuyla hemen hastalık tanısı konulup tedaviye başlanması ve planlanan tedavi bitiminde bu testin hemen negatifleşmesinin beklenmesidir. Tedavi bitiminde eğer Rose Bengal testi yine pozitif bulunursa "tedaviye yanıtız bruselloz" tanısı konarak hasta sevk edilmektedir veya yeniden tedaviye alınmaktadır. Bu konunun iyi kavranabilmesi için brusellozda antikor cevabının kronolojik gidişini bilmek gereklidir. Hastalığın başında ilk yanıt IgM tipinde olup bunu 7-10 gün sonra ortaya çıkmaya başlayan IgG antikorları izler. İyileşme döneminde IgG antikorlarının seviyesi birkaç ay içerisinde azalır. IgM antikorları ise düşük titrelerde yıllarca serumda kalabilir. Azalmayan bir IgG seviyesi persistan enfeksiyonu, azaldıktan sonra tekrar artan IgG seviyesi nüksü gösterir. Rose Bengal ve Wright aglutinasyonları ise IgM ve IgG tipindeki her iki antikorun varlığında da pozitif sonuç verir. Bu iki antikorun ayrı ayrı seviyeleri saptanmak istendiğinde merkaptotetanollü (veya rivanollü) Wright testi yapılmalıdır. Bu testte IgM antikorlarının aglutine olması engellenir ve ortaya çıkan sonuç yalnızca IgG titresini verir. Ayrıca ELİSA yöntemi ile de bu iki antikorun ayrı ayrı saptanması mümkündür. Bu bilgiler ışığında şunları söyleyebiliriz ki; tedaviye klinik yanıtı olan bir bruselloz hastasında, tedavi sonrasında serolojik takip Rose Bengal lam aglutinasyonu ile değil Wright tüp aglutinasyonu ile yapılmalıdır. Amaç antikor titresinin azaldığını göstermek olup tedavi bitiminden 2-3 ay sonra yapılmalıdır. Eğer Rose Bengal testi yapılacak olursa iyileşen bir hastada dahi uzunca süreler pozitif saptanacak ve bu da yanlış yorumlanırsa hastaya uzunca süreler veya tekrar tekrar tedaviler verilebilecektir.

Serolojik yöntemlerin yanlış kullanılması nedeniyle tanısında sık olarak ciddi yanlışların yapıldığı önemli hastalıklardan birisi de tifodur. Tifo, Salmonella typhi'nin etken oldu-

ğu düşmeyen yüksek ateş, mental konfüzyon, baş ağrısı, karın ağrısı, bulantı, kusma, splenomegali, hepatomegali, relatif bradikardi ve lökopeni ile seyreden, baktereminin olduğu sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Tabii ki bu belirti ve bulguların hepsi birden tüm hastalarda görülmemektedir ancak şunu kesinlikle söyleyebiliriz ki tifo ateşli ve kişinin genel durumunu bozan bir hastalıktır. Hatta hastanın ateşinin uygun tedaviye rağmen düşme süresi ortalama 4-6 gündür. Kesin tanısı kan ve kemik iliğinden etkenin üretilmesi ile konur. Tifoda serolitik tanı (Gruber-Widal testi) yardımcı bir test olup birçok sorunu nedeniyle kullanımını sınırlıdır. Bu testte amaç *S.typhi*'nin O somatik ve H kirpik antijenlerine karşı oluşmuş antikorların saptanmasıdır. Kültür pozitif hastaların yaklaşık üçte birinde Widal testi negatif kalmaktadır. Birçok durumda yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç verebilen bu testi doğru yorumlamak için aşağıda belirtilen noktalara dikkat etmek gereklidir.

