T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÜŞÜK DÜZEY POZİTİF ÖRNEKLERİN DOĞRULANMASINDA *TREPONEMA PALLİDUM* HEMAGLÜTİNASYON, *TREPONEMA PALLİDUM* PARTİKÜL AGLÜTİNASYON VE "CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY" TESTLERİNİN PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ERTAN ÇAKMAK

ORCID: 0000-0002-1330-0884

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mikrobiyoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR

EYLÜL 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2007970163

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÜŞÜK DÜZEY POZİTİF ÖRNEKLERİN DOĞRULANMASINDA *TREPONEMA PALLİDUM* HEMAGLÜTİNASYON, *TREPONEMA PALLİDUM* PARTİKÜL AGLÜTİNASYON VE "CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY" TESTLERİNİN PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ERTAN ÇAKMAK
ORCID: 0000-0002-1330-0884

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK
ORCID: 0000-0003-4415-7205

İZMİR
EYLÜL 2023

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora Programı öğrencisi **Ertan ÇAKMAK** tarafından hazırlanan "**Düşük Düzey Pozitif Örneklerin Doğrulanmasında Treponema Pallidum Hemaglütinasyon, Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon Ve "Chemiluminescence Immunoassay" Testlerinin Performansının Değerlendirilmesi**" başlıklı tez çalışması 05/09/2023 günü, 13:30-15:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile **DOKTORA TEZİ** olarak **kabul** edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Tezi onaylıyorum
ORCID: 0000-0003-4415-7205

Üye: Doç. Dr. Mahmut Cem ERGON
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Tezi onaylıyorum
ORCID: 0000-0002-4847-987X

Üye: Prof. Dr. Zeynep YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji AD.
Tezi onaylıyorum
ORCID: 0000-0002-2762-0942

Üye: Prof. Dr. Sabire Şöhret AYDEMİR
Ege Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Tezi onaylıyorum
ORCID: 0000-0001-8354-9100

Üye: Prof. Dr. Dilek Yeşim METİN
Ege Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD.
Tezi onaylıyorum
ORCID: 0000-0002-7282-5031

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Düşük Düzey Pozitif Örneklerin Doğrulanmasında Treponema Pallidum Hemaglütinasyon, Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon Ve "Chemiluminescence Immunoassay" Testlerinin Performansının Değerlendirilmesi" başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabul edeceğimi beyan ederim.

Ertan ÇAKMAK

05.09.2023

TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışmasında, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve özellikle de eğitimimde hatalarıma sabır gösteren danışmanım Prof. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK ve Doç. Dr. Mahmut Cem ERGON'a müteşekkirim.

Doktora eğitimime her daim önem vermiş olan eski danışmanlarım Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU ve Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM'e, doktora süresince desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Zeynep YÜCE ve Prof. Dr. Neşe ATABEY'e teşekkür ederim.

2004 yılında yüksek lisans eğitimime başladığım T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji anabilim dalının tüm öğretim üyelerine harikulade eğitimleri nedeniyle müteşekkirim.

Ayrıca Temel Tıp bölümünde onlarca çalışma arkadaşlarımın arkadaşlıklarına ve manevi desteklerine, doktorant olduğum anabilim dalına bağlı çalışanlarına ve T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Her daim eğitim almam gerektiğine inanan ve beni destekleyip, teşvik eden sevgili babama minnettarım.

Ertan ÇAKMAK

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER i
TABLO DİZİNİ vi
ŞEKİL DİZİNİ vii
KISALTMALAR ix
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Giriş 4
2.2. Tarihçe 4
2.3. Epidemiyoloji 5
2.4. Etken 9
2.4.1. Taksonomi 9
2.4.2. Morfoloji 9
2.4.3. Kültür Özellikler 11
2.4.4. Genom 11
2.4.5. Duvar Özellikleri 11
2.4.6. Flajel Özellikleri 12
2.5. Patogenez 13
2.6. Virulans Faktörleri 14
2.6.1. Adezyon 14
2.6.2. İnvazyon 15
2.6.3. Motilite 16
2.6.4. Kemotaksis 16
2.6.5. Sitotoksinler 16
2.7. İmmünolojisi 17
2.7.1. Doğal Bağışık Yanıtlar 17
2.7.2. Hücresel Bağışık Yanıtlar 18
2.7.2.1. Polimorf Nüveli Hücreler ve Makrofajlar 18
2.7.2.2. Dentritik Hücreler 19
2.7.2.3. T Hücreler 20

2.7.2.4. Sıvısal Bağışık Yanıtlar 20
2.7.2.5. Antikor Yanıtlar 21
2.7.2.6. Sitokin Yanıtları 21
2.7.2.7. Bağışıklık 21
2.8. Klinik 22
2.8.1. Primer Evre Sifiliz 23
2.8.2. Sekonder Evre Sifiliz 23
2.8.3. Latent Evre Sifiliz 24
2.8.4. Geç Evre Sifiliz 24
2.8.4.1. Gom 24
2.8.4.2. Kardiyovasküler Sifiliz 24
2.8.4.3. Nörosifiliz 25
2.8.5. Konjenital Sifiliz 26
2.9. Tanı 26
2.9.1. Etkeni Doğrudan Saptamaya Yönelik Testler 27
2.9.1.1. Karanlık Alan Mikroskopisi 27
2.9.1.2. Direkt Floresan Mikroskopisi 27
2.9.1.3. Gümüş Boyama 28
2.9.1.4. Tavşan Enfektivite Testi 28
2.9.1.5. Polimeraz Zincir Tepkimesi 28
2.9.2. Etkeni Dolaylı Olarak Saptayan Testler 29
2.9.2.1. Non-Treponemal Testler 29
2.9.2.2. Kompleman Birleşmesi Testleri (Wasserman ve Kolmer) 30
2.9.2.3. Flokülasyon Testleri 30
2.9.2.3.1. “Venereal Diseases Research Laboratory” Testi (VDRL) 30
2.9.2.3.2. “Unheated Serum Reagin” Testi (USR) 31
2.9.2.3.3. “Rapid Plasma Reagin” (RPR) 31
2.9.2.3.4. “Toluidine Red Unheated Serum Test" Testi (TRUST) 31
2.9.3. Treponemal Testler 32
2.9.3.1. Treponema pallidum İmmobilizasyon (TPI) Testi 32
2.9.3.2. Floresans Treponemal Antikor Absorbsiyon” Testi (FTA-ABS) 32
2.9.3.3. FTA-ABS Çift Boyama Testi 33
2.9.3.4. FTA-ABS 19S IgM testi 33

2.9.3.5. “Mikrohemaglutinasyon Assay for Treponema pallidum” (MHA-TP, TPHA) 34
2.9.3.6. Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon Testi (TPPA) 34
2.9.3.7. İmmünoblot (Western blot) Testi 35
2.9.3.8. “Enzyme Immunoassay” (EIA) 35
2.9.3.9. Hızlı Tanı Testleri 36
2.10. Tanıda Kullanılacak Testin Seçimi 36
2.10.1. Prime Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi 36
2.10.2. Sekonder Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi 37
2.10.3. Latent Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi 37
2.10.4. Geç Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi 38
2.10.5. Nörosifilizde Tanı Testin Seçimi 38
2.10.6. Konjenital Sifilizde Tanı Testin Seçimi 38
2.10.7. HIV Hastalarında Tanı Testin Seçimi 39
2.10.8. Tedavi Takibinde Tanı Testin Seçimi 39
2.11. Tanısal Akış Şeması 40
2.12. Tedavi 45
2.13. Antimikrobiyal ve Tiplendirme Direnç 47
2.14. Hastalık Kontrol ve Önlemler 47
2.15. Aşı Geliştirilmesi 48
3. GEREÇ VE YÖNTEM 50
3.1. Araştırmanın Tipi 50
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 50
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi 50
3.4. Çalışma Materyali 50
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 50
3.6. Veri Toplama Araçları 51
3.6.1. Araştırma Örneklerinin Hazırlanması 52
3.6.2. Araştırma Testleri 52
3.6.2.1. ARCHITECT Syphilis TP 52
3.6.2.1.1. ARCHITECT Syphilis TP Çalışma Prosedürü 53
3.6.2.2. Spinreact TPHA ve Omega IMMUTREP® TPHA 53
3.6.2.2.1. TPHA Çalışma Prosedürü 54
3.6.2.3. SERODIA®-TP-PA 55

3.6.2.3.1. SERODIA®-TP-PA Çalışma Prosedürü 56
3.6.2.4. Ana Çalışma Haritaları 57
3.6.2.5. Görsellerin Hazırlanması ve Kantitasyonu 61
3.6.2.6. Görsel Testin Hazırlanması ve Uygulaması 61
3.7. Kullanılan İstatistiki Yöntemler 62
3.8. Araştırma Planı ve Takvimi 62
3.9. Verilerin Değerlendirilmesi 63
3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları 63
3.11. Etik Kurul Onayı 64
4. BULGULAR 65
4.1. Çalışmada Kullanılacak Örneklerin CMIA Sonuçları 65
4.1.1. H1'e TPHA Çalışmalarına Ait Mikrodilüsyon Plakları Sonuçları 68
4.1.1.1. H1'ye Ait Omega ve Spinreact Marka TPHA Çalışmalarına Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri 71
4.1.1.2. H2'ye TPHA Çalışmalarına Ait Mikrodilüsyon Plakları Sonuçları 72
4.1.1.3. H2'ye Omega ve Spinreact Marka TPHA Çalışmalarına Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri 75
4.1.2. H1 ve H2'ye TPPA Çalışmalarına Ait Mikrodilüsyon Plakları Sonuçları 75
4.1.2.1. H1'e TPPA Çalışmalarına Ait Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri 78
4.1.2.2. H2'e TPPA Çalışmalarına Ait Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri 78
4.1.3. CMIA, TPHA ve TPPA Çalışmalarına Ait Karşılaştırmalı Genel Sonuçlar ... 79
4.2. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankasına Ait Veriler 82
4.3. Araştırmacıların Saptadıkları Analitik Duyarlılık Düzeyleri 87
4.3.1. Kan Bankası Veri Tabanının Araştırmacıların Belirledikleri Analitik Duyarlılık Düzeylerine Göre Değerlendirilmesi 87
4.4. Görsel Test Bulguları 91
4.4.1. Görsel Teste Değerlendiricilerin Verdiği Yanıtlar 91
4.4.2. TPHA ve TPPA Testlerin Görsel Test Sonuçlarına Göre Pozitif, Belirsiz, Negatif Test Kriterlerin Belirlenmesi 95
4.4.3. Kan Bankası Veri Tabanının Görsel Test Sonuçlarında Belirlenen Analitik Duyarlılık Düzeylerine Göre Değerlendirilmesi 95
4.5. Sonuç Görsellerinin İşlenmesi ve Kantitasyonu 99
4.5.1. H1'in Halka Çaplarının ölçümü 100
4.5.2. H2'in Halka Çaplarının ölçümü 103

4.5.3. H1 ve H2'nin Halka Çaplarının Pozitif, Belirsiz, Negatif Test Kriterlerin Belirlenmesi 106
4.5.4. Halka Ölçümünde Elde Edilen Sonuçların Veri Tabanına Uygulanması 108
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR 112
6. KAYNAKLAR 126
7. EKLER 140
7.1. Ek-1: Görsel Test 140
7.2. Ek-2: Etik Kurul Onayı 170
7.3. Ek-3: Özgeçmiş 173

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Son üç yılın insidans hızları. 6
Tablo 2. Evrelere göre tedavi protokolleri. 46
Tablo 3. Tez ve araştırma planına ait takvim. 63
Tablo 4. H1 hastasına ait CMIA çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının karşılaştırması. 66
Tablo 5. H2 hastasına ait CMIA çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının (S/CO) karşılaştırması. 66
Tablo 6. H1 hastasının Omega ve Spinreact marka TPHA çalışmasına ait sonuçlar ilgili dilüsyonda karşılaştırmalı sonuçlar. 72
Tablo 7. H2 hastasının Omega ve Spinreact marka TPHA çalışmasına ait sonuçlar ilgili dilüsyonda karşılaştırmalı sonuçlar. 75
Tablo 8. H1 hastasına ait çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının karşılaştırması. 78
Tablo 9. H2 hastasına ait çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının karşılaştırması. 79
Tablo 10. H1 ve H2'ye ait CMIA, TPHA ve TPPA tüm çalışmaların karşılaştırmalı sonuçları. 80
Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen verilere ait sıralı S/CO değerleri. 83
Tablo 12. Uzmanların Omega marka TPHA çalışmasının değerlendirme sonuçları. 92
Tablo 13. Uzmanların Spinreact marka TPHA çalışmasının değerlendirme sonuçları. 93
Tablo 14. Uzmanların TPPA çalışmasının değerlendirme sonuçları. 94
Tablo 15. H1 hastasına ait halka çaplarının ölçüm sonuçları..... 101
Tablo 16. H2 hastasına ait halka çaplarının ölçüm sonuçları..... 104

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Yıllara göre Türkiye'de görülen sifiliz olgu sayıları. 7
Şekil 2. Yaş aralıklarına göre olgu sayıları. 7
Şekil 3. *Treponema pallidum* spiroketlerinin karanlık alan mikroskopisindeki görüntüsü. 10
Şekil 4. *Treponema pallidum*'un elektron mikroskopisindeki görünümü. 10
Şekil 5. Tanısal akış şemaları. 42
Şekil 6. Ülkemizde Halk Sağlığı Tanısal Mikrobiyoloji Rehberi tanı akış şeması. 44
Şekil 7. H1'e ait TPHA çalışma haritası. 58
Şekil 8. H2'e ait TPHA çalışma haritası. 59
Şekil 9. H1'e ve H2'ye ait TPPA çalışma haritası. 60
Şekil 10. H1 hastasına ait CMIA çalışmasının dinamik aralığı (S/CO). 67
Şekil 11. H2 hastasına ait CMIA çalışmasının dinamik aralığı (S/CO). 67
Şekil 12. Test edilecek örneklere ait dinamik aralık. 68
Şekil 13. H1'e ait 1. çalışmanın sonucu. 69
Şekil 14. H1'e ait 2. çalışmanın sonucu. 69
Şekil 15. H1'e ait 3. çalışmanın sonucu. 70
Şekil 16. H1'e ait 4. çalışmanın sonucu. 70
Şekil 17. H2'ye ait 1. çalışmanın sonucu. 73
Şekil 18. H2'ye ait 2. çalışmanın sonucu. 73
Şekil 19. H2'ye ait 3. çalışmanın sonucu. 74
Şekil 20. H2'ye ait 4. çalışmanın sonucu. 74
Şekil 21. H1 ve H2'ye ait 1. çalışmanın sonucu. 76
Şekil 22. H1 ve H2'ye ait 2. çalışmanın sonucu. 76
Şekil 23. H1 ve H2'ye ait 3. çalışmanın sonucu. 77
Şekil 24. H1 ve H2'ye ait 4. çalışmanın sonucu. 77
Şekil 25. T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankasına ait verilerin yüzdelik dilimleri. 86
Şekil 26. Omega marka TPHA'nın analitik performansının kan bankasına verilerine uyarlanması. 88
Şekil 27. Spinreact marka TPHA'nın analitik performansının kan bankasına verilerine uyarlanması. 89
Şekil 28. Serodia marka TPPA'nın analitik performansının kan bankasına verilerine uyarlanması. 90

Şekil 29. Uzman değerlendiricilerin Omega marka sonuçlarının kan bankasına verilerine uyarlanması. 96
Şekil 30. Uzman değerlendiricilerin Spinreact marka sonuçlarının kan bankasına verilerine uyarlanması. 97
Şekil 31. Uzman değerlendiricilerin TPPA çalışmasına ait sonuçlarının kan bankasına verilerine uyarlanması. 98
Şekil 32. Örnek bir normalize edilmiş bir görsellerin ölçüm görseli. 100
Şekil 33. H1 hastasına ait Omega marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı..... 102
Şekil 34. H1 hastasına ait Spinreact marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı. 102
Şekil 35. H1 hastasına ait TPPA çalışmasının halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı. 103
Şekil 36. H2 hastasına ait Omega marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı..... 105
Şekil 37. H2 hastasına ait Spinreact marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı. 105
Şekil 38. H2 hastasına ait TPPA çalışmasının halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı. 106
Şekil 39. Belirlenen objektif test değerlendirme kriterlerine göre Omega marka TPHA'nın kan bankasına verilerine uyarlanması. 109
Şekil 40.Belirlenen objektif test değerlendirme kriterlerine göre Spinreact marka TPHA'nın kan bankasına verilerine uyarlanması. 110
Şekil 41. Belirlenen objektif test değerlendirme kriterlerine göre TPPA çalışmasının kan bankasına verilerine uyarlanması. 111

KISALTMALAR

TPHA: *Treponema pallidum* hemagglutination assay

TPPA: *Treponema pallidum* particle agglutination

CMIA: Chemiluminescence magnetic microparticle immunoassay

TPLA: *Treponema pallidum* latex agglutination

MHA-TP: Micro hemagglutination - *Treponema pallidum*

FTA-Abs: Fluorescent treponemal antibody-absorption

EIA: Enzyme immunoassay

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO)

RPR: Rapid plasma reagin

VDRL: Venereal Disease Research Laboratory

Tpp15: *Treponema pallidum* 15kDa lipoprotein

Tpp47: *Treponema pallidum* 47kDa lipoprotein

Tpp17: *Treponema pallidum* 17kDa lipoprotein

Tromp1: *Treponema pallidum* rare outer membrane protein 1

Tromp2: *Treponema pallidum* rare outer membrane protein 2

Tlp: Tiyoredoksin lipoprotein

PpiB: Peptidil prolil cis-trans izomeraz

GlpQ: Gliserofosdodiester fosfodiesteraz

TmpA: Treponemal membran proteini A

Bmp: Temel membran proteini

TpLRR: *Treponema pallidum* lisinden zengin tekrarlı protein

Tprs: *Treponema pallidum* tekrarlı proteinler

TprC/D: *Treponema pallidum* trimeric, pore-forming rare outer membrane protein

TprI: *Treponema pallidum* tekrarlı protein I

TprF: *Treponema pallidum* tekrarlı protein F

OprJ: Outer membrane channel component of MexCD-OprJ

OrpN: Outer membrane channel component of MexCD-OprN

TolC: Outer membrane protein

FlaA: Flagellin A

FlaB1: Flagellin B1

FlaB2: Flagellin B2

FlaB3: Flagellin B3

tlyC: Hemolysin C geni

hlyIII: Hemolysin III geni

hlyA: Hemolysin A geni

hlyB: Hemolysin B geni

hlyC: Hemolysin C geni

ICAM-1: Hücre içi adhezyon molekülü-1

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

TprK: *Treponema pallidum* tekrarlı protein K

MMP-1: Maktriks metallo proteaz-1

MCP: Kemotaktik transmembran proteinleri

Che: Sitoplazmik kemotaktik proteinler

TLR4: Toll benzeri protein 4

TLR2: Toll benzeri protein 2

IL-12: İnterlökin 12

Th1: T hücre yardımcı 1

IFN-γ: İnterferon- γ

CD4: Cluster of differentiation 4

IgM: İmmünglobolin M

IgG: İmmünglobolin G

Tp92: *Treponema pallidum* outer membrane protein

CD54: Cluster of differentiation 54

CD83: Cluster of differentiation 83

MHC: Major histocompatibility complex

IL-1β: İnterlökin 1β

IL-6: İnterlökin 6

TNF-α: Tümör nekrotizan faktör α

TpN(x): *Treponema pallidum* antijen (x)kDa

CD8: Cluster of differentiation 8

IL-17: İnterlökin 17

TpF1: *Treponema pallidum* antijen F1

IL-10: İnterlökin 10

TGF-β: Tümör büyüme faktörü β

T^{Reg}: T regülatör hücre

MIP1-α: Murine macrophage inflammatory protein 1 α

MIP1-β: Murine macrophage inflammatory protein 1 β

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

FITC: Floresein izotiyosiyanat

FDA: U.S. Food and Drug Administration

Tp47: *Treponema pallidum* antijen 47kDa geni

polA: Polimeraz A

bmp: Dış membran protein geni

PCR: Polimeraz zincir tepkimesi

RT-PCR: Ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification

HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü

USR: Unheated serum reagin

TRUST: Toluidine red unheated serum test

TPI: *Treponema pallidum* immobilizasyon testi

SLE: Sistemik lupus eritematozus

RFLP: Sınırlayıcı enzim parça uzunluk çeşitliliği

Gpd: Dış memran proteini

TmpB: Treponemal membrane proteini B

S/CO: Signal to cutoff ratio

H(x): Hasta (x)

px: Piksel

CIA: Chemiluminescence immunoassay

DÜŞÜK DÜZEY POZİTİF ÖRNEKLERİN DOĞRULANMASINDA *TREPONEMA PALLİDUM* HEMAGLÜTİNASYON, *TREPONEMA PALLİDUM* PARTİKÜL AGLÜTİNASYON VE "CHEMİLUMİNESCENCE İMMUNOASSAY" TESTLERİNİN PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Doktora Tezi

Ertan ÇAKMAK

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma sifiliz tanısında kullanılan TPHA, TPPA ve CMIA testlerinin düşük düzey gerçek pozitif örneklerin doğrulanmasındaki performanslarının karşılaştırılmasını ve CMIA ile özgül treponemal antikoru saptanan hasta örneklerinin TPHA ve TPPA testleri ile doğrulanmasını sorgulamayı amaçlamıştır. Çalışmaya, anti-Treponema antikoru kuvvetli pozitif olan iki gönüllü hastanın serumu dahil edildi. Bu serum örnekleri anti-Treponema antikoru negatif olan tek bir sağlıklı gönüllüye ait serum ile CMIA negatif olana dek dilüe edildi. Her bir dilüsyonda testlerin verdiği sonuçlar karşılaştırıldı. TPHA ve TPPA sübjektif olarak değerlendirilen testler olması nedeniyle çalışmaya tıbbi mikrobiyoloji uzmanı olan 15 gönüllü değerlendirici ve objektif test değerlendirme kriterleri oluşturulması ile değerlendirildi. Bu sonuçlar; çalışmanın yapıldığı hastanenin kan bankasından alınan veriler ile test performansları gerçek dünyada nasıl sonuç verecekleri değerlendirildi. CMIA ile düşük düzey pozitiflikte, örneklerin TPHA testi ile doğrulanması mümkün olmadı. TPPA testinin perfomansı CMIA ile karşılaştırılabilir düzeyde bulundu. Kullanılan iki TPHA testi arasında önemli duyarlılık farkı gözlendi. Gönüllü değerlendiriciler, araştırmacılara göre daha yüksek bir pozitiflik eşiği belirlemişlerse de, sonuçlar uyumludur. Bu sonuçlar hastane kan bankası verilerine uygulandığında, örneklerin bir TPHA testinde %63'ünün, diğer TPHA testinde %48'inin doğrulanamadığı görülmüştür. Bu oran TPPA testinde %15'tir. TPHA testlerinin performansı üretici firmadan firmaya büyük değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik CMIA yüksek pozitif örneklerin doğrulanmasında sorun yaratmazken, gerçek pozitif düşük S/CO'lu örneklerin TPHA testleri ile kaçırılmasına neden olabilir. Bu örneklerde TPPA kullanılması uygun olacaktır. Ayrıca doğrulamada TPHA kullanılacaksa testlerin verifikasyon çalışmalarında, bu araştırmada uygulandığı gibi, dilüe edilmiş gerçek pozitif örneklerle testin analitik duyarlılığını saptaması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Treponema pallidum* hemaglütinasyon test (TPHA), *Treponema pallidum* partikül aglütinasyon test (TPPA), Kemilüminesan Mikropartikül Enzim İmmünolojik Test (CMIA), Ters algoritma, Analitik duyarlılık

Tezin sayfa adedi: 125

Danışman: Prof. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK

EVALUATİON OF THE PERFORMANCE OF *TREPONEMA PALLİDUM* HEMAGGLUTİNATİON, *TREPONEMA PALLİDUM* PARTİCLE AGGLUTİNATİON AND "CHEMİLUMİNESCENCE İMMUNOASSAY" TESTS İN LOW-POSİTİVE SAMPLES AS CONFİRMATORY TESTS

Doctoral Thesis

Ertan Çakmak

DOKUZ EYLUL UNİVERSİTY HEALTH SCİENCE INSTITUTE

Department of Medical Microbiology

ABSTRACT

This study aimed to compare the performance of the TPHA, TPPA, and CMIA tests in confirming low-level true positive samples used in syphilis diagnosis, and to question the confirmation of patient samples with specific treponemal antibodies detected by CMIA using the TPHA and TPPA tests. The study included serum samples from two volunteer patients with strong positive anti-Treponema antibodies. These serum samples were diluted with serum from a single healthy volunteer with negative anti-Treponema antibodies until they tested negative on CMIA. The results of the tests were compared at each dilution. Since TPHA and TPPA are subjectively evaluated tests, the study involved 15 volunteer evaluators who were medical microbiology experts, and objective test evaluation criteria were established. These results were compared with data obtained from the hospital's blood bank and assessed for how the test performances would translate to real-world scenarios. Confirmation of samples using the TPHA test was not possible for low-level positivity detected by CMIA. The performance of the TPPA test was found to be comparable to CMIA. A significant sensitivity difference was observed between the two TPHA tests used. Although the volunteer evaluators set a higher positivity threshold compared to the researchers, the results are consistent. When these results were applied to the hospital's blood bank data, it was observed that 63% of the samples could not be confirmed by one TPHA test and 48% could not be confirmed by the other TPHA test. This rate was 15% for the TPPA test. The performance of TPHA tests varies significantly from manufacturer to manufacturer. While this variability does not pose a problem in confirming CMIA high positive samples, it might not capture true positive samples with low S/CO values in TPHA tests. For these samples, the use of TPPA would be appropriate. Additionally, if TPHA is to be used for confirmation, it is believed that verification studies of the tests should determine the analytical sensitivity of the test using diluted true positive samples, as applied in this study.

Keywords: *Treponema pallidum* hemagglutination assay (TPHA), *Treponema pallidum* particle agglutination assay (TPPA), Chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA), Reverse algorithm, Analytical sensitivity

Page number: 125

Advisor: Prof. Dr. Özgen Alpay ÖZBEK

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sifiliz hastalığının etkeni *Treponema pallidum*'dur. Cinsel yolla bulaşan bu etken, dünya genelinde yaygın bir enfeksiyona neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization, WHO, DSÖ) tahminlerine göre, yalnızca 2012 yılında dünya genelinde yaklaşık 5.6 milyon kişi sifiliz enfeksiyonuna yakalanmıştır (1).

Moleküler testler sifilizin tanısını koymak için geliştirilmiş olmasına rağmen, hastalığın tanısı hala serolojik testlerle yapılmaktadır. Bu testler, treponemal antikorları saptayan treponemal ve treponemal olmayan antikorları saptayan non-treponemal testler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (2).

Sifiliz, farklı klinik evrelerle seyreden bir enfeksiyondur. Her iki test grubu (non-treponemal ve treponemal), bu evrelerin farklı aşamalarında kullanılmaktadır. Treponemal testler toplum taramalarında non-treponemal testlere göre daha duyarlıdır, ancak hala tarama amacıyla non-treponemal testleri kullanan laboratuvarlar da vardır. Her durumda pozitif çıkan sonucun doğrulanması gerekmektedir ve bu nedenle farklı tanı algoritmaları geliştirilmiştir (2).

"American Microbiology Society", treponemal testlerde "enzim immunoassay" veya "chemiluminescence immunoassay" yöntemini kullanan testlerle pozitif sonuç veren örneklerin non-treponemal testlerle çalışılmasını ve bu test ile negatif çıkan örneklerin "*Treponema pallidum* particle agglutination (TPPA)" ile doğrulanmasını önermektedir. Tarama testi olarak non-treponemal test kullanılmış ise çıkan pozitif sonucun yine TPPA ile doğrulanması gerektiği belirtilmektedir (2).

Birleşik Krallık'ta "Health Protection Agency" tarafından önerilen tanı algoritmasında, taramanın "immunoassay" veya "chemiluminescence immunoassay" yöntemini kullanan treponemal bir testle yapılması, pozitif çıkan sonuçların "*Treponema pallidum* hemagglutination agglutination (TPHA)", TPPA veya "*Treponema pallidum* latex agglutination (TPLA)" ile doğrulanması gerektiği bildirilmektedir (3).

"Public Health Agency of Canada", taramanın her iki test grubuyla da yapılabileceğini, ancak pozitif çıkan sonuçların "Micro hemagglutination agglutination - *Treponema pallidum*" (MHA-TP), TPPA gibi testlerle doğrulanmasını önermektedir (4).

"Australian STI Management Guideline" sifiliz taramasıyla pozitif saptanan örneklerin TPHA veya TPPA ile doğrulanması gerektiğini bildirmektedir (5).

Ülkemizde, Ulusal Mikrobiyoloji Tanı Rehberi'nin önerisi non-treponemal test ile tarama yapılması ve pozitif çıkan sonucun treponemal test ile doğrulanmasıdır. Ülkemizde, taramada hem treponemal hem de non-treponemal testler kullanılmaya devam etmektedir. Pozitif çıkan sonuçların doğrulanmasında TPHA, TPPA, FTA-Abs veya farklı bir "Enzyme Immunoassay" (EIA) testi kullanılmaktadır (6). TPHA testinin maliyeti düşük ve çalışması kolay olduğu için ülkemizde yaygın bir şekilde doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. TPPA testinin yüksek maliyeti nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Ülkemizde en sık kullanılan otomatik test, "chemiluminescence microparticle immunoassay" (CMIA) yöntemini kullanan ARCHITECT Syphilis TP'dir (Abbott, Wiesbaden, Almanya) (7).

Yapılan araştırmalarda, doğrulama testi olarak önerilen treponemal testlerin duyarlılıklarının farklı olduğu gösterilmiştir. Örneğin, TPHA testinin klinik duyarlılığının TPPA ve CMIA yöntemlerine göre düşük olduğu bildirilmiştir (8,9). Ancak bu üç testin düşük düzey pozitiflikte analitik duyarlılıklarını karşılaştıran yeterli veri bulunmamaktadır. Testlerin analitik duyarlılıkları bilinmeden doğrulama testi olarak kullanılması, düşük düzeyde gerçek pozitif örneklerin doğrulanmasında sorunlar yaratabilir. Örneğin, analitik duyarlılığı yüksek bir treponemal tarama testiyle yakalanan gerçek pozitif bir örnek sonucu, analitik duyarlılığı daha düşük olan başka bir treponemal testle doğrulanmayabilir. Bu durumda gerçek pozitif örnek yanlışlıkla negatif olarak raporlanabilir.

Bu çalışmasının amacı, sifiliz tanı algoritmalarında doğrulama amacıyla önerilen testlerden TPHA, TPPA ve CMIA'nın düşük düzey anti-treponemal antikor içeren gerçek pozitif hasta örneklerindeki analitik duyarlılığının belirlenmesidir. Ayrıca, elde

edilecek veriler doğrultusunda dünyada uygulamada olan farklı tanı algoritmalarının sorgulanması ve Ulusal Tanı Rehberi'ne katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Giriş

Sifiliz, bir cinsel yolla bulaşan hastalıktır. Etkeni bir spiroket olan *Treponema pallidum*'dur. Hastalık, primer, sekonder, latent ve geç evre sifiliz olarak evrelendirilir. Hastalığın klinik bulguları ve tanı testlerinin performansı hastalığın evresine bağlı olarak değişiklik gösterir (10).

2.2. Tarihçe

Sifilizin ortaya çıkışı tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, kaynağı ve yayılması konusunda üç farklı hipotez bulunmaktadır (11).

İlk hipoteze göre hastalık, Christopher Columbus'un Amerika kıtasını keşfetmesi ve ardından yapılan seferlerle Avrupa'ya taşınarak yayılmıştır. Sifilizle ilgili ilk kayıt 1495 yılına aittir ve Fransız Kralı VIII. Charles'ın Napoli'yi işgal ettiği sırada salgın bir şekilde ortaya çıktığı kaydedilmiştir. Amerika kıtasının keşfi ise bundan üç yıl öncesine denk gelmektedir (11,12).

İkinci hipotez, hastalığın Amerika'nın keşfedilmesinden önce Avrupa'da zaten var olduğunu öne sürmektedir. Fransa, İtalya ve İspanya'da yapılan kazı çalışmalarında ortaya çıkan insan kalıntıların kemiklerinde sifiliz izlerine rastlanmış olması bu hipotezi desteklemektedir (11).

Üçüncü hipoteze göre ise hastalık, eski dünyadan yeni dünyaya taşınmıştır. Sifiliz etkeni, Güney Afrika'da ortaya çıkan "Yaws" etkeniyle genetik olarak büyük benzerlik göstermektedir ve bu hipotezde etkenin eski dünyadan yeni dünyaya taşındığı ve burada yayılarak evrim geçirdiği düşünülmektedir (11,12).

Ülkemizde sifilizle ilgili ilk kayıtlara 1886-87 yıllarına ait belgelerde rastlanmaktadır ve 1897'de hastalığa karşı ciddi bir mücadele başlatılmıştır. Sifiliz için toplumda yaygın olarak kullanılan "Frengi" adı, "Frenk Hastalığı"ndan gelmektedir. Hastalığın Anadolu'ya, İspanya'dan sürgün edilen Musevi kadınlarla geldiği düşünülmektedir. İlk salgın Kırım ve 93 Harbi sırasında görülmüştür. Kastamonu, Bolu, Sinop, Erzurum, Bartın gibi birçok yerden vakalar bildirilmiş olup, tedbir amaçlı

gezici sıhhi ekiplerle saha taraması yapılmış ve ilgili bölgelerde hastaneler kurulmuştur (13,14).

1921 ve 1938 yıllarında frengi ile mücadele için özel kanun çıkarılmıştır ve mücadele kapsamında vakalar düzenli olarak kayıt altına alınıp, halka basın yoluyla ilan edilmiştir. Amaç mücadelenin başarısını halka bildirmekti. Örneğin, 1924 yılında Cumhuriyet gazetesinin bir baskısında, dönemin ülke genelinde vaka sayısının 22,972 olduğu ve Sinop'ta 1,887 vaka ile birinci sırada olduğu bildirilmiştir (14).

Günümüzde, hastalığın tedavisi Frengi Yönetmeliği izlenerek yapılmaktadır (13).

2.3. Epidemiyoloji

Her yıl, dünya genelinde 15-49 yaş aralığında 6 milyon yeni sifiliz vakasının olduğu tahmin edilmektedir (15).

Penisilin'in keşfiyle birlikte hastalıkla mücadele hız kazanmış ve 1990 yılında insidans hızı tarihin en düşük seviyesine ulaşmıştır (10). Ancak, bu yıllardan sonra cinsel davranış ve alışkanlıkların değişmesiyle birlikte tekrar artış göstermiştir (10,15).

2016 yılında DSÖ Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklarla ilgili yeni bir strateji planı yayınlamıştır. Bu strateji planı, yoğun tanı ve takibi öngörmektedir. Özellikle konjenital sifiliz vakalarının 2030 yılına kadar %90 oranında azaltılması hedeflenmektedir (16).

Tüm çabalara rağmen, sifiliz hala gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bir sorun olarak devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki cinsel davranış değişiklikleri bu soruna katkıda bulunurken; gelişmekte olan ülkelerde sağlığa erişimin zorluğu nedeniyle sorun devam etmektedir (10,15,16).

DSÖ'nün 2012 tahminlerine göre, Amerika kıtasında 937.000, Avrupa'da 440.000, Orta Doğu'da 496.000, Afrika'da 1.843.000, Güney Asya'da 886.000, Çin ve Batı Pasifik'te ise 993.000 yeni sifiliz vakasının olduğu hesaplanmıştır (17).

Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi'nin 2018 yılında yayınladığı sifiliz istatistiklerine göre, Avrupa genelinde 2014'te 5,3 olan insidans hızı, 2018'de 7,0'a yükselmiştir. Ülke bazında değerlendirildiğinde, Birleşik Krallık için insidans hızı 7,4'ten 12,6'ya, Almanya için 7,2'den 8,9'a ve İspanya için 7,7'den 10,3'e çıkmıştır (18).

Son 20 yılda, Amerika Birleşik Devletleri'nde de insidansda bir artış görülmüştür. 21. yüzyılın başında insidans hızı 2,1 iken, 2018'de 10,8'e yükselmiştir (19).

Kanada'da, insidans hızı 2010 yılında 5,0 iken, 2015 yılında %85,6'lık bir artışla 9,3'e yükselmiştir (20).

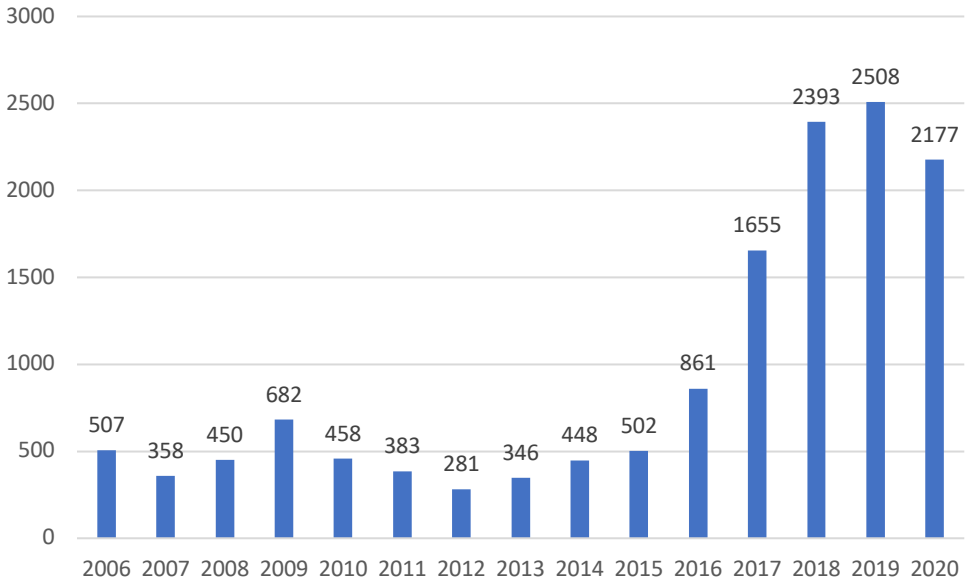
Yukarıda bahsedilen ülkelerle benzer bir insidans artışı Avustralya'da da gözlenmiştir. 2013 yılında insidans hızı 7,8 iken, %135'lik bir artışla 2017 yılında 18,3'e yükselmiştir (21).

Ülkemizde, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar ve Erken Uyarı Dairesi Başkanlığı'nın 31 Aralık 2020 tarihinde yayınladığı verilere göre, 2020 yılında 2177 yeni vaka bildirimi yapılmış ve insidans hızı 2,6 olarak gerçekleşmiştir (Tablo 1, Şekil 1 (22)) (22).

Tablo 1. Son üç yılın insidans hızları.

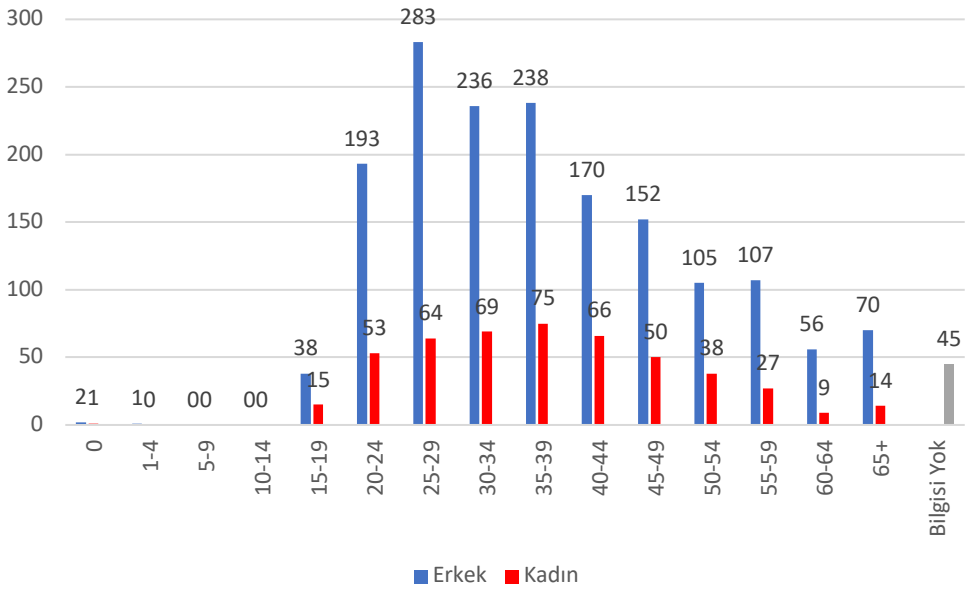
Yıl	İnsidans Hızı
2018	3,07
2019	3,21
2020	2,6

* 100.000'de.



Şekil 1. Yıllara göre Türkiye'de görülen sifiliz olgu sayıları.

Hastaların yaş dağılımı incelendiğinde, en yüksek vaka sayısının 25-29 yaş aralığında olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, vaka sayısı cinsel olarak aktif olan tüm yaş gruplarında yüksek seyretmektedir (Şekil 2 (22)) (22).



Şekil 2. Yaş aralıklarına göre olgu sayıları.

Erkeklerde, kadınlara göre sifiliz vakalarının 4 katından daha fazla olduğu gözlenmektedir (Şekil 2 (22)) (22).

Türkiye'deki sifiliz epidemiyolojisiyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Koçak ve arkadaşlarının 2004 yılında İstanbul çevresinde yaptıkları çalışmada, 1987-2003 yılları arasında "Rapid Plasma Reagin" (RPR) testi yapılan 1.737.943 kan donörünün sonuçları rapor edilmiştir. Buna göre, RPR pozitifliği 1987'de %0,04 iken, 2002'de %0,02'ye düşmüş ve 2003'te tekrar %0,09'a yükselmiştir (23).

2005 yılında, Ocak ve arkadaşlarının Hatay çevresinde yaptıkları çalışmada, 2003-2004 yılları arasında "Venereal Diseases Research Laboratory" (VDRL) ile taranan 12.313 kan donöründe VDRL pozitifliği %0,03 olarak bulunmuştur (24).

Adışen ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları makalede, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Polikliniği'ne 1994-2006 yılları arasında başvuran hastalar arasında yapılan geriye yönelik bir olgu taramasının sonuçları bildirilmiştir. Buna göre, sifiliz pozitifliği polikliniğe başvuran hastalar arasında 1994 yılında %0,027 oranında tespit edilmişken, bu oran 1996 yılında %0,122'ye yükselmiş ve 2003 yılında %0,004'e düşmüştür (25).

Dilek ve arkadaşlarının 2007 yılında Van Yüzüncü Yıl Tıp Fakültesi kan bankasında geriye dönük yaptıkları incelemede, VDRL testi yapılan 39.002 kan donörünün %0,057'sinde pozitiflik saptanmıştır (26).

Temiz ve arkadaşlarının Diyarbakır'da 2007 yılında yaptıkları çalışmada, 75.691 kan donörünün %0,05'inin VDRL pozitif olduğu bulunmuştur (27).

Çalışkan ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınladıkları makalede, 2008-2011 yılları arasında toplam 7.537 kan donöründe ARCHITECT Syphilis TP CMIA testi yapıldığı ve %0,7 oranında pozitiflik saptandığı bildirilmiştir (28).

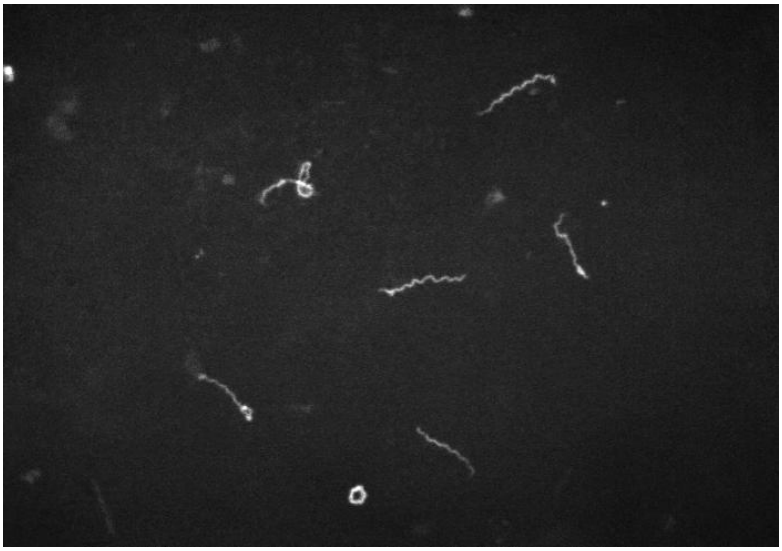
2.4. Etken

2.4.1. Taksonomi

Sifilizin etkeni, *Treponema pallidum* adlı bir spirokettir. Bu bakteri, Taksonomik olarak *Spirochaetales* takımı, *Spirochaetaceae* ailesi ve *Treponema* cinsi içinde yer almaktadır. *Treponema* ailesinde, insanlarda patojen olan dört tür ve insanda patojen olmayan altı başka tür bulunmaktadır. Bu ailenin üyeleri arasında, insanda sifilize neden olan *Treponema pallidum subsp. pallidum* (Sifiliz), *Treponema pallidum subsp. endemicum* (Bejel), *Treponema pallidum subsp. pertenue* (Yaws) ve *Treponema carateum* (Pinta) yer almaktadır. Bu türler morfolojik olarak ayırt edilemezler, ancak genetik olarak %95'ten fazla benzerlik gösterirler (29–31). Bununla birlikte, *Tpp15* lipoproteinini kodlayan genin 5' uç bölgesinde bu türleri birbirinden ayırmak için yeterli sinyal bulunmaktadır (32).