1. Hasta serumu antikorların oluşumundan önce alınmışsa negatif sonuç alınabilir. Kemoterapi, antikorların çıkma zamanını geciktirebilir.
2. Daha önce aşı olmuş kimselerde buna bağlı artık antikor bulunabilir. Özellikle aşılardan oluşmuş H antikorları uzun süre kalabilir.
3. Özellikle alkol ile hazırlanan O antijenlerinde bakterilerdeki fimbriyal antijenler yok olmazlar. Testte bu antijenler kullanıldığında, hasta serumunda başka nedenlere bağlı olarak oluşmuş antifimbriyal antikor varsa yanıltıcı pozitif sonuç verebilir.
4. Bazı durumlarda *Salmonella* antijenlerine karşı çoğu kez yüksek olmayan titrelerde aglütinasyon sonuçları elde edilebilir. *Escherichia coli*'nin yaptığı süregen enfeksiyonlarında, yaygın tüberküloz enfeksiyonlarında, eskiden salmonelloz geçirmiş ve halen başka enfeksiyon geçirmekte olanlarda (anımsal tepkime, anamnestic reaksiyon) *salmonella* antijenlerine karşı aglütinasyonlar ortaya çıkabilir.
5. Hastalık sürerken anti O antikorları daha erken (ilk haftanın sonunda) anti H antikorları daha geç (10-12. gün) ortaya çıkarlar. Hastalıktan sonra yine anti O antikorları daha erken, anti H antikorları daha geç kandan kaybolurlar. Bu duruma göre elde edilen sonuçlara göre hastalığın hangi periyotta olduğu tahmin edilir. Yalnız anti O antikorlarının anlamlı düzeyde bulunmasına karşın anti H antikorlarının bulunmaması durumlarında hastalığın erken döneminde, yalnız anti H antikorlarının anlamlı düzeyde bulunmasına karşın anti O antikorlarının bulunmaması veya düşük düzeyde olması halinde hastalığın iyileşme döneminde olduğu anlaşılır.
6. Hastalığın seyri sırasında hastadan 7 gün veya daha uzun süre aralıklarla alınan iki serumdan birincisinde, olumsuz ikincisinde olumlu sonuç alınması veya ikincisinde birinciye göre belirgin oranda (4 kat) daha yüksek titre saptanmasının tanısız değeri vardır.

Bu konuda yapılan en sık yanlış, hastanın kliniği tifoyu hiç düşündürmediği halde, hastanın ateşi olmadığı halde, sadece genel semptomların varlığında veya hiç yakınması yokken tarama amaçlı yapılan testlerin sonucunda, O veya H antikorlarından birinin kalitatif olarak pozitif bulunması ile kişiye tifo tanısı konup tedavi verilmesidir. Hatta bazen bu gereksiz tedavinin sonunda test tekrarlanıp sonuç yine pozitif bulununca tekrar tekrar antibiyoterapiler yapılmaktadır. Özellikle endemik bölgelerde tifolu olmayan kontrol gruplarında, en yüksek pozitif titre saptanır ve bu titrenin üzerindeki değerler daha ciddiye alınırsa faydalı olabilir. Ülkemiz için önerilen bu sınırlı titre ve üzeri değerlerdir.

Mikrobiyolojik tanısının pratikte yalnızca serolojik testlere dayandığı enfeksiyon hastalıklarından birisi de enfeksiyöz mononükleozdur (EM). Epstein-Barr virus'un (EBV) etken olduğu ateş, boğaz ağrısı, lenfadenopati ve atipik lenfositozla seyreden bir hastalıktır. Hastalığın laboratuvar tanısında hasta serumunda heterofil antikorların (HA) ve EBV spesifik antikorların saptanması için serolojik testler kullanılmaktadır. Heterofil antikorlar, EBV antijenlerine bağlanmayan fakat koyun, sığır ve at eritrositlerini hemolize edebilen IgM tipinde antikorlardır. Klasik olarak Paul-Bunnell testi veya Monospot test ile saptanmaktadır. Klinik bulguları uygun olan hastalarda heterofil antikor testinin pozitifliği tanı için yeterli olabilmektedir. Ancak bu testlerinde bazı kısıtlılıkları vardır. Buna neden olan durumların başında HA testlerinin hastalığın ilk haftasındaki duyarlılıklarının %40 civarında olması, ancak üçüncü haftada %80-90'lara ulaşması gelmektedir. Özellikle testin erken yapıldığı durumlarda tekrarlanması gerekebilmektedir. HA'lar hasta serumunda yaklaşık 3 ay kadar pozitif saptanır ancak bu süre 1 yıla kadar uzayabilmektedir. HA'ların özellikle 5 yaş altındaki çocuklarda, yaşlılarda ve atipik semptomlarla seyreden olgularda genellikle saptanamadığı da bilinmelidir. Monospot testi ticari kit olarak elde edilebilmekte olup klasik Paul-Bunnell testinden daha duyarlıdır. Fakat yalnızca pozitiflik sorunu çocuklarda ve başka bir viral enfeksiyon geçirmekte olanlarda sıktır. EBV spesifik antikor testleri daha çok EM şüpheli hastalardan HA negatif olanlarda ve atipik semptomlarla seyreden olgularda kullanılmaktadır. Bu antikorlar EBV viral kapsit antijenine karşı gelişen IgM ve IgG antikorları (EBV-VCA IgM, EBV-VCA IgG), EBV nükleer antijenine karşı gelişen antikor (Anti-EBNA) ve early antijene karşı oluşan antikorlardır (Anti-EA). ELİSA testi ile saptanabilen bu antikorlardan EBV-VCA IgM ve EBV-VCA IgG semptomlar başladığında %90'ın üzerinde pozitifleşir ve titreleri artmaya başlar. EBV-VCA IgM yaklaşık 2 ay kadar serumda saptanabilir, EBV-VCA IgG ise ömür boyu kalıcıdır. Bu nedenle akut hastalığın tanısında EBV-VCA IgM kullanılmaktadır. Anti-EBNA ise semptomların başlangıcından 3-6 hafta sonra neredeyse tüm hastalarda oluşur ve ömür boyu serumda kalır. Bu nedenle geçirilmiş es-