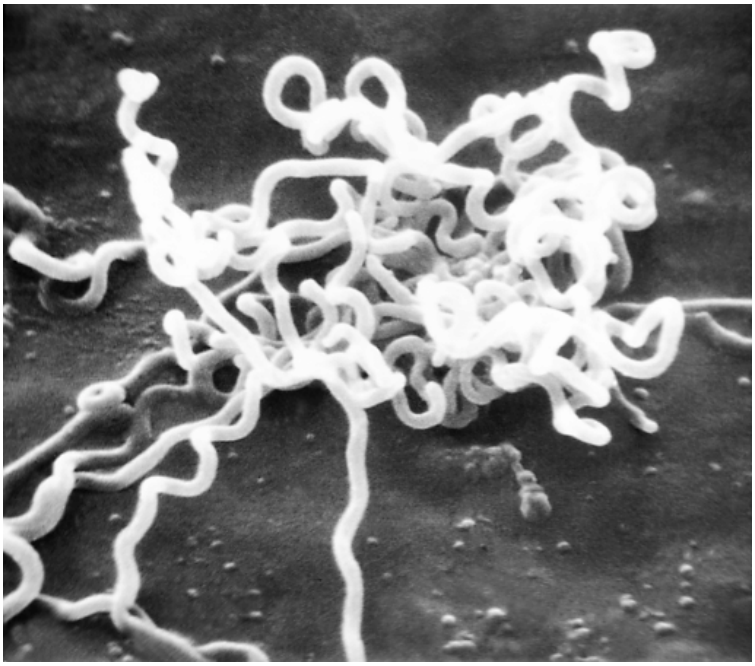
2.4.2. Morfoloji

Treponema pallidum bakterisi, 0,2 µm çapında ve 6-20 µm uzunluğundadır. Spiral şeklinde olan bu bakterinin 6-14 kıvrım arasında 1,1 µm'lik bir aralığı bulunmaktadır. Bakteri, küçük boyutları nedeniyle ışık mikroskobunda görülemez ve gram boyası ile boyanmaz (10,33). Görüntülenebilmesi için karanlık alan mikroskobu kullanılması gerekmektedir ve bu mikroskopla karakteristik ileri-geri hareketi gözlenebilir (Şekil 3 (34), Şekil 4 (35)) (10,34).



Şekil 3. *Treponema pallidum* spiroketlerinin karanlık alan mikroskopisindeki görüntüsü.

**Treponema pallidum* spiroketlerinin karanlık alan mikroskopisindeki görüntüsü, ince ve uzun spiral şekilli bakterilerin hareket halindeki ileri-geri hareketini gösterir. Bu görüntüde, spiroketler karanlık bir zemin üzerinde belirgin bir şekilde görülür ve karakteristik spiral yapıları dikkat çeker.



Şekil 4. *Treponema pallidum*'un elektron mikroskopisindeki görünümü.

2.4.3. Kültür Özellikler

Treponema pallidum'un *in vitro* kültürü yapılmamaktadır (36). *Treponema pallidum subsp. pallidum* Nichols suşu, sekonder evre sifiliz olan bir hastanın beyin omurilik sıvısından (BOS) izole edilmiş ve hala günümüzde tavşan testisine *in vivo* olarak inokulasyon yoluyla üretilmektedir (37,38). Bu etken yavaş bir şekilde çoğalmaktadır. Tavşanlarda 30-33 saatlik aralıklarla bölünerek üremektedir. Mikroaerofilik koşullarda 33-35°C sıcaklıkta üreyebilir. Ancak sıcaklık ve diğer kültür ortamı koşullarına olan toleransı düşüktür (39–41).

2.4.4. Genom

Treponema pallidum'un genom büyüklüğü 1.138.006 bp olarak belirlenmiştir. Genomda 1,041 açık okuma çerçevesi bulunmaktadır. Etken, enerji ihtiyacını glikoliz yoluyla karşılar ve metabolik aktivitesi için nükleotitler, yağ asitleri ve birçok amino asidi sentezleyemez. Ancak bu eksikliği, taşıma proteinlerini kodlayarak telafi etmektedir (42). Etken, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerini kodlayan genlere sahip değildir. Mikroaerofilik olduğu gösterilmiştir, bu da yüksek oksijen konsantrasyonlarının bakteri için toksik olduğunu açıklar (39,42).

2.4.5. Duvar Özellikleri

Treponema pallidum, ince bir peptidoglikan tabakasıyla bakteri hücre duvarına sahiptir ve bu özelliğiyle gram-negatif bakterilere benzemektedir. Ancak dış membranda lipopolisakkarit bulunmaz (42). Periplazmik aralıkta hareketi sağlayan karakteristik flajellalar mevcuttur (43). Bununla birlikte, membranda bulunan protein miktarı *Escherichia coli*'den 100 kat daha azdır (44–46). Daha önce, bakterinin antiserumla zayıf bir reaksiyon vermesinin, bakteriye özgü bir koruyucu tabakadan kaynaklandığı düşünülmekteydi. Ancak günümüzde, düşük miktarda protein bulunmasının bu duruma neden olduğu anlaşılmıştır (45,47,48).

Tpp47, Tpp15, Tpp17 gibi membran proteinleri, yüzeyde değil periplazmik aralıkta bulunurlar. İlk keşfedilen membran proteini Tpp47, penisilin bağlayan bir proteindir (48,49). Tromp1 ve Tromp2, transporttan sorumlu olduğu düşünülen diğer membran proteinleridir (50). Diğer tespit edilen membran proteinleri ve lipoproteinleri

ise Tiyoredoksin (Tlp), Peptidil prolil cis-trans izomeraz (PpiB), Gliserofosdodiester fosfodiesteraz (GlpQ), treponemal membran proteini A (TmpA), Temel membran proteini (Bmp), *Treponema pallidum* lizinden zengin tekrarlayan protein (TpLRR) ve 17 kDa lipoprotein Tpp17'dir (51).

Treponema pallidum tekrarlayan proteinleri (Tprs), membranda bulunan diğer proteinlerdendir. TprC/D, TprI ve TprF gibi üyeleri bulunur ve porin görevi gördükleri düşünülmektedir (52). Tpr ailesi ise immün yanıttan kaçışta rol aldığı düşünülen başka bir protein ailesidir. *tpr* genine komşu kaset DNA sekansları keşfedilmiştir ve bu kaset dizilerinin *tpr* geninin değişken bölgelerine hizmet ettiği düşünülmektedir. Bu sayede gen, farklı Tpr proteinlerini ifade ederek suşlar arasında ve suş içinde farklılaşarak konaktaki immün yanıttan kaçmaya yardımcı olmaktadır (53). Membranda bulunan efluks pompaları ise *Pseudomonas aeruginosa*'nın OprJ ve OrpN, (54) *Escherichia coli*'nin TolC ortologlarıdır (55).

Treponema pallidum'un iç membran yapısı gram-negatif bakterilerle benzerdir. İç membranda immünojenik ve bol miktarda lipoproteinler bulunur (44,45,47). Serolojik testlerde kullanılan rekombinant antijenler Tpp47, Tpp17, Tpp15 burada bulunur (51).

Diğer bakterilerde olduğu gibi peptidoglikan sentezini gerçekleştiren penisilin bağlayan proteinler iç membranda yer alır (47,56). Tpp47, karboksipeptidaz aktivitesi olan ve başka bir ortoloğu bulunmayan bir penisilin bağlayan proteindir (57).

2.4.6. Flajel Özellikleri

Treponema pallidum, hareketli bir bakteridir. Hareketi, endoflajel denilen periplazmik flajel tarafından sağlanır. Flajel, iç ve dış yapılardan oluşur. İç yapısı 10 nm, dış yapısı ise 17 nm'dir (58). Flajel, bakteri boyunca uzanır ve uygun koşullarda hücre dışına çıkarıldığında spiral bir şekil alır. Moleküler yapı analizinde dört alt üniteden oluştuğu görülmüştür. Dış kısmı FlaA adı verilen 37 kDa ağırlığındaki bir proteinden oluşurken, iç kısmında FlaB1 (34.5 kDa), FlaB2 (33 kDa) ve FlaB3 (30 kDa) olarak adlandırılan üç alt ünite bulunur. B alt ünitelerini kodlayan genler, birçok gram-negatif ve pozitif bakteriye benzerlik göstermektedir (59–62).

Flajel, *Treponema pallidum*'un bakteriye invazyon yeteneğini sağlar. Viskozitesi düşük bir ortamda bakteri kendi etrafında dönerek hareket ederken, viskoz bir ortamda, örneğin dokular içinde, bakteri ileri doğru hareket eder. Bu hareket hızı saniyede 19 µm olarak ölçülmüştür (63–65). Flajel, immünojenik özellik gösterir ve güçlü bir humoral yanıta neden olur (66–68).

2.5. Patogenez

Treponema pallidum'un patogenezi tam olarak anlaşılmamıştır. *In vitro* kültürünün yapılamaması nedeniyle, bakteri-konak etkileşimleri kısmen aydınlatılabilmiştir (36,69).

Doğal enfeksiyon yalnızca insanlarda görülür ve sifiliz cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır (69). Bakteri, temas esnasında konağın mukoz membranlarından geçer. Enfeksiyonların %10-20'sinde deri lezyonları gözlenir, bu da bakterinin derinin mikroçatlaklarından da girebileceğini düşündürür. Tavşan deneylerinde, sadece iki bakterinin inokulasyonunda, deney hayvanlarının %47'sinde birkaç saat ila 8 saat içinde enfeksiyon geliştiği gözlenmiştir. 20 bakteride bu oran %71'e, 200.000 bakteride ise %100'e çıkmaktadır (40).

Hayvan deneylerinde, inokulasyon sonrası birkaç saat içinde bakterinin lenf nodüllerinde bulunduğu saptanmıştır. Hücreye tutunma, *tpr* gen ailesi tarafından kodlanan proteinlerle gerçekleşir (69,70). *In vitro* deneylerde, hücre başına ≥100 bakteri düştüğünde, sitopatik etki 48 saat içinde gözlenir ve şiddeti zamanla artar, ancak hücre içine nasıl girdiği ve sitopatik etki yarattığı henüz tam olarak bilinmemektedir (69,71).

Treponema pallidum'un hücresel hasara neden olan sitotoksik etkisinin *tlyC*, *hlyIII*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyC* genlerini kodlayan proteinler aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu proteinler potansiyel sitotoksinler olarak kabul edilmektedir (72–75).

Treponema pallidum, gram-negatif bakterilere benzemesine rağmen lipopolisakkarit içermez. İnflamatuvar yanıtlara bağlı semptomların doku ve hücre hasarından kaynaklandığı düşünülmektedir (42,76,77).

Doğal enfeksiyonlarda, 2-10 hafta içinde ülserleşen papüller olarak adlandırılan lezyonlar görülür. Bu lezyonlar "Şankr" olarak adlandırılır ve lenfositler ve plazma hücreleri içerir (78,79). Hayvan deneylerinde yapılan inokulasyonlar, yüksek bakteri yükünün bu lezyonların daha hızlı oluşmasına neden olduğunu göstermiştir. Yaklaşık 10^7 bakteri yükü ile yapılan inokulasyonda şankrın 5-7 günde oluştuğu gözlenmiştir (40).

Deri ve mukozadan vücut içine giren bakteri, kan yoluyla konak vücudunda yayılır ve sifiliz hastalığına neden olan (41).

2.6. Virulans Faktörleri

2.6.1. Adezyon

Treponema pallidum hücre kültüründe adezyon özelliği gözlenebilmektedir (36). Dakikalar içinde yüzlerce bakteri hücrelere tutunmaktadır. Bakterinin tüm yüzeyiyle tutunabildiği ancak genellikle uç kısmıyla tutunduğu gözlenmiştir. Bu durumun bakterinin ileriye doğru hareket etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Elektron mikroskopisi çalışmalarında, bakterinin konak hücreyle temas ettiği nokta elektrondens bir alan oluşturmaktadır ve bu alanın füzyon bölgesi olduğu düşünülmektedir (80,81).

Treponema pallidum eritrositler dışında tüm çekirdekli hücrelere tutunabilmektedir. Adezyonda fibronektin adlı proteinin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. *Treponema pallidum*'un fibronektin kaplı yüzeylere tutunabildiği ve anti-fibronektin antikoru ile adezyonun engellenebildiği gözlenmiştir. Bakterinin yüzey antijenlerinin az olmasına rağmen anti-fibronektin antikorunun adezyonu engellemesi, bakterinin üzerindeki az sayıdaki antijenin adezyon için gereklilik gösterdiği düşüncesini desteklemektedir (82–86).

Hücrenin, Tpn47 ile karşılaşması sonucunda ICAM-1, VCAM-1, E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırır (77,87). *tpr* gen ailesine ait proteinler de adezyonda görev almaktadır (88). Bu gen ailesinin proteinleri immünojenik özellik gösterir. Özellikle TprK proteinine karşı opsojenik antikorlar gelişir. Ancak *tpr* gen

ailesinde suşlar arası varyasyonlar olduğundan, bu antikorların heterolog enfeksiyonların kontrolünde konağa bir avantaj sağlamadığı bilinmektedir (89,90).

2.6.2. İnvazyon

Treponema pallidum, çevre koşullarına duyarlı olmasına ve metabolik eksikliklere sahip olmasına rağmen, konak için oldukça invaziftir. Bu invazivlik yeteneği, yüksek motilite sağlayan flajellerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bakteri, konakta maktriks metallo proteaz-1 (MMP-1) ekspresyonunu indükleyerek, bu enzimin ekstraselüler matriksi parçalayarak bakterinin dokuda daha rahat ilerlemesini sağladığı düşünülmektedir (70,91).

Yapılan deneysel çalışmalarda, *Treponema pallidum*'in endotelyal arası sıkı bağlantılarından geçebildiği gösterilmiştir. İki saat gibi kısa sürede hücre tabasının üst kısmından alt kısma geçtiği gözlenmiştir (70). Başka bir invazyon çalışmasında, kültür çemberine yerleştirilen dokudan, $5x10^8$ bakteriden $6x10^7$'si 24 saat içerisinden çemberin alt kısmına geçebildiği gözlenmiştir (92).

Tavşan deneylerinde, intradermal veya intratestiküler inokulasyon sonrasında *Treponema pallidum*'un dakikalar içinde kanda tespit edilebildiği gösterilmiştir. Tavşan testisine inokule edilen bakterilerin, 18 saat sonra lenf, beyin, beyin omurilik sıvısı ve diğer doku sıvılarında tespit edilebildiği gözlenmiştir (93,94). Fare deneylerinde ise, farelerin bakteri ile infekte edildikten 24 saat sonra polimeraz zincir tepkimesi ile birçok organda *flaA* geni tespit edilmiştir ve 45 gün sonra alınan dalak, lenf, beyin ve deri örneklerinin tavşanda enfeksiyöz olduğu gösterilmiştir. Bakteri, birçok dokuya yayılma yeteneğine sahiptir. Saç folikülleri, sinirler gibi immün sürveyanstan korunmuş veya daha az etkilenen bölgelere de invazyon yapabilir (95,96).

Treponema pallidum'un invazyon yeteneği, latent enfeksiyonlara ve immün sürveyanstan korunmuş bölgelere invazyona neden olarak immün yanıtlardan kaçmasına olanak sağladığı düşünülmektedir. Bu saklanma durumu, hastalığın seyrinde tekrar alevlenmelere ve farklı klinik evrelerin ortaya çıkmasına yol açabileceği düşünülmektedir (97).

2.6.3. Motilite

Motilite, *Treponema pallidum* için önemli bir virülans faktörüdür. Bakterinin motilitesi periplazmik flajelinden kaynaklanır. Visköz olmayan ortamda tirbüşon şeklinde ileri geri hareket ederken, visköz ortamlarda ileriye doğru hareket etmesini sağlar (64,65).

Diğer bakterilerde flajel tek bir protein alt ünitesinden oluşurken, *Treponema pallidum*'un flajeli dört alt üniteden oluşur. Dış kısımda 17 nm çapında ve 37 kDa ağırlığında FlaA bulunurken, iç kısımda 10 nm çapındaki üç alt ünitede FlaB1 (34.5 kDa), FlaB2 (33 kDa) ve FlaB3 (30 kDa) yer alır. Bu proteinlerin motor hareketi diğer bakterilerin flajel proteinleriyle homoloji gösterir (58–62).

Flajel oldukça immünojendir ve enfeksiyon sırasında humoral yanıt gelişir. Ancak bu antikorlar koruyucu değildir. Flajele karşı gelişen antikorlar canlı bakteriye bağlanamadığı için enfeksiyon gelişimi engellenemez. Bunun nedeni, flajelin bakteri dışında değil periplazmik boşlukta bulunmasıdır. Ancak bu antikorlar immünojenik oldukları için tanısal testlerde kullanılabileceği düşünülmektedir (66,68,98,99).

2.6.4. Kemotaksis

Kemotaksis, diğer bir virülans faktörü olan *Treponema pallidum*'da doğrudan gözlenmemiş olsa da, genetik çalışmalar *Treponema pallidum*'un kemotaksis yapabilme yeteneğini düşündüren genlerin varlığını göstermiştir. Bununla birlikte, kemotaksis oluşumu henüz deneysel olarak kanıtlanmamıştır (42,64).

Metil-kabul eden kemotaktik transmembran proteinleri (MCP) ve sitoplazmik kemotaktik proteinler (Che), bakterilerin kemotaksis yapmasını sağlayan önemli proteinlerdir. *Treponema pallidum* genomunda bu proteinlerin dördünün homologları tespit edilmiştir (42,100,101).

2.6.5. Sitotoksinler

Hücre kültürü deneylerinde *Treponema pallidum* tarafından sitopatik etkiler gözlenmiştir, bu da sitotoksinlerin varlığına işaret etmektedir. Diğer bakterilerde homolog olan *tlyC*, *hlyIII*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyC* genlerin kodladığı proteinlerin potansiyel

sitotoksinler olduğu düşünülmektedir, ancak henüz deneysel olarak kanıtlanmamıştır. *Treponema pallidum*'da lipopolisakkarit bulunmamaktadır. Bu nedenle, ortaya çıkan sitopatik etki ve inflamatuar yanıtlar, bakterinin invazif doğasına ve hücre-doku hasarına yönelik konak immün yanıtına bağlanmaktadır (42,71–77).

2.7. İmmünolojisi

Treponema pallidum'a karşı konak bağışıklık yanıtları detaylı bir şekilde araştırılmış olmasına rağmen, immünolojik süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır. Sitotoksinler ve lipopolisakkarit gibi immünojenik pro-inflamatuar maddelerin eksikliği nedeniyle, inflamasyonun daha çok bakterinin invazif doğasına ve hücre-doku hasarına karşı konak yanıtlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (91,93,95,96). *Treponema pallidum* oldukça immünojenik antijenlere sahip olmasına rağmen, bu antijenlerin çoğunluğu hücre içinde bulunurken yüzeyde az miktarda yer almaktadır. Bu durum koruyucu bir bağışıklık yanıtının gelişmesini engellemektedir (48). Bakterinin uzun süre konakta varlığını sürdürebilmesi nedeniyle, hastalık sürecinde ortaya çıkan semptomların asıl nedeninin, gelişen immün yanıtların açığa çıkan antijenlere karşı olduğu düşünülmektedir (77,87,102–104).

2.7.1. Doğal Bağışık Yanıtlar

Treponema pallidum, lipopolisakkarit içermese de, dış membranda bulunan lipoproteinlerin TLR4 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu lipoproteinler, tamamen serbest değildir ve diğer pro-inflamatuvar maddelere göre daha az uyarıcı etkiye sahiptir. Enfeksiyon sırasında, bu lipoproteinlerin makrofajların vakuollerinde sindirilirken açığa çıktığı ve Toll-benzeri reseptörlerle etkileşime girdiği düşünülmektedir. Tpn47, makrofajlarda TLR2 aktivasyonuna ve makrofajlardan IL-12 salınımına neden olur. IL-12, Th1 yanıtlarının gelişmesi ve hücresel bağışıklık yanıtını uyarıcı sitokinlerin salınımında rol oynar (105–108).

Treponema pallidum ayrıca maktriks metallo proteaz-1 (MMP-1) ekspresyonunu indükler. Bu enzim, ekstraselüler matriksi yıkar. Hücre-doku bütünlüğünün bozulması, inflamasyon sırasında konak immün yanıtların gelişmesinin bir diğer nedenidir (70,91).

Tpn47, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Bu yüzey molekülleri, konak hücresel bağışıklığının vasküler endotelden enfeksiyon bölgesine göç etmesinde rol oynar. İmmün sistemin hücresel bağışıklık hücrelerinin bu lokal bölgelere çekilmesi, hastalık seyrinde belirli bölgelerde inflamatuvar yanıtların gözlenmesini açıklayabilir (77,87).

2.7.2. Hücresel Bağışık Yanıtlar

Sifilizde, *Treponema pallidum*'un invazif yeteneği sayesinde konakta yayılabildiği ve latent bir enfeksiyon oluşturabildiği bilinmektedir. Bu patojen, kendini gizleyen bir şekilde konakta varlığını sürdürebilmektedir. Bununla birlikte, hastalığın seyri boyunca hücresel bağışıklık yanıtları semptomların asıl sebebi olarak kabul edilmektedir. Konakta, *Treponema pallidum*'a karşı hücresel bağışıklık sisteminin elemanları, enfeksiyonu ortadan kaldırmak için hücre ve doku hasarı gelişene kadar aktif olarak savaşmaktadır. Bu süreçte, inflamatuvar yanıtlar ve hücresel immünite yanıtları, sifiliz semptomlarının oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (102–105,108).

2.7.2.1. Polimorf Nüveli Hücreler ve Makrofajlar

Polimorf nüveli hücreler, sifiliz enfeksiyonu bölgesinde yaygın olarak bulunur. Bu hücreler miyeloperoksidaz bağımlı öldürme yeteneğine sahiptir ve erken dönemde inflamasyon bölgesine göç ederler. Diğer bakteriyel enfeksiyonlara kıyasla daha az sayıda bulunurlar (109–111). Deneysel çalışmalarda, *Treponema pallidum*'un TpN17 ve TpN47 lipoproteinlerinin deriye enjekte edildiğinde, bu hücrelerin geçici olarak enjeksiyon bölgesine göç ettiği gözlenmiştir (112,113). Tavşan deneylerinde, tavşan defensinlerinin (NP-1, NP-2, NP-5) enfeksiyon bölgesinde 24 saat içinde tespit edildiği gösterilmiştir. Polimorf nüveli hücrelerde bulunan bazı katelisidinlerin, *in vitro* olarak *Treponema pallidum*'a karşı etkin olduğu da gösterilmiştir. Ancak bu hücrelerin enfeksiyonu kontrol altına alamadığı da gözlenmiştir (114,115).

Makrofajlar da *Treponema pallidum* enfeksiyonunda aktif bir rol oynar (105). Makrofajlar, enfeksiyon bölgesine 6-10 gün içinde göç eder ve 13. günde en yüksek sayıya ulaşır. 13-17. günler arasında, enfeksiyon bölgesinde bakteri sayısı giderek

azalır. Ancak makrofajlar tarafından tüm bakterilerin fagosite edilmediği de gözlenmiştir (116,117). Tpn47 lipoproteini, makrofajlarda TLR2 aktivasyonuna ve IL-12 salınmasına neden olur. IL-12, Th1 yanıtlarının gelişmesine ve hücresel bağışıklık yanıtını uyarıcı sitokinlerin (örneğin IFN-γ) salınmasına katkıda bulunur. Bu durum, enfeksiyon bölgesinde T hücreleri ve doğal katil hücrelerinin bulunmasına ve aktive olmasına yol açar (107,118).

Treponema pallidum'un *trp* gen ailesi üyeleri, özellikle TprK proteini, opsonizasyon özellikli antikorların gelişmesine neden olur. Opsinizasyon, patojenin makrofajlar tarafından fagosite edilmesinde önemli bir mekanizmadır. Hem IgM hem de IgG tipi antikorlar opsonizasyonu sağlar. TprK ve Tp92'ye karşı opsonize edici antikorların geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca VDRL antijenlerine karşı da opsonize edici antikorlar gelişmektedir (52,88,119).

Yapılan araştırmalar, opsonize edilen birçok bakterinin enfeksiyon bölgesinden ortadan kaldırıldığını, ancak buna rağmen hala bölgede bakteri tespit edilebildiğini göstermiştir. Bu durum, *Treponema pallidum*'un opsine edici antikorlara karşı direnç geliştirdiği ve enfeksiyon bölgesinden tamamen temizlenemediği görüşünü desteklemiştir (116,117). Ayrıca, *tpr* gen ailesinin değişken bölgeler içerdiği bilinmektedir. Bu değişken bölgeler antijenik varyasyona neden olur ve enfeksiyonun seyri sırasında bu bölgelere karşı gelişen antikorların etkinliğinin azaldığı düşünülmektedir (42,88,94).

2.7.2.2. Dentritik Hücreler

Dendritik hücreler, deri, mukoza ve enfeksiyon bölgelerinde bulunur. Lipopeptitler aracılığıyla TLR-2 üzerinden aktive olan bu hücreler, patojeni fagosite eder ve lenf düğümlerine göç ederek T hücrelerine antijen sunumu yapar. TpN47'nin immatür dendritik hücreleri aktive ettiği ve olgunlaşmalarını sağladığı gözlenmiştir. Antijenle karşılaşan dendritik hücreler, olgunlaşma belirteçleri olan CD54, CD83 ve MHC Sınıf II'yi eksprese eder ve IL-1β, IL-6, IL-12 ve TNF-α gibi sitokinleri salgılamaya başlar (112,118,120–122).

Derisine TpN17 ve TpN47 enjeksiyonu yapılan gönüllülerde, enjeksiyon bölgesinden alınan örneklerde CD83+ dendritik hücreler tespit edilmiştir. Yüzeyel olmayan bu proteinler, bakterinin parçalanması sonucunda ortaya çıkar ve dendritik hücreleri TLR2 üzerinden uyarır. Bu durum, gecikmiş bir dendritik hücre yanıtına neden olur ve inflamasyonun gecikmesine ve bakterinin yayılmasına fırsat tanır (112).

2.7.2.3. T Hücreler

Sifiliz hastalığının tüm evrelerinde, enfeksiyon bölgelerinde T hücre infiltrasyonu gözlenir. Primer evrede, şankrda ağırlıklı olarak CD4+ hücreler görülürken, sekonder evre lezyonlarında CD8+ hücreler daha fazladır. Bu durum, ekstraselüler patojen olduğu sanılan bakterinin intraselüler de olabileceğini düşündürmüştür. Lezyonlarda bulunan CD8+ hücrelerinde IFN-γ, IL-17, perforin ve granzim B gibi moleküller saptanmıştır. Perforin ve granzim B salınımının, ekstraselüler bir bakteriye karşı nasıl bir yanıt olarak geliştiği tam olarak bilinmemekle birlikte, sifilizde gözlenen doku hasarının sebebi olarak düşünülmektedir. Primer ve sekonder evre lezyonlarında Th1 yanıtını tetikleyen IL-2 ve IFN-γ de tespit edilmiştir. Geç primer evrede, antijen spesifik CD4+ hücrelerin miktarı artar. Erken sekonder evrede kan lenfositlerinde Fas aracılı apoptoz artışı gözlenir ve bu durum hastalığın kronikleşmesiyle ilişkilendirilir. Ayrıca, TpF1 monositlerden IL-10 ve TGF-β salınmasına yol açar ve bu sitokinler T^{Reg} (Regülatör T hücre) gelişimini destekler. T^{Reg} hücreleri, hastalıklarda konak hücresel bağışıklığının sönmesinde rol oynar ve hastalığın kronikleşmesinin bir göstergesi olarak kabul edilir (35,102,104,123).

2.7.2.4. Sıvısal Bağışık Yanıtlar

Sıvısal bağışıklığın bileşenleri arasında kompleman sistemi, sitokinler ve antikorlar yer alır. Bu bileşenler, *Treponema pallidum* enfeksiyonunun kontrolü ve ortadan kaldırılmasında rol oynar ve hücresel bağışık yanıtların yönlendirilmesine katkı sağlar. Bununla birlikte, bu sıvısal bağışıklık yanıtlarının *Treponema pallidum* enfeksiyonunu tamamen ortadan kaldıramadığı, hastalığın uzun yıllar boyunca seyretmesiyle anlaşılmaktadır (94,97,98,108,119).

2.7.2.5. Antikor Yanıtlar

Tavşan deneylerinde, *Treponema pallidum* spesifik IgM ve IgG antikorları altı gün içinde tespit edilebilir. Sifilizin erken evresinde IgM antikorları gözlenirken, ileri evrelerde ise güçlü bir IgG yanıtı görülür. Bu antikorlar, flajeller, lipoproteinler, Tpr ailesi gibi birçok başka proteine karşı oluşur. Opsonize edici antikorlarla birlikte nötralize edici antikorlar da gözlenmiştir. *Treponema pallidum* ile enfekte edilmiş tavşan serumunda bulunan antikorlar, *in vitro* olarak bakterinin hücrelere bağlanmasını engelleyebilir. Bu, düşük antijenik özelliğe sahip dış yüzeyinin az miktarda da olsa nötralize edici antikor yanıtına neden olduğunu düşündürmektedir. Tavşan deneylerinde, hayvanın pasif olarak immünize edilmesi lezyon gelişimini durdurabilir, ancak immünizasyon durdurulduğunda enjeksiyon bölgesinde lezyon görülür. Bu durum, antikorların bakteriyi tamamen ortadan kaldırmadığını, ancak yavaşlattığını düşündürmektedir (88–90,94,119,124–127).

2.7.2.6. Sitokin Yanıtları

Hücresel bağışıklık bileşenlerinin ve endotel hücrelerinin aktivasyonu, inflamatuvar sitokin salınımına neden olur. Parçalanmış bakteriler, makrofajlardan TNF-α salınımına yol açar. TpN15, TpN17, TpN38 ve TpN47, TNF-α salınımına neden olur. TpN47 ayrıca IL-1β, IL-6, IL-12 salınımını tetikler. TpN47, MIP1-α ve MIP1-β gibi kemoatraktanların salınımına neden olur. TpN17 ise makrofajlarda IL-1β salınımına neden olur. Salınan sitokinlerin profilinin incelenmesi, *Treponema pallidum*'un antijenlerinin erken aşama inflamasyon tetikleyicileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sitokin profilinde Th1 yanıtlarının ağırlıkta olduğu gözlenir (105,107,118,120,121,128–132).

2.7.2.7. Bağışıklık

Sifiliz enfeksiyonlarında, antikorlar ve hücresel bağışıklık koruyucu değildir, ancak enfeksiyonun kontrol altına alınmasında etkilidir, bu nedenle enfeksiyon yıllarca sürebilir. Tedavi edilmiş sifiliz vakaları tekrar enfekte olabilir. Bununla birlikte, gelişen bağışık yanıtlar hastalığın bir şekilde kontrol altına alınmasını sağlar. Örneğin, konjenital sifilizi olan bir bebekle beslenen emziren annelerin meme

uçlarında lezyonlar gelişirken, sifiliz hastası bir annede bu lezyonlar gelişmez. Tedavi edilmemiş bireylerde bakteri enjeksiyonu lezyona neden olmazken, tedavi edilmiş kişilerde bakteri enjeksiyonu lezyonlara neden olur. Tavşan deneylerinde, radyasyonla öldürülmüş bakterinin tekrar tekrar enjekte edilmesi, aynı suşa karşı koruyucu etki göstermiştir. Bununla birlikte, *Treponema pallidum*'un özellikle Tpr ailesi gibi antijenik varyasyonları, koruyucu bir antikor varlığı olmadığı düşüncesini desteklemektedir. Opsinize edici antikorların hedefi olan TprK antijeninin tavşanlarda kısmi bir koruyucu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir, ancak enfeksiyon gelişimi karşısında yetersiz kalmaktadır. Pasif immünizasyon da tavşan deneylerinde enfeksiyonu sadece geciktirdiği gösterilmiştir. Antiserum kesildiğinde enfeksiyon gelişimi gözlenmiştir. Bu durum, gelişen antikorların ne enfeksiyonu durdurabildiğini ne de reenfeksiyondan koruyabildiğini düşündürmektedir. Aşı çalışmaları devam etmekle birlikte, henüz bu konuda önemli bir ilerleme sağlanamamıştır (67,88–90,94,108,116,117,124,125,127).

2.8. Klinik

Sifiliz, birden çok evreli ve komplikasyonları olan bir hastalıktır. Tedavi edilmezse konakta on yıllarca aktif olarak varlığını sürdürebilir. Sifiliz cinsel yolla bulaşır ve birincil veya ikincil lezyonlarla temas eden kişilerde bulaşır. Cinsel birleşmeden sonra, enfeksiyonun %16-30'u 30 gün içinde gerçekleşir. Konjenital sifiliz ise etkenin plasentadan veya doğumda bebeğe bulaşmasıyla oluşur. Sifiliz, primer, sekonder, latent ve geç olmak üzere dört evrede ilerler. Bulaşmadan sonra 90 gün içinde primer evre sifiliz gelişir ve bulaşma yerinde şankr adı verilen lezyonlar oluşur. Primer evreden sonra 2-12 hafta sonra sekonder evre sifiliz ortaya çıkar. Bu evreden sonra latent evre gelir ve hastalık yıllarca sessiz kalabilir. Hastaların %25'inde hastalık tekrar nüksedebilir ve sekonder evre sifiliz belirtileri gösterir. Bu evreden sonra nörosifiliz gibi ilerleyici tablolar ortaya çıkar. Latent evre sifiliz hastalarının %28'inde geç evre sifiliz görülür, diğerlerinde ise enfeksiyon latent evrede kalır (133–136).

2.8.1. Primer Evre Sifiliz

Primer evre sifiliz, cinsel birleşmeden sonra 90 gün içinde ortaya çıkar. En belirgin semptom şankr adı verilen bir ülserdir. Şankr ağrısız, temiz tabanlı ve sert bir ülserdir. Hastaların %47-92'sinde şankr gelişir. Lezyonların boyutları 0.3-30 mm arasında değişebilir ve birden fazla olabilir. Hastaların %80'inde, lezyona yakın bölgelerde ağrısız lenf bezlerinde büyüme görülür. Erkeklerde lezyonlar genellikle sulkus koronaryus ve glans penis bölgesinde görülür. Eşcinsel erkeklerde ise anal lezyonlar sıkça görülür. Kadınlarda lezyonlar labia majora, labia minora, simfizis pubis ve perineum gibi bölgelerde ortaya çıkabilir. Cinsel organlar dışında da lezyonlar görülebilir, örneğin parmaklar, anüs, dudaklar, dil ve ağız mukozası gibi bölgelerde. Şankr, genellikle 4-6 hafta içinde kendiliğinden iyileşir (133–136).

2.8.2. Sekonder Evre Sifiliz

Primer ve sekonder evre sifiliz arasında kesin bir ayrım yoktur. Primer evre sifiliz, primer evre sifilizden sonra 2-12 hafta içinde gelişir. Bu dönemde şankr adı verilen ülser devam edebilir ve etken tüm vücuda yayılmıştır. Genel sistemik semptomlar arasında boğaz ağrısı, kas ağrısı, baş ağrısı, kilo kaybı ve halsizlik yer alır. Hastaların %85'inde lenf bezlerinde büyüme görülür. Mukokutanöz döküntü en belirgin semptom olarak ortaya çıkar. Genellikle ekstremitelerde başlar ve vücuda yayılır. Bazı hastalarda lezyonlar nekrotiktir. Döküntüler genellikle eller ve ayaklarda görülür. Kıl kökleri etkilenebilir ve saç dökülmesi (alopesi) olabilir. Hastaların %10'unda kondiloma lata adı verilen lezyonlar görülebilir. Bu lezyonlar genital bölgede enfeksiyon bulaştırma riski taşır. Mukoza yüzeyinde inflamasyon, ağız ve dilde inflamasyon görülebilir. Gastrointestinal belirtiler arasında iştahsızlık, bulantı ve kusma yer alır. Karaciğer tutulumu hastaların %12'sinde sarılığa neden olabilir. Böbrek tutulumu nadirdir, ancak protenüri (idrarda protein kaybı) sık görülen belirtidir. Erken nörosifiliz hastaların %5'inde görülür. Asemptomatik menenjit sekonder evre sifilizin sinir sistemini etkilemesi sonucu ortaya çıkar. Oküler tutulum, inflamasyon, görme bozukluğu ve görme kaybı gibi belirtilerle kendini gösterebilir. Bazı hastalarda işitme kaybı da görülebilir. Sekonder evre sifiliz iki yıla kadar sürebilir ve latent evre veya nörosifiliz gelişebilir (133–136).

2.8.3. Latent Evre Sifiliz

Latent evre sifiliz, genellikle belirtisiz seyreden bir dönemdir. Sekonder evre sifiliz belirtilerinin sona ermesinden 3 ay sonra başladığı kabul edilir. Latent evre sifiliz iki alt döneme ayrılır: erken latent evre sifiliz ve geç latent evre sifiliz. Bu dönemler, belirtilerin tekrarlamasına bağlı olarak tanımlanır. Belirtiler bir yıl içinde tekrar ederse erken latent evre sifiliz, bir yıldan sonra tekrar ederse geç latent evre sifiliz adını alır. Hastaların %25'inde sekonder evre sifiliz tekrar gelişebilir. Geç latent evre sifilizde etken cinsel yolla bulaşmaz. Bu dönem, tedavi edilmeyen hastalarda geç evre sifiliz belirtileri ortaya çıkana kadar devam eder (133–136).

2.8.4. Geç Evre Sifiliz

Geç evre sifiliz, nörosifiliz, kardiyovasküler sifiliz gibi belirtilerin ortaya çıktığı bir dönemdir. Bu dönem, sekonder evre sifiliz ya da latent evre sifiliz sonrası 10-30 yıl içinde gelişir. Günümüzde, yaygın antibiyotik kullanımı ve tanısal gelişmeler nedeniyle nadiren görülen bu döneme ilişkin veriler daha çok penisilin öncesi döneme ve etik olmayan araştırmalardan elde edilmiştir. Geç evre sifiliz döneminde gom, kardiyovasküler sifiliz ve nörosifiliz gibi belirtiler görülebilir (133–136).

2.8.4.1. Gom

Gom, geç benign sifiliz olarak da bilinir ve genellikle sekonder evre sifilizden sonra 1-46 yıl arasında (ortalama 15 yıl) ortaya çıkar. Deri lezyonları nodüler, nodüler ülseratif veya ülseratif şekildedir. Kemiklerde periostit (kemik zarının iltihabı) görülür. Belirtiler genellikle baş, tibia (kaval kemiği), klavikular (köprücük kemiği) gibi bölgelerde ortaya çıkar ve ağrı ve şişlik ile kendini gösterir. Lezyonlar genellikle hayatı tehdit etmediği için "benign" olarak adlandırılır. Ancak beyin, karaciğer, kalp gibi organlarda lezyonlar gelişebilir ve hayatı tehdit eden komplikasyonlara yol açabilir (133–136).

2.8.4.2. Kardiyovasküler Sifiliz

Günümüzde kardiyovasküler sifiliz nadir görülen bir durumdur. Penisilin'in keşfinden önce, sifiliz nedeniyle ölümler genellikle kardiyovasküler sifiliz

kaynaklıydı. O dönemde kardiyovasküler hastalıkların %10-15'i sifilizden kaynaklanmaktaydı ve sifiliz hastalarının otopsisinde %55-85 oranında kardiyovasküler sifiliz tespit edilmekteydi. Kardiyovasküler sifiliz, enfeksiyondan 10-30 yıl sonra gelişir. Tedavi edilmemiş hastaların %10'unda komplikasyonlar ortaya çıkar. Geri kalan hastalarda ise belirtiler hafif veya hiç görülmeyebilir. En sık görülen komplikasyon aort yetmezliğidir. Ostial stenoz (daralma) ve anevrizma diğer olası komplikasyonlardır. Yapılan bir çalışmada, anevrizmalı hastalarda anevrizma bölgesinde *Treponema pallidum* tespit edilmiştir ve bu durum anevrizma oluşumunun nedeni olarak düşünülmüştür. Angina (göğüs ağrısı) sık görülen bir belirtidir, ancak enfarktüsle ilişkilendirilmez (133–136).

2.8.4.3. Nörosifiliz

Tedavi edilmeyen hastaların önemli bir kısmında Treponema pallidum bakterisi beyin omurilik sıvısında bulunabilir, ancak herkesin anormal BOS bulguları gelişmez. Nörosifiliz, enfeksiyonun başlamasından 5-10 yıl sonra ortaya çıkar. Belirtilerin ilerlemesiyle birlikte meningovasküler sifiliz, tabes dorsalis veya parazi gibi durumlar gelişebilir. Asemtomatik hastalar, BOS'ta anormallik gözlemlenmesine rağmen nörolojik bulgular sergilemeyen kişilerdir. BOS-VDRL testi, pozitiflik açısından en yüksek titrasyonu 12-18 ay içinde gösterebilir. Aseptik menenjit, enfeksiyondan 6 ay sonra gelişebilir. Baş ağrısı, bulantı, kusma, kafa karışıklığı, ense sertliği gibi belirtiler görülür, ancak ateş yoktur. Bazı hastalarda göz siniri tutulumu ve görme kaybı da ortaya çıkabilir. Hastaların %10'unda 4-7 yıl içinde meningovasküler sifiliz gelişir. Bu durumda, günlerce süren baş ağrısı, uykusuzluk, baş dönmesi gibi belirtiler gözlenir. Kişilik değişiklikleri ve duygusal dengesizlikler de hastalarda görülebilir. Tabes dorsalis, omurilik tutulumuyla karakterize bir durumdur ve dejeneratif özellik gösterir. Ortaya çıkması beş ila 25 yıl sürebilir. Özellikle alt ekstremitelerde ani ağrılar gelişir. Denge ve görme kaybı, bulantı, kusma gibi belirtiler ortaya çıkabilir. Parazi ise aynı sürelerde gelişebilir ve hareket bozukluğu, hafıza kaybı, bilişsel zayıflama, demans, ruhsal değişiklikler, psikotik ataklar gibi belirtiler gösterebilir (133–136).

2.8.5. Konjenital Sifiliz

Treponema pallidum, hamilelik sürecinin herhangi bir aşamasında fetusa geçebilir. Annenin ilk iki trimesterde tedavi edilmesi, konjenital sifilizin olumsuz sonuçlarını engelleyebilir. Bulaş riski en yüksek olan evre, primer evre sifilizdir ve ilerleyen evrelerde bu risk azalır. Tedavi görmeyen hamilelerde ölü doğum, düşük doğum ağırlığı, fetal büyüme bozuklukları gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilir. Konjenital sifilizli yeni doğanların hemen hepsinde düşük doğum ağırlığı görülür. Akciğer komplikasyonları, hepatit veya diğer bakteriyel enfeksiyonlar, konjenital sifilizli bebeklerde ölümün başlıca nedenleridir. Konjenital sifiliz, erken ve geç olmak üzere iki evrede incelenir. Erken konjenital sifiliz, doğumdan itibaren ilk iki yıl içinde ortaya çıkar, geç konjenital sifiliz ise ikinci yaşından sonra gelişir. Doğumdan 2-10 hafta sonra, kanla birlikte burun akıntısı görülebilir. Kemik tutulumu ve gomalar oluşabilir. Erken konjenital sifilizde, dalak büyümesi, sarılık, böbrek sorunları, döküntüler, asemptomatik menenjit, yaygın lenfadenopati gibi sekonder evre sifiliz belirtileri görülebilir. Erken konjenital sifilizli hastaların %80'inde beyin omurilik sıvısında anormallik ve pozitif serolojik test sonuçları saptanabilir. Geç konjenital sifilizde ise genellikle gelişimsel bozukluklar gözlenir. İskelet sisteminde bozukluklar ve deformasyonlar ortaya çıkar. 5-10 yaş arasında başlayan bu belirtilere, iris ve kornea tutulumu ile görme kaybı ve sekizinci kranial sinir sağırlığı eşlik edebilir. Nörosifiliz nadir görülse de geç konjenital sifilizde ortaya çıkabilir (133–136).

2.9. Tanı

Treponema pallidum'un laboratuvar tanısı kolaylıkla yapılamaz. Kültür yöntemi uygulanamadığından, klinik bulgular dikkate alınarak test stratejisi belirlenir. Testler, aktif enfeksiyonun belirlenmesi, geçmiş enfeksiyonun saptanması veya tarama amacıyla kullanılır. Moleküler yöntemler geliştirilmiş olsa da, hala serolojik yöntemlerin tanıdaki yeri önemlidir. *Treponema pallidum* tanısının zorluğu nedeniyle akış şemaları geliştirilmiştir. Bu şemalar takip edilerek hastanın klinik durumu yorumlanır. Tanısal yöntemler üç başlık altında toplanabilir: doğrudan etken saptama yöntemleri, non-treponemal ve treponemal testlerdir (10).