ki enfeksiyonun tanısında EBV-VCA IgG ve Anti-EBNA kullanılır. EM şüpheli hastaların serolojik testleri istenirken ve yorumlanırken bu konulara dikkat edilmesi bizleri daha doğru sonuçlara götürecektir.

Günlük klinik hekimlikte sık kullanılan bir test olan anti-streptolizin O (ASO) antikorlarının saptanması, geçirilmiş A grubu streptokok enfeksiyonu tanısını doğrulamak ve akut romatizmal ateş tanısını desteklemek açısından oldukça faydalı olabilmektedir. Ancak ne yazık ki, bu amaçtan daha çok akut streptokoksik bir enfeksiyon hastalığına tanı koyma aracı olarak kullanılmaya çalışılmaktadır. Oysa A grubu streptokoksik enfeksiyonlu hastalarda ASO yanıtı 1. haftadan sonra başlar ve 3-6 hafta sonra en yüksek düzeye ulaşır. 6-8 hafta sonra ASO titreleri düşmeye başlar. Streptokoksik tonsillofarenjitte ASO titreleri hızla yükselir. Buna karşın streptokoksik piyodermi ve impetigoda ASO titrelerinde yükselme çok az olur. Bu farklılık deride bulunan serbest kolesterolün streptolizin O molekülünü bağladığı ve böylece streptolizin O'nun antijenitesinin azaldığı şeklinde açıklanmaktadır. Kronik karaciğer hastalarında, multipl miyelomlu, hipergammaglobulinemili hastalarda ASO titreleri yanlış yüksek bulunur. C ve G grubu streptokoklar da streptolizin O antijenine sahiptir. ASO yüksekliği bunlarla geçirilen enfeksiyonlara bağlı olabilir.

Tanısında serolojik testlerin çok önemli bir yer tuttuğu başka bir enfeksiyon hastalığı da sifilizdir. Kan donörlerinde de rutin olarak taraması yapıldığından ve hastalığın belirtili ve belirtisiz dönemlerle seyretmesinden dolayı bazı tanısız karışıklıkların yaşanabildiği bir hastalıktır. Sifiliz tanısında serumda serolojik yöntemlerle nonspesifik (nontreponemal) ve spesifik (treponemal) olmak üzere iki çeşit antikor aranmaktadır. Nontreponemal testler olan VDRL (venereal disease research laboratory) ve RPR (rapid plasma reagin) ucuz, hızlı ve çok sayıda serumu taramak için uygun testler oldukları için sık kullanılmaktadır. Ayrıca nontreponemal antikorların tedavi ile titrelerinin azalması belli bir süre sonra da kaybolmaları tedaviye yanıtın takibinde de kullanılabilir. Nontreponemal antikorların negatifleşmesi hastalığın tedavi öncesi evresine göre değişir. Bu süre primer sifilizde 1 yıl, sekonder sifilizde 2 yıl olup geç sifilizde 5 yılı bulur. Bu durum da beraberinde persistan enfeksiyon, re-enfeksiyon ve yalancı pozitif reaksiyon ayırımı gibi sorunları da beraberinde getirecektir ancak tedavi sonrası nontreponemal antikor titrelerinin takibi bu konuda yardımcı olabilecektir. Nontreponemal testlerin en sık karşılaşılan sorunu yalancı pozitif reaksiyonlarıdır. Bu yalancı pozitiflik akut bakteriyel ve viral enfeksiyon, aşılama ve erken dönem HIV enfeksiyonu gibi ağır immünolojik uyarının olduğu durumlarda geçici bir süre için görülebilir. Ayrıca intravenöz ilaç bağımlılarında, otoimmün ve konnektif bağ dokusu hastalığı olanlarda ve yaşlı kişilerde aylarca süren yalancı pozitiflikler olabilmektedir. Yetmiş yaş üzeri kişilerde nontreponemal