2.9.1. Etkeni Doğrudan Saptamaya Yönelik Testler

Doğrudan etkenin görüntülenmesi veya genomunun saptanması amacıyla yapılan testlerdir (10).

2.9.1.1. Karanlık Alan Mikroskopisi

Karanlık alan mikroskopisi, *Treponema pallidum*'u doğrudan görmeyi sağlayan önemli bir yöntemdir. Bu yöntem, primer veya sekonder evre sifiliz lezyonlarından alınan örneklerin incelenmesini içerir. Örnekte en az 105/mL bakteri bulunmalıdır. Canlı bakterilerin görüntülenmesine dayanan bu yöntemde, örneğin 20 dakika içinde incelenmelidir, aksi takdirde bakteriler ölür ve tipik tirbüşon hareketi gözlenmez. Negatif bir sonuç, tanıyı tamamen dışlamaz. Antibiyotik kullanımı nedeniyle lezyonda bakteri yükü azalabilir ve yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Pozitif bir sonuç elde edildiğinde, hastaya hemen tedavi başlanabilir. Bu testin doğru bir şekilde çalıştırılması deneyim gerektirir. Oral lezyonlardan alınan örneklerde komensal spiroketler bulunabileceğinden, bu tür örneklerin incelenmemesi önerilir. Karanlık alan mikroskopisinin duyarlılık oranı %79-97, özgüllük oranı ise %77-100 arasında değişmektedir (137–139).

2.9.1.2. Direkt Floresan Mikroskopisi

Karanlık alan mikroskopisine alternatif bir yöntem olan direkt floresan mikroskopisi kullanılır. Bu yöntemde, *Treponema pallidum*'un özgü floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş antikorları kullanılır. Bu sayede *Treponema pallidum* diğer spiroketlerden ve bakterilerden kolaylıkla ayırt edilebilir. Bu yöntemle primer ve sekonder evre sifiliz lezyonlarından alınan örnekler incelenir. Özel antikorların kullanılması ve bakteri morfolojisinin görülmesiyle tanı konulabilir. Ancak FDA onaylı bir direkt floresan testi bulunmamaktadır. Monoklonal antikorlar, poliklonal antikorlara tercih edilmelidir. Test sonuçları çapraz reaksiyon olasılığını göz önünde bulundurarak değerlendirilmelidir. Direkt floresan mikroskopisinin duyarlılık oranı %73-100 arasında değişir (137–139).

2.9.1.3. Gümüş Boyama

Treponema pallidum'un hücre duvar yapısı gram-negatif bakterilere benzerken, gram boyası ile boyanmaz. Bunun yerine gümüş boyası kullanılarak görüntülenir. Parafin doku kesitlerinde bakterinin morfolojisi incelenerek tanı konulabilir. Ancak melanin granülleri ve retiküler fiberler nedeniyle bazen bakteri görüntülenemez veya yanlışlıkla başka yapılarla karıştırılabilir. Bu yöntemin duyarlılık oranı %33-71 arasında değişmektedir (10,139).

2.9.1.4. Tavşan Enfektivite Testi

Tavşan enfektivite testi oldukça duyarlı ve özgül bir testtir. Ancak rutin uygulanabilecek bir yöntem değildir. Hem aylar sürebilen bir yöntem olması, hem de deney hayvanı kullanılması nedeniyle sadece araştırma amaçlı bir yöntem olarak yerini almıştır. Günümüzde herhangi bir şekilde tanısal yöntem olarak kullanılmamaktadır. Primer evre ve sekonder evre sifiliz lezyonlarından, ya da amniyotik sıvıdan örneklerin tavşana inokulasyonu sonucu sifiliz gelişiminin gözlenmesiyle tanı koyulur. Polimeraz zincir tepkimesi ile benzer duyarlılığa sahiptir. Testin çalışması için örnekte 1-50 bakteri olması yeterlidir (10,139).

2.9.1.5. Polimeraz Zincir Tepkimesi

Treponema pallidum'un tanısında polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction, PCR) halen bir araştırma konusudur. Pratik ve kesin tanı koydurucu özelliğin yanında maliyetli, ekipman ihtiyacı ve tecrübe gerektirdiğinden henüz rutin laboratuvar test yöntemi olarak kullanılmamaktadır. Bu yöntemde en büyük sorun standardizasyondur. Hem örnek ve zamanlama seçiminde, hem de PCR yöntem seçiminde duyarlılık ve özgüllük değişmektedir. Hedef genleri olarak Tp47, polA ve bmp proteinlerini kodlayan gen bölgeleri kullanılmaktadır. Bir PCR testinde, bu hedeflerin en az iki tanesi kullanılması önerilmektedir. Sifiliz evresine göre, örnek veya suşun gen ekspresyon profiline göre genlerinden birinden biri saptanamayabilir (10,139–143).

Lezyondan sürüntü, biyopsi, tükrük, amniyotik sıvı, BOS veya kan örneği kullanılarak PCR testi yapılabilir. Örneğe ve hastalığın evresine göre duyarlılık

değişebilmektedir. Örneğin, lezyondan sürüntü örneğinde geleneksel PCR ile çalışıldığında erken primer evre sifilizde duyarlılık %89,1 iken, sekonder evre sifilizde bu oran %50'ye düşmektedir. Tam kan örneğinde de, seruma göre duyarlılık düşüktür ve primer evre sifilizde daha başarılıdır. RPR titresi de duyarlılığı etkileyebilir. Primer evre sifilizde RPR titresi arttıkça duyarlılık azalırken, sekonder evre sifilizde RPR titresi arttıkça duyarlılık da artmaktadır (10,139–143).

Tükürük örneğinde de duyarlılık değişkenlik gösterebilir. Sekonder evre sifilizde tükürük örneği diğer evrelere göre daha başarılı bulunmuştur. Primer evre sifilizde duyarlılık %31, sekonder evre sifilizde %87,5, latent evre sifilizde ise %25,6 olarak belirlenmiştir. Duyarlılık ve özgüllük, sadece araştırılan gen bölgesi, örnek veya evreye göre değil, ayrıca kullanılan yönteme göre değişebilir. Geleneksel PCR, "Nested PCR", RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), multipleks PCR ve LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) gibi yöntemler *Treponema pallidum*'un tanısında araştırılmaktadır (10,139–143).

Örneğin, primer evre sifiliz sürüntü örneklerinde geleneksel PCR ile duyarlılık %89,1, "Nested PCR" ile %82, multipleks PCR ile %100 olarak belirlenmiştir. Nörosifiliz ya da konjenital sifilizde PCR kullanımının değeri başka bir araştırma konusudur. BOS-VDRL ile kıyaslanarak yapılan araştırmalarda duyarlılık %40-100 arasında değişmektedir (10,139–143).

2.9.2. Etkeni Dolaylı Olarak Saptayan Testler

Bu testlerde *Treponema pallidum*'a özgü antijenlerin veya enfeksiyon sırasında konakta oluşan immün yanıtların ve hücre-doku yıkımı sonucu açığa çıkan antijenlerin saptanmasıyla yapılan testlerdir. Günümüzde en çok kullanılan serolojik testler bu kategoride yer almaktadır ve tanı, tedavi takibi ve tarama testleri için yaygın olarak kullanılmaktadır (10).

2.9.2.1. Non-Treponemal Testler

Bu testler, *Treponema pallidum* enfeksiyonu sırasında konakta gelişen immün yanıtlar ve bakteri nedeniyle oluşan hücre-doku yıkımı sonucunda ortaya çıkan konak antijenlerine karşı gelişen antikorların saptanmasına dayanır. Bu testler "non-

treponemal" olarak adlandırılır çünkü saptanan antikorlar enfeksiyonun aktif olduğu dönemde ortaya çıkar ve tedavi sonrasında azalır veya kaybolur (10,139).

2.9.2.2. Kompleman Birleşmesi Testleri (Wasserman ve Kolmer)

1901 yılında Bordet ve Gengou, kompleman birleşme testini keşfetmiş ve Wasserman 1906 yılında bu testi sifiliz tanısında kullanmak üzere uyarlamıştır. Wasserman, sifilizden ölen çocukların karaciğerinden elde edilen antijenleri kullanmıştır. Bu test, kolesterol ve lesitin eklenmesiyle geliştirilmiştir. Kolmer ise kardiyolipin antijenleriyle kompleman birleşme testini geliştirmiştir. Kompleman birleşme testinde, antikor antijen komplekslerine bağlanan komplemanın duyarlı koyun eritrositlerini parçalamama esasına göre pozitif sonuç verir. Eğer örnekte antijen yoksa, serbest kompleman duyarlı koyun eritrositlerini parçalayacak ve test negatif olarak yorumlanacaktır. Sifiliz için kompleman birleşme testi bir gün sürebilir ve birçok çözeltiye ihtiyaç duyabilir. Günümüzde artık kullanılmamaktadır (138).

2.9.2.3. Flokülasyon Testleri

Tanısal laboratuvarlarda, treponemal testlerle birlikte kullanılan non-treponemal testler, özellikle tedavi takibinde kullanılmaktadır. Bu testler, hastanın öyküsüne göre titrasyonlu olarak çalışılarak tanısal değerlere sahiptir. Ancak, yalancı negatiflik veya yalancı pozitiflik durumları gözlenebilir. Yalancı pozitiflik sebepleri arasında gebelik, tüberküloz, otoimmün hastalıklar, kronik karaciğer rahatsızlığı, HIV (Human Immmunodeficiency Virus) enfeksiyonu gibi durumlar bulunur. Yalancı negatiflik ise prozon olayı, erken tedavi gibi nedenlere bağlı olabilir (10,138,139).

2.9.2.3.1. "Venereal Diseases Research Laboratory" Testi (VDRL)

"Venereal Diseases Research Laboratory" (VDRL) testi, sığır kardiyolipin, kolesterol ve lesitin gibi antijenleri kullanan bir testtir. Test için kullanılacak serumlar 56°C'de inaktive edilir. Test, mikroskop lamları üzerinde yapılan ve x100 büyütme ile floküslasyonun gözlenerek gerçekleştirildiği bir testtir. Flokülasyonun son gerçekleştiği titrasyon pozitiflik değeri olarak kabul edilir. Bu test günümüzde hala kullanılmakta olup özellikle nörosifiliz ve konjenital sifilizde BOS örneğinde uygulanmaktadır. VDRL testi, kardiyolipine karşı IgM ve IgG antikorlarını saptar.

Prozon olayı görülebilir, ancak oranı düşüktür. Primer evre sifilizde duyarlılık %67-78, sekonder evre sifilizde %96-100, latent evre sifilizde %88-100, geç evre sifilizde %85-95 arasındadır ve özgüllük %96-99 arasındadır. BOS örneklerinde özgüllük yüksektir, ancak duyarlılık %30-78 arasında değişebilir (10,138,139).

2.9.2.3.2. "Unheated Serum Reagin" Testi (USR)

"Unheated Serum Reagin" (USR) testi, VDRL testiyle aynı yöntemi kullanır. Testte kullanılan antijene kolin klorid eklenerek günlük hazırlık gerektirmez ve serumların ısıyla inaktive edilmesi gereksinimini ortadan kaldırır. RPR'nin geliştirilmesiyle birlikte kullanımı azalmıştır (10,138).

2.9.2.3.3. "Rapid Plasma Reagin" (RPR)

"Rapid Plasma Reagin" (RPR) testi, VDRL testinin modifiye edilmiş bir versiyonudur. Mikroskopik değil, makroskopik olarak değerlendirilir. RPR testinde VDRL antijenleri karbon partiküllerine bağlanmıştır. Antijen ve hasta serumu titreleri, işaretli kartlara karıştırılarak flokülasyon gözlenir. Flokülasyonun gerçekleştiği son titre pozitiflik değerini belirler. Hem kalitatif hem de kantitatif olarak kullanılabilir ve tedavi takibinde azalan titre pozitifliği tedavi başarısını ölçmek için kullanılır. Test sonuçlarında prosedürlerin doğru uygulanmaması veya değerlendiricinin tecrübesine bağlı olarak sapmalar olabilir. Bu nedenle otomatik RPR testleri geliştirilmiştir. Ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. RPR testinin duyarlılık oranları primer evre sifilizde %60-86, sekonder evre sifilizde %100, latent evre sifilizde %95-100, geç evre sifilizde %73-98 arasında değişir. Özgüllük oranı ise %93-99 arasındadır (10,138,139).

2.9.2.3.4. "Toluidine Red Unheated Serum Test" Testi (TRUST)

"Toluidine red unheated serum test" (TRUST) testi, RPR'ye benzer şekilde yapılan ve antijenin karbon partiküllerine toluidin kırmızısı ile immobilize edildiği, USR'deki gibi kolin klorid eklenmiş VDRL antijeni kullanan bir testtir. TRUST testinin duyarlılık oranları primer evre sifilizde %70-85, sekonder evre sifilizde %100, latent evre sifilizde %95-100, geç evre sifilizde ise %98 arasında değişir. Özgüllük oranı ise %98-99 arasındadır (10,138).

2.9.3. Treponemal Testler

Bu testlerde *Treponema pallidum* spesifik antijenler kullanılmaktadır. Manuel veya otomatize testler mevcuttur. Manuel testlerde immobilize edilmiş tüm bakteri kullanılırken, otomatize testlerde rekombinant antijenler TpN15, TpN17 ve TpN47 en sık kullanılanlardır. Bu testler IgM ve IgG antikorlarını saptarlar. Treponemal testlerde oluşan spesifik antikorlar ömür boyu pozitif kalır. Bu nedenle, pozitif sonuçlar durumunda aktif ya da tedavi edilmiş enfeksiyon ayrımı yapabilmek için non-treponemal testlerle birlikte kullanılması gerekmektedir (10,138,139).

2.9.3.1. Treponema pallidum İmmobilizasyon (TPI) Testi

Treponema pallidum immobilizasyon (TPI) testi, antijen olarak canlı Nichols suşunu kullanan bir testtir. Bu testte, hastanın serumunda bulunan antikorların, bakterinin tipik hareketini durdurduğu gözlenerek sonuç elde edilir. İnceleme genellikle karanlık alan mikroskopisiyle yapılır. Ancak, bu testin canlı bakteri gerektirmesi, diğer treponemal testlere göre duyarlılık ve özgüllük açısından daha düşük olması nedeniyle tanısal laboratuvarlarda kullanımı azalmıştır (138,139).

2.9.3.2. Floresans Treponemal Antikor Absorbsiyon" Testi (FTA-ABS)

İndirekt floresanla işaretlenmiş antikor kullanılan treponemal testlerde, öldürülmüş Nichols suşuna karşı antikor araştırılır. Başlangıçta özgül bir yöntem olduğu düşünülse de, daha sonra çapraz reaksiyonlara neden olan antikorların varlığı gözlenmiştir. Bu nedenle, test öncesi bir absorsiyon basamağı eklenerek nonspesifik antikorlar uzaklaştırılır. Hasta serumu, nonpatojenik Reiter suşu ile inkübe edilerek nonspesifik antikorlar serumdan uzaklaştırılır ve ardından test gerçekleştirilir. Bu işlem için dilüsyon oranı 1/200 olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde daha özgül sonuçlar elde edilirken, duyarlılık dilüsyon nedeniyle düşmektedir. Bu yöntem sadece IgG tipi antikorları saptamaktadır ve FITC ile floresan işaretleme yapılır. Pozitiflik derecesi, gözlemci tarafından izlenen floresan şiddetine göre sübjektif olarak belirlenir. Bu test, erken primer evre sifilizde kullanılan bir spesifik treponemal testtir ve enfeksiyonun başlamasından 3 hafta sonra pozitif sonuçlar verir. Yalancı pozitiflik oranı %0,35 olarak bildirilmiş olup, HIV enfeksiyonları, otoimmün hastalıklar ve

hamilelik gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir. Testin duyarlılığı primer evre sifilizde %82-90, sekonder evre sifilizde %100, latent evre sifilizde %100 ve geç evre sifilizde %100 olarak bulunmuştur. Özgüllük ise %94,5-97 arasında değişmektedir (10,137–139).

2.9.3.3. FTA-ABS Çift Boyama Testi

FTA-ABS yönteminde zıt boya kullanılmadığından, negatif sonuçlarda bakteri gözlenmez. Bu durum, testi yapan kişi için mikroskobik inceleme açısından zahmetli olabilir. Negatif olduğu ışık mikroskopisinde bakteri görülmesine rağmen, ultraviole mikroskopisinde bakterinin floresan vermemesiyle sonuç değerlendirilir. Bu durumu ortadan kaldırmak için FTA-ABS çift boyama testi geliştirilmiştir. Bu testte, tetrametil rodamin izotiyosiyanat ile işaretlenmiş anti-insan IgG antikoru, hasta serumundaki spesifik antikorları araştırırken, FITC ile işaretlenmiş anti-Treponema pallidum antikoru zıt boya olarak kullanılır. Böylece sadece filtre değiştirilerek pozitif veya negatif olduğu kolayca değerlendirilebilir. Yanlış pozitiflik oranı normal bireylerde %1 iken, hamilelikte bu oran %3'e kadar çıkar. Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, skleroderma gibi otoimmün hastalıkları olan hastalarda bu oran daha da artabilir. Duyarlılık ve özgüllük açısından FTA-ABS yöntemine yakın sonuçlar verir (138,139).

2.9.3.4. FTA-ABS 19S IgM testi

Bu test, konjenital sifiliz tanısında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Yeni doğanlarda *Treponema pallidum*'e özgü IgM antikorlarının varlığını araştırır. Yeni doğanlarda romatoid faktörler ve maternal IgG'lerin etkilediği bu testin uygulanabilmesi için, yeni doğanlarda %80'inde bulunan romatoid faktörlerin ve serbest veya IgM'e bağlı IgG'lerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu, immobilize protein G ile kolon pürifikasyonu yoluyla gerçekleştirilir. Testte anti-insan IgM antikoru kullanılarak indirekt olarak incelenir, FTA-ABS gibi. Duyarlılık %92, özgüllük ise %93'tür. Bu testin ticari bir üretimi bulunmamakta ve FDA onaylı değildir (139).

2.9.3.5. "Mikrohemaglutinasyon Assay for Treponema pallidum" (MHA-TP, TPHA)

Günümüzde *Treponema pallidum* hemaglütinasyon testi (TPHA) olarak bilinen test, aslında orijinal TPHA testine alternatif olarak geliştirilen "Mikrohemaglutinasyon Assay for *Treponema pallidum*" (MHA-TP) testidir. Orijinal TPHA testinde antijen ve hasta serumu 0,5 mL miktarında karıştırılır, ancak bu maliyetli bir işlemdir. Bu nedenle orijinal TPHA testi, daha az antijen ve reaktif kullanılarak mikroplakta çalışabilecek şekilde modifiye edilmiş ve MHA-TP olarak adlandırılmıştır. Günümüzde MHA-TP olarak adlandırılan tüm testler, TPHA olarak bilinir ve ticari olarak satılır. Testte kullanılan antijenler, Nichols suşunun ultrasonikasyon ürünleridir ve tannik asit ile duyarlılaştırılmış eritrositlerine bağlanır. Temel prensip, hemaglütinasyon testleriyle aynıdır. Pozitif bir örnekte, antikorlar antijen-antikor kompleksleri oluşturarak eritrositlerin yerçekimiyle dibe çökmelerini engeller. Negatif bir örnekte ise eritrositler dibe çöker. Test sonuçlarının değerlendirilmesi için U tabanlı mikrodilüsyon plakları kullanılır. Lyme hastalığı, leptospirozlar, lepra, sıtma, SLE, viral hastalıklar ve hamilelik gibi durumlarda yanlış pozitiflikler görülebilir. Her test, pozitif ve negatif kontrol örnekleriyle birlikte çalışılmalıdır. Test kalitatif veya kantitatif olarak uygulanabilir. Duyarlılık, primer evre sifilizde %57-88, sekonder evre sifilizde %96-100, latent evre sifilizde %96-97 ve geç evre sifilizde %100'dür. Özgüllük ise %99'dur (10,138,139).

2.9.3.6. Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon Testi (TPPA)

Treponema pallidum partikül aglütinasyon testi (TPPA), MHA-TP ile aynı çalışma prensibine ve uygulama şekline sahiptir, ancak eritrosit yerine boyanmış jel partiküller kullanır. Bu sayede eritrosit antijenlerine çapraz reaksiyon gösteren antikorların etkisi ortadan kaldırılmış olur. TPPA'nın maliyeti MHA-TP'ye göre daha yüksektir. Henüz bir üretici tarafından ticari olarak satışa sunulmuş olmasa da kullanımı yaygınlaşmaktadır ve MHA-TP'nin yerini almaktadır. Duyarlılık ve özgüllük MHA-TP'ye kıyasla daha yüksektir ve EIA ile karşılaştırılabilir. Primer evre sifilizde duyarlılık %85-97, sekonder evre sifilizde %100, latent evre sifilizde %100 ve geç evre sifilizde %96,2-100'dür. Özgüllük ise %100'dür (10,139).

2.9.3.7. İmmünoblot (Western blot) Testi

İmmünoblot yöntemi, bir patojene ait proteinlerin poliakrilamit jel elektroforezi ve membrana transfer edilmesi prensibine dayanır. Membrana aktarılan proteinlerle reaksiyon vermesi beklenen hasta serumu ile inkübe edilir ve spesifik proteinlere bağlanmış immünglobulinlerin varlığı konjugat ile belirlenir. Bu yöntem, hem IgM hem de IgG antikorlarının ayrı ayrı tespit edilmesini sağlar. Tek bir reaksiyonun gözlenmesi yerine, spesifik antijenlere karşı reaksiyonun tespit edilmesi, kesin bir tanı koymada yardımcı olur. Bu yöntemle, birden fazla spesifik antijen reaksiyonu araştırılabilir ve çapraz reaksiyonların diğer testlerde olduğu gibi önüne geçilebilir. *Treponema pallidum* immünoblot testi, Nichols suşundan elde edilen lizatlarla hazırlanır. Ancak ev yapımı testlerde antijen miktarı ve sayısı kontrol edilemediğinden, günümüzde hazır şeritler şeklinde üretilen, rekombinant antijenler içeren ve kontrolleri içeren ticari immünoblot testler daha yaygın olarak kullanılmaktadır. TpN15, TpN17, TpN30, TpN33, TpN34, TpN37, TpN44, TpN47 ve TmpA (TpN44,5) en sık reaksiyon veren antijenlerdir. TpN15, TpN17, TpN47 ve TmpA ise en sık kullanılan rekombinant antijenlerdir. Primer evre sifilizde duyarlılık %90-94, sekonder evre sifilizde %98-100, latent evre sifilizde %100 ve geç evre sifilizde %100'dür. Özgüllük ise %99,3-100 arasındadır (10,138,139).

2.9.3.8. "Enzyme Immunoassay" (EIA)

İmmünoblot yöntemi günümüzde birçok hastalığın tanısında ve taramasında en sık kullanılan test yöntemidir. Ancak çapraz reaksiyonlar gözlenebilir, bu nedenle diğer testlerle doğrulama gereklidir. Sifiliz tanısında, "Enzyme Immunoassay" (EIA) testleri kullanılır ve IgM, IgG veya toplam immünglobülin düzeylerini saptar. Bu testler manuel veya otomatik olarak uygulanabilir ve sonuç değerlendirmesi kolorometrik bir substrat veya kemilüminesan yöntemiyle yapılır. Testler direkt, sandviç, indirekt veya yarıştırmalı şekilde gerçekleştirilebilir. Antijen olarak *Treponema pallidum* lizatları kullanılabileceği gibi ticari olarak satılan hazır testler daha çok TpN15, TpN17, TpN47 ve TmpA rekombinant antijenlerini içerir. Bir veya birden çok rekombinant antijen kullanılabilir, ancak birden çok antijen kullanan testlerin üstünlüğü tartışmalıdır. Primer evre sifilizde duyarlılık %91,4-100, sekonder

evre sifilizde %89,3-100, latent evre sifilizde %100 ve geç evre sifilizde %86,4-100'dür. Özgüllük ise %98,1-99,1 arasındadır (10,138,139,144,145).

2.9.3.9. Hızlı Tanı Testleri

Treponemal Testlerin maliyeti, ekipman ve iş gücü gereksinimlerine alternatif olarak hızlı tanı testleri geliştirilmiştir. Bu testler düşük maliyetli, tecrübesiz kişiler tarafından dahi uygulanabilen ve özellikle saha taraması ve sosyo-ekonomik olarak düşük bölgelerde kullanım için umut vaat eden testlerdir. İmmünokromatografik şerit şeklinde üretilirler ve bir ucuna kan veya serum damlatılır. Bu kısımda işaretli anti-insan globülin bulunur. İmmünglobulin kompleksleri şerit boyunca ilerlerken, şeridin bir bölümüne *Treponema pallidum*'a ait bir rekombinant antijen veya lizat emdirilmiştir ve sonunda bir kontrol bölgesi bulunur. İmmünglobulin kompleksleri ilgili antijenle reaksiyona girer ve bu bölgede renk değişimi meydana gelir. Test doğru çalıştığında kontrol şeridi de renk değiştirir ve test geçerli kabul edilir. Bu testler sadece treponemal antijenlerle değil, non-treponemal antijenlerle de hazırlanabilir. Bu şekilde hastanın hem özgül antikor yanıtı hem de aktif enfeksiyon durumu belirlenebilir. Pozitif bir sonuç durumunda hasta örneği laboratuvara gönderilerek daha özgül testlerle doğrulama yapılır. Treponemal Testlerle karşılaştırıldığında bu hızlı tanı testlerinin duyarlılığı %94,5-100 arasında, özgüllüğü ise %91,5-100 arasındadır (10,144,146).

2.10. Tanıda Kullanılacak Testin Seçimi

Sifiliz, evrelerine göre ilerleyen bir hastalık olduğu için ve öncelikli olarak serolojik testler kullanıldığı için, test seçimi dikkatle yapılmalıdır. Hastaların non-treponemal ve treponemal antijenlere karşı gelişen antikor yanıtları her evrede farklı olduğu için, test seçimi bu durumu dikkate alarak yapılmalıdır. Ayrıca, HIV gibi başka bir hastalıkta veya konjenital sifiliz şüphesi gibi özel durumlarda da test seçimi farklılık gösterebilir (10,138,139).

2.10.1. Prime Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi

Primer evre sifiliz, cinsel temas sonrası 90 gün içinde gelişen bir evredir ve hastalarda üç hafta sonra belirtiler ortaya çıkar. Bu evrede antikor yanıtı henüz

gelişmediği için, kişide lezyon varsa karanlık alan veya floresan mikroskopisi kullanılması önerilir. Treponemal veya non-treponemal testlerle saptanan antikorlar, şankr oluşumundan 1-4 hafta geçmeden tespit edilemeyebilir. Erken primer evrede hastaların %30'u VDRL, %50'si ise yalnızca FTA-ABS, EIA ve immünoblot testlerinde pozitif sonuç verebilir. MHP-TP testi, primer evre sifilizde FTA-ABS ve non-treponemal testlere göre daha az duyarlıdır. Moleküler yöntemler, erken primer evrede kullanılabilmektedir. Ancak bu yöntemler henüz standartlaşmamış veya sınırlı sayıda laboratuvar tarafından uygulanmaktadır, bu yüzden rehberlerde öneriler arasında henüz yer almamaktadır. Tanı, bu evrede, şüpheli cinsel temas durumunda hastanın izlenmesi, lezyon gelişimi varsa lezyondan örnek alınarak etkenin doğrudan tespiti, antikor yanıtının gelişmesi için yeterli sürenin geçmesi durumunda ise treponemal ve non-treponemal testler kullanılarak konulur (10,138,139).

2.10.2. Sekonder Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi

Primer evre sifiliz sonrası 2-6 hafta içinde sekonder evre sifiliz gelişir ve bu dönemde tüm treponemal testler neredeyse %100 pozitif sonuç verir. Lezyonlar varsa, bu lezyonlardan etkenin doğrudan saptanması pratikte uygulanmaz. Hastalar non-treponemal testlerle de incelenmelidir. İlk defa sifiliz hastalığı geçiren bir kişide, non-treponemal testin titrasyonu ≥8 veya daha yüksek çıkması veya daha önce de sifiliz hastası ise titrasyonun bir önceki teste göre dört kat artması tanıyı doğrulayıcıdır. Bu evrede dikkate alınması gereken nokta, hastanın immünsüpresif bir durumu varsa treponemal ve non-treponemal testlerin pozitif olmayabileceğidir. Bu nedenle, sekonder evre sifilizden şüphelenilen durumlarda hastaların testleri düzenli aralıklarla tekrarlanmalıdır (10,138,139).

2.10.3. Latent Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi

Latent evre sifiliz, primer ve sekonder evre sifiliz arasında yer alan veya sekonder evre sifiliz sonrası gelişen bir dönemdir. Bu evrede hastalık sessiz bir şekilde ilerler ve herhangi bir semptom görülmez. Erken latent evre sifiliz, sekonder evre sifiliz sonrası ilk bir yıla denir. Non-treponemal testler hala pozitif sonuç verirken, treponemal testlerin tamamı pozitif sonuç verir. Hasta tedavi görmese bile, non-treponemal testlerin titresi düşer ve sonunda negatif olabilir. Non-treponemal testler

negatife dönse bile, treponemal testlerin tamamı pozitiftir. Hasta semptom göstermediğinden, non-treponemal testin negatif ancak treponemal testin pozitif çıkması durumunda, Geç uyku evresi sifiliz veya tedavi edilmiş sifiliz olup olmadığını ayırt etmek için hastanın öyküsü bilinmesi gerekebilir (10,138,139).

2.10.4. Geç Evre Sifilizde Tanı Testin Seçimi

Geç evre sifiliz, ilk semptomların başlamasından 10-20 yıl sonra gelişir. Non-treponemal testler negatif sonuç verirken, treponemal testlerin tamamı pozitiftir. Geç evre sifiliz, bu evrede görülen hastalık tablolarıyla tanı konulur. Kemik tutulumuna bağlı radyolojik bulgular veya gom gibi lezyonlardan izole edilen bakterinin mikroskobik olarak incelenmesi tanıya yardımcı olur. Santral sinir sistemindeki lezyon bulguları ve klinik belirtilerin yanı sıra, beyin omurilik sıvısında bakterinin saptanması da tanıyı doğrulayıcıdır. Moleküler yöntemler, mikroskopiden daha duyarlı olduğu için bu yöntemlerin kullanımı tartışılmaktadır (10,138,139).

2.10.5. Nörosifilizde Tanı Testin Seçimi

Nörosifiliz, ilk belirtilerden sonra iki yıl içinde gelişebilir. Hastaların BOS örnekleri treponemal ve non-treponemal testlerin yanı sıra biyokimya ve hematolojik bulgular açısından incelenmelidir. Hastaların treponemal testleri pozitif sonuç verir. Nörosifiliz tanısı için BOS-VDRL testinin pozitif olması, beşten fazla lenfositin bulunması ve protein miktarının ≥40mg/dL olması gerekmektedir. Bakterinin BOS'ta mikroskobik olarak görüntülenmesi tanıya yardımcı olur. Serumda FTA-ABS testi pozitifken BOS-FTA-ABS testi negatifse tanı dışlanır. Nörosifilizde moleküler yöntemlerin kullanımı hala araştırma konusudur (10,138,139,143).

2.10.6. Konjenital Sifilizde Tanı Testin Seçimi

Maternal IgG nedeniyle sifilizli bir hastadan doğan yeni doğanlarda treponemal testler pozitif sonuç verir. Yeni doğanlarda IgM yanıtını belirlemek için FTA-ABS-19s IgM testi kullanılabilir, ancak bu test yaygın olarak kullanılmamakta ve ticari olarak üretilmemektedir. Ancak, semptomları olan konjenital sifilizli hastaların %90'ında bu test pozitif sonuç verir. Yeni doğanlarda bakteri vücutta yayılmış olduğu için primer evre sifilize özgü belirtiler gözlenmez. Sekonder ve geç evre dönemi

belirtileri konjenital sifilizli yeni doğanlarda daha sık görülür, ancak bazı vakalarda asemptomatik olabilirler. Yeni doğanda non-treponemal testlerin anneye göre dört kat artışı tanıyı doğrulayıcıdır. Konjenital sifilizde amniyotik sıvıdan tavşan enfektivite testi veya moleküler yöntemlerin kullanımı diğer test yaklaşımlarıdır. Tavşan enfektivite testi rutin tanı laboratuvarlarında kullanılmamaktadır ve moleküler yöntemlerin konjenital sifilizdeki gücü belirsizdir. Konjenital sifiliz tanısı hala zorlu bir tanıdır ve birçok bulgu ve test sonucuna göre koyulur. Non-treponemal test titrasyonu, BOS-VDRL testi, lezyonlardan veya diğer örneklerden bakterinin görülmesi, klinik ve radyolojik bulguların değerlendirilmesi konjenital sifiliz tanısında kullanılan yöntemler arasındadır (10,138,139,147).

2.10.7. HIV Hastalarında Tanı Testin Seçimi

HIV hastalarında non-treponemal testler yanlış pozitif sonuçlar verebilirken, treponemal testler az sayıda da olsa yanlış negatif sonuçlar verebilir. Gelişen lezyonlardan veya BOS'ta bakterinin mikroskopik olarak görüntülenmesi tanıyı doğrulayıcıdır. HIV hastalarının önemli bir kısmında treponemal testler pozitif çıkar, ancak non-treponemal testlerin titresi HIV negatif hastalara göre daha yüksek olabilir. Treponemal testlerin kantitatif sonuçları zamanla azalabilirken, non-treponemal testlerin titresi hasta tedavi olsa bile yavaşça azalır. HIV hastalarında bağışıklık yanıtlarının bozulması nedeniyle klinik seyir farklılık gösterebilir. Semptomlar karmaşık olabilir veya sekonder ve geç evre sifiliz evrelerine HIV negatif hastalara göre daha hızlı geçebilir. HIV hastalarında sifiliz tanısı konjenital sifilizde olduğu gibi klinik ve laboratuvar bulguların birlikte değerlendirilmesiyle konulur (10,137,138).

2.10.8. Tedavi Takibinde Tanı Testin Seçimi

Treponemal testlerin ömür boyu pozitif kalması nedeniyle, tedavi takibi ve tedavi başarısının değerlendirilmesinde kullanılamazlar. Ancak erken evrede tespit edilen ve tedavi edilen hastalarda serokonversiyon gözlenmeyebilir. Tedavi başlangıcından itibaren ilk yıl içinde hastanın non-treponemal testi üç ayda bir yapılmalı ve bu testte en az dört katlık bir titre azalması görülmelidir. Tedavi başarısı, non-treponemal testlerin iki yıl sonra negatifleşmesi ile belirlenir. İleri evre sifiliz

hastalarında veya defalarca enfekte olan hastalarda non-treponemal testlerin negatifleşmesi daha uzun sürebileceği dikkate alınmalıdır (10,13,138,139).

2.11. Tanısal Akış Şeması

Treponema pallidum enfeksiyonunun tanısı kolay değildir. Bakterinin kültürü yapılamadığı ve moleküler testlerin maliyetli ve zahmetli olduğu için tanıda en yaygın olarak serolojik testler kullanılır. Sifiliz hastalığı farklı evrelerde seyrettiği ve her evrede immün yanıtların farklı olduğu için serolojik testlerde bazı zorluklar vardır. Tanıya en uygun testlerin seçimi için yönergeler ve öneriler yayınlanmıştır (10).

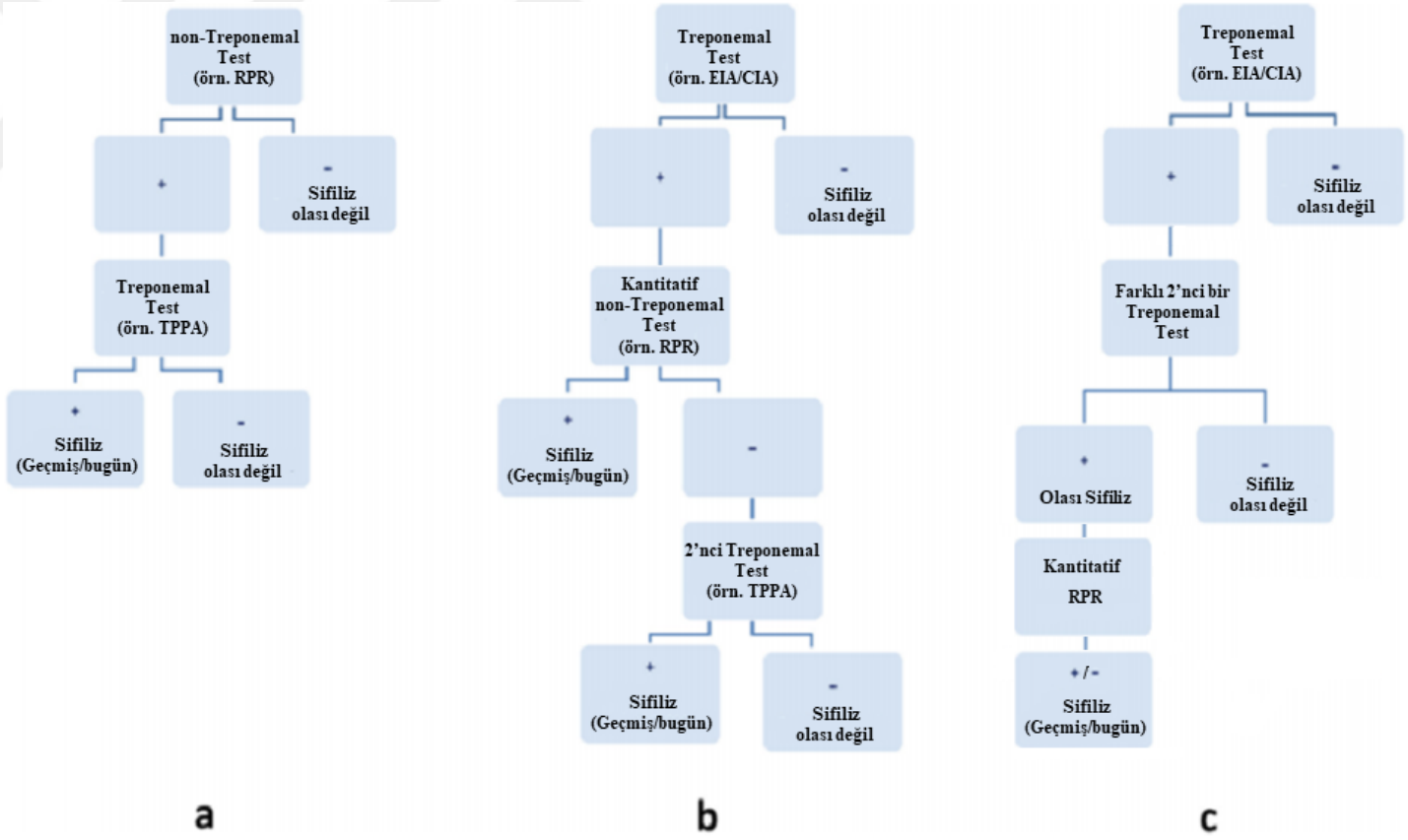
Serolojik testler non-treponemal ve treponemal testler olmak üzere iki gruba ayrılır. Non-treponemal testler, tarihsel olarak ilk kullanılan testlerdir ve enfeksiyon sırasında ortaya çıkan antijenleri tespit eder. Bu antijenler, konak antijenlere reaksiyon veren antijenlerdir ve hücre-doku hasarı olan diğer hastalıklarda da pozitif sonuç verebilir. Bu nedenle, bu testler kullanılırken hastanın öyküsü de göz önünde bulundurularak sonuçlar yorumlanmalıdır. Non-treponemal testler aktif enfeksiyonda pozitif sonuç verirken, erken primer evre sifiliz ve latent evre sifilizde pozitiflik göstermez. Bu nedenle, aktif enfeksiyonu olmayan sifiliz hastaları tespit edilemeyebilir. Bu eksiklik, treponemal testlerle giderilebilir (10,138,139).

Treponemal testler, bakteriye özgü antijenleri tespit eder ve yanlış pozitiflik oranı daha düşüktür. Treponemal bir testle pozitif sonuç alınması, başka bir yöntem veya antijen kullanılan treponemal testle doğrulanabilir. Ancak treponemal testler aktif enfeksiyonu tespit edemez ve hasta tedavi olmuş olsa bile ömür boyu pozitif kalır. Bu nedenle, non-treponemal testlerin tanıdaki önemi hala devam etmektedir (10,138,139).

Tarihsel olarak, non-treponemal testlerle tanı konulurken, treponemal testlerin geliştirilmesiyle birlikte non-treponemal testlerin bazı vakaları saptayamadığı ve kaçırabildiği anlaşılmıştır. Başlangıçta, non-treponemal testle pozitif sonuç alan vakaların treponemal bir testle doğrulanması yaklaşımı benimsenmiştir. Ancak günümüzde treponemal testlerin yaygınlaşması, otomatik kullanılabilir olması ve tanısal güçleri nedeniyle kullanım amaçları değişmiş ve bu konudaki rehberler güncellenmiştir (2,148,149).

Örneğin, bir treponemal testle tespit edilen bir vakada aktif enfeksiyon olup olmadığını anlamak için non-treponemal bir test yapılması önerilmektedir. Bu şekilde, treponemal testlerin yaygın kullanımı sayesinde sessiz enfeksiyonlar ve aktif enfeksiyonlar daha kolay tespit edilebilir hale gelmiştir. Bu nedenle, resmi sağlık kurumları ve sağlık örgütleri tanı rehberleri yayınlamıştır. Şekil 5'te, (2,148–150) bu rehberlerin tanı akış şeması gösterilmektedir (2,148,149).

Bu rehberler, serolojik testlerin doğru bir şekilde kullanılmasını ve sifiliz tanısının daha kesin bir şekilde konulmasını sağlamak için önemli bir rehberlik kaynağıdır. Tanısal akış şemaları, klinik özelliklere, test sonuçlarına ve hastanın öyküsüne dayanarak doğru tanıya ulaşmak için bir yol haritası sunar. Bu şekilde, sifiliz tanısının doğru ve güvenilir bir şekilde konulması sağlanır (2,148,149).



Şekil 5. Tanısal akış şemaları.

a: Geleneksel, b: Ters tanı algoritması, c: ECDC ters tanı algoritması.

* Kaynağından Türkçeleştirilmiş ve güncellenmiştir (2,148–150).

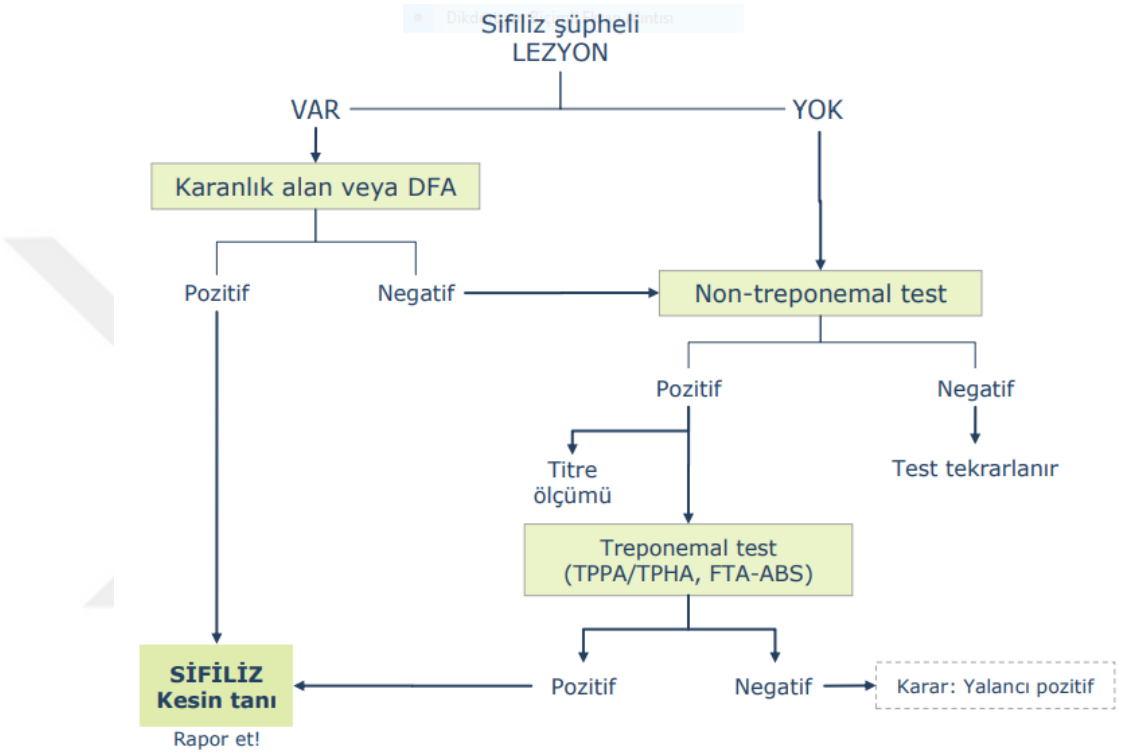
Günümüzde üç farklı tanı akış şeması bulunmaktadır: geleneksel, ters ve Avrupa Hastalık Kontrol ve Korunma Merkez'in (European Centers for Disease Control and Prevention, ECDC) akış şeması. Geleneksel akış şemasında, tanı için ilk olarak non-treponemal bir test kullanılır. Genellikle RPR tercih edilen bu kolay uygulanabilir testin pozitif çıkması durumunda, tanıyı doğrulamak için treponemal bir test yapılır. Treponemal testin de pozitif çıkmasıyla hastaya sifiliz tanısı konur. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından önerilen bu akış şemasının bir sorunu, non-treponemal testin başlangıçta kullanılması ve bu nedenle sessiz enfeksiyonu olan kişilerin tespit edilememesidir (2,148,149).

Günümüzde, treponemal testlerin yüksek duyarlılık göstermesi ve otomatik sistemlerde kullanılabilmesi nedeniyle ters akış şeması rehberlere girmiştir. Bu şemaya göre, hastalar öncelikle treponemal bir testle değerlendirilir. Yüksek duyarlılığa sahip bir treponemal test tercih edilir. Testin pozitif çıkması durumunda, non-treponemal bir test uygulanır. Non-treponemal testin pozitif çıkmasıyla aktif sifiliz enfeksiyonu olan bir hasta olarak tanı konulur. Non-treponemal testin ikinci basamağında negatif çıkması durumunda, ilk treponemal testin yanlış pozitif sonuç verebilme olasılığı nedeniyle, farklı bir treponemal test kullanılarak ilk sonuç doğrulanmaya çalışılır. İkinci test sonucu negatif ise, belirli bir süre sonra treponemal test tekrarlanır. Bu, erken evre birinci evre sifiliz vakalarında yeterli antikor yanıtının gelişmemiş olabileceği ve geçen süre içinde bu yanıtın diğer treponemal testlerle tespit edilebilecek seviyeye ulaşabileceği için gereklidir. Tekrarlanan test yine negatif çıkarsa, ilk sonuç yanlış pozitif olarak değerlendirilir. Eğer başlangıçta veya sonradan yapılan ikinci treponemal test pozitif çıkarken, non-treponemal test negatif çıkarsa, hasta sessiz bir enfeksiyona sahip olabilir veya tedavi görmüş olabilir. Bu durum, hasta öyküsünün araştırılmasıyla anlaşılır (2,148,149).

ECDC, tanı akış şeması olarak birinci tarama testi olarak treponemal bir testin kullanılmasını önermektedir ve otomatik sistemlerde yaygın olarak kullanılan testlerin tercih edilmesini tavsiye etmektedir. Birinci testte elde edilen pozitif sonucun ikinci ve birinci testten farklı bir treponemal test ile doğrulanmasını önermektedir. İkinci basamakta kullanılan treponemal testin negatif çıkması durumunda, bir ay sonra tekrar

test yapılması gerektiği belirtilmektedir. Treponemal testler aktif enfeksiyonu tespit edemediği için ikinci testin de pozitif çıkması durumunda kantitatif RPR testi yapılmasını önermektedir (148–150).

Ülkemizde Halk Sağlığı Tanısal Mikrobiyoloji Rehberi, erken sifiliz tanısındaki akış şeması Şekil 6'da (6) gösterilmektedir (6).



Şekil 6. Ülkemizde Halk Sağlığı Tanısal Mikrobiyoloji Rehberi tanı akış şeması.

Akış şeması, erken evrede treponemal testlerin negatif sonuç vermesi durumunda, lezyon varlığında etkenin doğrudan mikroskopi yöntemleriyle tespit edilmesini önermektedir. Lezyon bulunmadığı durumlarda ise geleneksel akış şemasının uygulanmasını önermektedir. Ulusal Mikrobiyoloji Tanı Rehberi henüz taslak aşamasındadır. Ülkemizde kan bankacılığında kullanılan örnekler düzenli olarak treponemal testlerle taranmaktadır. Klinik örneklerde de treponemal testlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Treponemal testle pozitif saptanan vakalar, non-treponemal testlerle taranmakta ve treponemal testin tekrarı yapılmaktadır. Bu uygulama, ters akış şeması prensiplerinin takip edildiği bir yaklaşım olduğunu söyleyebiliriz (6).

2.12. Tedavi

Tarihsel olarak, civa, arsfenamin, ağır metaller ve sıtma paraziti gibi tedaviler kullanılmıştır. Ancak 1943'ten beri penisilin, tedavide ilk tercih edilen antibiyotik olmuştur. Penisilin alerjisi olan kişilerde doksosilin, tetrasiklin, eritromisin, azitromisin, seftriaksiyom gibi diğer antibiyotikler önerilmektedir. Tedavide cinsel partnerin de dahil edilmesi gerekmektedir ve hastalar laboratuvar bulgularıyla birlikte düzenli olarak takip edilmelidir. Tedavi başlandıktan sonra ilk 24 saatte Jarisch-Herxheimer reaksiyonu adı verilen bir reaksiyon ortaya çıkabilir. Bu reaksiyon, ölü bakterinin dolaşıma karışmasıyla ilişkilendirilse de kesin nedeni bilinmemektedir. Baş ağrısı, miyalji, ateş, bulantı ve kusma gibi belirtiler sıklıkla görülmektedir. Bu reaksiyon eritromisin ve tetrasiklin kullanıldığında penisiline göre daha az ortaya çıkmaktadır. Bu reaksiyonu kontrol etmek için antipiretik ilaçlar kullanılabilir, ancak her zaman etkili olmayabilir. Antibiyotik tedavisi ve tercihi, hastalığın evresine ve hastanın durumuna göre değişmektedir. DSÖ tarafından önerilen tedavi şeması Tablo 2'de özetlenmiştir (1,13,150).

Tablo 2. Evrelere göre tedavi protokolleri.

Evre	Tedavi Protokolü		
	Yetişkin	**Bebek ve Çocuk**	**Penisilin alerjisi olanlarda**
Primer	Benzatin penisilin G (IM), tek doz	Benzatin penisilin G (IM), tek doz	Doksisiklin, Tetrasiklin (PO),14 gün Azitromisin (PO), tek doz Seftriakson (IM/IV), tek doz, ya da 10-14 gün
Sekonder	Primer evre sifiliz ile aynı	Primer evre sifiliz ile aynı	Primer evre sifiliz ile aynı
Erken latent	Primer evre sifiliz ile aynı	Primer evre sifiliz ile aynı	Primer evre sifiliz ile aynı
Geç latent	Benzatin Penisilin G, (IM), 3 hafta ve haftada bir kez	Benzatin penisilin G (IM), 3 hafta ve haftada bir kez	Doksisiklin, Tetrasiklin (PO), 28 gün
Grç	Geç latent evre sifiliz ile aynı	-	Geç latent evre sifiliz ile aynı
Nörosifiliz	Kristalize penilisin G (IV), 10-14 gün,	-	Seftriakson (IM/IV), 10-14 gün
Konjenital sifiliz	**Bir aydan küçük**	**Bir aydan büyük**	
Konjenital sifiliz	Kristalize penisilin G (IV), Prokain penisilin G (IM), 10 gün	Kristalize penisilin (IV), 10 gün	
Gebeler	Benzatin penisilin G (IM), 2 hafta ve haftada bir kez		
HIV Hastaları	HIV negatif hastalar hangi evrede nasıl tedavi ediliyorsa, aynı şekilde tedavi edilmelidir		

* IM: İntramüsküler, IV: İntravenöz, PO: Peroral.

2.13. Antimikrobiyal ve Tiplendirme Direnç

Treponema pallidum'da makrolid direnci ilk kez 1977 yılında gözlenmiştir. Azitromisin ve eritromisin gibi makrolidlere karşı direnç, 23S rRNA geninde bulunan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (151,152). *Treponema pallidum*'da direnç nadir görülen bir durumdur, ancak makrolidlerle tedavi seçeneği düşünülürken dikkate alınması gereken bir durumdur. Diğer kullanılan antibiyotiklere karşı direnç belirlenmemiştir. Antibiyotik direnci moleküler yöntemlerle belirlenebilirken, klasik minimal inhibisyon konsantrasyonu (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) değerlendirme yaklaşımı da geliştirilmektedir. Bu yaklaşımda, antibiyotik varlığında kültürde yedi gün inkübe edilen bakteri daha sonra deney hayvanına enjekte edilerek hastalık yapma potansiyeli değerlendirilir ve buna bağlı olarak MIC belirlenir. Ancak bu yöntem pratik olmayabilir (153–155). Moleküler tiplendirme yöntemleri, *Treponema pallidum* suşlarının ve antibiyotik direncinin yayılımını incelemek için kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında *arp* genindeki 60bp tekrarların sayısının belirlenmesi ve *trp* alt aile II genlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ile incelenmesi bulunur. Treponema pallidum alt tipleri, *arp* genine göre 2-21 arasında sayılar ve RFLP paternine göre a-g harfleri ile isimlendirilir (156).

2.14. Hastalık Kontrol ve Önlemler

Sifiliz vakalarının dünya genelinde azaltılması için sağlık örgütleri stratejiler geliştirmektedir. Bu stratejiler, vakaların tespit edilmesi, mevcut hastaların tedavi edilmesi ve konjenital sifilizin önlenmesine odaklanmaktadır. Toplumu bilinçlendirmek amacıyla, cinsel yolla bulaşan hastalıkların nasıl bulaştığı ve nasıl önlenmesi gerektiği konularında yazılı ve görsel materyaller hazırlanarak basın aracılığıyla yayılmaktadır. Kondom kullanımı, özellikle HIV ve sifiliz gibi hastalıklarda etkili olduğu için teşvik edilmektedir, ancak tüm cinsel yolla bulaşan hastalıklarda koruyucu olmayabilir. Okullarda cinsel eğitim, bireylerin bilinçlenmesi açısından önemlidir. Sürveyans, sifiliz vakalarının belirlenmesinde en etkili yöntemdir. Şüpheli durumlarda test istenmesi, kan naklinde kullanılacak ürünlerin taranması veya alan taraması yapılması gerekebilir. Düşük yaygınlığa sahip toplumlarda toplu taramalar maliyetli olduğu için önerilmemektedir. Ancak hızlı tanı

kitlerinin yaygınlaşmasıyla yüksek yaygınlığa sahip bölgelerde taramalar yapmak bir seçenek olabilir. Bir kişinin enfekte olduğunun tespitiyle temaslı kişilerin de taranması gerekmektedir. Uyuşturucu kullanımının yaygın olduğu toplum kesimlerinde tarama düşünülmelidir. Hamilelerin tamamı, konjenital sifiliz olasılığı nedeniyle taranmalıdır. Cinsel yolla bulaşan hastalığı olan veya risk altında olan kişiler, sifiliz dahil olmak üzere diğer tüm cinsel yolla bulaşan hastalıklar açısından taranmalıdır. Erken dönem sifilizi tespit etmedeki testlerin başarısızlığı nedeniyle, bir kişiyle cinsel ilişkiye girildikten sonra geçen süre 90 günden az ise profilaktik tedavi önerilebilir (1,144,150,151).

2.15. Aşı Geliştirilmesi

Treponema pallidum'a karşı etkili bir aşı henüz geliştirilememiştir. Ancak, bazı çalışmalarda öldürülmüş veya atenüe suşlarla aşılama denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerde sadece radyasyonla öldürülmüş bakterilerle immünize edilen tavşanlarda bir dereceye kadar bağışıklık oluştuğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bu yöntem insanlarda pratik bir aşı olmadığından karmaşık, uzun ve maliyetlidir (125,157).

Treponema pallidum'un çeşitli antijenleri, örneğin endoflajella, Gpd, TmpB, Tp92, TpN15, TpN47, TprF, TprI, TprK gibi antijenlerle tavşanları aşılama çalışmaları yapılmıştır. Bu antijenler immün yanıta neden olmuş olsa da, enfeksiyonun tamamen engellenmesine yönelik koruyucu bir bağışıklık sağlanamamıştır. Treponema pallidum'un antijen azlığı, passif immünizasyonun sınırlı koruyuculuğu ve daha önce sifiliz geçiren kişilerin tekrar enfekte olabilmesi gibi faktörler, hücresel bağışıklığın *Treponema pallidum* enfeksiyonunda önemli olduğunu göstermektedir (88,99,158–163).

Ayrıca, immünojen *tpr* gen ailesinin yüksek varyasyon göstermesi, aşı geliştirme çalışmalarında başka bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu varyasyonlar, aşıların geniş bir *Treponema pallidum* suşlarının tümünü kapsamasını zorlaştırmaktadır (164).

Sonuç olarak, *Treponema pallidum*'a karşı etkili bir aşı geliştirilmesi henüz mümkün olmamıştır. Ancak, araştırmalar devam etmekte ve yeni stratejilerin geliştirilmesi için çalışmalar sürmektedir (164).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma, deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Ekim 2017 tarihinde kaynak araştırmasıyla başladı ve laboratuvarda gerçekleştirilen deneysel kısmı Eylül 2018'de tamamlandı. Görsel test Aralık 2019'da yapıldı ve elde edilen diğer bulguların değerlendirmesi Haziran 2020'de tamamlandı. Araştırma, T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi'nin Merkez Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmaya, sifiliz tanısında doğrulama amacıyla kullanılması önerilen "*Treponema pallidum* hemaglütinasyon" (TPHA), "*Treponema* pallidum partikül aglütinasyon" (TPPA) ve "chemiluminescence microparticle immunoassay test" (CMIA) testlerinin analitik duyarlılığının belirlenmesi için dört ticari kit, iki gönüllü hasta, bir sağlıklı gönüllü ve deneysel sonuçlardan oluşturulan görsel test ile birlikte 15 gönüllü tıbbi mikrobiyoloji uzmanı dahil edildi.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmada, daha önce sifiliz tanısı almış ve T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi'nin merkez laboratuvarında kullanılan ARCHITECT Syphilis TP testinde kuvvetli pozitiflik gösteren iki hastanın ve sifiliz negatif olduğu belirlenen bir gönüllünün serum örnekleri kullanıldı. Hastalara ait klinik bilgilere, hastaların e-Nabız'da sağlık kayıtlarına erişimi kısıtladıkları için ulaşılamadı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada, bağımsız değişkenler sifiliz hastalarının serumları ve görsel testte kullanılan TPHA ve TPPA sonuçlarına ait resimlerdir. Bağımlı değişkenler ise hasta

serumlarından hazırlanan örneklerin ölçümü yapılan CMIA, TPHA ve TPPA testlerine ait sonuçlardır.

3.6. Veri Toplama Araçları

Test performansının araştırılmasında, 3.6.1 başlığında belirtildiği gibi, dilüe edilmiş ve alikotlanmış örnek serum setleri kullanıldı. Çalışma tasarımı dört ana başlık altında gerçekleştirildi:

1. Serum setleri, CMIA, TPHA ve TPPA kitleri kullanılarak üretici firmalarının çalışma yönergelerine uygun olarak çalışıldı. Hasta 1 (H1) ve Hasta 2 (H2)'ye ait toplam 16 serum seti, her biri dört ayrı günde olmak üzere dört ticari testle bir kez çalışıldı.

2. Sonuçların fotoğraflanarak kayıt altına alındı.

3. Test sonuçları, üretici firmanın önerileri doğrultusunda yorumlandı. CMIA sonuçlarının yorumlanmasında cihazın okuduğu "Signal to Cutoff" (S/CO) değerleri kullanılırken, TPHA ve TPPA testlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi ve yorumlanmasında üç ayrı yöntem kullanıldı:

    a. İlk yöntemde, testi yürüten araştırmacı ve çalışılan serum setlerinin özelliklerinden habersiz olan 2 uzman, test sonuçlarını değerlendirdi.

    b. İkinci yöntemde, bir yazılım kullanılarak değerlendirme sayısal verilere dönüştürüldü ve yorumlandı.

    c. Üçüncü yöntemde, test sonuçları fotoğraflarla kaydedilmiş olan 15 farklı tıbbi mikrobiyoloji uzmanına gönderilerek değerlendirilmesi istendi.

4. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankası verileriyle karşılaştırılarak rutin laboratuvar uygulamalarına nasıl yansıyacağı belirlendi.

3.6.1. Araştırma Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmada, ölçümün dinamik aralığını temsil edecek ve çalışmaya dahil olma kriterlerini karşılayacak yeterli sayıda hastanın toplanmasının zor olduğu ve her hasta serumunun testlere vereceği tepkinin bireysel farklılıklardan dolayı değişkenlik gösterebileceği düşünüldü. Bu nedenle, deneyler az sayıda hastanın serumlarının seri dilüsyonlarıyla gerçekleştirildi.

Ön deneme ve optimizasyon aşamalarında düşük titredeki seri dilüsyonlarla CMIA S/CO oranlarının ikili geometrik katlar halinde azalmadığı tespit edildi. Bu nedenle, her hasta için farklı başlangıç oranlarıyla dilüsyonlar yapılarak istenilen çalışma aralığına ulaşıldı.

Sifiliz hastalarından alınan serum örneklerine, sağlıklı bir gönüllüden alınan sifiliz negatif serum ile farklı dilüsyon oranları uygulandı. Dilüsyon işlemi, CMIA üretici firmanın negatif olarak yorumladığı S/CO<1 sonucu alınana kadar iki kat arttırılarak devam etti. Her hasta için S/CO negatif sonuç elde edilebilen dilüsyon oranları aşağıda belirtilmiştir:

H1: 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096

H2: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128

H1 ve H2'ye ait dilüe edilmiş toplam 16 serum seti, her dört ticari testle dört ayrı günde tekrarlanacak şekilde alikotlandı ve -20°C'de çalışma günlerine kadar saklandı.

3.6.2. Araştırma Testleri

3.6.2.1. ARCHITECT Syphilis TP

Araştırmada, örneklerin kantitatif sonucunu belirlemek için ARCHITECT Syphilis TP (Abbott, Wiesbaden, Almanya) otomatize CMIA testi kullanıldı. Bu test, bir kemilüminesan mikropartikül enzim immünolojik testidir (CMIA; Chemiluminescence microparticle immunoassay test) ve sandviç immünotest temelli çalışır.

Test, TpN15, TpN17 ve TpN47 antijenleri ile kaplı paramanyetik mikropartiküllere karşı IgM ve IgG varlığını araştırır. Konjugat, akridinyum işaretli anti-insan IgM ve IgG'dir. Hasta örneği ve partiküllerin bir araya getirildiği reaksiyon aşamasından sonra yıkama aşaması gerçekleşir. Mikropartiküllere bağlanmayan immünglobulinler bu aşamada test tüpünden uzaklaştırılır. Yıkama aşamasından sonra "Pre-Trigger" ve "Trigger" çözeltisi eklenir. "Pre-Trigger" (Hidrojen peroksit), asidik bir ortam oluşturur ve konjugatın erken ışıma salmasını engellerken, mikropartiküllerin topaklanmasının da önüne geçer. "Trigger" (Sodyum hidroksit) çözeltisinin eklenmesiyle akridinyum oksidasyona uğrar ve oluşan N-Metilakridon ışımaya başlar. Bu ışıma enerjisi, "Reaksiyona bağlı ışık birimi" (RLU) olarak ölçülür. RLU değeri test kalibratörleri ile karşılaştırılır ve eşit ya da büyükse sonuç değeri S/CO olarak raporlanır. Test, üretici firmanın test prosedürüne uygun olarak uygulanmıştır.

3.6.2.1.1. ARCHITECT Syphilis TP Çalışma Prosedürü

1. Her bir hastanın ve ilgili dilüsyonların içerisinde 300µl örnek bulunduran alikotlar, -20°C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözüldü.

2. TPHA ve TPPA testleri için her bir hastanın ve ilgili dilüsyonların içerisinden 45µl örnek alındı ve ayrıldı.

3. Geriye kalan 205µl örnek analizöre aktarıldı (Minimum çalışma hacmi: 150µl).

4. Analizörün çalışması tamamlandıktan sonra sonuçlarının çıktıları alındı ve kaydedildi.

5. Üretici firmanın test sonucu değerlendirme kriterlerine göre, S/CO değeri <1.0 ise sonuç negatif, ≥1.0 ise sonuç pozitiftir.

3.6.2.2. Spinreact TPHA ve Omega IMMUTREP® TPHA

Spinreact marka TPHA (SPİNREACT, S.A./S.A.U, Santa Coloma, İspanya) ve Omega IMMUTREP® TPHA (Omega Diagnostics, İngiltere) testleri, "Mikrohemaglutinasyon Assay for *Treponema pallidum*" (MHA-TP)

modifikasyonları olan orijinal *Treponema pallidum* hemaglütinasyon testidir. Bu testler U tabanlı mikrodilüsyon plakalarında çalışır ve duyarlılaştırılmış kuş eritrositlerine bağlanmış Nichols suşunu antijen olarak kullanır. Hasta örneğindeki IgM ve IgG antikorları bu antijenlere bağlanır ve çok sayıda bağlanma sonucunda ağ şeklinde immün kompleksler oluşur. Bu nedenle, eritrositlerin yerçekimiyle çökmesi engellenir ve reaksiyonun şiddetine bağlı olarak tüm kuyuyu kaplar veya halka şeklinde gözlemlenir. Negatif bir sonuçta, inkübasyon süresi sonunda eritrositler dibe çöker ve bir nokta şeklinde görülür. Test, her zaman pozitif ve negatif kontrollerle birlikte çalıştırılmalıdır. Pozitif kontrol sifiliz hastalarından alınan insan serumunu, negatif kontrol ise sifiliz negatif hayvan serumunu içerir. Testte, antijen kaplı eritrositlerin yanı sıra antijen kaplanmamış kontrol eritrositleri de kullanılır. Pozitif ve negatif kontrol serumları, antijenli ve antijensiz eritrositlerle gerçekleşen reaksiyonlarla testin pozitif ve negatif kontrol kuyularını oluştururken, araştırılan hasta örneği antijenli ve antijensiz eritrositlerle yan yana kuyularda çalışılır. Pozitif bir hasta örneğinin antijenli eritrositlerle reaksiyon vermesi beklenirken, pozitif veya negatif bir hasta örneğinin her zaman antijensiz eritrositlerle reaksiyona girmemesi beklenir. Testler, kalitatif olarak 1/80 dilüsyonda çalışır, ancak yarı kantitatif olarak daha büyük seri dilüsyonlarda da çalışmak mümkündür. Testler, üretici firmaların test prosedürüne uygun olarak uygulanmıştır. Araştırmada kullanılan her iki ticari TPHA testinin çalışma yöntemleri aynıdır.

3.6.2.2.1. TPHA Çalışma Prosedürü

1. U tabanlı mikrodilüsyon plağının dilüsyon kuyularına 190µl dilüent eklenmiştir.
2. Her bir hasta ve ilgili dilüsyondan 10µl dilüent ile karıştırılmıştır.
3. Dilüe edilmiş 25µl örnek, antijenli ve antijensiz eritrosit içeren çalışma kuyularına eklenmiştir.
4. Birinci ve ikinci basamak pozitif ve negatif kontroller için tekrarlanmıştır.
5. Hasta örneğin değerlendirildiği kuyulara 75µl antijenli eritrosit eklenmiştir.

6. Hasta örneği kontrol kuyularına antijensiz eritrosit eklenmiştir.

7. Beşinci ve altıncı basamak pozitif ve negatif kontroller için tekrarlanmıştır.

8. 45 ve 60 dakika inkübasyon süresinden sonra tüm mikrodilüsyon plağı ve her bir kuyu ayrı ayrı odaklanarak fotoğraflanmış ve kaydedilmiştir.

9. Omega marka TPHA için üretici firmanın test değerlendirme kriteri, aglütine oluşmayan eritrositlerin kuyu diplerinde toplandığı sonucun negatif, hafif aglütinasyonla karakterize edilen bir halka şeklinin belirsiz, güçlü aglütinasyon sonucunun pozitif olduğunu açıklamaktadır. Spinreact marka TPHA için üretici firmanın test değerlendirme kriteri ise eritrositlerin kuyu dibinde düğme şeklinde toplandığı sonucun negatif, sınırda delik bulunan düğme şeklinin +1 pozitif, kırmızı halkayla sınırlanan hafif aglütinasyonun +1'e göre daha büyük olduğu sonucun +2 pozitif, geniş aglütinasyonun +3 pozitif ve tüm kuyuyu kaplayan aglütinasyonun +4 pozitif olarak değerlendirilmesi gerektiğini açıklamaktadır. Her iki test için de kontroller eşliğinde çalışılması, valide edilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi üretici firmalar tarafından vurgulanmıştır.

3.6.2.3. SERODIA®-TP-PA

SERODIA®-TP-PA (Fujirebio Inc., Tokyo, Japonya) *Treponema pallidum* partikül aglütinasyon testi (TPPA), MHP-TP ile aynı çalışma prensibine ve testin uygulanma şekline sahiptir. Tek fark, eritrositler yerine boyanmış jel partiküllerinin kullanılmasıdır. Jel partiküllerindeki antijen TPHA'daki Nichols suşuna benzer şekilde kullanılır. Inkübasyon süresi TPHA'nın iki katıdır. Sonuçların değerlendirilmesi TPHA ile aynıdır. Test kalitatif olarak 1/80 dilüsyonda çalışır, ancak yarı kantitatif olarak daha büyük seri dilüsyonlarda da çalışmak mümkündür. Kontrollerin çalışma dilüsyonu, TPHA'dan farklı olarak 1/40 ile başlayan ve 1/320'de sonlanan seri dilüsyon şeklindedir. Test, üretici firmanın test prosedürüne uygun olarak uygulanmıştır.

3.6.2.3.1. SERODIA®-TP-PA Çalışma Prosedürü

1. U tabanlı mikrodilüsyon plağının dilüsyon kuyularına 100µl dilüent eklenmiştir.

2. İkinci, üçüncü ve dördüncü dilüsyon kuyularına 25µl dilüent eklenmiştir. (Üçüncü dilüsyon kuyusu antijensiz partiküller için kontrol kuyusu iken, dördüncü dilüsyon kuyusu hasta örneği için antijenli partiküllü çalışma kuyusudur).

3. Her bir hasta ve ilgili dilüsyonundan 25µl birinci dilüsyon kuyusundaki dilüentle karıştırılmıştır.

4. Birinci dilüsyon kuyusundan alınan 25µl örnek ikinci dilüsyon kuyusuna eklenmiştir.

5. İkinci dilüsyon kuyusundan alınan 25µl örnek üçüncü dilüsyon kuyusuna eklenmiştir.

6. Üçüncü dilüsyon kuyusundan alınan 25µl örnek dördüncü dilüsyon kuyusuna eklenmiştir.

7. Pozitif kontrol için beş kuyuya dilüent hazırlanmış ve pozitif kontrol serumu bu kuyularda seri dilüe edilmiştir. Negatif kontrol olarak dilüent kullanılmıştır.

8. Üçüncü kuyulara 25µl antijensiz jel partiküller eklenmiştir.

9. Dördüncü kuyulara 25µl antijenli jel partiküller eklenmiştir.

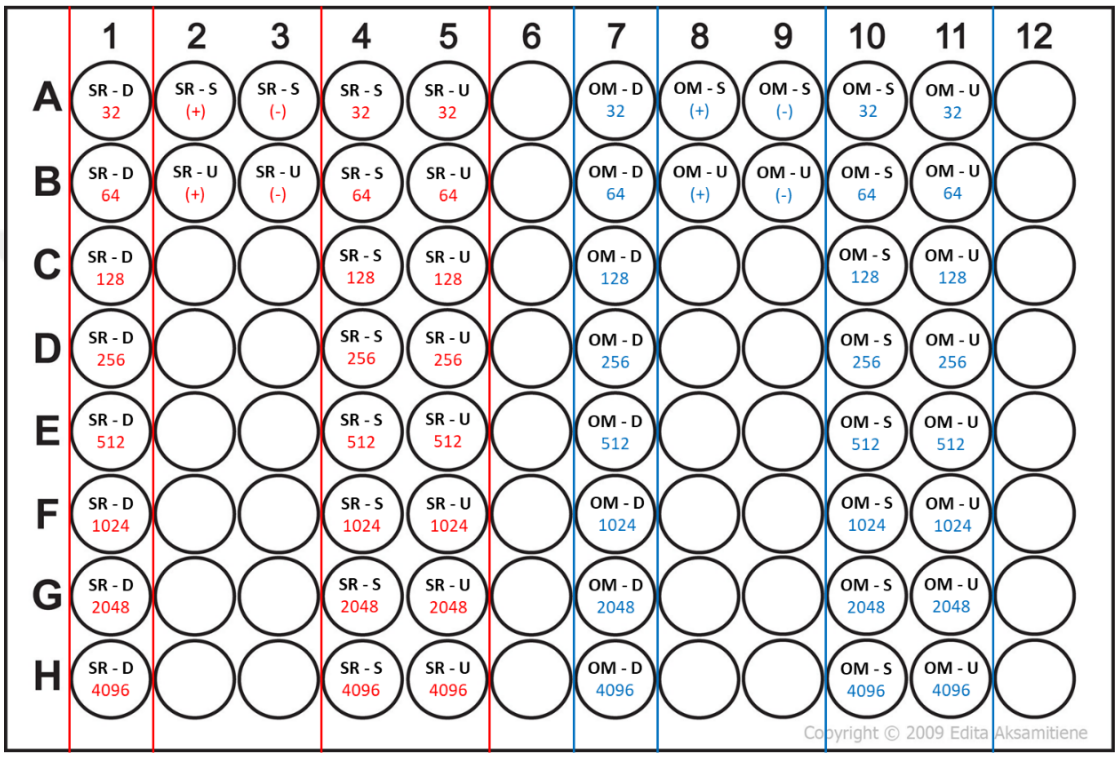
10. Pozitif ve negatif kontrol kuyularına antijenli partiküllerden 25µl eklenmiştir.

11. 120 dakika inkübasyondan sonra tüm mikrodilüsyon plağı ve her bir kuyu ayrı ayrı odaklanarak fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

12. Üretici firmanın test değerlendirme kriterine göre, partiküllerin kuyu dibinde düğme şeklinde toplandığı sonucu negatif, halka şeklindeki sonucun sınırda ve daha büyük kenarlı halka şeklinde aglütine olmuş partikül sonucuna +1 pozitif, tüm kuyunun aglütine olduğu sonucuna +2 pozitif olarak değerlendirilmelidir. Testin kontroller eşliğinde çalışılması, valide edilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi üretici firma tarafından vurgulanmıştır.

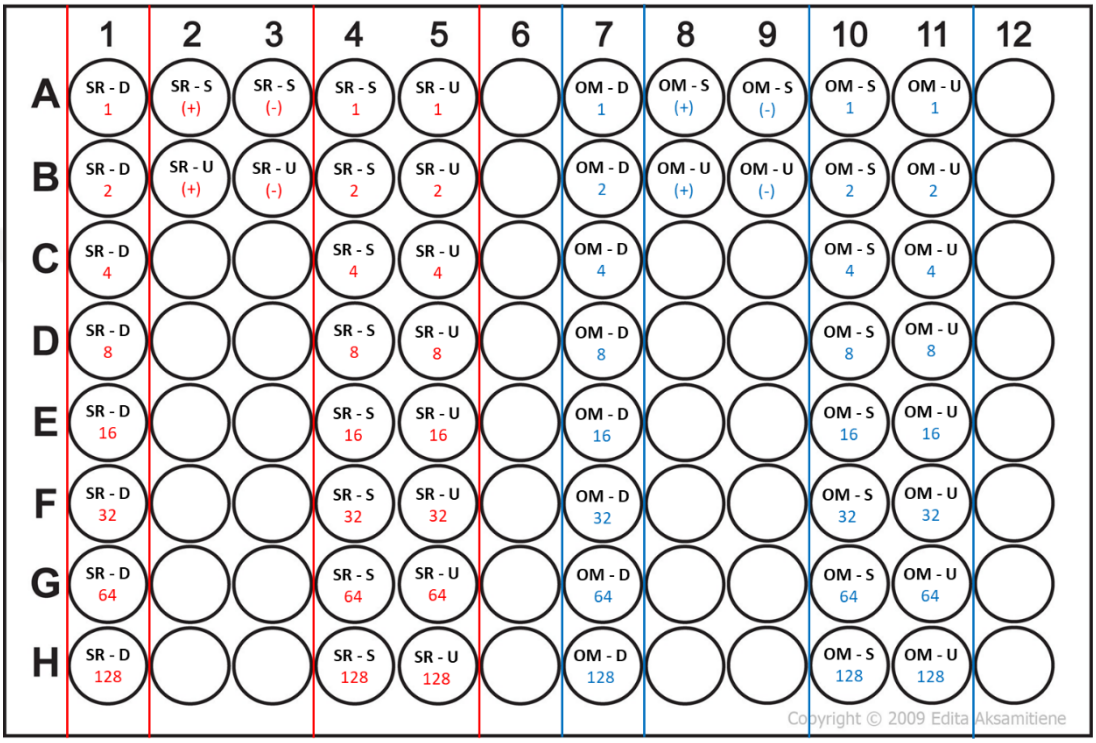
3.6.2.4. Ana Çalışma Haritaları

Ana çalışmaya başlamadan önce, hangi hastaya ait örneğin ve dilüsyonun hangi U tabanlı mikrodilüsyon plakasına yerleştirileceği için haritalar oluşturulmuştur. Bu işlem hem hata olasılığını azaltmak için hem de çalışmadan elde edilen sonuç görsellerinin konumlandırılabilmesi için yapılmıştır. Şekil 7'de H1 TPHA'ya ait harita, Şekil 8'de H2 TPHA'ya ait harita ve Şekil 9'da H1 ve H2'ye TPPA'ya ait harita bulunmaktadır.



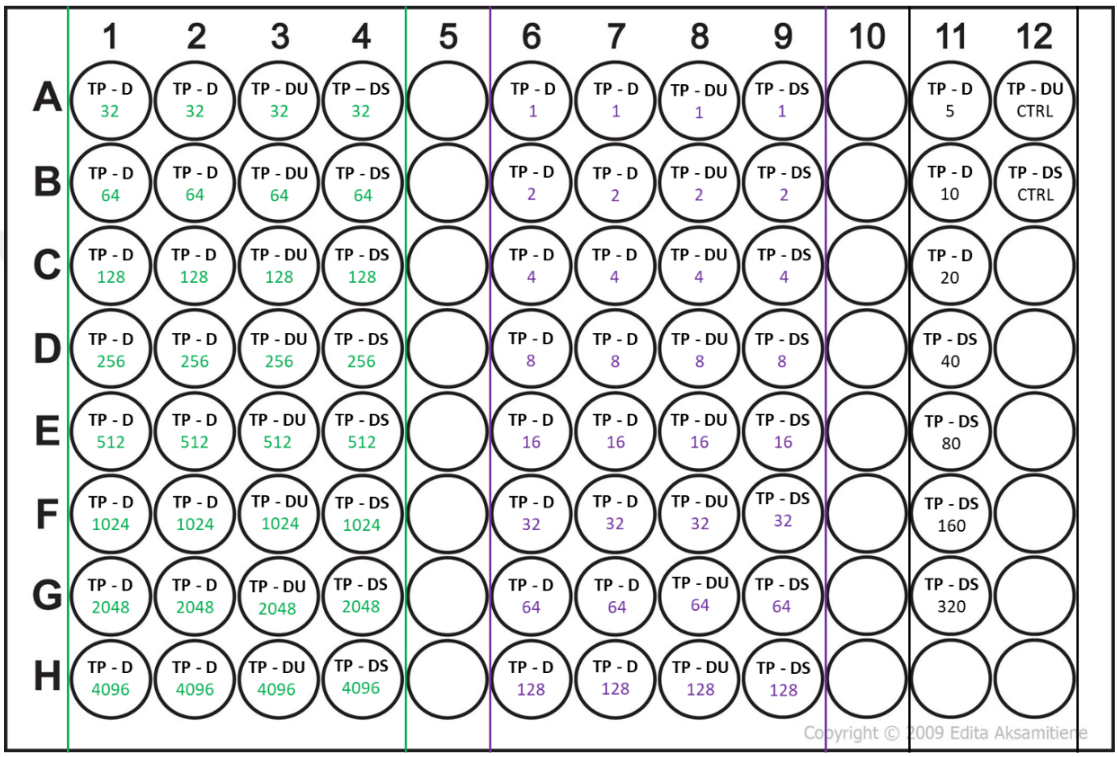
Şekil 7. H1'e ait TPHA çalışma haritası.

* SR-D: Spinreact hasta dilüsyonu. SR-S: Spinreact sensitize eritrositler. SR-U: Spinreact sensitize olmayan eristrositler. OM-D: Omega hasta dilüsyonu. OM-S: Omega sensitize eritrositler. OM-U: Omega sensitize olmayan eristrositler.



Şekil 8. H2'e ait TPHA çalışma haritası.

* SR-D: Spinreact hasta dilüsyonu. SR-S: Spinreact sensitize eritrositler. SR-U: Spinreact sensitize olmayan eristrositler. OM-D: Omega hasta dilüsyonu. OM-S: Omega sensitize eritrositler. OM-U: Omega sensitize olmayan eristrositler.



Şekil 9. H1'e ve H2'ye ait TPPA çalışma haritası.

* Yeşil renkle belirtilmiş kuyular H1'e, mor renkte belirtilmiş kuyular H2'ye aittir. Siyah renkle belirtilmiş kuyular kontrol kuyularıdır. TP-D, Hasta dilüsyonu. TP-S, Sensitize partiküller. TP-U, Sensitize olmayan partiküller. TP-DS, Sensitize partiküllerin kontrol kuyuları. TP-DU, Sensitize olmayan partiküllerin kontrol kuyuları.

3.6.2.5. Görsellerin Hazırlanması ve Kantitasyonu

Araştırmada, TPHA ve TPPA sonuç görüntülerinin çalışmaya uygun hale getirilmesi için işlenmeleri gerekmekteydi. Bu amaçla, açık kaynaklı PhotoDemon 7.0.1 sürümü adlı bir resim işleme yazılımı kullanıldı.

Yapılan işlemler, resimlerin gerekli kısımlarının kesilerek ve piksel ölçülerine göre aynı boyuta getirilmesini içermekteydi. Bu işlemler sırasında, resimlerin deformasyona uğramadan işlenmesini sağlamak için uygun resim işleme algoritmaları kullanıldı.

Resimlerin eş boyuta getirilmesi, normalizasyon amacıyla yapıldı çünkü çekim sırasında odak uzaklığı farklılık gösterebilmekte ve her resmin boyutu aynı olmamaktadır. Normalize edilmemiş resimlerin karşılaştırılması hatalı sonuçlara yol açabilir ve sonraki aşamalarda gönüllü değerlendiriciler arasında görsel karışıklığa neden olabilir. Normalize edilen resimler 250x250 piksel (px) boyutundadır.

Elde edilen görsellerdeki sonuçlar ImageJ 1.52r sürümü kullanılarak halka çapları ölçülmüştür. Bu ölçümler, objektif test kriterleri oluşturmak ve bu kriterlerle testleri değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu sayede, görsel değerlendirmeye dayalı olan öznel yorumların yerine daha objektif bir değerlendirme yapılması amaçlanmıştır. Bu şekilde, test sonuçlarının daha güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

3.6.2.6. Görsel Testin Hazırlanması ve Uygulaması

TPHA ve TPPA görsel olarak değerlendirilmektedir. Halka çaplarının ölçülmesi pratikte uygulanan bir ölçüm yaklaşımı değildir. Görsel değerlendirme tecrübe ve öznel yorum ile yapılmaktadır ve bu durum test sonucun yorumlanması etkiliyebilmektedir. Bu etkinin ne kadar olduğunu ölçmek için bir görsel test hazırlandı. Üç teste ait 48 sonuç, her bir test kendi içinde gruplanarak ve yüksek ile düşük ard arda gelecek şekilde düzenlenmiş halde (Seri halde gösterimin yanlılık oluşturabileceği düşüncesiyle.) değerlendiricilere gösterildi ve sonuçların pozitif (+), belirsiz (±) ya da negatif (-) olarak değerlendirilmesi istendi.

Çalışmanın bu kısmına 15 kişi katıldı. Katılımcılar, TPHA yöntemi ile halen hasta sonucu vermekte olduğunu belirten ya da önceki yıllarda bu yöntemle hasta sonucu verdiğini ifade eden tıbbı mikrobiyoloji uzmanı kişiler arasından seçildi. Görsel test ve değerlendirme formu ilgili kişilere e-Posta ile gönderildi.

Görsel Testte, görüntü yazılımı ile işlemlenen görseller kullanıldı. İki ayrı TPHA ve TPPA'ya ait tüm sonuçlar değerlendiricilere, her bir serum sonucu ve bu sonucun kontrol kuyusu birlikte gösterildi.

Görsel Test, Microsoft Powerpoint 365'te hazırlanmış olup, amacını anlatan bir giriş, hakkında ve neye dikkat edilmesi gerektiğine dair açıklamalar, değerlendirmelerin nasıl yapılacağı konusunda yönergeler içermekteydi. Değerlendiricilere, rastgele gösterilen sonuçların yanında bulunan sıra numarasına karşılığında verilen değerlendirme formuna değerlendirdikleri sonucun kutucuğu işaretlenmesi beklendi. Çalışmada kullanılan görsel test EK-1'dedir.

3.7. Kullanılan İstatistiki Yöntemler

Çalışmaya dahil edilen hasta sayısı iki kişidir. Bu hastalardan hazırlanan serum setin örnek sayısı 16'dır ve her bir 8 serum seti iki hastaya aittir. Çalışmada, her bir serum örneği gerçek bir hasta serumu olarak kabul edilmiştir; ancak bu serumların iki hastaya ait olduğu gerçeğini değiştirmemektedir ve bu örneklem evrenin çözümlenmesi için bir non-parametrik istatistik yöntemi bilinmemektedir. Elde edilen sonuçlar yüzdelik olarak karşılaştırılmıştır. Uzmanların değerlendirmesi üç sonuç üzerinden yapılmıştır: pozitif, belirsiz, negatif. Ancak amacı, bu üç sonucu ve her bir uzmanın performansını karşılaştırmak değildir, bu nedenle uzmanların verdiği cevaplar da yüzdelik olarak hesaplanmıştır.

3.8. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın, ilgili kurulların ve komisyonların kabulünün başlangıcından, yapılan deneylerin ve elde edilen bulguların değerlendirilmesi, tezin yazımı ve sonuçlandırmasına dair takvim Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Tez ve araştırma planına ait takvim.

Ekim 2017-Şubat 2018	Tez önerisinin hazırlanmaya başlanması ve literatür araştırılması yapılması
Mart 2018	Etik kurul onayı, Merkez laboratuvar onayı Tez önerisinin sunumu ve kabulü Tez önerisinin enstitü yönetim kurulu tarafından onaylanması
Ekim 2018–Haziran 2019	Hasta örneklerin toplanması
Nisan 2019-Haziran 2019	Gereçlerin temini
Ağustos 2019	Çalışma örneklerin hazırlanması
Ağustos 2019	TPHA ve CMIA ön çalışmanın yapılması
Eylül 2019	TPHA-TPPA ve CMIA ana çalışmanın yapılması
Ekim 2019	Görsellerin hazırlanıp çözümlenmesi
Kasım 2019	Görsel testin hazırlanması
Aralık 2019	Görsel testin yapılması
Ocak 2020-Haziran 2020	Bulguların değerlendirilmesi
Temmuz 2020-Temmuz 2023	Tez yazımı
05 Eylül 2023	Tez savunması

3.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Performansı karşılaştırılan testlerin sonuçları kıyaslamalı olarak değerlendirildi. Bu kıyaslamaların sonucunda elde edilen bulgular, T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankası verilerine oranlanarak yüzdelik olarak hesaplandı. Görsel Testte elde edilen sonuçlar da yüzdelik olarak hesaplandı.

3.10. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmada yalnızca iki hastanın dilüe edilmiş serum setleri kullanılmıştır. Hasta örnek sayısının az olması çalışmanın en önemli kısıtlılığıdır. Ülkemizde sifiliz hastalığının prevalansı düşüktür. Bu nedenle, çalışmaya hazırlık döneminde yüksek S/CO pozitifliği olan yalnızca iki hastaya rastlanmıştır. Örneklemin küçük olması nedeniyle kapsamlı bir istatistik çözümleme yapılamamıştır.

3.11. Etik Kurul Onayı

3833-GOA protokol numaraları bu araştırmaya ait etik kurul onayı, T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 01.03.2018 tarihinde 2018/06-15 sayılı karar ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılacak Örneklerin CMIA Sonuçları

İki sifiliz pozitif ve bir sifiliz negatif hastadan alınan tam kan örnekleri santrifüjlenip serumları ayrıldı. Sifiliz pozitif hastalara ait serum örnekleri, sifiliz negatif gönüllünün serumu ile dilüe edilerek seri dilüsyon setleri hazırlandı.

CMIA deneyleri, TPHA ve TPPA gibi ayrı ayrı günlerde dört kez tekrarlandı. H1 için CMIA sonuçları Tablo 4'te, H2 için CMIA sonuçları ise Tablo 5'te tablo ve şekilde gösterilmektedir. Bu sonuçlara ait çalışmanın dinamik aralığı da Şekil 10, 11 ve 12'de görülebilir.

Tablo 4. H1 hastasına ait CMIA çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının karşılaştırması.