testlerin yalancı pozitiflik oranı yaklaşık %10'dur. Bu nedenle pozitif nontreponemal test sonuçlarının doğrulanması gerekmektedir. Bunun için özgül (treponemal) antikor testleri kullanılır. En çok kullanılan treponemal antikor testleri FTA-ABS (floresan treponemal antikor absorpsiyon testi), MHA-TP (T.pallidum mikrohemaaglutinasyon testi) ve TPHA'dır (T.pallidum hemaglutinasyon testi). Bu testler pozitifleşince genellikle ömür boyu negatifleşmez. Ancak, özellikle erken dönemde tedavi başlanan %10 hastada negatifleşebileceği de bilinmelidir. Kısaca nontreponemal antikor testlerinin tarama ve tedaviye yanıtı takip amaçlı, treponemal antikor testlerinin ise doğrulama amaçlı kullanılması gerektiğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak; serolojik tanı yöntemleri sık ve yaygın kullanılan, tanıda ve tedaviye yanıtı takipte oldukça yararlı bilgiler verebilen testlerdir. Ancak klinik uygulamalarda, testlerin doğru endikasyonlarda kullanılması ve sonuçların doğru yorumlanması konusunda yapılan yanlışlar azımsanamayacak düzeydedir. Bu nedenle serolojik test yöntemlerinin bazı temel bilgilerin göz önünde bulundurularak kullanılmaları gerekmektedir. Unutmayalım ki her pozitif test sonucu hastalığı kesinlikle göstermediği gibi her negatif sonuç da hastalığı tamamen ekarte ettirmez.

KAYNAKLAR

- 1- Aybay C. İmmünolojik Teknikler. In: Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999: 325-339.
- 2- Babacan F. İnfeksiyon hastalıklarının immüno-serolojisi. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1996: 86-112.
- 3- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. Baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları. 2004.
- 4- Cohen JI. Epstein-Barr Virus Infections, Including Infectious Mononucleosis. In: Faudi AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th ed. New York: McGraw-Hill; 1998: 1089-1091.
- 5- İmir T. Antikor. In: Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999:137-142.
- 6- İmir T. Antikor. In: Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999:137-142.
- 7- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. New York: Lippincott-Raven;
- 8- Kutlu SS, Çelikbaş AK. İnfeksiyon hastalıklarında IgG avidite testinin değeri. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection). 2003; 17 (3): 365-368. 1997.

- 9- Mert A, Özaras R, Tabak F, et al. The sensitivity and specificity of Brucella agglutination tests. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 46: 241-243.
- 10- Parry CM, Hien TT, Dougan G, et. al. Typhoid fever. *N Engl J Med.* 2002; 347: 1770-1782.
- 11- Sözen TH. Bruselloz. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1996: 486-491.
- 12- Topçu AW. Tifo ve tifo dışı salmonellozlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1996: 491-505.
- 13- Tramont EC. *Treponema pallidum* (Syphilis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000: 2474-2490.
- 14- Uğurman F, Berktaş MB. Tıpta Tanı Testleri ve Risk Değerlendirmelerinde Kullanılan Temel Kavramlar. *Akciğer Arşivi:* 2003; 4: 235-240
- 15- Uzel N. Streptokok antikor testlerinin klinik kullanımı ve yorumu. *ANKEM Derg.* 2004; 18 (Ek 2): 51-53.
- 16- Yazar S, Yaman O, Şahin İ. *Toxoplasma gondii* seropozitif gebelerde IgG-Avidite sonuçlarının değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 2005; 29: 221-223.
- 17- Young EJ. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000: 2386-2393.