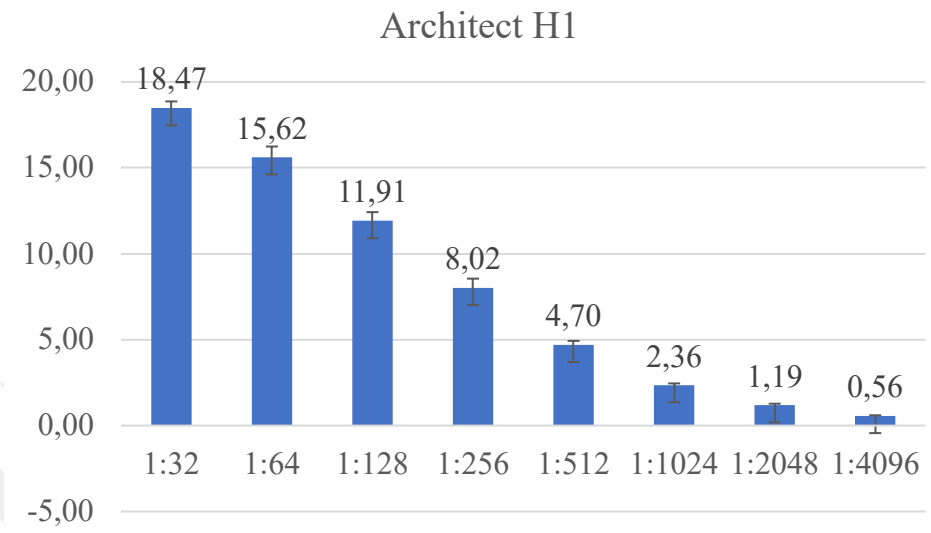
H1	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma	4. Çalışma	Ortalama	Standart Sapma
1:32	18,38	17,95	18,83	18,72	18,47	0,40
1:64	15,84	15,37	16,36	14,91	15,62	0,62
1:128	11,46	12,04	11,55	12,58	11,91	0,52
1:256	8,1	7,3	8,07	8,6	8,02	0,54
1:512	4,78	4,7	4,93	4,38	4,70	0,23
1:1024	2,46	2,23	2,4	2,34	2,36	0,10
1:2048	1,29	1,23	1,11	1,13	1,19	0,08
1:4096	0,55	0,61	0,57	0,52	0,56	0,04

* Değerlerin birimi S/CO'dur.

Tablo 5. H2 hastasına ait CMIA çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının (S/CO) karşılaştırması.

H2	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma	4. Çalışma	Ortalama	Standart Sapma
1:1	17,92	17,36	18,76	18,51	18,14	0,63
1:2	13,94	15,03	14,71	15,82	14,88	0,78
1:4	10,97	8,68	10,62	9,26	9,88	1,09
1:8	6,75	6,53	7,14	7,06	6,87	0,28
1:16	3,22	3,60	3,21	3,73	3,44	0,27
1:32	1,88	1,65	1,65	1,90	1,77	0,14
1:64	0,84	0,87	0,86	0,89	0,87	0,02
1:128	0,47	0,41	0,41	0,48	0,44	0,04

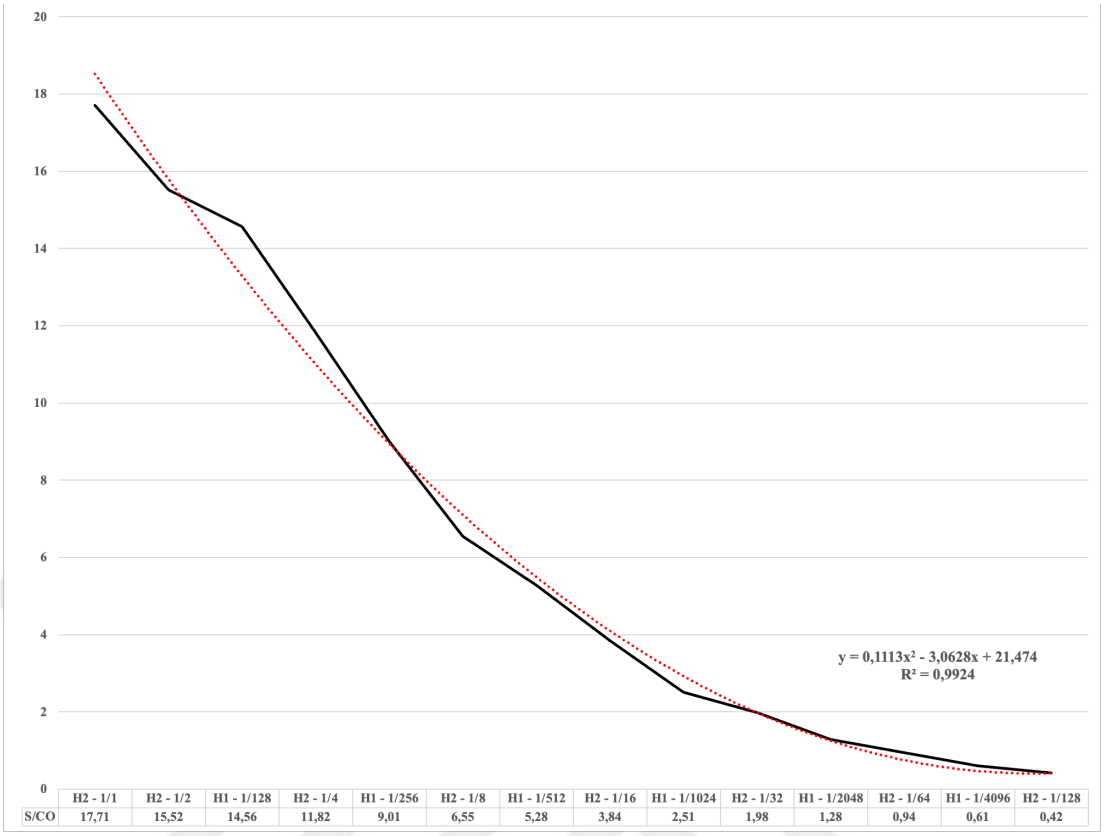
* Değerlerin birimi S/CO'dur.



Şekil 10. H1 hastasına ait CMIA çalışmasının dinamik aralığı (S/CO).



Şekil 11. H2 hastasına ait CMIA çalışmasının dinamik aralığı (S/CO).

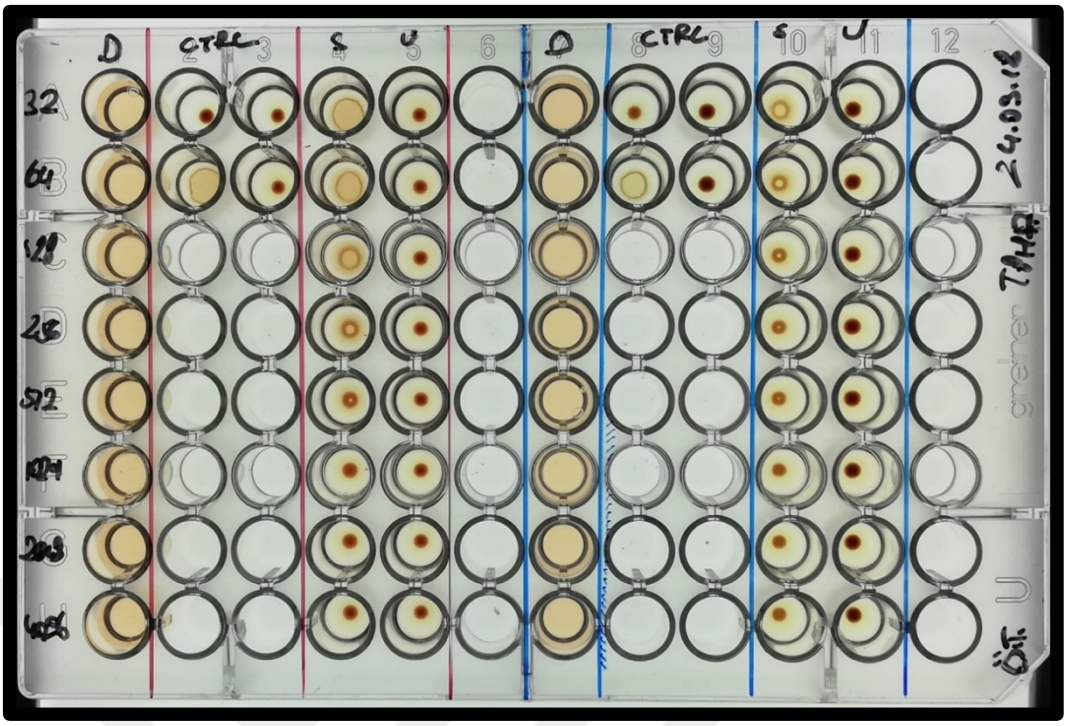


Şekil 12. Test edilecek örneklere ait dinamik aralık.

* Kırmızı renkteki eğik eğilim çizigisini göstermektedir.

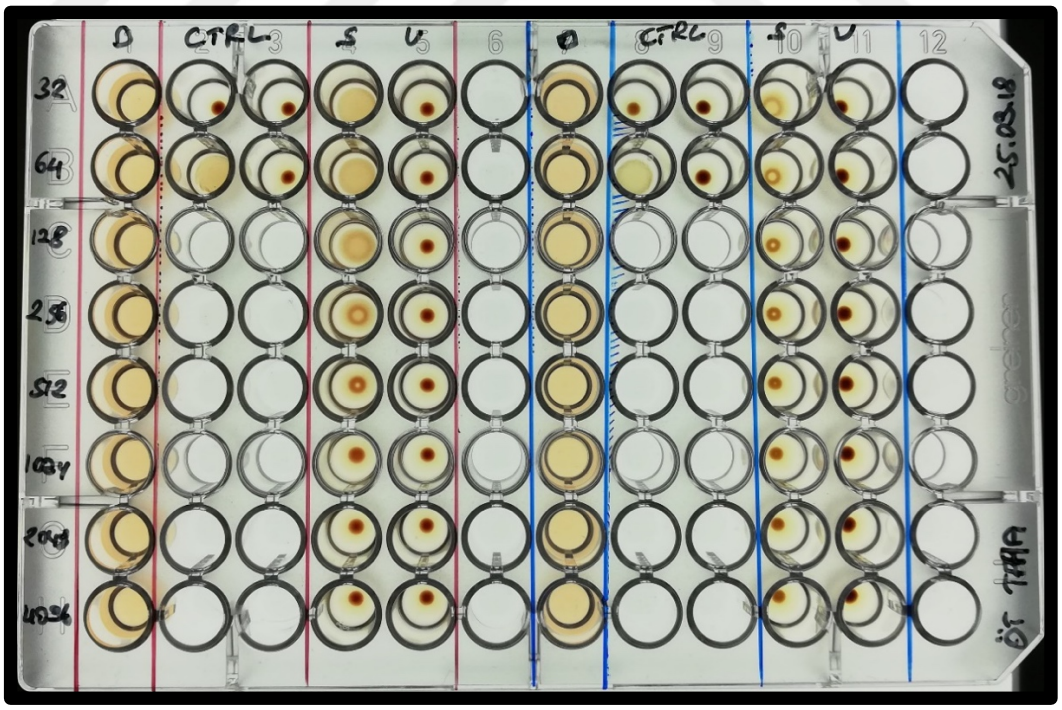
4.1.1. H1'e TPHA Çalışmalarına Ait Mikrodilüsyon Plakları Sonuçları

TPHA çalışmaları ayrı günlerde dört kez tekrarlandı. H1'e ait TPHA genel görünümü Şekil 13, 14, 15 ve 16'da gösterilmektedir. Soldan birinci ila beşinci kuyu arası Spinreact marka TPHA testine, yedinci ve 11. kuyu arası ise Omega marka TPHA testine ayrılmıştır.



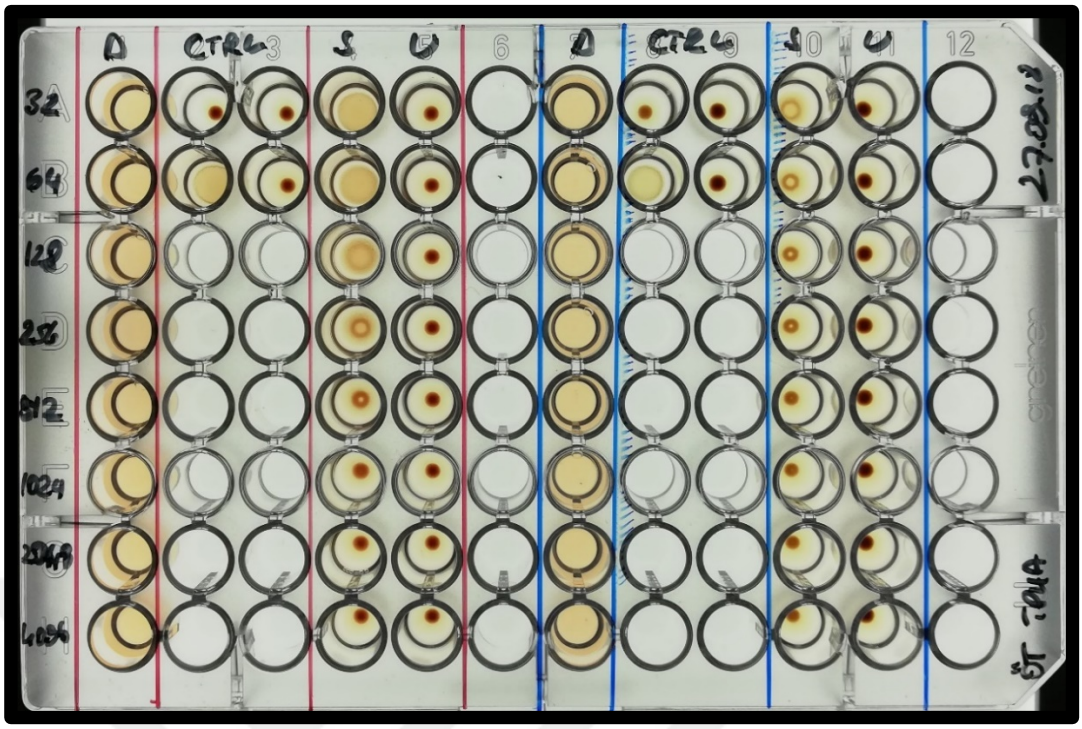
Şekil 13. H1'e ait 1. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.



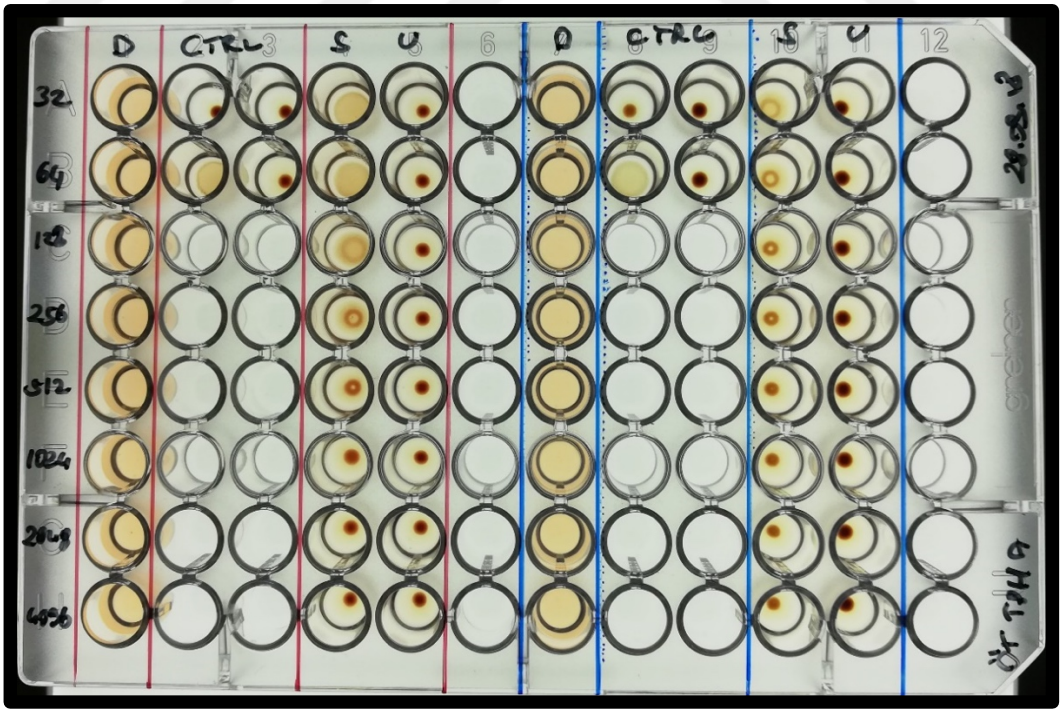
Şekil 14. H1'e ait 2. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.



Şekil 15. H1'e ait 3. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.



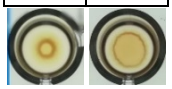
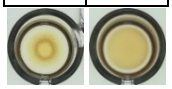
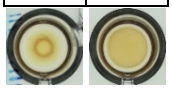
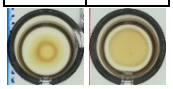
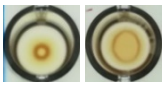
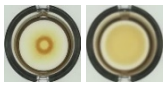
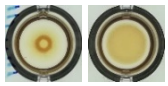
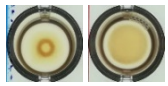
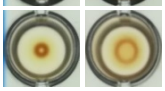
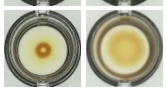
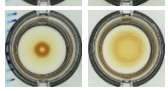
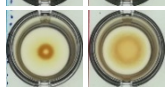
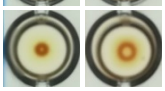
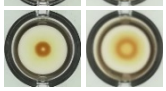
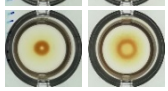
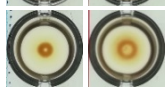
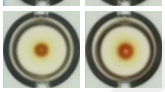
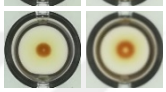
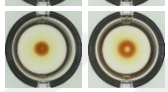
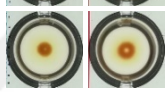
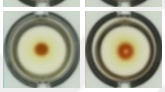
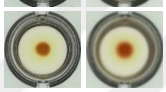
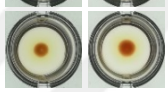
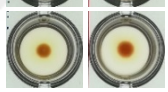
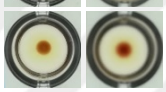
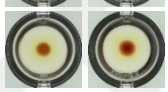
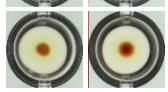
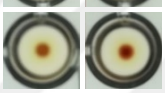
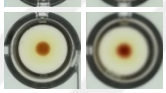
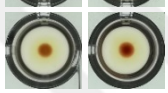
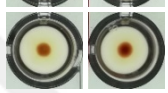
Şekil 16. H1'e ait 4. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.

4.1.1.1. H1'ye Ait Omega ve Spinreact Marka TPHA Çalışmalarına Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri

Tablo 6'da, H1 hastasının Omega ve Spinreact marka TPHA çalışmasına ait sonuçlar ilgili dilüsyonda karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir.

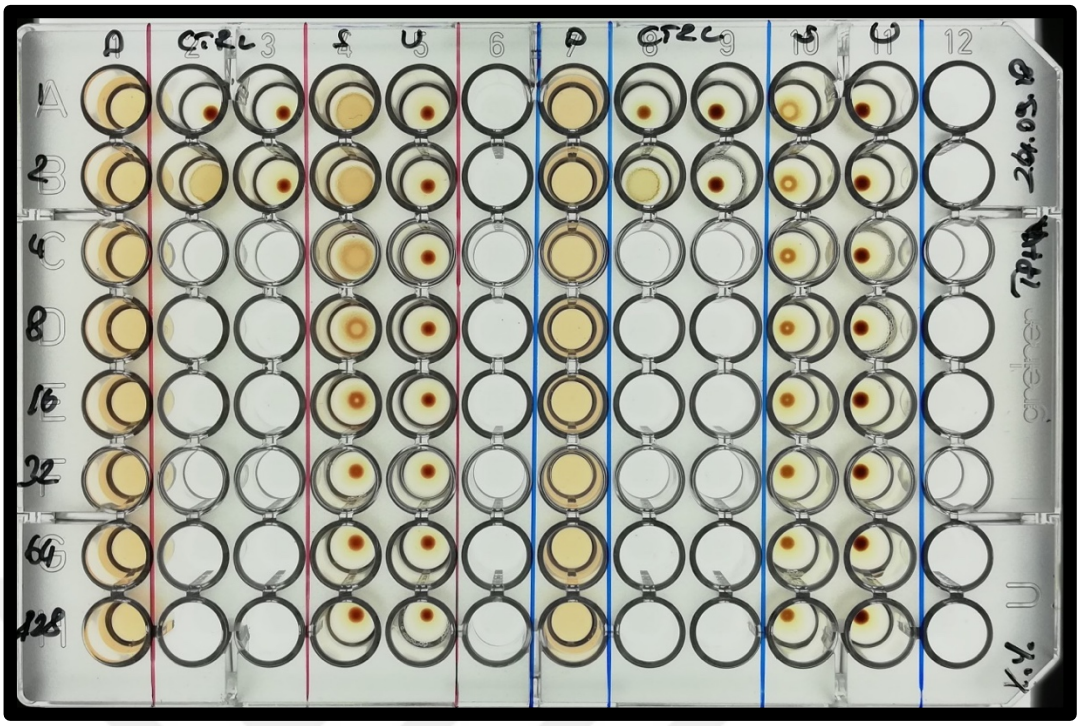
Tablo 6. H1 hastasının Omega ve Spinreact marka TPHA çalışmasına ait sonuçlar ilgili dilüsyonda karşılaştırmalı sonuçlar.

H1	1. Çalışma		2. Çalışma		3. Çalışma		4. Çalışma	
	OM	SP	OM	SP	OM	SP	OM	SP
1:32								
1:64								
1:128								
1:256								
1:512								
1:1024								
1:2048								
1:4096								

* OM; Omega. SP; Spinreact

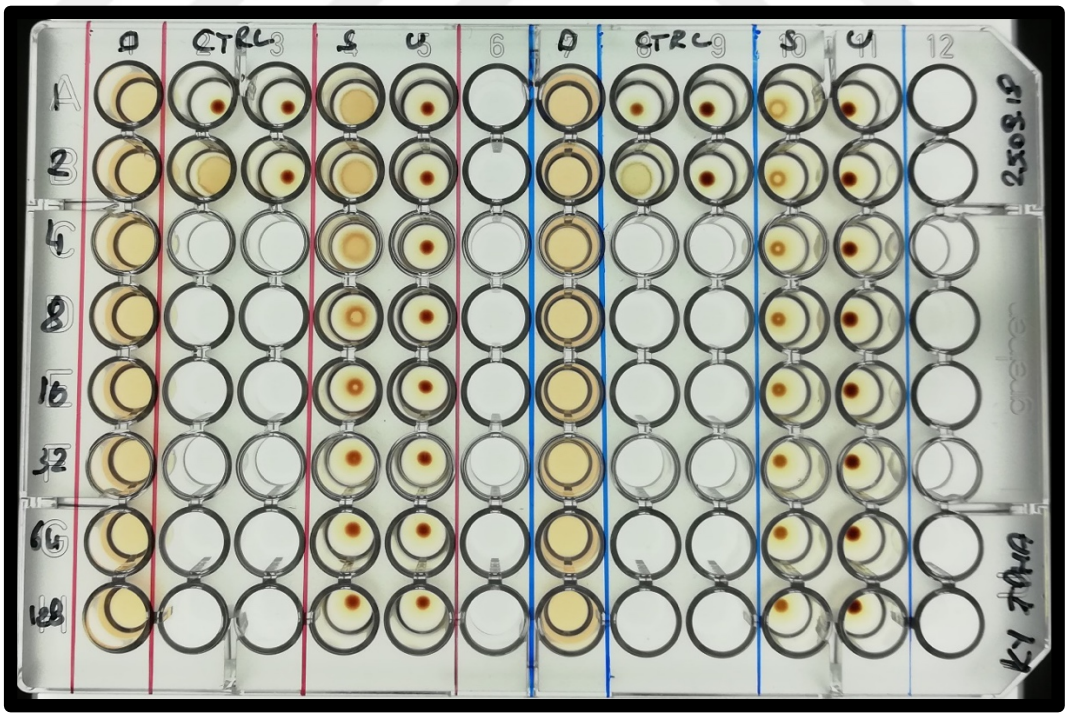
4.1.1.2. H2'ye TPHA Çalışmalarına Ait Mikrodilüsyon Plakları Sonuçları

TPHA çalışmaları ayrı günlerde dört kez tekrarlandı. Şekil 17, 18, 19 ve 20'de H2'e ait TPHA genel görünümü gösterilmektedir. Bu şekillerde soldan birinci ila beşinci kuyu arası Spinreact marka TPHA testine, yedinci ve 11. kuyu arası Omega marka TPHA testine ayrılmış kuyulardır.



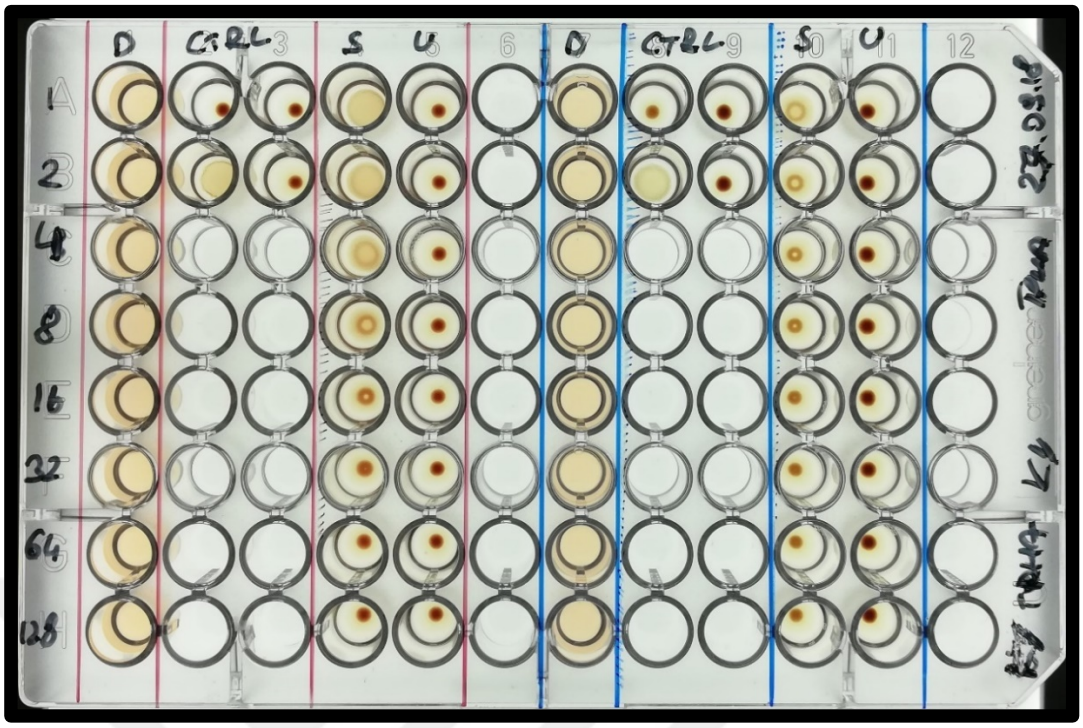
Şekil 17. H2'ye ait 1. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.



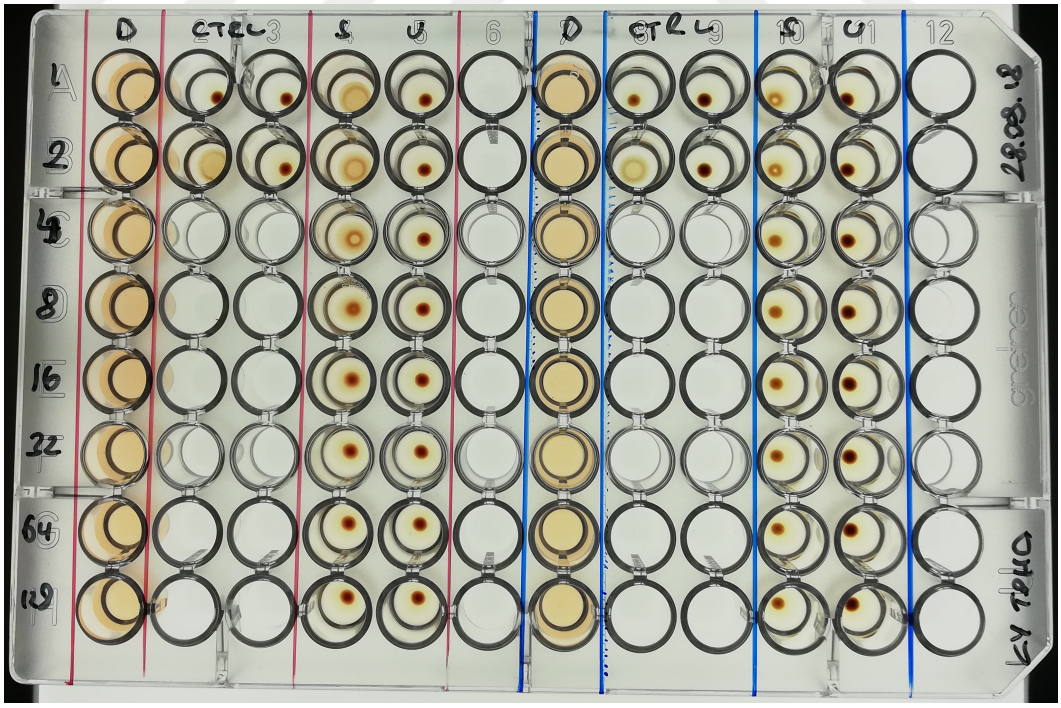
Şekil 18. H2'ye ait 2. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.



Şekil 19. H2'ye ait 3. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.



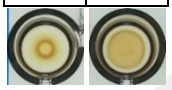
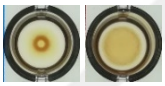
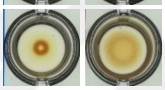
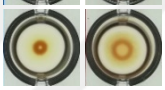
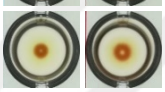
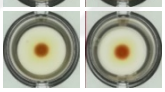
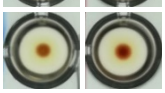
Şekil 20. H2'ye ait 4. çalışmanın sonucu.

* D; dilüsyon. CTRL; kontrol. S; sensitize. U: sensitize olmayan.

4.1.1.3. H2'ye Omega ve Spinreact Marka TPHA Çalışmalarına Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri

Tablo 7'de, H2 hastasına ait Omega ve Spinreact marka TPHA çalışmasına ait sonuçlar ilgili dilüsyonda karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir.

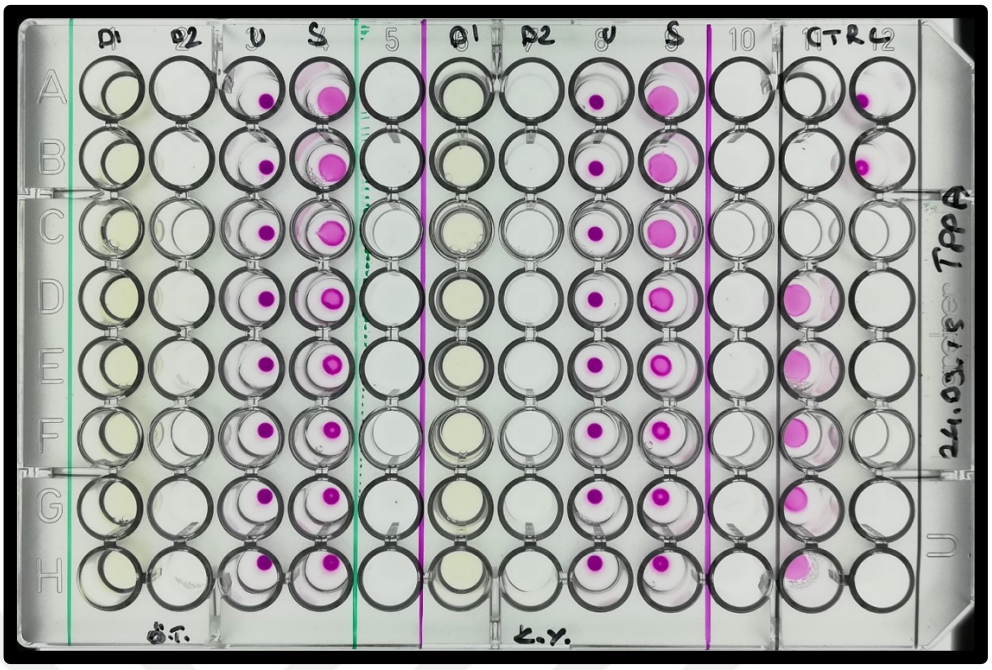
Tablo 7. H2 hastasının Omega ve Spinreact marka TPHA çalışmasına ait sonuçlar ilgili dilüsyonda karşılaştırmalı sonuçlar.

H2	1. Çalışma		2. Çalışma		3. Çalışma		4. Çalışma	
	OM	SP	OM	SP	OM	SP	OM	SP
1:1								
1:2								
1:4								
1:8								
1:16								
1:32								
1:64								
1:128								

* OM; Omega. SP; Spinreact.

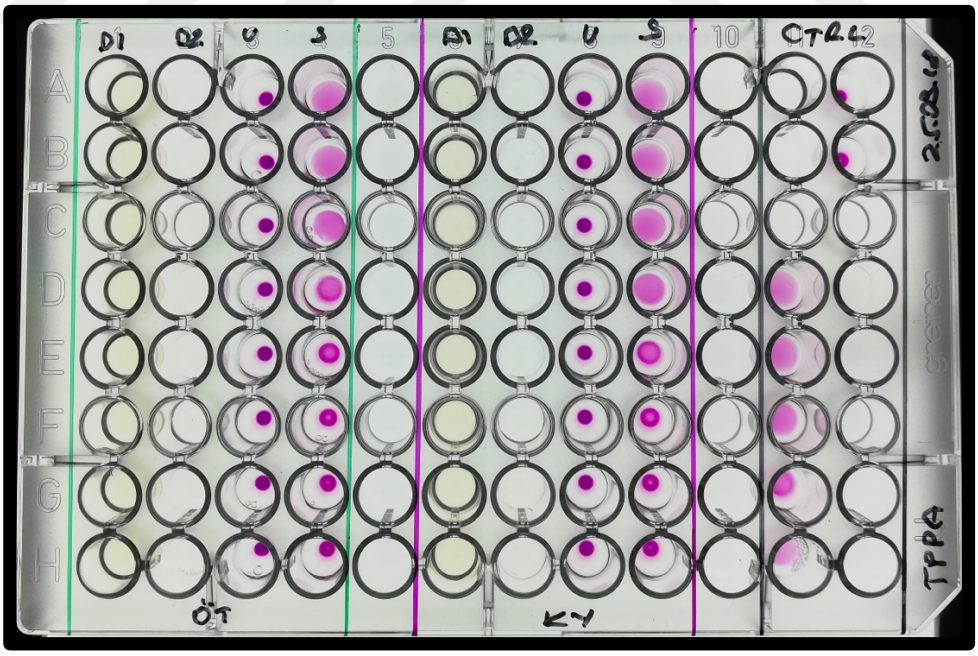
4.1.2. H1 ve H2'ye TPPA Çalışmalarına Ait Mikrodilüsyon Plakları Sonuçları

TPPA çalışmaları ayrı günlerde dört kez tekrarlandı. Şekil 21, 22, 23 ve 24'te H1 ve H2'ye ait TPPA genel görünümü gösterilmektedir. İlk dört kuyu H1'e aitken, altıncı ve dokuzuncu kuyular arasında H2'e aittir. Son iki kuyu ise kontrollere ayrılmıştır.



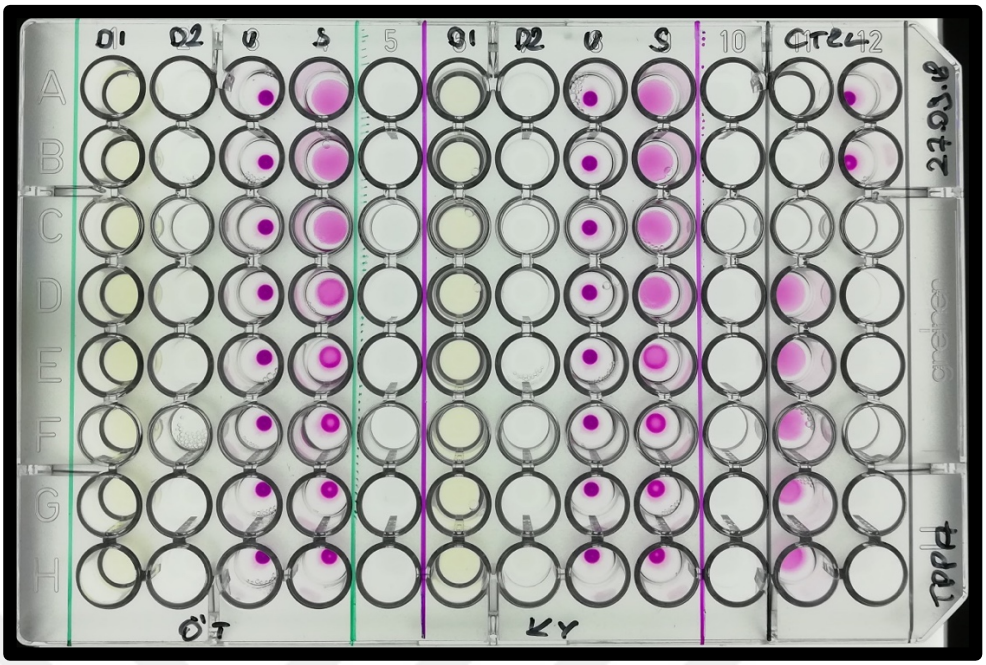
Şekil 21. H1 ve H2'ye ait 1. çalışmanın sonucu.

* D1; hasta dilüsyonu. D2; hasta örneğinin test dilüsyonu. U; sensitize olmayan. S: sensitize. CTRL: kontrol.



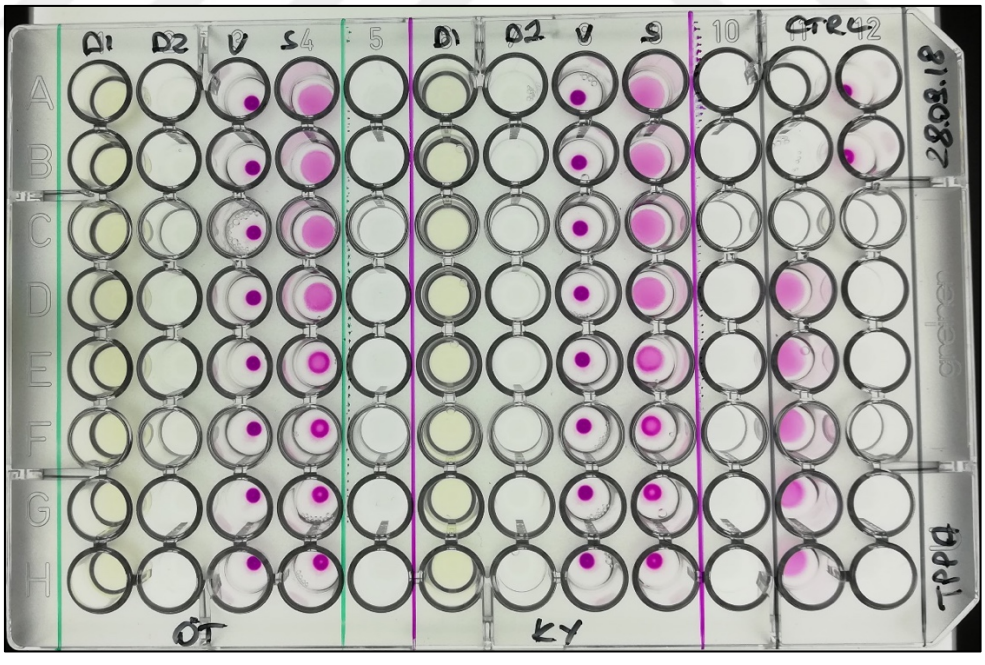
Şekil 22. H1 ve H2'ye ait 2. çalışmanın sonucu.

* D1; hasta dilüsyonu. D2; hasta örneğinin test dilüsyonu. U; sensitize olmayan. S: sensitize. CTRL: kontrol.



Şekil 23. H1 ve H2'ye ait 3. çalışmanın sonucu.

* D1; hasta dilüsyonu. D2; hasta örneğinin test dilüsyonu. U; sensitize olmayan. S: sensitize. CTRL: kontrol.



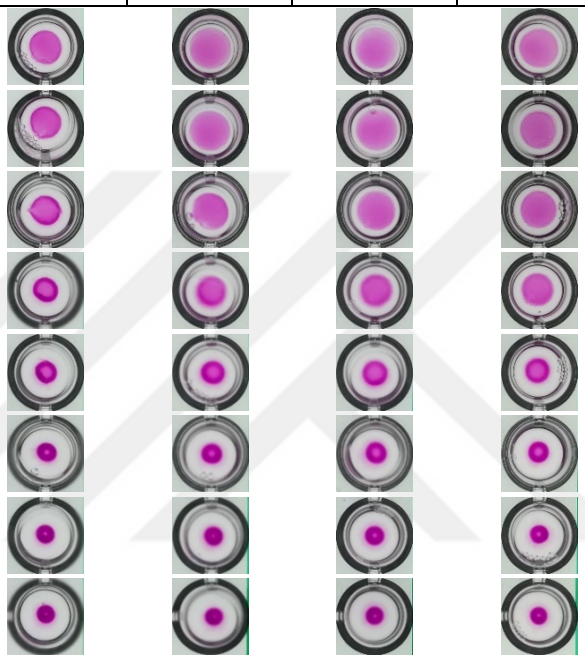
Şekil 24. H1 ve H2'ye ait 4. çalışmanın sonucu.

* D1; hasta dilüsyonu. D2; hasta örneğinin test dilüsyonu. U; sensitize olmayan. S: sensitize. CTRL: kontrol.

4.1.2.1. H1'e TPPA Çalışmalarına Ait Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri

Tablo 8'de, H1 hastasına ait TPPA çalışmasının her bir dilüsyon ve tekrardaki sonuçlar gösterilmektedir.

Tablo 8. H1 hastasına ait çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının karşılaştırması.

H1	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma	4. Çalışma
1:32				
1:64				
1:128				
1:256				
1:512				
1:1024				
1:2048				
1:4096				

4.1.2.2. H2'e TPPA Çalışmalarına Ait Dilüsyon Sonuçları Görüntüleri

Tablo 9'da, H2 hastasına ait TPPA çalışmasının her bir dilüsyon ve tekrardaki sonuçlar gösterilmektedir.

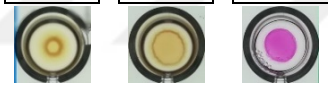
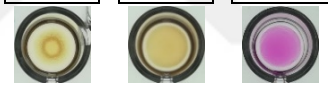
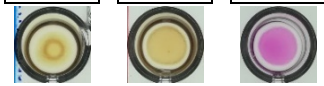
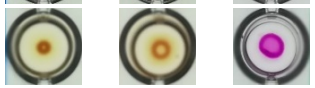
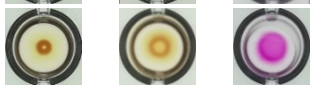
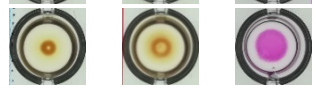
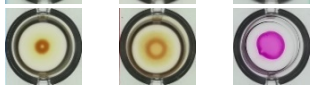
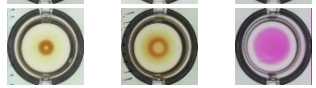
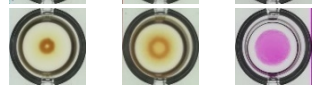
Tablo 9. H2 hastasına ait çalışmalarının dilüsyon sonuçlarının karşılaştırması.

H2	1. Çalışma	2. Çalışma	3. Çalışma	4. Çalışma
1:1				
1:2				
1:4				
1:8				
1:16				
1:32				
1:64				
1:128				

4.1.3. CMIA, TPHA ve TPPA Çalışmalarına Ait Karşılaştırmalı Genel Sonuçlar

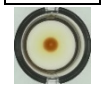
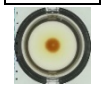
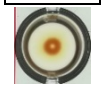
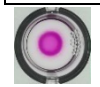
CMIA, TPHA ve TPPA tüm çalışma sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. H1 ve H2'ye ait CMIA, TPHA ve TPPA tüm çalışmaların karşılaştırmalı sonuçları.

Genel Sonuçlar	Dilüsyon Oranları	1. Çalışma				2. Çalışma				3. Çalışma				4. Çalışma			
		OM	SP	TPPA	CMIA	OM	SP	TPPA	CMIA	OM	SP	TPPA	CMIA	OM	SP	TPPA	CMIA
H1	1:32				18,38				17,95				18,83				18,72
H2	1:1				17,92				17,36				18,76				18,51
H1	1:64				15,84				15,37				16,36				14,91
H2	1:2				13,94				15,03				14,71				15,82
H1	1:128				11,46				12,04				11,55				12,58
H2	1:4				10,97				8,68				10,62				9,26
H1	1:256				8,1				7,3				8,07				8,6
H2	1:8				6,75				6,53				7,14				7,06

* OM; Omega. SP; Spinreact. CMIA sonuçların birimi S/CO'dur.

Tablo 10. H1 ve H2'ye ait CMIA, TPHA ve TPPA tüm çalışmaların karşılaştırmalı sonuçları (Devamı).

Genel Sonuçlar	Dilüsyon Oranları	1. Çalışma				2. Çalışma				3. Çalışma				4. Çalışma			
		OM	SP	TPPA	CMIA	OM	SP	TPPA	CMIA	OM	SP	TPPA	CMIA	OM	SP	TPPA	CMIA
H1	1:512				4,78				4,7				4,93				4,38
H2	1:16				3,22				3,60				3,21				3,73
H1	1:1024				2,46				2,23				2,4				2,34
H2	1:32				1,88				1,65				1,65				1,90
H1	1:2048				1,29				1,23				1,11				1,13
H2	1:64				0,84				0,87				0,86				0,89
H1	1:4096				0,55				0,61				0,57				0,52
H2	1:128				0,47				0,41				0,41				0,48

* OM; Omega. SP; Spinreact. CMIA sonuçların birimi S/CO'dur.de

4.2. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankasına Ait Veriler

Test performanslarının, saha verileri ile karşılaştırılabilmesi için 3 Ocak 2014-4 Temmuz 2018 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankası'nda ARCHITECT Syphilis TP testi ile pozitif olarak saptanan örnekler incelendi. Toplam 204 donörün test sonucunda pozitiflik saptandığı belirlendi. Donörlere ait S/CO test sonuçları Tablo 11'de gösterilmektedir.

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen verilere ait sıralı S/CO değerleri.

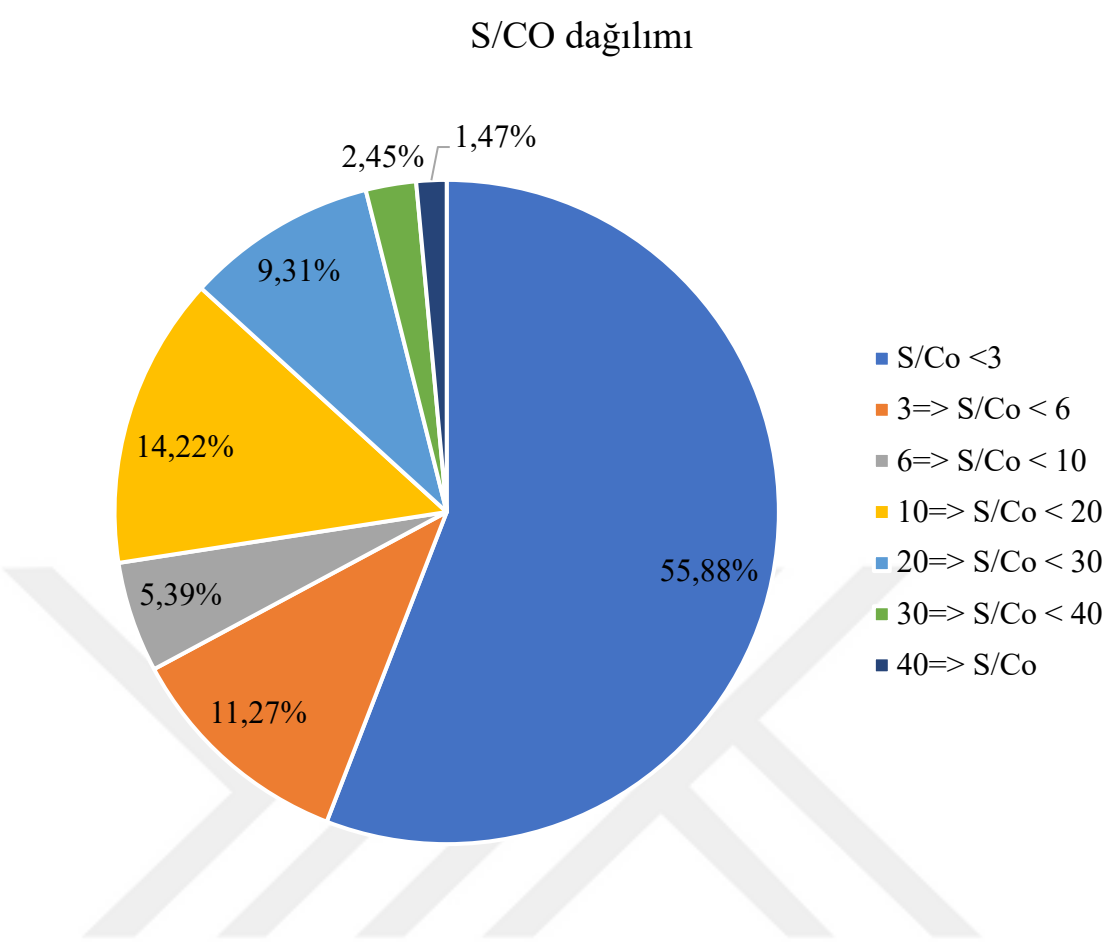
Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO
1	1,00	16	1,07	31	1,19	46	1,32	61	1,58	76	1,86
2	1,01	17	1,08	32	1,20	47	1,33	62	1,58	77	1,86
3	1,01	18	1,08	33	1,21	48	1,34	63	1,59	78	1,88
4	1,02	19	1,09	34	1,21	49	1,37	64	1,60	79	1,88
5	1,03	20	1,09	35	1,23	50	1,43	65	1,60	80	1,93
6	1,03	21	1,10	36	1,24	51	1,44	66	1,62	81	1,93
7	1,03	22	1,10	37	1,25	52	1,44	67	1,62	82	1,97
8	1,03	23	1,12	38	1,25	53	1,48	68	1,65	83	2,00
9	1,03	24	1,12	39	1,26	54	1,52	69	1,66	84	2,04
10	1,04	25	1,12	40	1,27	55	1,54	70	1,72	85	2,05
11	1,04	26	1,14	41	1,27	56	1,55	71	1,73	86	2,06
12	1,06	27	1,15	42	1,28	57	1,56	72	1,75	87	2,06
13	1,06	28	1,17	43	1,29	58	1,56	73	1,78	88	2,07
14	1,06	29	1,18	44	1,30	59	1,56	74	1,80	89	2,10
15	1,07	30	1,18	45	1,31	60	1,57	75	1,84	90	2,13

Tablo11. Çalışmaya dahil edilen verilere ait sıralı S/CO değerleri (Devamı).

Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO
91	2,14	106	2,61	121	3,72	136	5,85	151	10,77	166	17,37
92	2,17	107	2,63	122	3,76	137	5,99	152	11,43	167	17,47
93	2,19	108	2,66	123	3,81	138	6,55	153	11,47	168	17,68
94	2,19	109	2,67	124	3,93	139	6,64	154	11,83	169	17,83
95	2,20	110	2,72	125	3,95	140	7,24	155	11,85	170	17,87
96	2,26	111	2,80	126	4,01	141	7,64	156	11,98	171	17,96
97	2,31	112	2,84	127	4,33	142	8,73	157	12,14	172	17,97
98	2,34	113	2,84	128	4,41	143	8,77	158	12,67	173	17,98
99	2,35	114	2,85	129	4,62	144	8,92	159	13,41	174	18,00
100	2,38	115	3,09	130	4,91	145	9,00	160	13,66	175	18,55
101	2,38	116	3,11	131	5,20	146	9,60	161	15,18	176	18,69
102	2,49	117	3,24	132	5,46	147	9,83	162	15,50	177	19,47
103	2,50	118	3,24	133	5,47	148	9,90	163	16,74	178	20,13
104	2,52	119	3,41	134	5,52	149	10,09	164	16,80	179	20,27
105	2,55	120	3,61	135	5,69	150	10,57	165	16,88	180	20,75

Tablo11. Çalışmaya dahil edilen verilere ait sıralı S/CO değerleri (Devamı).

Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO	Hasta No.	S/CO
181	20,94	186	22,72	191	23,82	196	29,18	201	34,72
182	20,96	187	22,88	192	24,21	197	30,46	202	40,46
183	21,42	188	23,05	193	25,46	198	30,75	203	42,99
184	21,63	189	23,76	194	27,68	199	30,80	204	43,78
185	22,18	190	23,78	195	28,30	200	31,37		



Şekil 25. T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankasına ait verilerin yüzdelik dilimleri.

Şekil 25'te, kan bankasında pozitif bulunan 204 donöre ait S/CO verilerinin kategorize edildiği yüzdelik dilimler gösterilmektedir.

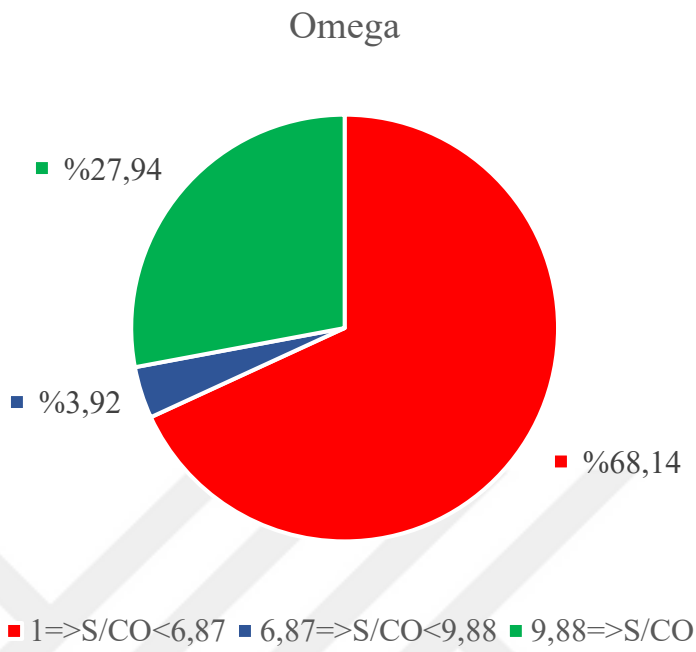
Tablo 11 ve Şekil 25'e göre, üç donörün S/CO oranı S/CO≥40'tan büyüktür ve toplam donörlerin %2'sini temsil etmektedir. Beş donörün S/CO oranları S/CO=30-40 arasındadır (%3). 19 donörün S/CO oranları S/CO=20-30 arasındadır (%9). 29 donörün S/CO oranları S/CO=10-20 arasındadır (%14). 11 donörün S/CO oranları S/CO =6-10 arasındadır (%5). 23 donörün S/CO oranları S/CO=3-6 arasındadır (%11). 114 donörün S/CO oranları ise S/CO<3'ün altındadır (%56).

4.3. Araştırmacıların Saptadıkları Analitik Duyarlılık Düzeyleri

Araştırmacılar, test sonuçlarını serum setlerinin CMIA sonuçlarından habersiz olarak, yani kör bir şekilde değerlendirdi. Bu değerlendirme sonucunda, Omega marka TPHA için S/CO≥9,88'in üzerinde pozitif, S/CO=6,87-9,88 arasında belirsiz ve S/CO<6,87'nin altında negatif sonuç verdiği; Spinreact marka TPHA için S/CO≥6,87'nin üzerinde pozitif, S/CO=6,87-3,44 arasında belirsiz ve S/CO<3,44 altında negatif sonuç verdiği; TPPA için S/CO≥3,44 üzerinde pozitif, S/CO=1,77-3,44 arasında belirsiz ve S/CO<1,77 altında negatif sonuç verdiği bulunmuştur

4.3.1. Kan Bankası Veri Tabanının Araştırmacıların Belirledikleri Analitik Duyarlılık Düzeylerine Göre Değerlendirilmesi

Kan bankasında CMIA yöntemiyle pozitif çıkan donör serumları için, doğrulama testleri olarak TPHA veya TPPA yöntemleri kullanıldığında ortaya çıkacak sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 26, 27 ve 28'de gösterilmektedir.

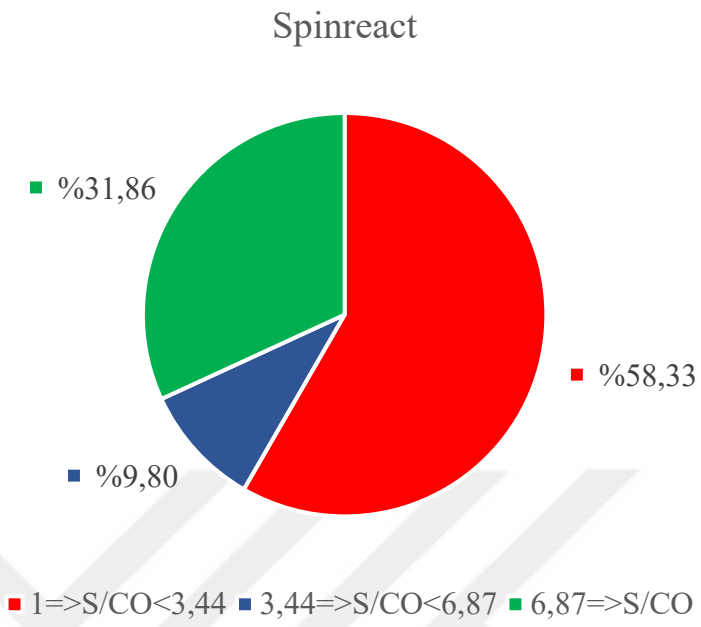


Şekil 26. Omega marka TPHA'nın analitik performansının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Omega marka TPHA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥9,88 üzeri olan 57 kişi (%27,94) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=6,87-9,87 arasında olan 8 kişi (%3,92) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<6,86'dan küçük olan 139 kişi (%68,14) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Omega marka TPHA testi gerçek pozitif olmasına rağmen donörlerin %68.14'üne negatif sonuç verebilir, %3.92'sine belirsiz sonuç verirken yalnızca %27.94'üne pozitif sonuç verebilir.

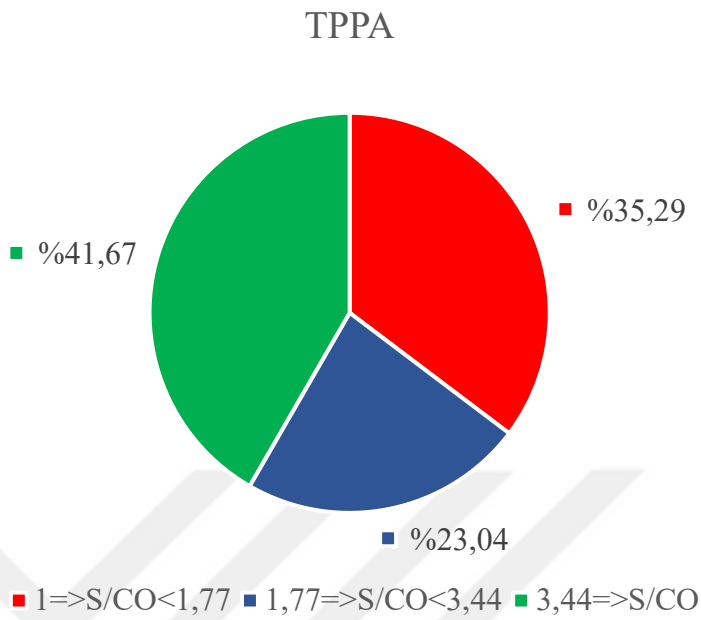


Şekil 27. Spinreact marka TPHA'nın analitik performansının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Spinreact marka TPHA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥6,87 üzeri olan 65 kişi (%31,86) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=3,44-6,86 arasında olan 20 kişi (%9,80) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<3,43'den küçük olan 119 kişi (%58,33) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Spinreact marka TPHA testi gerçek pozitif olan donörlerin dahi %58,33'üne negatif sonuç verecek, %9,80'ine belirsiz ve yalnızca %31,86'sına pozitif sonuç verebilecektir.



Şekil 28. Serodia marka TPPA'nın analitik performansının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Serodia marka TPPA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥3,44 üzeri olan 85 kişi (%41,67) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=1,77-3,43 arasında olan 47 kişi (%23,04) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<1,76'dan küçük olan 72 kişi (%35,29) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Serodia marka TPPA testi gerçek pozitif olan donörlerin dahi %35,29'una negatif sonuç verecek, %23,04'üne belirsiz ve yalnızca %41,67'sine pozitif sonuç verebilecektir.

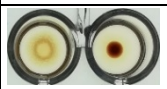
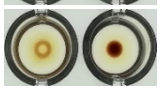
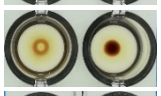
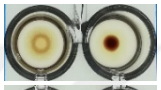
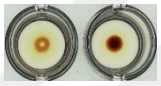
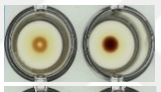
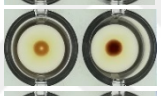
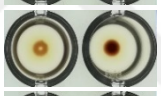
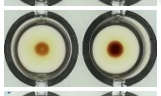
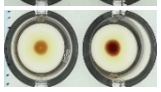
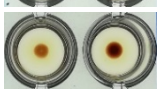
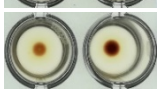
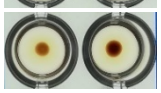
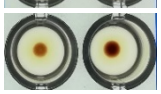
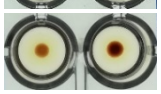
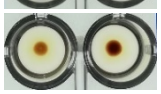
4.4. Görsel Test Bulguları

TPHA ve TPPA, makroskobik olarak gözle değerlendirilen testlerdir. Bu nedenle, değerlendiricinin bilgi ve tecrübe düzeyi değerlendirme sonuçlarını etkiler. Testlerin analitik duyarlılıkları, testi okuyan kişinin değiştiği durumlarda nasıl etkilendiğini belirlemek için bir görsel test hazırlandı. Bu test, 15 tıbbi mikrobiyoloji uzmanına gönderildi.

4.4.1. Görsel Teste Değerlendiricilerin Verdiği Yanıtlar

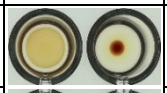
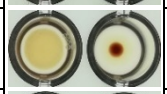
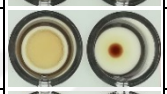
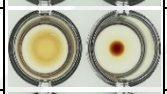
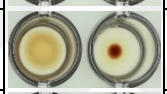
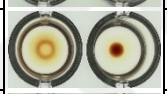
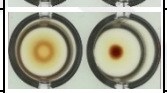
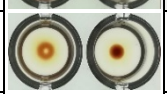
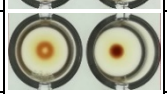
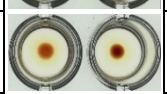
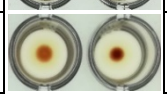
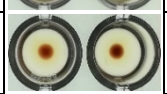
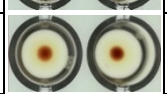
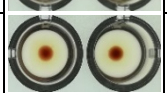
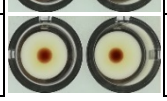
15 tıbbi mikrobiyoloji uzmanın görsel teste verilen cevaplar Tablo 12, 13 ve 14'de gösterilmektedir.

Tablo 12. Uzmanların Omega marka TPHA çalışmasının değerlendirme sonuçları.

Soru	Hasta	Oran	CMIA	OM TPHA	(+)	(±)	(-)
16	H1	1:32	18,47		87	13	
9	H1	1:64	15,62		73	27	
3	H2	1:2	14,88		60	40	
8	H2	1:1	14,18		80	20	
11	H1	1:128	11,91		27	60	13
2	H2	1:4	9,88		13	74	13
12	H1	1:256	8,02		13	60	27
1	H2	1:8	6,87		13	67	20
14	H1	1:512	4,7			27	73
4	H2	1:16	3,44			27	73
10	H1	1:1024	2,36			7	93
6	H2	1:32	1,77			7	93
15	H1	1:2048	1,19				100
7	H2	1:64	0,87			7	93
13	H1	1:4096	0,56				100
5	H2	1:128	0,44			7	93

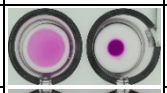
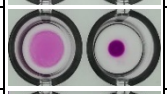
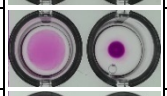
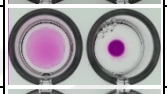
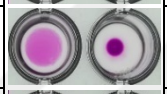
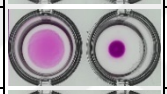
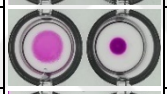
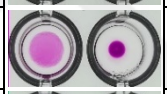
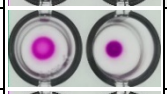
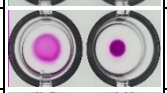
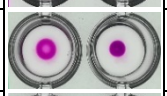
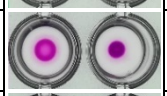
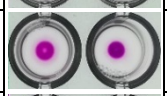
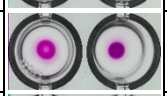
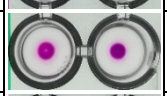
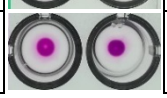
* OM; Omega. CMIA değerleri S/CO birimindedir.

Tablo 13. Uzmanların Spinreact marka TPHA çalışmasının değerlendirme sonuçları.

Soru	Hasta	Oran	CMIA	SP TPHA	(+)	(±)	(-)
27	H1	1:32	18,47		100		
30	H1	1:64	15,62		100		
18	H2	1:2	14,88		100		
21	H2	1:1	14,18		100		
26	H1	1:128	11,91		100		
19	H2	1:4	9,88		100		
32	H1	1:256	8,02		93	7	
23	H2	1:8	6,87		93	7	
28	H1	1:512	4,7		28	65	7
22	H2	1:16	3,44		27	73	
31	H1	1:1024	2,36			13	87
24	H2	1:32	1,77			27	73
25	H1	1:2048	1,19				100
20	H2	1:64	0,87				100
29	H1	1:4096	0,56				100
17	H2	1:128	0,44				100

* SP; Spinreact. CMIA değerleri S/CO birimindedir.

Tablo 14. Uzmanların TPPA çalışmasının değerlendirme sonuçları.

Soru	Hasta	Oran	CMIA	TPPA	(+)	(±)	(-)
47	H1	1:32	18,47		100		
45	H1	1:64	15,62		100		
33	H2	1:2	14,88		100		
38	H2	1:1	14,18		100		
48	H1	1:128	11,91		100		
36	H2	1:4	9,88		100		
41	H1	1:256	8,02		100		
37	H2	1:8	6,87		100		
44	H1	1:512	4,7		67	33	
40	H2	1:16	3,44		93	7	
42	H1	1:1024	2,36		27	60	13
34	H2	1:32	1,77		28	65	7
46	H1	1:2048	1,19			40	60
39	H2	1:64	0,87		13	47	40
43	H1	1:4096	0,56				100
35	H2	1:128	0,44			13	87

* CMIA değerleri S/CO birimindedir.

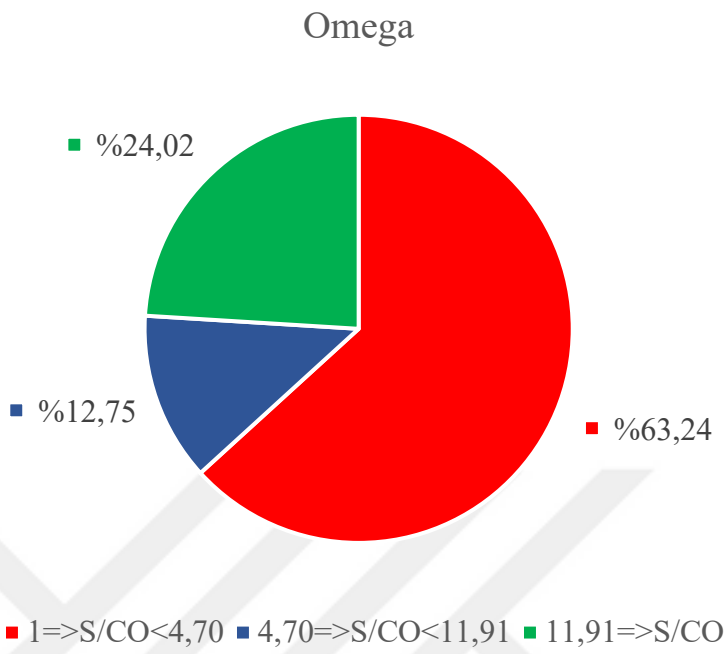
4.4.2. TPHA ve TPPA Testlerin Görsel Test Sonuçlarına Göre Pozitif, Belirsiz, Negatif Test Kriterlerin Belirlenmesi

Tablolar incelendiğinde, pozitif, belirsiz ve negatif sonuçlar için cevap yüzdeleri verilmiştir. Belirsiz cevap yüzdesi pozitif cevap yüzdesini aştığında belirsiz sonuçların başladığı, aynı şekilde negatif cevap yüzdesi belirsiz cevap yüzdesini aştığında negatif sonuçların başladığı test değerlendirme kriteri olarak kabul edilmiştir.

Buna göre uzman değerlendiricilerin; Omega marka TPHA için S/CO≥11,91 üzeri, Spinreact marka TPHA için S/CO≥4,70 üzeri, TPPA testi için S/CO≥2,36 üzeri tüm sonuçlar pozitiftir ve CMIA sonuçları bu testlerle doğrulanabilir. Test tekrarı gerektiren belirsiz aralıklar şu şekildedir: Omega marka TPHA için S/CO=4,70-11,91, Spinreact marka TPHA için S/CO=2,36-4,70, TPPA testi için S/CO=1,19-2,36 aralığı. Negatif sonuç raporlanması gereken alt eşikler ise şunlardır: Omega marka TPHA için S/CO<4,70, Spinreact marka TPHA için S/CO<2,36, TPPA testi için S/CO<1,19.

4.4.3. Kan Bankası Veri Tabanının Görsel Test Sonuçlarında Belirlenen Analitik Duyarlılık Düzeylerine Göre Değerlendirilmesi

3 Ocak 2014-4 Temmuz 2018 tarihleri arasında ARCHITECT Syphilis TP ile tespit edilen 204 sonuç, T.C. Dokuz Eylül Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Bankası verileri kullanılarak görsel test sonucunda belirlenen analitik duyarlılık düzeyleri ile tekrar değerlendirildi. Bu değerlendirme sonuçları Şekil 29, 30 ve 31'de gösterilmektedir.

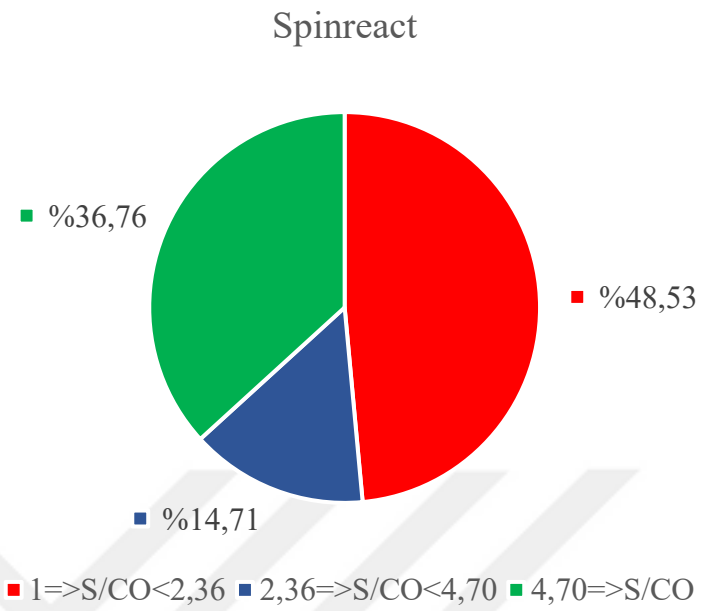


Şekil 29. Uzman değerlendiricilerin Omega marka sonuçlarının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Omega marka TPHA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥11,91 üzeri olan 49 kişi (%24,02) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=4,70-11,90 arasında olan 26 kişi (%12,75) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<4,69'dan küçük olan 129 kişi (%63,24) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Omega marka TPHA testi gerçek pozitif olmasına rağmen donörlerin %63.24'üne negatif sonuç verebilir, %12.75'ine belirsiz sonuç verirken yalnızca %24.02'sine pozitif sonuç verebilir.

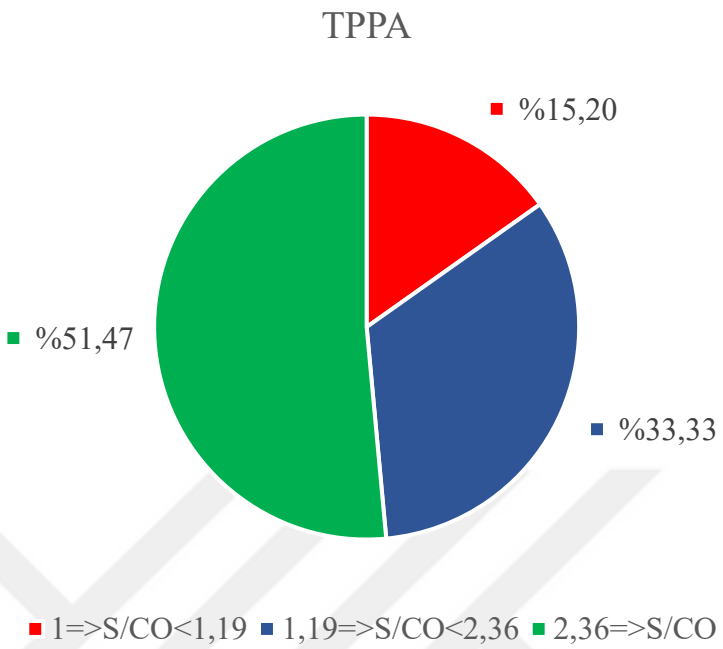


Şekil 30. Uzman değerlendiricilerin Spinreact marka sonuçlarının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Spinreact marka TPHA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥4,70 üzeri olan 75 kişi (%36,76) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=2,36-4,70 arasında olan 30 kişi (%14,71) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<2,36'dan küçük olan 99 kişi (%48,53) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Spinreact marka TPHA testi gerçek pozitif olan donörlerin dahi %48,53'üne negatif sonuç verecek, %14,71'ine belirsiz ve yalnızca %36,76'sına pozitif sonuç verebilecektir.



Şekil 31. Uzman değerlendiricilerin TPPA çalışmasına ait sonuçlarının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Serodia marka TPPA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥2,36 üzeri olan 105 kişi (%51,47) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=1,19-2,36 arasında olan 68 kişi (%33,33) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<1,19'dan küçük olan 31 kişi (%15,20) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Serodia marka TPPA testi gerçek pozitif olan donörlerin dahi %51,47'sine negatif sonuç verecek, %33,33'üne belirsiz ve yalnızca %15,20'sine pozitif sonuç verebilecektir.

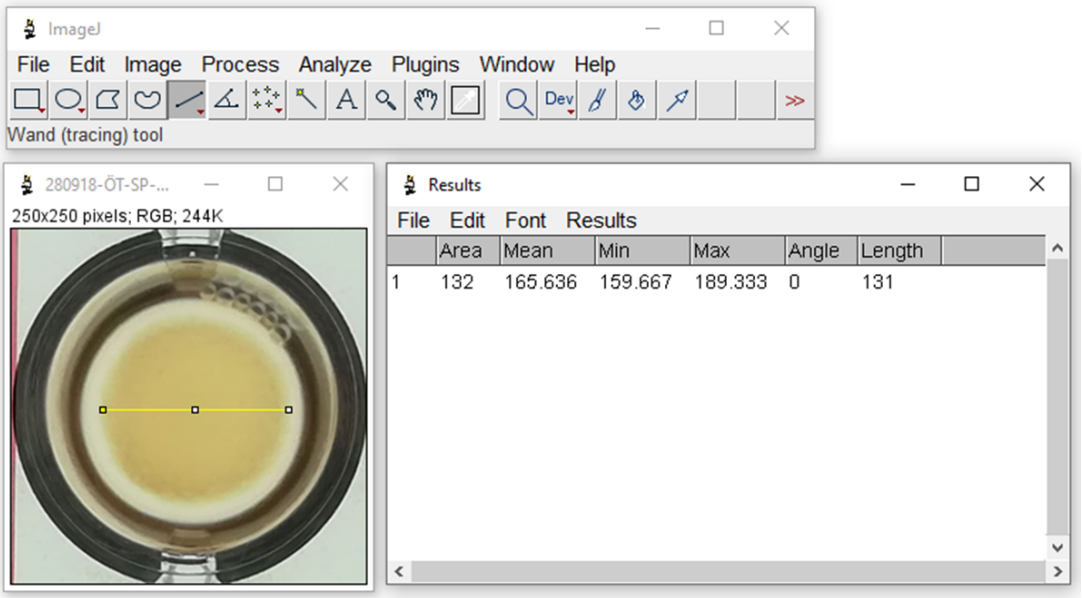
4.5. Sonuç Görsellerinin İşlenmesi ve Kantitasyonu

Araştırmada, TPHA ve TPPA sonuç görüntülerinin çalışmaya uygun hale getirilmesi amacıyla işleme tabi tutulması gerekmekteydi. Bu amaçla, açık kaynaklı bir resim işleme yazılımı olan PhotoDemon sürüm 7.0.1 kullanıldı.

Yapılan işlemler şunları içermektedir: resimlerin gereken kısımlarının kesilmesi ve piksel ölçüsü temelinde aynı boyuta getirilmesi. Bu işlemler sırasında, işlenmiş resimlerin orijinal resimlere göre deforme olmamasını sağlamak için uygun bir resim işleme algoritması kullanıldı ve resimler eş boyuta getirilerek normalize edildi. Normalize edilen resimlerin boyutu 250x250 piksel (px) olarak ayarlandı. Bu işlemler, görsel testte gösterilen sonuçların boyut, renk gibi değişkenlerden etkilenmeden doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlamayı amaçlamaktadır. Ayrıca, ImageJ 1.52r sürümü adlı yazılım kullanılarak normalize edilen sonuç görsellerine ait halka çaplarının ölçülmesi mümkün hale gelmiştir.

Günümüzde, yapay zeka tıp alanında kullanımı tartışılmaktadır (Radyoloji, Patoloji vb.) (9,165–168). Bu çalışmada da TPHA ve TPPA testleri görsel olarak değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme süreci, gelecekte bu testlerin incelenmesinde kullanılabilecek yapay zeka için öneriler oluşturmak ve objektif test kriterlerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Bu bağlamda, sonuç görsellerine ait halka çapları ölçülmüş, grafik haline getirilmiş ve yorumlanmıştır. Şekil 32'de bir örnek olarak kırpılmış ve normalize edilmiş bir görselin ölçüm görseli görülmektedir.



Şekil 32. Örnek bir normalize edilmiş bir görsellerin ölçüm görseli.

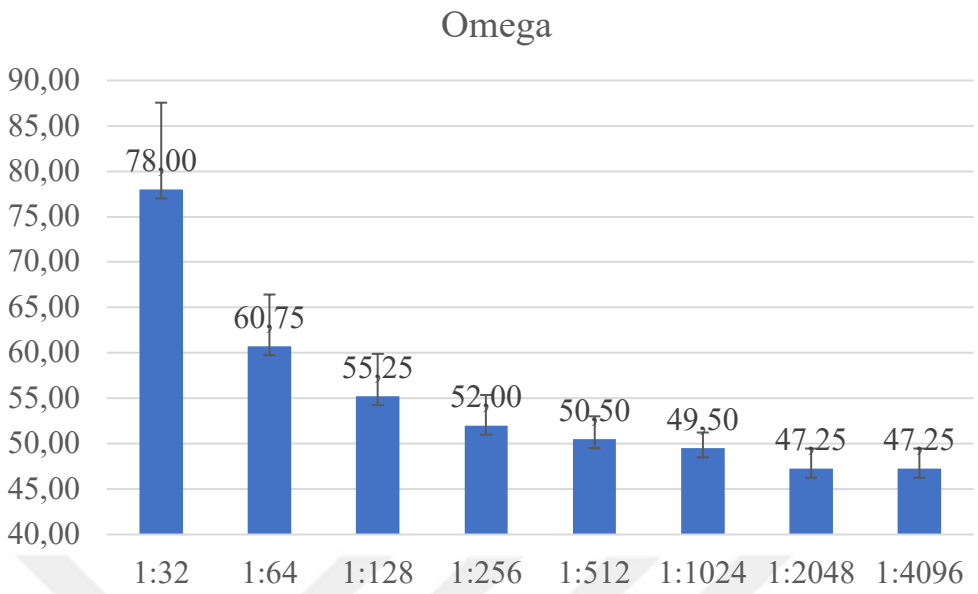
4.5.1. H1'in Halka Çaplarının ölçümü

H1'e ait halka çapları ölçülmüş ve çaplar piksel (px) boyutunda her bir çalışma ve dilüsyon için Tablo 15 ve Şekil 33, 34 ve 35'da gösterilmiştir.

Tablo 15. H1 hastasına ait halka çaplarının ölçüm sonuçları.

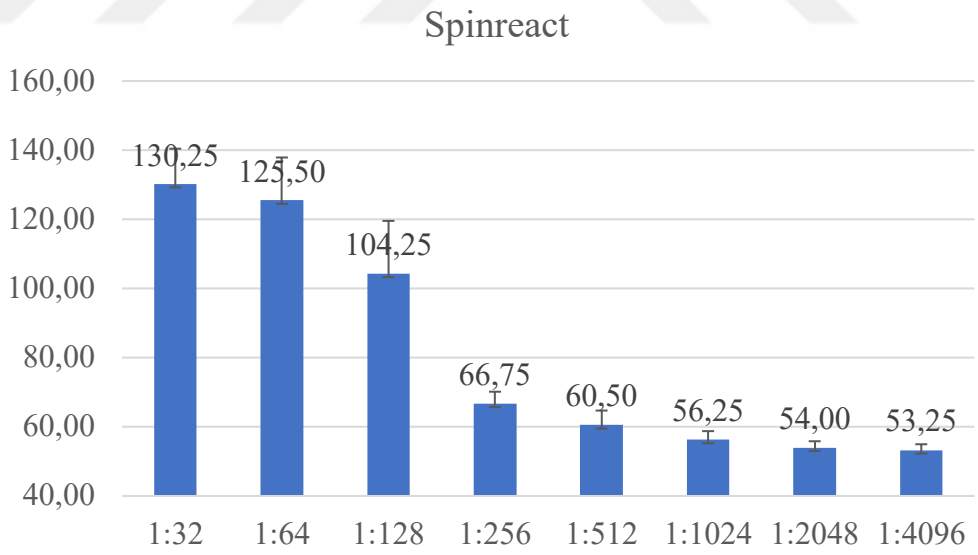
H1	1. Çalışma			2. Çalışma			3. Çalışma			4. Çalışma			OM		SP		TPPA	
	OM	SP	TPPA	OM	SP	TPPA	OM	SP	TPPA	OM	SP	TPPA	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD
1:32	67	115	111	74	136	137	89	135	137	82	135	128	78,00	9,56	130,25	10,18	128,25	12,26
1:64	53	107	106	65	130	131	60	133	136	65	132	122	60,75	5,68	125,50	12,40	123,75	13,18
1:128	49	82	99	55	117	123	57	109	129	60	109	117	55,25	4,65	104,25	15,31	117,00	12,96
1:256	47	64	86	53	68	106	54	71	114	54	64	106	52,00	3,37	66,75	3,40	103,00	11,94
1:512	47	55	76	51	60	85	51	65	89	53	62	83	50,50	2,52	60,50	4,20	83,25	5,44
1:1024	47	53	70	50	56	80	50	57	75	51	59	73	49,50	1,73	56,25	2,50	74,50	4,20
1:2048	44	53	65	49	52	68	48	55	67	48	56	64	47,25	2,22	54,00	1,83	66,00	1,83
1:4096	44	53	65	49	51	65	48	54	66	48	55	63	47,25	2,22	53,25	1,71	64,75	1,26

* px; Piksel. OM; Omega. SP; Spinreact.



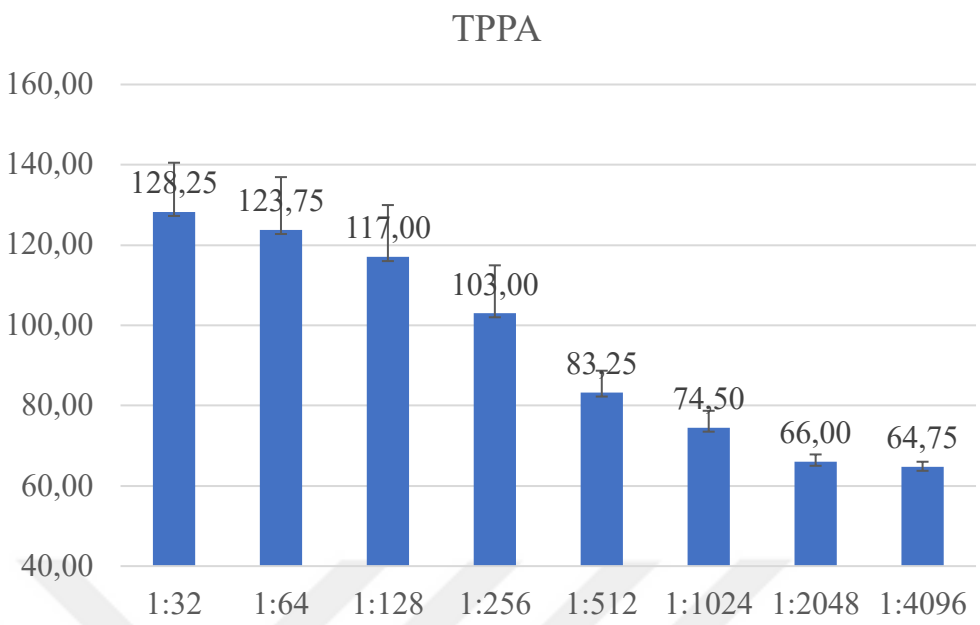
Şekil 33. H1 hastasına ait Omega marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı.

* px; Piksel.



Şekil 34. H1 hastasına ait Spinreact marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı.

* px; Piksel.



Şekil 35. H1 hastasına ait TPPA çalışmasının halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı.

* px; Piksel.

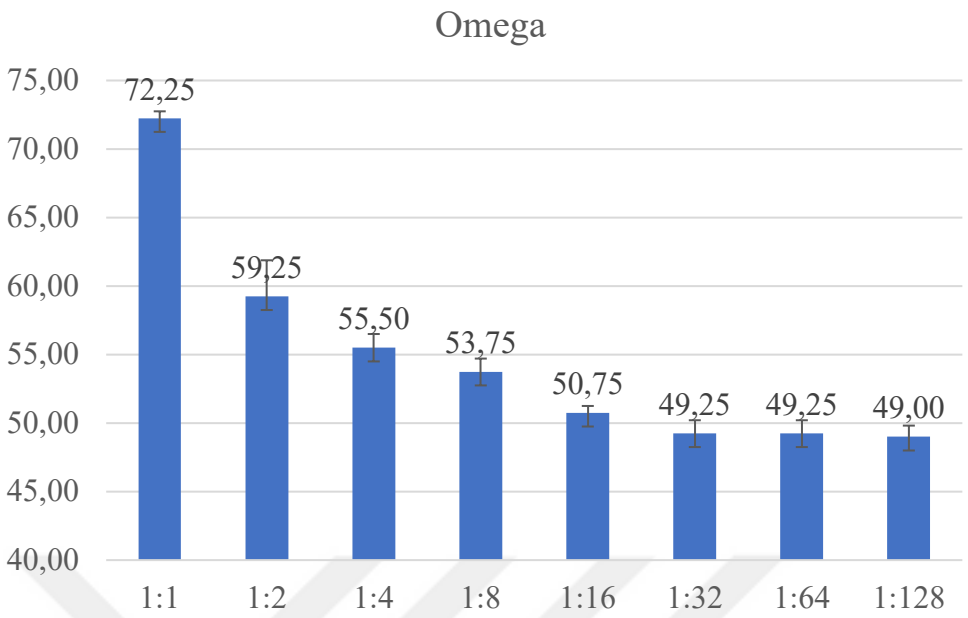
4.5.2. H2'in Halka Çaplarının ölçümü

H2'in halka çapları ölçüldü ve çaplar piksel (px) boyutunda her bir çalışma ve dilüsyon için Tablo 16 ve Şekil 36, 37 ve 38'de gösterilmiştir.

Tablo 16. H2 hastasına ait halka çaplarının ölçüm sonuçları.

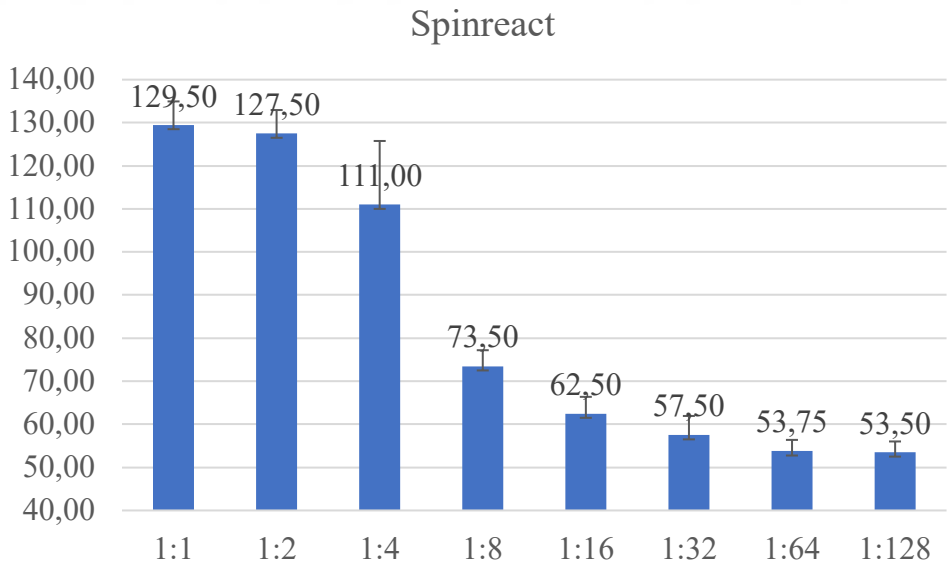
H2	1. Çalışma			2. Çalışma			3. Çalışma			4. Çalışma			OM		SP		TPPA	
	OM	SP	TPPA	OM	SP	TPPA	OM	SP	TPPA	OM	SP	TPPA	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD
1:1	72	122	115	73	129	144	72	134	142	72	133	138	72,25	0,50	129,50	5,45	134,75	13,40
1:2	57	121	114	57	125	138	61	132	139	62	132	135	59,25	2,63	127,50	5,45	131,50	11,79
1:4	55	116	108	55	107	133	57	93	133	55	128	130	55,50	1,00	111,00	14,76	126,00	12,08
1:8	54	75	98	53	70	122	55	71	121	53	78	119	53,75	0,96	73,50	3,70	115,00	11,40
1:16	51	58	83	51	61	97	51	64	95	50	67	102	50,75	0,50	62,50	3,87	94,25	8,06
1:32	48	51	74	50	59	81	50	59	78	49	61	77	49,25	0,96	57,50	4,43	77,50	2,89
1:64	48	50	68	50	56	71	50	54	68	49	55	65	49,25	0,96	53,75	2,63	68,00	2,45
1:128	48	50	64	50	56	70	49	54	64	49	54	64	49,00	0,82	53,50	2,52	65,50	3,00

* px; Piksel. OM; Omega. SP; Spinreact.



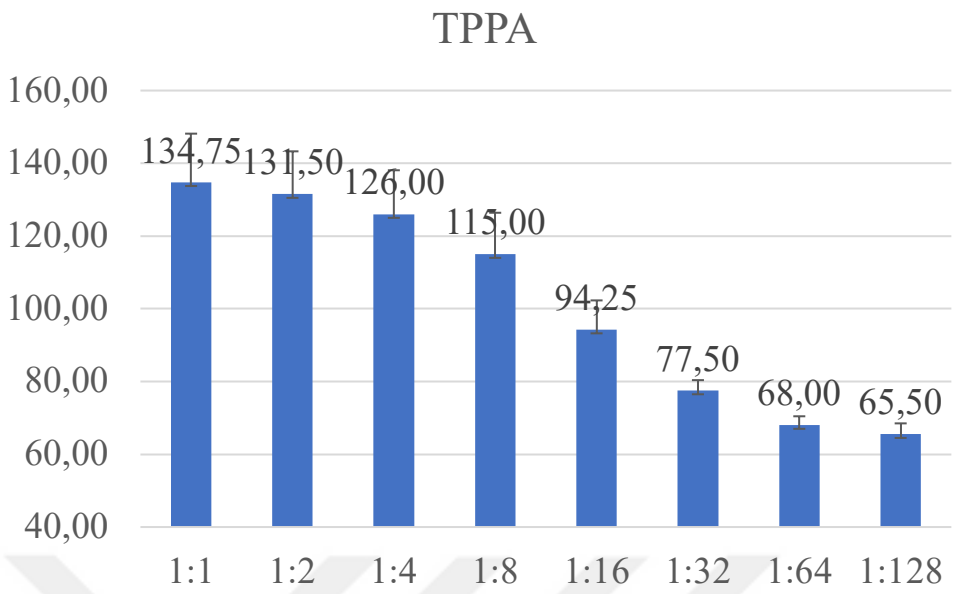
Şekil 36. H2 hastasına ait Omega marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı.

* px; Piksel.



Şekil 37. H2 hastasına ait Spinreact marka halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı.

* px; Piksel.



Şekil 38. H2 hastasına ait TPPA çalışmasının halka çaplarının ölçüm sonuçlarının dinamik aralığı.

* px; Piksel.

4.5.3. H1 ve H2'nin Halka Çaplarının Pozitif, Belirsiz, Negatif Test Kriterlerin Belirlenmesi

TPHA ve TPPA testleri farklı çalışma şekillerine sahiptir. Bu testler, 1:80 dilüsyonunda kalitatif ve seri dilüsyonda kantitatif olarak ikiye ayrılmaktadır. Her iki çalışma şekli için de test kriterleri belirlenmiştir. Kalitatif değerlendirme için halka çapı aralığı kullanılırken, kantitatif değerlendirme için bir üst dilüsyonla kıyaslama yapılarak test kriterleri oluşturulmuştur.

Eğer TPHA ve TPPA testleri kalitatif olarak çalışılıyorsa:

1. Omega marka TPHA'nın halka çapı 56 pikselden büyükse, Spinreact marka TPHA'nın halka çapı 61 pikselden büyükse ve Serodia marka TPPA'nın halka çapı 75 pikselden büyükse sonuç pozitif olarak değerlendirilir.

2. Omega marka TPHA'nın halka çapı 56-54 arasında, Spinreact marka TPHA'nın halka çapı 60-57 arasında ve Serodia marka TPPA'nın halka çapı 74-67 arasında ise sonuç negatif olarak değerlendirilir.

3. Omega marka TPHA'nın halka çapı 53 pikselden küçükse, Spinreact marka TPHA'nın halka çapı 66 pikselden küçükse ve Serodia marka TPPA'nın halka çapı 66 pikselden küçükse sonuç pozitif olarak değerlendirilir.

TPHA ve TPPA testleri kantitatif olarak çalışılıyorsa:

Ölçüm sonuçları dikkate alındığında, belirsizlik noktasında çap farkının bir alt dilüsyona göre küçüldüğü, negatifleştiği bölümde ise farkın neredeyse sıfıra indiği gözlenir. Sabit kriterler oluşturmak için:

1. Bir üst dilüsyonun ölçüm sonucuna göre farkın 10 pikselden büyük olması (pozitif).

2. Bir üst dilüsyonun ölçüm sonucuna göre farkın 5 pikselden küçük olması (belirsiz).

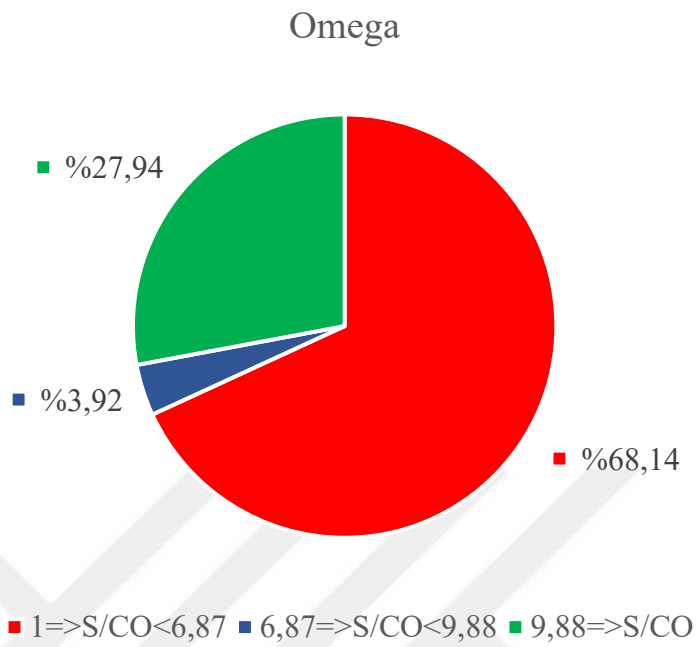
3. Bir üst dilüsyonun ölçüm sonucuna göre farkın 1 pikselden küçük olması (negatif).

Kalitatif ve kantitatif ölçüm için oluşturulan üçer maddelerle pozitif, belirsiz ve negatif tanımlanırsa, Omega marka TPHA için S/CO≥9,88 üzeri pozitif, S/CO=6,87-9,88 arasında belirsiz, S/CO<6,87'den küçük negatif olarak görülmektedir. Spinreact marka TPHA için S/CO≥4,70 üzeri pozitif, S/CO=3,44-4,70 arasında belirsiz, S/CO<3,44'den küçük kişi negatiftir. Serodia marka TPPA için S/CO≥2,36 üzeri olan pozitif, S/CO=1,29-2,36 arasında olan belirsiz, S/CO<1,77'den küçük olan negatif olarak görülmektedir.

Bu değerler, görsel test değerlendirmesinde objektif değerler olarak kullanılmıştır.

4.5.4. Halka Ölçümünde Elde Edilen Sonuçların Veri Tabanına Uygulanması

Halka çapları ölçülerek ve objektif test değerlendirme kriterleri belirlenerek, 3 Ocak 2014-4 Temmuz 2018 tarihleri arasında ARCHITECT Syphilis TP ile elde edilen 204 sonucun T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Bankasına ait veriler tekrar değerlendirildi. Bu değerlendirmenin sonuçları Şekil 39, 40 ve 41'de gösterilmektedir.

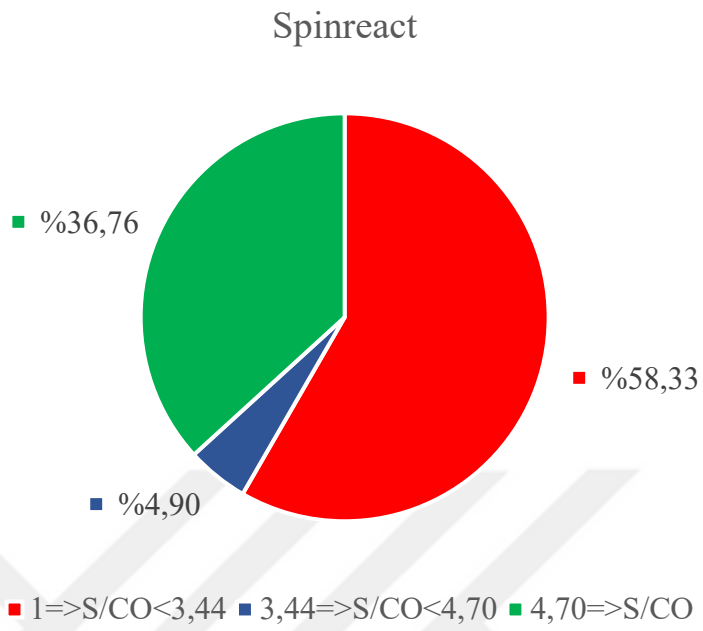


Şekil 39. Belirlenen objektif test değerlendirme kriterlerine göre Omega marka TPHA'nın kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Omega marka TPHA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥9,88 üzeri olan 57 kişi (%27,94) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=6,87-9,88 arasında olan 8 kişi (%3,92) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<6,87'den küçük olan 139 kişi (%68,14) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Omega marka TPHA testi gerçek pozitif olmasına rağmen donörlerin %68,14'üne negatif sonuç verebilir, %3.92'sine belirsiz sonuç verirken yalnızca %27.94'üne pozitif sonuç verebilir.

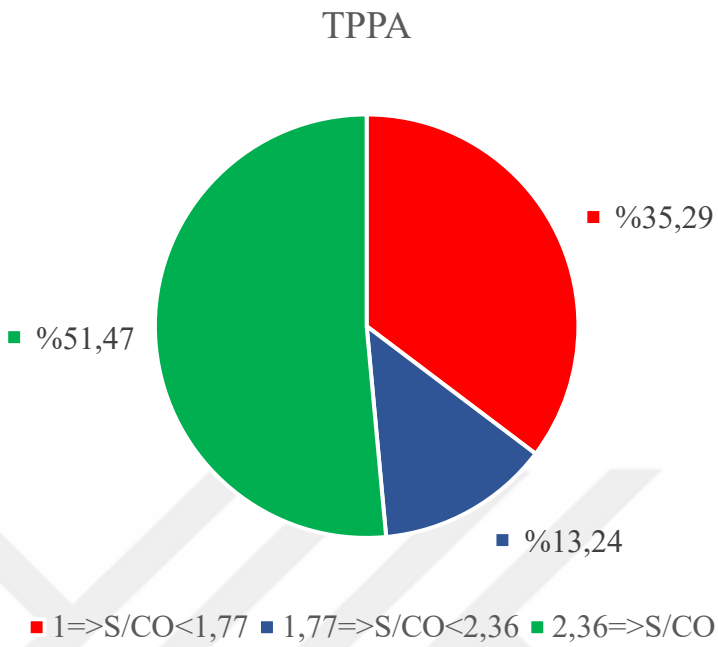


Şekil 40.Belirlenen objektif test değerlendirme kriterlerine göre Spinreact marka TPHA'nın kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Spinreact marka TPHA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥4,70 üzeri olan 75 kişi (%36,76) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=3,44-4,70 arasında olan 10 kişi (%4,90) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<3,44'den küçük olan 119 kişi (%58,33) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Spinreact marka TPHA testi gerçek pozitif olan donörlerin dahi %58,33'üne negatif sonuç verecek, %4,90'ına belirsiz ve yalnızca %36,76'sına pozitif sonuç verebilecektir.



Şekil 41. Belirlenen objektif test değerlendirme kriterlerine göre TPPA çalışmasının kan bankasına verilerine uyarlanması.

Doğrulama testi olarak Serodia marka TPPA'nın analitik duyarlılık düzeylerine göre donörler gruplandırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

- S/CO değeri S/CO≥2,36 üzeri olan 105 kişi (%51,47) pozitif olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO=1,77-2,36 arasında olan 27 kişi (%13,24) belirsiz olarak sınıflandırılır.
- S/CO değeri S/CO<1,77'den küçük olan 72 kişi (%35,29) negatif olarak sınıflandırılır.

Bu sonuçlara göre, Serodia marka TPPA testi gerçek pozitif olan donörlerin dahi %35,29'una negatif sonuç verecek, %13,24'üne belirsiz ve yalnızca %51,47'sine pozitif sonuç verebilecektir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Sifiliz tanısı, hastanın öyküsü, klinik bulguları ve serolojik test sonuçlarının bir arada değerlendirilmesiyle konulur. Serolojik testler treponemal ve nontreponemal olarak sınıflandırılır ve her iki test yönteminin de tarama testi olarak kullanılması halen farklı tanı algoritmaları tarafından önerilmektedir (3,4,6,148–150).

Günümüzde yüksek kapasiteli otomatize treponemal EIA ve CMIA yöntemleri, kan donörleri ve diğer asemptomatik popülasyonun taranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılığı genellikle nontreponemal testlere göre sifilizin erken dönemlerinde daha iyidir. Ancak düşük prevalanslı toplumlarda bu testlerle yanlış pozitif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle, tanı algoritmalarında EIA ve CMIA yöntemleriyle saptanan pozitifliklerin farklı teknikte hazırlanmış testlerle doğrulanması önerilmektedir (2,148–150).

TPHA ve TPPA testleri, EIA ve CMIA pozitif sonuçların doğrulanmasında önerilen başlıca yöntemlerdir (148–150). TPHA ucuz ve farklı ticari firmalarca üretilebilen bir test yöntemidir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. TPPA ise görece pahalı ve tek bir firma tarafından üretilen bir testtir, bu nedenle sınırlı sayıda laboratuvar tarafından kullanılabilmektedir.

Çeşitli çalışmalarda, her iki testin de yüksek pozitif örneklerin doğrulanmasında başarılı olduğu ve genellikle yüksek pozitif değerlerin ikinci bir testle doğrulanmasının gerekli olmadığı belirtilmiştir (7,169–174). Bu çalışmalarda, TPHA ve TPPA testlerinin tespit edebildiği en düşük S/CO değerleri de bildirilmiştir. Ancak, bildirilen değerler, sınırlı sayıda hasta örneği üzerinde antikor düzeylerine dayanarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise TPHA ve TPPA testlerinin analitik duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak, gerçek pozitif örnekler S/CO değerleri negatif hale gelene kadar diliüe edilmiş ve bu testlerle çalışılarak analitik duyarlılıkları belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan CMIA, TPHA ve TPPA testlerinin analitik duyarlılığını değerlendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Cole ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 114 sifiliz hastası ve

rastgele seçilen 249 kan donörünün serum örneklerini on farklı EIA, dört farklı TPHA ve bir TPPA testi içeren 15 farklı treponemal testle çalışarak testlerin performansını araştırmışlardır. Dört farklı ticari TPHA testinin duyarlılığını %93,9 ile %97,3 arasında, TPPA'nın duyarlılığını ise %99,1 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar, bir ticari TPHA testinin pozitif olan birçok örneğe negatif sonuç verdiğini, aynı örnekleri testin farklı lot numaralarıyla çalıştıklarında ise pozitif sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu sorunun ilgili testin üretim aşamasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca, TPHA'nın inkübasyon süresi boyunca aglütinasyon paterninde değişiklikler olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra, test sonuçlarının değerlendirilmesinde TPPA'nın TPHA'ya göre daha başarılı olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacıların sonucu, tanı algoritmalarında ikinci bir test olarak TPHA'nın önerilmesine rağmen, TPPA'nın kullanılmasını gerektirmiştir (9). Çalışmamızda da bu makalede belirtildiği gibi TPHA testlerinin duyarlılığında markadan markaya farklılık olduğunu gözlemledik. Bu durum özellikle düşük pozitif CMIA sonuçlarının TPHA ile doğrulanmasında sorun olabileceğini düşündürmektedir.

Özbek ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında, 2007-2010 arasında CMIA ile taranan 12.195 örnek içinde RPR pozitif çıkan 206 hasta örneği ve RPR negatif çıkan 92 örnekte Omega marka TPHA testinin performansını ikinci test olarak değerlendirmişlerdir. S/CO oranları açısından karşılaştırdıklarında, S/CO=1-5,99 arasında TPHA sonucunu 51 hastada negatif, sekiz hastada pozitif bulmuşlardır. TPHA sonucu S/CO=6-11,99 arasındaki dört hastada negatif, beş hastada ise pozitif çıkmıştır. Çalışmalarında, S/CO≥12'den büyük olan 24 hastanın tamamında TPHA pozitif sonuç vermiştir. Özbek ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları Omega marka TPHA'nın S/CO=1,0–2,0 arasında negatifleştiğini bildirmektedirler. CMIA ve TPHA ile karşılaştırdıkları tüm örnekler RPR negatif olduğu için hastaların klinik verilerinden bahsetmemişlerdir. Bu nedenle TPHA negatif örneklerin CMIA yalancı pozitif olduğu sonucuna varmaktadırlar. Bu görüşlerini, üç hafta arayla test tekrarı istedikleri 15 hastadan hiçbirinin TPHA testinin pozitifleşmediği ve 2 hastanın CMIA sonucunun negatifleştiğine dayandırmaktadırlar (169).

Sommese ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları çalışmalarında, CMIA ile pozitif sonuç veren örneklerin doğrulanmasında ikinci bir test olarak immünoblot yöntemi ve Omega marka TPHA testinin performansını karşılaştırmışlardır. Çalışmaya ileriye yönelik olarak 4572 kan donörü dahil edilmiştir. Sommese ve arkadaşları, Omega marka TPHA testinin pozitiflik verdiği en düşük S/CO değerini S/CO=5,63 olarak bulmuşlardır (175).

Sommese ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, yeni geliştirilen bir CMIA testi, 2015 yılında kullandıkları CMIA testi ile karşılaştırılmıştır (2016 yılı (175) numaralı referans). Aynı immünoblot ve Omega marka TPHA testi ikinci treponemal test olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, CMIA S/CO değeri S/CO=3,49 olan bir hastanın immünoblot ve TPHA (1/160 dilüsyonda) testleri pozitif bulunmuştur (176).

Akçakanat ve arkadaşlarının 2018 yılında yayınladıkları çalışmada, kan donörlerini taramada kullanılan CMIA testi ile pozitif saptanan örneklerin ikinci bir treponemal testle doğrulanmaya gerek kalmadan, hastaların %95'inin sifiliz hastası olduğunu belirleyebilecek asgari S/CO oranını belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmaya dahil ettikleri 177 CMIA pozitif örneği doğrulamak için immünoblot yöntemini kullanmışlardır. Ayrıca, aynı örneklerle Omega marka TPHA ve RPR testlerini de çalışmışlardır. İmmünoblot pozitif olarak tespit edilen 65 hastanın beşinde TPHA negatif sonuç elde etmişlerdir. Bu beş hastanın ikisinde CMIA S/CO oranları S/CO=2,49 ve S/CO=3,08 olanları immünoblot ile IgM ve IgG birlikte pozitif bulmuşlardır. Diğer üç hastada ise S/CO oranları sırasıyla S/CO=1,73, S/CO=12,83 ve S/CO=17,00 olanlarda tek başına IgG pozitifliği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, immünoblot negatif ve TPHA pozitif sonuç elde edilen beş hastanın S/CO değerlerinin S/CO=3,24-11,54 arasında olduğunu bildirmişlerdir. TPHA'nın pozitif olarak tespit edildiği en düşük S/CO oranı S/CO=3,1 olarak bulunmuştur. Bu nedenle, S/CO<3 olan CMIA örneklerinin TPHA ile doğrulanmamasını önerilmiştir. Akçakanat ve arkadaşlarının bildirdiği Omega marka TPHA için en düşük CMIA S/CO değeri Sommese ve arkadaşlarının bildirdiği S/CO=3,49 değerine çok yakındır. Ancak her iki çalışmada da TPHA ile pozitif sonuç alınan ve en düşük S/CO değerlerine sahip olan hastaların klinik bulguları hakkında bilgi bulunmamaktadır (170,176).

Yürüyen ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları çalışmada, tanı algoritmalarında önerilen ikinci bir treponemal doğrulama testi kullanmadan CMIA ile %100 doğrulukla tanı koyulabilecek S/CO değerini araştırmışlardır. Çalışmaya, Plasmatec TPHA ile çalışılan 2002 CMIA pozitif örneği dahil etmişlerdir. S/CO değeri S/CO=5,26 üzeri olan örneklerin %85'inde ve S/CO değeri S/CO≥27,83 üzeri olan örneklerin %100'ünde ikinci bir treponemal test kullanmadan sifiliz tanısı koyulabileceğini bulmuşlardır. TPHA'nın negatif sonuç verdiği örneklerin ortanca değerini S/CO=2,08 olarak bildirmişlerdir (birinci çeyreklik S/CO=1,46, üçüncü çeyreklik S/CO=3,48) (171).

Demir Çuha ve arkadaşlarının 2022 yılında yayınladıkları çalışmada, tanısal algoritmanın maliyet açısından doğrulama testinin gerekliliğini değerlendirdi. CMIA testini tarama testi olarak kullandıkları durumda, hangi S/CO eşik değerinin üzerindeki sonuçların doğrulama testi yapmadan sifiliz tanısı alabileceğini araştırdılar. 2247 pozitif örneğin 1747'sinin (%70,8) S/CO değeri S/CO≥10,4'ten büyük bulundu. Özgüllüğü %95 olan örneklerin S/CO değeri S/CO≥7,2 ve %100 özgüllüğe sahip örneklerin S/CO değeri S/CO≥10,4 olarak belirlendi. 75 örneklik bir alt grupta 62 örneğin FTA-Abs ile pozitif bulundu, bunlardan 24'ünün S/CO değeri <10,4 ve TPHA ile RPR sonuçları negatifti. CMIA sonucu S/CO değeri S/CO≥10,4 olan örneklerin doğrulama için yeterli olduğu sonucuna vardılar ve daha yüksek değerlerde doğrulama yapma ihtiyacını tartıştılar. Ancak bu değerden daha düşük riskli hastaların örneklerinde doğrulama testi kullanılması gerektiğini belirttiler. Çalışmalarında hangi marka TPHA kullandıklarına dair bilgi verilmemiştir, bu durum çok merkezli bir çalışma olmasından kaynaklanabilir ve her bir merkezin farklı marka TPHA testi kullanmış olabilir (7).

Mo ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada, geliştirilen bir EIA ile TRUST ve TPPA kullanarak performansı araştırılmıştır. Her ne kadar çalışmamızda kullanılan CMIA'nın S/CO değerleri ile bu EIA'yı karşılaştırmak mümkün olmasa da, bulgularında kullandıkları EIA testin negatif, ancak TPPA testinin belirsiz sonuç verdiği iki örneğin Omega marka TPHA'da negatif olduğunu belirtmişlerdir. Bir diğer verileri düşük pozitiflikte (S/CO=1,21-3,45) latent olan dört

ve tedavi edilmiş olan iki sifiliz olgusu dışında TPPA testinin 1:80 dilüsyonunda da pozitiflik verdiğini ifade etmektedirler (177).

Hunter ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, CMIA sonuçlarının klinik anlamını araştırdılar ve CMIA sonucunun tek başına tanı koydurucu olmadığını ve RPR sonucunu öngörmekte kullanılamayacağını bulmuşlardır. 1171 CMIA sonucu, FTAbs, TPPA ve klinik bilgilerin karşılaştırıldığı bu çalışmada, TPPA'nın pozitiflik verdiği en düşük S/CO değeri S/CO=1,48'dir (1:80 dilüsyonunda) (178).

Lee ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, ters algoritmanın tanısal performansını araştırdılar. Tarama testi olarak CMIA ve doğrulama testi olarak TPPA'yı kullanarak özellikle birbiriyle uyumsuz serum örneklerini incelediler. Çalışmalarında istatistiksel analizler yaparak CMIA ve TPPA testlerinin ROC analizini gerçekleştirdiler ve TPPA'nın en etkili olduğu eşik değeri araştırdılar. Elde ettikleri sonuç, TPPA ile doğrulama yapıldığında kullanılması gereken en düşük S/CO eşik değerinin S/CO=3,1 olduğunu gösterdi. Bu değerin altında test tekrarının gerektiğini ve yanlış pozitif sonuçların olabileceğini belirttiler (179).

Dai ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, S/CO değerine göre tarama algoritmasını geliştirmeyi araştırmışlardır. Çalışmalarında, 47 TPPA testi negatif olan örneğin aralığı S/CO=1,02-9,8 ve TPPA testi pozitif olan 272 örneğin aralığı S/CO=1,21-41,26 olarak bulmuşlardır. Negatif ve pozitif örneklerin ortanca değerleri arasında büyük bir fark olduğunu hesaplamışlardır. Negatif sonuçlar için ortanca S/CO=1,7 ve pozitif sonuçlar için ortanca S/CO=19'dur. S/CO<9,9'dan küçük sonuçlar için TPPA testi ile doğrulama yapılmasını önermektedirler (172).

Liu ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınladıkları çalışmada, ev yapımı bir EIA geliştirip performansını TPPA ve Architect Syphilis TP ile karşılaştırmışlardır. 1052 serum örneğinde her üç testin uyumsuz sonuç verdiği altı örnek bulunmuştur. Bu örneklerin tamamı S/CO<5'ten küçük olduğunu ifade etmektedirler. Bu altı örneğin verisi incelendiğinde S/CO=0,53'te TPPA testin zayıf pozitiflik ve S/CO=1,17 ve S/CO=3,32'de TPPA testin negatif olduğu görülmektedir (180).

Jonckheere ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınladıkları çalışmada, Architect Syphilis TP pozitif olan ve RPR negatif olan 178 serum örneğinde yedi treponemal testin performansını araştırmışlardır. Çalışmalarında, TPPA testin ortalama negatif olduğu sonuç S/CO=2,51, pozitif olduğu ortalama sonuç S/CO=7,82 olarak bildirilmiştir (181).

Boonchaoy ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, gebelerde CMIA performansını araştırmışlardır. 65 CMIA pozitif çıkan sonuçlardan yedi hastanın RPR ve TPPA sonucu da pozitif bulunmuştur. RPR negatif olan 58 hastanın 35'inin TPPA sonucu da negatif olarak bulunmuştur. Bu 35 hastanın ilk CMIA sonucunun yanlış pozitiflik olduğunu belirtmektedirler. Kalan RPR negatif, TPPA pozitif olan 23 hastanın 7'si daha önce sifiliz tedavisi almış ve diğerleri tedavi edilmemiş veya latent olarak kabul edilmiştir. Bu 16 gebelerin sonuçları S/CO=1,56-40,71 aralığındadır ve ortanca sonuç S/CO=2,86'dır. Gebe kadınlarda CMIA sonucu S/CO=1,5 üzeri pozitif olarak kabul edilmesi gerektiğini önermektedirler ve bu da yanlış pozitiflik oranını %60,3'ten %37,8'e düşürdüğünü ifade etmektedirler (182).

Li ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, sifiliz taramasında CMIA performansını ve uyumsuz sonuçlarla ilgili araştırma yapmışlardır. TPPA ve CMIA sonuçlarını S/CO değerlerine göre kategorize ederek karşılaştırmışlardır. S/CO≥10 ve üzerinde %100 uyum gözlenmiştir. S/CO=6-9,99 arasında %91,2'si, S/CO=3-5,99 arasında %60,5'i, S/CO=1-2,99 arasında ise örneklerin %14,3'ü uyumlu bulunmuştur. %30,7'sini temsil eden 82 CMIA pozitif örnek TPPA negatif olarak raporlanmıştır. Bu negatif örneklerden ikisi RPR pozitif bulunmuştur. Bu farklılığı immünoblot ile araştırdıklarında %19,5'i pozitif (n=16), %34,2'si belirsiz (n=28) ve %46,3'ü negatif (n=38) bulunmuştur. Bu 82 örneğin sonuçları S/CO=1,12-9,87 arasındadır. 16 pozitif örnekten sadece beşinin sifiliz geçmişi vardır. Kalan üçü gebe ve sekizinin kardiyovasküler ya da kronik böbrek rahatsızlığı vardır. 38 immünoblot negatif sonuçlardan 15'i gebe, dokuzunun tümörü var, yedisinin otoimmün hastalığı ve yedisi de sistiti olan yaşlı hasta olarak ifade edilmiştir. Bu bulgular üzerine 38 örnek CMIA yanlış pozitiflik olarak değerlendirilmiştir (173).

Wang ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, Çin için uygun tanı algoritmasını araştırmışlardır. Çalışmalarında, TPPA, CMIA ve RPR test

sonuçlarını karşılaştırmışlardır. CMIA testi pozitif olan ve RPR ve TPPA testlerinin pozitif veya negatif olduğu 18 örneği immünoblot ile incelemişlerdir. Buna göre; TPPA pozitif olduğu yedi örnek immünoblotta da pozitif bulunmuştur. TPPA negatif olup CMIA pozitif olan 11 örnek ise immünoblotta da negatif bulunmuştur. Bu 11 örnek CMIA yanlış pozitiflik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarında toplam 80 CMIA testin yanlış pozitiflik verdiğini bulmuşlardır. Yanlış pozitiflikleri değerlendirdiklerinde bu 80 örneğin 30'unun gebe ve kalanın geriatrik, tümörü olan hasta, otoimmün hastalığı olan hastalar, diyaliz hastası ve diğer hastalıklar arasında dağıldığını ifade etmişlerdir. Wang ve arkadaşları TPPA testi ve klinik bulguları altın standart olarak kabul ettikleri verileri CMIA ile S/CO sonuçları kategorize ederek incelemişlerdir. Ayrıca, TPPA ile klinik verilerin %100 uyumlu olduğunu göstermişlerdir. S/CO=1-2,99 arasında CMIA gerçek pozitiflik %27,27, S/CO=3-5,99 arasında %66,67, S/CO=6-9,99 arasında %92,3, S/CO≥10 ve üzeri olan sonuçlarda ise %100 olarak bulunmuştur. S/CO=1-3 arasındaki örneklerin daha fazla dikkat gösterilmesi gerektiğini tartışmışlardır. Bu aralıkta preoperatif ve deri ve zührevi hastalıklarında yatan hastaların gerçek pozitiflik oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla %46,4 ve %36,7). Ancak yine bu aralıkta sonuçların gebelere ait 30 örneğin tamamında CMIA testinin yanlış pozitif verdiği belirtilerek, her ne olursa olsun S/CO≥1'den büyük tüm sonuçların doğrulanması gerektiği ve TPPA eşliğinde RPR kullanarak doğrulanmasının önerildiği ifade edilmiştir (174).

Murai ve arkadaşlarının 2018 yılında yayınladıkları çalışmada, Mediace TPLA testini diğer treponemal testlerle performansını araştırmışlardır. Üç olguda testler arasında uyumsuzluk bulmuşlardır. Architect Syphilis TP testinde düşük pozitiflikte olan bu üç olguda S/CO=2,52 ve S/CO=0,85 olan örneklerin FTA-Abs testi de pozitif, S/CO=0,52 sonucu olan örneğin FTA-Abs testi ise negatif olarak bulunmuştur. Bu üç olgunun TPPA test sonucu negatif olarak bildirilmiştir (183).

Peng ve arkadaşlarının 2018 yılında yayınladıkları çalışmada, prospektif olarak 119,891 serum örneği üzerinde CDC ve ECDC tarafından önerilen iki tanı performansını karşılaştırmışlardır ve çalışma sonucunda ECDC'nin CDC algoritması ile tanı sonuçlarının %99,996 oranında uyumlu olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, TPPA testinin analitik performansını da araştırmışlardır. Bu analizi, serum örneklerinin seri

dilüsyonlarında incelemişlerdir. Seri dilüe edilen 20 sifiliz pozitif serum örneğinden 19'unun TPPA testi tarafından pozitif bulunduğunu ve oldukça düşük CMIA sonuçlarında (S/CO=1,00-1,10) TPPA testinin CMIA testine göre daha düşük analitik duyarlılığa sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmalarında gösterdikleri dört ayrı seri dilüyonda serum örneğinin ayrıntılı verisine bakıldığında, TPPA testinin hasta 1 için S/CO=1,00'de negatif, S/CO=1,64'te belirsiz, S/CO=2,04 ve üzerinde pozitif sonuç verdiğini, hasta 2 için S/CO=1,02'de negatif, S/CO=1,95'te pozitif, hasta 3 için S/CO=0,55'te negatif, S/CO=1,08'de belirsiz, S/CO=2,22 ve üzerinde pozitif sonuç verdiğini ve hasta 4 için S/CO=0,15'te negatif, S/CO=0,38 ve üzerinde pozitif sonuç saptandığını ifade etmişlerdir. Ancak, çalışmada kullandıkları seri dilüyentten bahsetmemişlerdir (184).

Liang ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları çalışmada, Architect Syphilis TP ile Lumipulse anti-Treponema pallidum testlerin performanslarını seçilmiş 223 pozitif ve 1041 negatif serum örneğinde TPPA testini altın standart olarak kullanarak araştırmışlardır. TPPA ile karşılaştırıldığında Architect Syphilis TP'nin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %99,14; Lumipulse anti-Treponema pallidum'un duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Yanlış pozitiflik oranı ise Lumipulse anti-Treponema pallidum için %0 ve Architect Syphilis TP için %0,86 (n=9) bulunmuştur. Architect Syphilis TP'nin yanlış pozitiflik verdiği sonuçlar S/CO=1,14-2,23 arasındadır. Sunulan verilerde, pozitiflik olan en düşük S/CO değeri S/CO=2,2 (TPPA; 1/160) ve S/CO=2,41'dir (TPPA; 1/320). Her iki değere ait örneklerin immünoblot sonucunda Tp15-17 IgM pozitifliği, ESPLINE TP ise birinci örneğin Tpn47, Tp15-17 +1 pozitifliği, ikinci örneğin ise Tp15-17 +2 pozitifliği olarak saptanmıştır. Bu örneklerin erken dönem sifiliz vakaları olabileceğini belirtmektedirler (185).

Ji ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları çalışmada, Roche ECMIA ile Architect Syphilis TP testin performansını karşılaştırmışlardır. Doğrulama testi olarak immunoblot ve TPPA testi kullanmışlardır. Sonuçlarını S/CO değerlerine göre kategorize ederek göstermişlerdir. Sonuçları S/CO=1-2,99 aralığında olan örneklerin %98,07'si (n=74, (+)=66, (±)=2, (-)=6) TPPA testi ile pozitif olarak bulunmuştur. Sonuçları S/CO=3-5,99 arasında olan örneklerin %99,75'i (n=70, (+)=69, (±)=0, (-)=1)

TPPA testi ile pozitif bulunmuştur. Sonuçları S/CO≥6 ve üzeri olan örneklerin tamamı (n=323, (+)=323, (±)=0, (-)=0) TPPA testi ile pozitif bulunmuştur (186).

Günümüzde sifiliz tanı algoritmaları, birçok araştırmada retrospektif ve prospektif olarak çeşitli EIA, CMIA, TPHA ve TPPA testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır (7,9,169–186). Bu çalışmaların temel amacı, mevcut durumu değerlendirmek ve geliştirilen yeni testlerin performansını araştırmaktır. Çalışmalarda kullanılan hasta örnekleri, otomatize testlerin pozitif sonuç verdiği örneklerdir ve düşük pozitiflik durumunu, bir çalışma hariç, (184) özel olarak araştırmamışlardır. Bununla birlikte, düşük pozitiflik durumunda TPHA'nın ikinci bir treponemal test olarak yerini tartışmamışlardır (7,9,169–171,175,176).

Her ne kadar çalışmamıza az sayıda hasta dahil edilmiş olması bir kısıtlılık olsa da, bulgularımızda da görüldüğü gibi seri dilüsyon ile hazırlanan örnekler gerçek hayat senaryolarında elde edilebilecek S/CO değerlerine sahiptir. Bu nedenle her bir dilüe edilmiş serum örneği bir hasta örneği gibi değerlendirilip çalışıldı. Bu çalışma örnekleri, Özbek, Akçakanat, Yürüyen, Demir Çuha ve diğer araştırmacıların çalışmalarına göre CMIA S/CO≥12'den büyük olup doğrulama testi kullanmadan %100 kesin tanı alması gereken ve yine Sommese, Özbek, Akçakanat, Yürüyen, Demir Çuha ve diğer araştırmacıların çalışmalarına göre TPHA S/CO≥6'dan büyük olup TPHA ile doğrulanabilecek, S/CO≤3'ten küçük olup TPHA ile doğrulanamayacak örneklerden oluşmaktadır, (7,169–171,175) Hunter, Lee, Mo, Dai, Liu, Jonckheere, Boonchaoy, Li, Wang, Murai, Peng, Liang, Ji ve arkadaşlarının çalışmalarına göre ise TPPA için S/CO≥3,1'den büyük olup doğrulanacak, S/CO≤1,49 altında olup negatif sonuçla doğrulanamayacak örneklerden oluşmaktadır (172–174,177–186).

TPHA testleri arasında sonuç farklılıkları gözlenmiştir. Bu durum, ticari olarak üretilen testlerin firma tarafından kullanılan antijen ve test kitinin üretim aşaması, partiler arasında farklılık ve depolama sürecinde oluşabilecek aksaklıklar nedeniyle ortaya çıkabilir (9). Ayrıca, hastalar bir testte serokonversiyon geçirirken diğer testte bu serokonversiyon daha geç gerçekleşebilir. Bunun yanında, TPHA ve TPPA testlerinde sonike edilmiş bütün bakteriye ait antijenler bulunmaktadır. Otomatize testlerde ise rekombinant antijen kullanılıyor ve bu antijenlerin TPHA ve TPPA'da

kullanılan sonike edilen bakteri antijenlerinden daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca, her bireyin antijenlere farklı tepkiler verdiği ve bu da testler arasında uyumsuzluğa neden olabileceği literatürde tartışılmaktadır (9,170,176,177,180,184).

Çalışmamıza dahil edilen hastaların tamamı bu çalışmada kullanılan testlerin tümünde serokonversiyon geçirmiş hastalardır. Çalışmanın tasarımı, yüksek pozitif serumları dilüe ederek araştırılması üzerine kuruludur. Bu nedenle dilüe etmeye gerek kalmayacak gerçek düşük pozitif serumlar dahil edilmemiştir.

Bütün bu değişkenleri dikkate aldığımızda TPHA'yı doğrulama testi olarak kullanacak laboratuvarların testin verifikasyon çalışmalarında, bu çalışmada olduğu gibi, gerçek pozitif bir serum setinin dilüsyonu ile testin analitik duyarlılığını saptamalarını önermekteyiz.

Peng ve arkadaşları, bu çalışmada olduğu gibi, seri dilüsyon ile serum seti hazırlamışlardır. 20 hastadan oluşan sette, 19 hastanın dilüsyonlarını TPPA ile çalışmışlar ve dört hastaya ait düşük pozitiflikteki TPPA sonuçlarını bildirmişlerdir. Çalışmamız, Peng ve arkadaşlarının bildirdiği sonuçlar ile uyumludur. Ancak çalışmada kullanılan dilüentin ne olduğundan bahsedilmemektedir (184). Dilüentin, sonuçlarda ne gibi bir farklılığa neden olabileceği bu tez çalışmasında araştırılmamıştır. Kalite kontrol için serum seti hazırlanması planlandığında, dilüentinin test sonuçlarına ne kadar etki edebileceği bir araştırma konusudur. Bu tez çalışmasına dahil edilen sağlıklı gönüllüye, testleri etkileyebilecek biyokimyasal ve serolojik ölçümler yapılmış ve serumları dilüent olarak kullanılmıştır (180).

Araştırmacılar, bu çalışmada TPHA ve TPPA test sonuçlarını makroskopik olarak değerlendirdiklerinde, üretici firmanın ürün kılavuzlarında belirtilen test değerlendirme kriterlerine göre; Omega marka TPHA için S/CO≥9,88'in üzerinde pozitif, S/CO=6,87-9,88 arasında belirsiz ve S/CO<6,87'nin altında negatif sonuç verdiği; Spinreact marka TPHA için S/CO≥6,87'nin üzerinde pozitif, S/CO=6,87-3,44 arasında belirsiz ve S/CO<3,44 altında negatif sonuç verdiği; TPPA için S/CO≥3,44 üzerinde pozitif, S/CO=1,77-3,44 arasında belirsiz ve S/CO<1,77 altında negatif sonuç verdiği bulunmuştur. Bu test sonuçlarının eşik değerleri, literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (7,169–186).

TPHA ve TPPA test sonuçları makroskopik olarak değerlendirilmektedir ve bu nedenle uzmanlar arasında değerlendirme farklılıkları olabilir (9). Bu durumu dikkate alarak elde edilen sonuçlar 15 uzman tıbbi mikrobiyoloğa gönderilmiş ve değerlendirilmeleri istenmiştir. Bu değerlendiricilerin verdiği yanıtlar yüzdesel olarak hesaplanmış ve ilgili test sonucu çoğunluğa göre belirlenmiştir. Buna göre; Omega marka TPHA için S/CO≥11,91 üzeri, Spinreact marka TPHA için S/CO≥4,70 üzeri, TPPA testi için S/CO≥2,36 üzeri tüm sonuçlar pozitiftir ve CMIA sonuçları bu testlerle doğrulanabilir. Test tekrarı gerektiren belirsiz aralıklar şu şekildedir: Omega marka TPHA için S/CO=4,70-11,91, Spinreact marka TPHA için S/CO=2,36-4,70, TPPA testi için S/CO=1,19-2,36 aralığı. Negatif sonuç raporlanması gereken alt eşikler ise şunlardır: Omega marka TPHA için S/CO<4,70, Spinreact marka TPHA için S/CO<2,36, TPPA testi için S/CO<1,19. Bu test eşikleri, uzman değerlendiricilerin yanıtlarına göre belirlenmiş olup literatürle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (7,169–186).

Ayrı günlerde yapılan dört kez test çalışmasında, test içi varyasyonların uyumlu ve kabul edilebilir bir standart sapma değerinde olduğu görülmüştür. Bu nedenle, objektif test sonuç kriterleri belirlenmiştir. TPHA ve TPPA testlerinin halka çapları ölçülerek değerlendirildiği bu kriterlere göre; Omega marka TPHA için S/CO≥9,88 üzeri, Spinreact marka TPHA için S/CO≥4,70 üzeri, TPPA testi için S/CO≥2,36 üzeri tüm sonuçlar pozitiftir ve CMIA sonuçları bu testlerle doğrulanabilir. Test tekrarı gerektiren belirsiz aralıklar şu şekildedir: Omega marka TPHA için S/CO=6,87-9,88, Spinreact marka TPHA için S/CO=3,44-4,70, TPPA testi için S/CO=1,29-2,36 aralığı. Negatif sonuç raporlanması gereken alt eşikler ise şunlardır: Omega marka TPHA için S/CO<6,87, Spinreact marka TPHA için S/CO<3,44, TPPA testi için S/CO<1,29. Bu objektif kriterlere göre belirlenen test eşikleri de literatürle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (7,169–186).

Omega marka TPHA'nın pozitif sonuç vereceği bir hastanın CMIA sonucunun S/CO≥12'den büyük olması beklenir, bu nedenle bu eşik değerden daha yüksek bir CMIA sonucuyla hastaların %95-100'ünden fazlasına zaten tanı konulabilir (169–171). Bu nedenle, bu marka TPHA'nın sadece güçlü bir CMIA sonucu ve klinik uyumsuzluk durumunda doğrulama amacıyla kullanılması önerilmektedir. Spinreact

marka TPHA sonuçları, CMIA sonuçlarıyla karşılaştırıldığında literatürle uyumlu duyarlılık göstermektedir ve S/CO≥6'dan büyük tüm CMIA sonuçları doğrulama için uygundur. Ancak, bu eşik değerin altında olan örneklerin pozitif olmaması durumunda, S/CO≥3,1'den büyükse testin tekrarlanması gerekmekte ve olası bir serokonversiyon durumunda hastanın üç hafta sonra yeniden test edilmesi gerektiği düşünülmelidir (169–171,175,184). TPPA sonuçları, literatürle uyumlu olarak değerlendirilmekte olup, S/CO=3,44 olan bir CMIA sonucunun doğrulama için gerekliliğini gösterirken, daha yüksek değerler yüksek duyarlılık ve özgüllükle tanı koydurucu niteliktedir ve günümüzde tanısal algoritmalarda doğrulama için ikinci bir treponemal test olarak önerilmektedir (9,172–174,177–182,184–186).

T.C. Dokuz Eylül Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin kan bankasında yapılan CMIA taraması sonucunda, incelenen kan donörlerinin durumu şu şekildedir:

- S/CO oranı S/CO≥40'tan büyük olan 3 hasta %1,47'sini temsil etmektedir.
- S/CO oranı S/CO=30-40 arasında olan 5 hasta %2,45'ini temsil etmektedir.
- S/CO oranı S/CO=20-30 arasında olan 19 hasta %9,31'ini temsil etmektedir.
- S/CO oranı S/CO=10-20 arasında olan 29 hasta %14,22'sini temsil etmektedir.
- S/CO oranı S/CO=6-10 arasında olan 11 hasta %5,39'unu temsil etmektedir.
- S/CO oranı S/CO=3-6 arasında olan 23 hasta %11,27'sini temsil etmektedir.
- S/CO oranı S/CO<3'ün altında olan 114 hasta %55,88'ini temsil etmektedir.

Testlerden elde edilen sonuçlar, hastane sonuçlarının gerçek bir test popülasyonu olarak kabul edilirse; araştırmacılar tarafından test sonuçları değerlendirildiğinde, Omega marka TPHA için S/CO≥9,88 üzeri olan 57 kişi pozitif (%27,94), S/CO=6,87-9,88 arasında olan 8 kişi belirsiz (%3,92), S/CO<6,87'den küçük olan 139 kişi negatif (%68,14) olarak görülmektedir. Spinreact marka TPHA için S/CO≥6,87 üzeri olan 65 kişi pozitif (%31,86), S/CO=3,44-6,87 arasında olan 20 kişi belirsiz (%9,8), S/CO<3,44'den küçük olan 119 kişi negatif (%58,33) olarak görülmektedir. Serodia marka TPPA için S/CO≥3,44 üzeri olan 85 kişi pozitif (%41,67), S/CO=1,77-3,44

arasında olan 47 kişi belirsiz (%23,04), S/CO<1,77'den küçük olan 72 kişi negatif (%35,29) olarak görülmektedir.

Görsel test sonuçlarından elde edilen kriterlere göre; Omega marka TPHA için S/CO≥11,91 üzeri olan 49 kişi pozitif (%24,02), S/CO=4,70-11,91 arasında olan 26 kişi belirsiz (%12,75), S/CO<4,70'den küçük olan 129 kişi negatif (%63,24) olarak görülmektedir. Spinreact marka TPHA için S/CO≥4,70 üzeri olan 75 kişi pozitif (%36,76), S/CO=2,36-4,70 arasında olan 30 kişi belirsiz (%14,71), S/CO<2,36'den küçük olan 99 kişi negatif (%48,53) olarak görülmektedir. Serodia marka TPPA için S/CO≥2,36 üzeri olan 105 kişi pozitif (%51,47), S/CO=1,19-2,36 arasında olan 68 kişi belirsiz (%33,33), S/CO<1,29'den küçük olan 31 kişi negatif (%15,20) olarak görülmektedir.

Halka çaplarının değerlendirmesi sonucunda elde edilen test kriterlerine göre; Omega marka TPHA için S/CO≥9,88 üzeri olan 57 kişi pozitif (%27,94), S/CO=6,87-9,88 arasında olan 8 kişi belirsiz (%3,92), S/CO<6,87'den küçük olan 139 kişi negatif (%68,14) olarak görülmektedir. Spinreact marka TPHA için S/CO≥4,70 üzeri olan 75 kişi pozitif (%36,76), S/CO=3,44-4,70 arasında olan 10 kişi belirsiz (%4,90), S/CO<3,44'den küçük olan 119 kişi negatif (%58,33) olarak görülmektedir. Serodia marka TPPA için S/CO≥2,36 üzeri olan 105 kişi pozitif (%51,47), S/CO=1,29-2,36 arasında olan 27 kişi belirsiz (%13,24), S/CO<1,77'den küçük olan 72 kişi negatif (%35,29) olarak görülmektedir.

Araştırmacıların, uzmanların görsel test ve halka çapı ölçümlerine dayanan sonuçları dikkate alındığında, T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi popülasyonu için en uygun doğrulama testinin Spinreact marka TPHA veya TPPA testidir. Omega TPHA'nın kullanımı ise tartışmalıdır çünkü az sayıda S/CO≥12 sonucunun doğrulama testine ihtiyaç duymadan %100 gerçek pozitiflik göstermesi nedeniyle bu çalışmanın bulguları açısından uygunluğu sorgulanabilir.

Çalışmada, sifiliz tanısı almış iki hastanın CMIA sonuçları kuvvetli pozitif olduğu için bu hastaların örnekleri ile iki TPHA testi ve bir TPPA testinin performansı incelenmiştir. Çalışmanın kısıtlılıkları, sadece iki hastanın olması, sınırlı sayıda TPHA testinin kullanılması, ülkede düşük sifiliz yaygınlığı ve T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi

Araştırma ve Uygulama Hastanesinde sifiliz tanısı alan hastaların az sayıda olmasıdır. Bu nedenlerle hasta sayısı sınırlı kalmış ve birden fazla TPHA testi kullanılamamıştır.

Sonuç olarak, doğrulama testi olarak TPPA'nın kullanımı giderek yaygınlaşmakta, yüksek duyarlılık ve özgüllük nedeni ile tercih edilmektedir. Ancak hem Türkiye'de hem de dünya genelinde maliyetinin düşük olması nedeniyle, TPHA testi hala yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında, TPPA testi henüz yalnızca bir firma tarafından üretilmekte, buna karşın TPHA testi için alternatif birçok test üreticisi bulunmaktadır. Bu çalışma verilerine göre, TPHA testlerinin performansı üretici firmadan firmaya büyük değişkenlik göstermektedir. Bu performans değişkenliği CMIA yüksek pozitif örneklerin doğrulanmasında sorun yaratmazken, gerçek pozitif düşük S/CO'lu örneklerin TPHA testleri ile kaçırılması sonucunu doğurabilir. Böyle örneklerde TPPA kullanılması uygun olacaktır. Ayrıca, CMIA pozitif örneklerin doğrulanmasında TPHA kullanacak klinik mikrobiyoloji labortuvarlarının verifikasyon çalışmalarında bu çalışmada uygulandığı gibi dilüe edilmiş gerçek pozitif örneklerle testlerin analitik duyarlılıklarını saptaması gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Wasserheit J, Schünemann H, Garcia P, Adu-Sarkodie Y, Amato A, Bolan G, vd. WHO Guidelines for the Treatment of Treponema pallidum (Syphilis). 2016.
2. Morshed MG, Singh AE. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. Clinical and Vaccine Immunology. Şubat 2015;22(2).
3. Public Health England. Syphilis Serology. UK Standards for Microbiology Investigations. 14 Nisan 2015;44(2).
4. Public Health Agency of Canada. Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections. 2017.
5. Syphilis – Australian STI Management Guidelines [Internet]. [a.yer 12 Ocak 2018]. Erişim adresi: https://sti.guidelines.org.au/sexually-transmissible-infections/syphilis/
6. T.C. Sağlık BakanlığıTürkiye Halk Sağlığı KurumuBaşkanlığıMikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi [Internet]. 2014 [a.yer 13 Haziran 2021]. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_1.pdf
7. Demir Çuha M, Özdemir A, Evren K, Can B, Doyuk Z, Yiş R, vd. Correlation of Treponemal Chemiluminescent Microparticle Immunoassay Screening Test Signal Strength Values With Reactivity of Confirmatory Testing. Sex Transm Dis. Haziran 2022;49(6):453-7.
8. Park IU, Tran A, Pereira L, Fakile Y. Sensitivity and Specificity of Treponemal-specific Tests for the Diagnosis of Syphilis. Clinical Infectious Diseases. 24 Haziran 2020;71(Supplement_1).
9. Cole MJ, Perry KR, Parry J V. Comparative evaluation of 15 serological assays for the detection of syphilis infection. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 04 Eylül 2007;26(10).
10. Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock, editörler. Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. American Society of Microbiology; 2011.
11. Rothschild BM. History of Syphilis. Clinical Infectious Diseases. 15 Mayıs 2005;40(10).
12. Farhi D, Dupin N. Origins of syphilis and management in the immunocompetent patient: Facts and controversies. Clin Dermatol. Eylül 2010;28(5).
13. Türkiye üreme sağlığı programı, Ek V: Türkiye'de cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE) ve HIV/AIDS'in sürveyans sistemine ilişkin durum analizi. İlerleme raporu III. 2005.
14. Kılıç R. Türkiye'de Frenginin Tarihi. Kebikeç İnsan Bilimleri İçin Kaynak Araştırmaları Dergisi. 2014;0(38):291-305.

15. Kojima N, Klausner JD. An Update on the Global Epidemiology of Syphilis. Curr Epidemiol Rep. 19 Mart 2018;5(1).

16. Global Health Sector Strategy on Sexually Transmitted Infections 2016-2021. WHO; 2016.

17. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, vd. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. PLoS One. 08 Aralık 2015;10(12).

18. 9. European Centre for Disease Prevention and Control. Syphilis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020.

19. Kersh EN, Workowski KA. Evidence Review for Centers for Disease Control and Prevention Guidance Development on Laboratory Testing to Detect Treponema pallidum Infection (Syphilis). Clinical Infectious Diseases. 24 Haziran 2020;71(Supplement_1).

20. Choudhri Y, Miller J, Sandhu J, Leon A, Aho J. Infectious and congenital syphilis in Canada, 2010–2015. Canada Communicable Disease Report. 01 Şubat 2018;44(2).

21. Kirby Institute. HIV, viral hepatitis and sexually transmissible infections in Australia: annual surveillance report 2018. Sydney: Kirby Institute, UNSW Sydney; 2018.

22. T.C. Sağlık Bakanlığı - Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü - Bulaşıcı Hastalıklar ve Erken Uyarı Dairesi Başanlığı [Internet]. 2020 [a.yer 04 Haziran 2021]. Sifiliz İstatistik. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bulasici-hastaliklar/sifiliz/sifiliz-liste/sifiliz-istatistik.html

23. Kocak N, Hepgul S, Ozbayburtlu S, Altunay H, Ozsoy M, Kosan E, vd. Trends in Major Transfusion-transmissible Infections among Blood Donors over 17 Years in Istanbul, Turkey. Journal of International Medical Research. Kasım 2004;32(6).

24. Ocak S, Duran N, Savaş L, Önlen Y, Dibek MA. Hatay Bölgesindeki Kan Donörlerinde HBV, HCV, HIV ve VDRL Seropozitifliği. Viral Hepatit Dergisi. 2005;10(1):49-53.

25. Adışen E, Öztaş M, Gürer MA. 1994-2006 Yılları Arasında İzlediğimiz Sifilizli Hastaların Demografik Bulguları. Türkderm. 2008;42:9-12.

26. Dilek İ, Demir C, Bay A, Akdeniz H, Oner A. Seropositivity rates of HBsAg, anti-HCV, anti-HIV and VDRL in blood donors in Eastern Turkey. 30 Kasım 2006;24.

27. Temiz H, Gül K. Kan vericilerinin HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve VDRLtest sonuçlarının değerlendirilmesi. Turk J Infect. 01 Ocak 2008;22:79-82.

28. Caliskan E, Sahin I, Ozturk CE, Karadağ G, Avcioğlu F. Evaluation of screening tests results of the blood donors. Duzce Univ Inst Health Sci J. 01 Ocak 2012;2:1-3.

29. Miao RM, Fieldsteel AH. Genetic relationship between Treponema pallidum and Treponema pertenue, two noncultivable human pathogens. J Bacteriol. Ocak 1980;141(1):427-9.

30. Noordhoek GT, Hermans PWM, Paul AN, Schouls LM, Van Der Sluis JJ, Van Embden JDA. Treponema pallidum subspecies pallidum (Nichols) and Treponema pallidum subspecies pertenue (CDC 2575) differ in at least one nucleotide: comparison of two homologous antigens. Microb Pathog. Ocak 1989;6(1):29-42.

31. Miao R, Fieldsteel AH. Genetics of Treponema: relationship between Treponema pallidum and five cultivable treponemes. J Bacteriol. Ocak 1978;133(1):101-7.

32. Centurion-Lara A, Castro C, Castillo R, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Lukehart SA. The Flanking Region Sequences of the 15-kDa Lipoprotein Gene Differentiate Pathogenic Treponemes. Journal of Infectious Diseases. 01 Nisan 1998;177(4):1036-40.

33. Treponema pallidum. A bibliographical review of the morphology, culture and survival of T. pallidum and associated organisms: Introduction. Bull World Health Organ. 1966;35 Suppl(Suppl):5-9.

34. Schwartz W. CDC. 1961 [a.yer 05 Haziran 2021]. Treponema pallidum Dark Field Microscopy. Erişim adresi: https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10179

35. Babolin C, Amedei A, Ozoliņš D, Žileviča A, D'Elios MM, de Bernard M. TpF1 from *Treponema pallidum* Activates Inflammasome and Promotes the Development of Regulatory T Cells. The Journal of Immunology. 01 Ağustos 2011;187(3).

36. Cox DL. Culture of Treponema pallidum. Içinde 1994. s. 390-405.

37. Lukehart SA, Marra CM. Isolation and Laboratory Maintenance of *Treponema pallidum*. Curr Protoc Microbiol. Kasım 2007;7(1).

38. NICHOLS HJ, HOUGH WH. DEMONSTRATION OF SPIROCHAETA PALLIDA IN THE CEREBROSPINAL FLUID. J Am Med Assoc. 11 Ocak 1913;60(2):108.

39. Fieldsteel AH, Stout JG, Becker FA. Comparative behavior of virulent strains of Treponema pallidum and Treponema pertenue in gradient cultures of various mammalian cells. Infect Immun [Internet]. Mayıs 1979;24(2):337-45. Erişim adresi: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/378851

40. MAGNUSON HJ, EAGLE H, FLEISCHMAN R. The minimal infectious inoculum of Spirochaeta pallida (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication in vivo. Am J Syph Gonorrhea Vener Dis. Ocak 1948;32(1):1-18.

41. CUMBERLAND MC, TURNER TB. The rate of multiplication of Treponema pallidum in normal and immune rabbits. Am J Syph Gonorrhea Vener Dis. Mayıs 1949;33(3):201-12.

42. Fraser CM. Complete Genome Sequence of Treponema pallidum, the Syphilis Spirochete. Science (1979). 17 Temmuz 1998;281(5375).

43. JEPSEN OB, HOUGEN KH, BIKCH-ANDERSEN A. ELECTRON MICROSCOPY OF TREPONEMA PALLIDUM NICHOLS. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica. 17 Ağustos 2009;74(2):241-58.

44. Lugtenberg B, Van Alphen L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes. Mart 1983;737(1):51-115.

45. Walker EM, Zampighi GA, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Demonstration of rare protein in the outer membrane of Treponema pallidum subsp. pallidum by freeze-fracture analysis. J Bacteriol. Eylül 1989;171(9):5005-11.

46. Walker EM, Borenstein LA, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Analysis of outer membrane ultrastructure of pathogenic Treponema and Borrelia species by freeze-fracture electron microscopy. J Bacteriol. Eylül 1991;173(17):5585-8.

47. Radolf JD, Norgard M V, Schulz WW. Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent Treponema pallidum. Proceedings of the National Academy of Sciences. Mart 1989;86(6):2051-5.

48. Cox DL, Chang P, McDowall AW, Radolf JD. The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent Treponema pallidum. Infect Immun. Mart 1992;60(3):1076-83.

49. Cox DL, Akins DR, Porcella SF, Norgard M V., Radolf JD. Treponema pallidum in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of treponemal molecular architecture. Mol Microbiol. Mart 1995;15(6):1151-64.

50. Hardham JM, Stamm L V., Porcella SF, Frye JG, Barnes NY, Howell JK, vd. Identification and transcriptional analysis of a Treponema pallidum operon encoding a putative ABC transport system, an iron-activated repressor protein homolog, and a glycolytic pathway enzyme homolog. Gene. Eylül 1997;197(1-2):47-64.

51. Shevchenko D V, Akins DR, Robinson EJ, Li M, Shevchenko O V, Radolf JD. Identification of homologs for thioredoxin, peptidyl prolyl cis-trans isomerase, and glycerophosphodiester phosphodiesterase in outer membrane fractions from Treponema pallidum, the syphilis spirochete. Infect Immun. Ekim 1997;65(10):4179-89.

52. Cox DL, Luthra A, Dunham-Ems S, Desrosiers DC, Salazar JC, Caimano MJ, vd. Surface Immunolabeling and Consensus Computational Framework To Identify Candidate Rare Outer Membrane Proteins of *Treponema pallidum*. Infect Immun. Aralık 2010;78(12):5178-94.

53. Leader BT, Hevner K, Molini BJ, Barrett LK, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Antibody Responses Elicited against the *Treponema pallidum* Repeat Proteins Differ during Infection with Different Isolates of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. Infect Immun. Ekim 2003;71(10):6054-7.

54. Yonehara R, Yamashita E, Nakagawa A. Crystal structures of OprN and OprJ, outer membrane factors of multidrug tripartite efflux pumps of *P seudomonas aeruginosa*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. Haziran 2016;84(6):759-69.

55. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature. Haziran 2000;405(6789):914-9.

56. Cunningham TM, Miller JN, Lovett MA. Identification of Treponema pallidum penicillin-binding proteins. J Bacteriol. Kasım 1987;169(11):5298-300.

57. Weigel LM, Radolf JD, Norgard M V. The 47-kDa major lipoprotein immunogen of Treponema pallidum is a penicillin-binding protein with carboxypeptidase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 22 Kasım 1994;91(24):11611-5.

58. Hougen KH, Birch-Andersen A. Electron microscopy of endoflagella and microtubules in Treponema reiter. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1971;79(1):37-50.

59. Penn CW, Cockayne A, Bailey MJ. The outer membrane of Treponema pallidum: biological significance and biochemical properties. J Gen Microbiol. Eylül 1985;131(9):2349-57.

60. Norris SJ, Charon NW, Cook RG, Fuentes MD, Limberger RJ. Antigenic relatedness and N-terminal sequence homology define two classes of periplasmic flagellar proteins of Treponema pallidum subsp. pallidum and Treponema phagedenis. J Bacteriol. Eylül 1988;170(9):4072-82.

61. Blanco DR, Champion CI, Miller JN, Lovett MA. Antigenic and structural characterization of Treponema pallidum (Nichols strain) endoflagella. Infect Immun. Ocak 1988;56(1):168-75.

62. Cockayne A, Bailey MJ, Penn CW. Analysis of sheath and core structures of the axial filament of Treponema pallidum. J Gen Microbiol. Haziran 1987;133(6):1397-407.

63. Kimsey RB, Spielman A. Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. J Infect Dis. Kasım 1990;162(5):1205-8.

64. Charon NW, Greenberg EP, Koopman MB, Limberger RJ. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. Res Microbiol. 1992;143(6):597-603.

65. Ruby JD, Charon NW. Effect of temperature and viscosity on the motility of the spirochete Treponema denticola. FEMS Microbiol Lett. 15 Aralık 1998;169(2):251-4.

66. Pedersen NS, Petersen CS, Axelsen NH. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody against the Reiter treponeme flagellum in syphilis. J Clin Microbiol. Ekim 1982;16(4):608-14.

67. Hanff PA, Fehniger TE, Miller JN, Lovett MA. Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of Treponema pallidum. J Immunol. Eylül 1982;129(3):1287-91.

68. Pedersen NS, Petersen CS, Vejtorp M, Axelsen NH. Serodiagnosis of syphilis by an enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies against the Reiter treponeme flagellum. Scand J Immunol. Nisan 1982;15(4):341-8.

69. Fitzgerald TJ. Pathogenesis and immunology of Treponema pallidum. Annu Rev Microbiol. 1981;35:29-54.

70. Thomas DD, Navab M, Haake DA, Fogelman AM, Miller JN, Lovett MA. Treponema pallidum invades intercellular junctions of endothelial cell monolayers. Proc Natl Acad Sci U S A. Mayıs 1988;85(10):3608-12.

71. Fitzgerald TJ, Repesh LA, Oakes SG. Morphological destruction of cultured cells by the attachment of Treponema pallidum. Br J Vener Dis. Şubat 1982;58(1):1-11.

72. Weinstock GM, Norris SJ, Sodergren EJ, Smajs D. Identification of Virulence Genes in Silico: Infectious Disease Genomics. Içinde: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Wiley; 2000. s. 251-61.

73. Norris SJ, Weinstock GM. The genome sequence of Treponema pallidum, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? Curr Opin Infect Dis. Şubat 2000;13(1):29-36.

74. Weinstock GM, Hardham JM, McLeod MP, Sodergren EJ, Norris SJ. The genome of Treponema pallidum: new light on the agent of syphilis. FEMS Microbiol Rev. Ekim 1998;22(4):323-32.

75. Weinstock GM, Smajs D, Hardham J, Norris SJ. From microbial genome sequence to applications. Res Microbiol. Mart 2000;151(2):151-8.

76. Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Hansen EJ, Radolf JD, Norgard M V. Virulent Treponema pallidum activates human vascular endothelial cells. J Infect Dis. Mart 1992;165(3):484-93.

77. Lee KH, Choi HJ, Lee MG, Lee JB. Virulent Treponema pallidum 47 kDa antigen regulates the expression of cell adhesion molecules and binding of T-lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells. Yonsei Med J. Ekim 2000;41(5):623-33.

78. Chapel TA. The variability of syphilitic chancres. Sex Transm Dis. 1978;5(2):68-70.

79. DiCarlo RP, Martin DH. The clinical diagnosis of genital ulcer disease in men. Clin Infect Dis. Ağustos 1997;25(2):292-8.

80. Hayes NS, Muse KE, Collier AM, Baseman JB. Parasitism by virulent Treponema pallidum of host cell surfaces. Infect Immun. Temmuz 1977;17(1):174-86.

81. Konishi H, Yoshii Z, Cox DL. Electron microscopy of Treponema pallidum (Nichols) cultivated in tissue cultures of Sf1Ep cells. Infect Immun. Temmuz 1986;53(1):32-7.

82. Fitzgerald TJ, Repesh LA, Blanco DR, Miller JN. Attachment of Treponema pallidum to fibronectin, laminin, collagen IV, and collagen I, and blockage of attachment by immune rabbit IgG. Br J Vener Dis. Aralık 1984;60(6):357-63.

83. Thomas DD, Baseman JB, Alderete JF. Fibronectin mediates Treponema pallidum cytadherence through recognition of fibronectin cell-binding domain. J Exp Med. 01 Mart 1985;161(3):514-25.

84. Thomas DD, Baseman JB, Alderete JF. Fibronectin tetrapeptide is target for syphilis spirochete cytadherence. J Exp Med. 01 Kasım 1985;162(5):1715-9.

85. Thomas DD, Baseman JB, Alderete JF. Putative Treponema pallidum cytadhesins share a common functional domain. Infect Immun. Eylül 1985;49(3):833-5.

86. Cameron CE, Brown EL, Kuroiwa JMY, Schnapp LM, Brouwer NL. Treponema pallidum fibronectin-binding proteins. J Bacteriol. Ekim 2004;186(20):7019-22.

87. Riley BS, Oppenheimer-Marks N, Hansen EJ, Radolf JD, Norgard M V. Virulent Treponema pallidum Activates Human Vascular Endothelial Cells. Journal of Infectious Diseases. 01 Mart 1992;165(3):484-93.

88. Centurion-Lara A, Castro C, Barrett L, Cameron C, Mostowfi M, Van Voorhis WC, vd. Treponema pallidum major sheath protein homologue Tpr K is a target of opsonic antibody and the protective immune response. J Exp Med. 15 Şubat 1999;189(4):647-56.

89. Morgan CA, Lukehart SA, Van Voorhis WC. Protection against syphilis correlates with specificity of antibodies to the variable regions of Treponema pallidum repeat protein K. Infect Immun. Ekim 2003;71(10):5605-12.

90. Leader BT, Hevner K, Molini BJ, Barrett LK, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Antibody responses elicited against the Treponema pallidum repeat proteins differ during infection with different isolates of Treponema pallidum subsp. pallidum. Infect Immun. Ekim 2003;71(10):6054-7.

91. Chung KY, Kim KS, Lee MG, Chang NS, Lee JB. Treponema pallidum induces up-regulation of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts. Acta Derm Venereol. 2002;82(3):174-8.

92. Riviere GR, Thomas DD, Cobb CM. In vitro model of Treponema pallidum invasiveness. Infect Immun. Ağustos 1989;57(8):2267-71.

93. Collart P, Franceschini P, Durel P. Experimental rabbit syphilis. Br J Vener Dis. Aralık 1971;47(6):389-400.

94. Sell S, Salman J, Norris SJ. Reinfection of chancre-immune rabbits with Treponema pallidum. I. Light and immunofluorescence studies. Am J Pathol. Şubat 1985;118(2):248-55.

95. ROSAHN PD, GUEFT B, ROWE CL. Experimental mouse syphilis; organ distribution of the infectious agent. Am J Syph Gonorrhea Vener Dis. Temmuz 1948;32(4):327-36.

96. Lu S, Zheng K, Wang J, Xu M, Xie Y, Yuan S, vd. Characterization of Treponema pallidum Dissemination in C57BL/6 Mice. Front Immunol. 2020;11:577129.

97. Medici MA. The immunoprotective niche— A new pathogenic mechanism for syphilis, the systemic mycoses and other infectious diseases. J Theor Biol. Eylül 1972;36(3):617-25.

98. Champion CI, Miller JN, Borenstein LA, Lovett MA, Blanco DR. Immunization with Treponema pallidum endoflagella alters the course of experimental rabbit syphilis. Infect Immun. Eylül 1990;58(9):3158-61.

99. Hindersson P, Petersen CS, Axelsen NH. Purified flagella from Treponema phagedenis biotype Reiter does not induce protective immunity against experimental syphilis in rabbits. Sex Transm Dis. 1985;12(3):124-7.

100. Hagman KE, Porcella SF, Popova TG, Norgard M V. Evidence for a methyl-accepting chemotaxis protein gene (mcp1) that encodes a putative sensory transducer in virulent Treponema pallidum. Infect Immun. Mayıs 1997;65(5):1701-9.

101. Greene SR, Stamm L V. Molecular characterization of Treponema pallidum mcp2, a putative chemotaxis protein gene. Infect Immun. Haziran 1998;66(6):2999-3002.

102. van Voorhis WC, Barrett LK, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Lesions of primary and secondary syphilis contain activated cytolytic T cells. Infect Immun. Mart 1996;64(3):1048-50.

103. Salazar JC, Cruz AR, Pope CD, Valderrama L, Trujillo R, Saravia NG, vd. Treponema pallidum elicits innate and adaptive cellular immune responses in skin and blood during secondary syphilis: a flow-cytometric analysis. J Infect Dis. 15 Mart 2007;195(6):879-87.

104. Stary G, Klein I, Brüggen MC, Kohlhofer S, Brunner PM, Spazierer D, vd. Host defense mechanisms in secondary syphilitic lesions: a role for IFN-gamma-/IL-17-producing CD8+ T cells? Am J Pathol. Kasım 2010;177(5):2421-32.

105. Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, vd. Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. J Immunol. 15 Mart 1995;154(6):2866-77.

106. Radolf JD. Role of outer membrane architecture in immune evasion by Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi. Trends Microbiol. Eylül 1994;2(9):307-11.

107. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, vd. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science. 30 Temmuz 1999;285(5428):732-6.

108. Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD. The immune response to infection with Treponema pallidum, the stealth pathogen. Microbes Infect. Eylül 2002;4(11):1133-40.

109. Musher DM, Hague-Park M, Gyorkey F, Anderson DC, Baughn RE. The interaction between Treponema pallidum and human polymorphonuclear leukocytes. J Infect Dis. Ocak 1983;147(1):77-86.

110. Bos JD, Hamerlinck F, Cormane RH. Immunoglobulin-bearing polymorphonuclear leucocytes in primary syphilis. Br J Vener Dis. Ağustos 1980;56(4):218-20.

111. Tight RR, Perkins RL. Treponema pallidum infection in subcutaneous polyethylene chambers in rabbits. Infect Immun. Haziran 1976;13(6):1606-12.

112. Sellati TJ, Waldrop SL, Salazar JC, Bergstresser PR, Picker LJ, Radolf JD. The cutaneous response in humans to Treponema pallidum lipoprotein analogues involves cellular elements of both innate and adaptive immunity. J Immunol. 15 Mart 2001;166(6):4131-40.

113. Norgard M V, Riley BS, Richardson JA, Radolf JD. Dermal inflammation elicited by synthetic analogs of Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins. Infect Immun. Nisan 1995;63(4):1507-15.

114. Borenstein LA, Ganz T, Sell S, Lehrer RI, Miller JN. Contribution of rabbit leukocyte defensins to the host response in experimental syphilis. Infect Immun. Nisan 1991;59(4):1368-77.

115. Borenstein LA, Selsted ME, Lehrer RI, Miller JN. Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against Treponema pallidum subsp. pallidum. Infect Immun. Nisan 1991;59(4):1359-67.

116. Lukehart SA, Shaffer JM, Baker-Zander SA. A subpopulation of Treponema pallidum is resistant to phagocytosis: possible mechanism of persistence. J Infect Dis. Aralık 1992;166(6):1449-53.

117. Lukehart SA, Baker-Zander SA, Lloyd RM, Sell S. Characterization of lymphocyte responsiveness in early experimental syphilis. II. Nature of cellular infiltration and Treponema pallidum distribution in testicular lesions. J Immunol. Ocak 1980;124(1):461-7.

118. Bouis DA, Popova TG, Takashima A, Norgard M V. Dendritic cells phagocytose and are activated by Treponema pallidum. Infect Immun. Ocak 2001;69(1):518-28.

119. Morgan CA, Molini BJ, Lukehart SA, Van Voorhis WC. Segregation of B and T cell epitopes of Treponema pallidum repeat protein K to variable and conserved regions during experimental syphilis infection. J Immunol. 15 Temmuz 2002;169(2):952-7.

120. Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard M V, Roth MD, vd. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. J Immunol. 15 Şubat 2001;166(4):2444-50.

121. Shin JL, Chung KY, Kang JM, Lee TH, Lee MG. The effects of Treponema pallidum on human dendritic cells. Yonsei Med J. 30 Haziran 2004;45(3):515-22.

122. Salazar JC, Pope CD, Moore MW, Pope J, Kiely TG, Radolf JD. Lipoprotein-Dependent and -Independent Immune Responses to Spirochetal Infection. Clinical and Vaccine Immunology. Ağustos 2005;12(8):949-58.

123. Van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. J Infect Dis. Şubat 1996;173(2):491-5.

124. Bishop NH, Miller JN. Humoral immunity in experimental syphilis. I. The demonstration of resistance conferred by passive immunization. J Immunol. Temmuz 1976;117(1):191-6.

125. Weiser RS, Erickson D, Perine PL, Pearsall NN. Immunity to syphilis: passive transfer in rabbits using serial doses of immune serum. Infect Immun. Mayıs 1976;13(5):1402-7.

126. NELSON RA, MAYER MM. Immobilization of Treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection. J Exp Med. 01 Nisan 1949;89(4):369-93.

127. Turner TB. PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM OF SYPHILITIC RABBITS. J Exp Med. 31 Mayıs 1939;69(6):867-90.

128. Sieling PA, Chung W, Duong BT, Godowski PJ, Modlin RL. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. J Immunol. 01 Ocak 2003;170(1):194-200.

129. Norgard M V, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Harrich DA, Radolf JD. Activation of human monocytic cells by Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides proceeds via a pathway distinct from that of lipopolysaccharide but involves the transcriptional activator NF-kappa B. Infect Immun. Eylül 1996;64(9):3845-52.

130. Sellati TJ, Wilkinson DA, Sheffield JS, Koup RA, Radolf JD, Norgard M V. Virulent Treponema pallidum, lipoprotein, and synthetic lipopeptides induce CCR5 on human monocytes and enhance their susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. J Infect Dis. Ocak 2000;181(1):283-93.

131. Radolf JD, Norgard M V, Brandt ME, Isaacs RD, Thompson PA, Beutler B. Lipoproteins of Borrelia burgdorferi and Treponema pallidum activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis. Analysis using a CAT reporter construct. J Immunol. 15 Eylül 1991;147(6):1968-74.

132. Akins DR, Purcell BK, Mitra MM, Norgard M V, Radolf JD. Lipid modification of the 17-kilodalton membrane immunogen of Treponema pallidum determines macrophage activation as well as amphiphilicity. Infect Immun. Nisan 1993;61(4):1202-10.

133. Hollier LM, Cox SM. Syphilis. Semin Perinatol. Ağustos 1998;22(4):323-31.

134. French P. Syphilis. BMJ. 20 Ocak 2007;334(7585):143-7.

135. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Syphilis. Nat Rev Dis Primers. 12 Ekim 2017;3(1):17073.

136. Çakmak SK, Tamer E, Karadağ AS, Waugh M. Syphilis: A great imitator. Clin Dermatol. Mayıs 2019;37(3):182-91.

137. Lautenschlager S. Diagnosis of syphilis: Clinical and laboratory problems. JDDG. Aralık 2006;4(12).

138. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev. Ocak 1995;8(1).

139. Wicher K, Horowitz HW, Wicher V. Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. Microbes Infect. Ekim 1999;1(12).

140. Zhou C, Zhang X, Zhang W, Duan J, Zhao F. PCR detection for syphilis diagnosis: Status and prospects. J Clin Lab Anal. 02 Haziran 2019;33(5).

141. Wang C, Cheng Y, Liu B, Wang Y, Gong W, Qian Y, vd. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. Emerg Microbes Infect. 01 Aralık 2018;7(1).

142. Wang C, Hu Z, Zheng X, Ye M, Liao C, Shang M, vd. A New Specimen for Syphilis Diagnosis: Evidence by High Loads of *Treponema pallidum* DNA in Saliva. Clinical Infectious Diseases. 25 Ekim 2020;

143. Marks M, Lawrence D, Kositz C, Mabey D. Diagnostic performance of PCR assays for the diagnosis of neurosyphilis: a systematic review. Sex Transm Infect. Aralık 2018;94(8).

144. Sonmez C, Sezen F, Kilic S. Performance evaluation of nine different syphilis serological tests in comparison with the FTA-abs test. J Immunol Methods. Ocak 2019;464.

145. Marangoni A, Moroni A, Accardo S, Cevenini R. Laboratory diagnosis of syphilis with automated immunoassays. J Clin Lab Anal. 2009;23(1):1-6.

146. Causer LM, Kaldor JM, Conway DP, Leslie DE, Denham I, Karapanagiotidis T, vd. An Evaluation of a Novel Dual Treponemal/Nontreponemal Point-of-Care Test for Syphilis as a Tool to Distinguish Active From Past Treated Infection. Clinical Infectious Diseases. 15 Temmuz 2015;61(2):184-91.

147. Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 25 Mayıs 2010;29(5):495-501.

148. Binnicker MJ. Which algorithm should be used to screen for syphilis? Curr Opin Infect Dis. Şubat 2012;25(1).

149. Tong ML, Lin LR, Liu LL, Zhang HL, Huang SJ, Chen YY, vd. Analysis of 3 Algorithms for Syphilis Serodiagnosis and Implications for Clinical Management. Clinical Infectious Diseases. 15 Nisan 2014;58(8).

150. Janier M, Unemo M, Dupin N, Tiplica GS, Potočnik M, Patel R. 2020 European guideline on the management of syphilis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 22 Mart 2021;35(3):574-88.

151. Lukehart SA, Godornes C, Molini BJ, Sonnett P, Hopkins S, Mulcahy F, vd. Macrolide resistance in Treponema pallidum in the United States and Ireland. N Engl J Med. 08 Temmuz 2004;351(2):154-8.

152. Stamm L V, Bergen HL. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant Treponema pallidum clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. Mart 2000;44(3):806-7.

153. Norris SJ, Edmondson DG. In vitro culture system to determine MICs and MBCs of antimicrobial agents against Treponema pallidum subsp. pallidum (Nichols strain). Antimicrob Agents Chemother. Ocak 1988;32(1):68-74.

154. Stamm L V, Stapleton JT, Bassford PJ. In vitro assay to demonstrate high-level erythromycin resistance of a clinical isolate of Treponema pallidum. Antimicrob Agents Chemother. Şubat 1988;32(2):164-9.

155. Stapleton JT, Stamm L V, Bassford PJ. Potential for development of antibiotic resistance in pathogenic treponemes. Rev Infect Dis. 1985;7 Suppl 2:S314-7.

156. Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, vd. Molecular subtyping of Treponema pallidum subspecies pallidum. Sex Transm Dis. Eylül 1998;25(8):408-14.

157. Miller JN. Immunity in experimental syphilis. VI. Successful vaccination of rabbits with Treponema pallidum, Nichols strain, attenuated by -irradiation. J Immunol. Mayıs 1973;110(5):1206-15.

158. Cameron CE, Castro C, Lukehart SA, Van Voorhis WC. Function and protective capacity of Treponema pallidum subsp. pallidum glycerophosphodiester phosphodiesterase. Infect Immun. Aralık 1998;66(12):5763-70.

159. Cameron CE, Lukehart SA, Castro C, Molini B, Godornes C, Van Voorhis WC. Opsonic potential, protective capacity, and sequence conservation of the Treponema pallidum subspecies pallidum Tp92. J Infect Dis. Nisan 2000;181(4):1401-13.

160. Centurion-Lara A, Arroll T, Castillo R, Shaffer JM, Castro C, Van Voorhis WC, vd. Conservation of the 15-kilodalton lipoprotein among Treponema pallidum subspecies and strains and other pathogenic treponemes: genetic and antigenic analyses. Infect Immun. Nisan 1997;65(4):1440-4.

161. Baughn RE, Jiang A, Abraham R, Ottmers V, Musher DM. Molecular mimicry between an immunodominant amino acid motif on the 47-kDa lipoprotein of Treponema pallidum (Tpp47) and multiple repeats of analogous sequences in fibronectin. J Immunol. 15 Temmuz 1996;157(2):720-31.

162. Sun ES, Molini BJ, Barrett LK, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Van Voorhis WC. Subfamily I Treponema pallidum repeat protein family: sequence variation and immunity. Microbes Infect. Temmuz 2004;6(8):725-37.

163. Giacani L, Sambri V, Marangoni A, Cavrini F, Storni E, Donati M, vd. Immunological evaluation and cellular location analysis of the TprI antigen of Treponema pallidum subsp. pallidum. Infect Immun. Haziran 2005;73(6):3817-22.

164. Tang Y, Zhou Y, He B, Cao T, Zhou X, Ning L, vd. Investigation of the immune escape mechanism of Treponema pallidum. Infection. Nisan 2023;51(2):305-21.

165. Mintz Y, Brodie R. Introduction to artificial intelligence in medicine. Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies. 04 Mart 2019;28(2):73-81.

166. Hamet P, Tremblay J. Artificial intelligence in medicine. Metabolism. Nisan 2017;69:S36-40.

167. Ramesh A, Kambhampati C, Monson J, Drew P. Artificial intelligence in medicine. Ann R Coll Surg Engl. 01 Eylül 2004;86(5):334-8.

168. Gore JC. Artificial intelligence in medical imaging. Magn Reson Imaging. Mayıs 2020;68:A1-4.

169. Özbek AÖ, Doğan Y. Taramada treponemal test kullanan bir sifiliz tanı algoritmasının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. Ocak 2011;45(1):93-103.

170. Akçakanat İE, Özbek ÖA, Doğan Y, Abacıoğlu YH. Determination of a Sample-to-Cutoff Ratio to Predict True-Positivity in Blood Donor Samples Screened for Syphilis by a Chemiluminescent Immunoassay. The Journal of Basic and Clinical Health Sciences. 2018;

171. Yürüyen C, Aksaray S. Is the Second Treponemal Test Necessary in the Reverse Algorithm for the Diagnosis of Syphilis? Clin Lab. 2020;66(06/2020).

172. Dai S, Chi P, Lin Y, Zheng X, Liu W, Zhang J, vd. Improved Reverse Screening Algorithm for Treponema pallidum Antibody Using Signal-to-Cutoff Ratios from Chemiluminescence Microparticle Immunoassay. Sex Transm Dis. Ocak 2014;41(1):29-34.

173. Li Z, Feng Z, Liu P, Yan C. Screening for antibodies against *Treponema pallidum* with chemiluminescent microparticle immunoassay: analysis of discordant serology results and clinical characterization. Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine. 17 Eylül 2016;53(5):588-92.

174. Wang KD, Xu DJ, Su JR. Preferable procedure for the screening of syphilis in clinical laboratories in China. Infect Dis. 02 Ocak 2016;48(1):26-31.

175. Sommese L, Paolillo R, Sabia C, Costa D, De Pascale MR, Iannone C, vd. Syphilis detection: evaluation of serological screening and pilot reverse confirmatory assay algorithm in blood donors. Int J STD AIDS. 10 Temmuz 2016;27(8).

176. Sommese L, Sabia C, Esposito A, Iannone C, Montesano ML, Napoli C. Comparison of performance of two *Treponema pallidum* automated chemiluminescent immunoassays in blood donors. Infect Dis. 02 Haziran 2016;48(6).

177. Mo X, Jin Y, Yang Y, Hu W, Gu W. Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis. Eur J Med Res. 2010;15(2):66.

178. Hunter MG, Robertson PW, Post JJ. Significance of Isolated Reactive Treponemal Chemiluminescence Immunoassay Results. J Infect Dis. 01 Mayıs 2013;207(9).

179. Lee K, Park H, Roh EY, Shin S, Park KU, Park MH, vd. Characterization of Sera with Discordant Results from Reverse Sequence Screening for Syphilis. Biomed Res Int. 2013;2013.

180. Liu L, Xie Y, Dai Z, Zhuo C, Wu Y. Establishment and Evaluation of a One-Step Microplate Chemiluminescence Immunoassay to Detect IgG Antibody Against *Treponema Pallidum*. J Clin Lab Anal. Kasım 2015;29(6):493-7.

181. Jonckheere S, Berth M, Van Esbroeck M, Blomme S, Lagrou K, Padalko E. Evaluation of different confirmatory algorithms using seven treponemal tests on Architect

Syphilis TP-positive/RPR-negative sera. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 18 Ekim 2015;34(10):2041-8.

182. Boonchaoy A, Wongchampa P, Hirankarn N, Chaithongwongwatthana S. Performance of Chemiluminescent Microparticle Immunoassay in Screening for Syphilis in Pregnant Women from Low-Prevalence, Resource-Limited Setting. J Med Assoc Thai. Şubat 2016;99(2):119-24.

183. Murai R, Yamada K, Yonezawa H, Yanagihara N, Takahashi S. Evaluation of new algorithm using TPLA as an initial syphilis screening test. Journal of Infection and Chemotherapy. Ocak 2019;25(1).

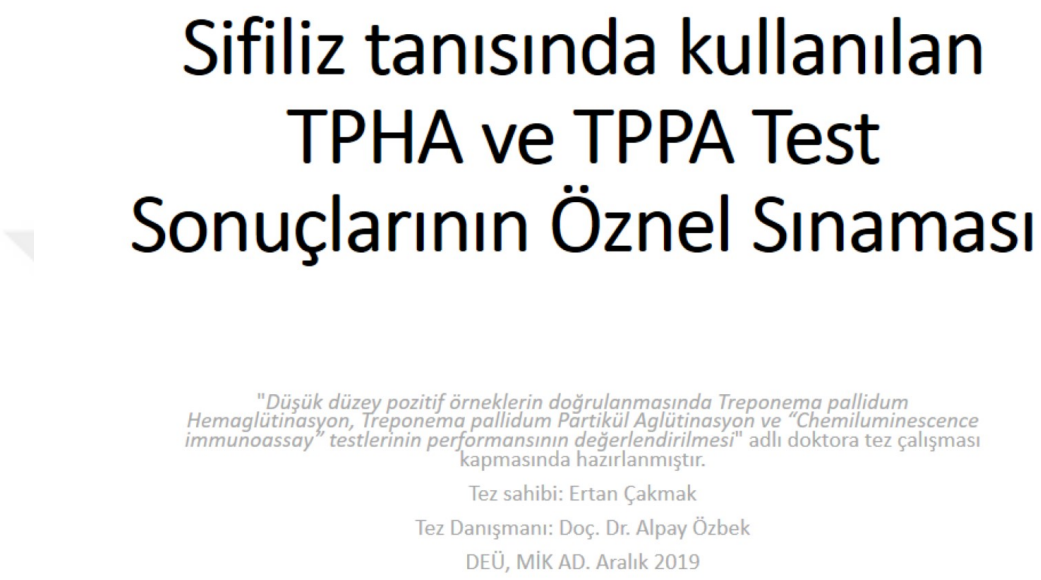
184. Peng J, Lu Y, Yu H, Wu S, Li T, Li H, vd. Analysis of 2 Reverse Syphilis Testing Algorithms in Diagnosis of Syphilis: A Large-Cohort Prospective Study. Clinical Infectious Diseases. 31 Ağustos 2018;67(6):947-53.

185. Liang J, Wan J, Huang C, Cai G, Li L, Liu M. Comparison of "Lumipulse anti- *Treponema pallidum* " and "Architect Syphilis TP" and further examination. J Clin Lab Anal. 24 Mayıs 2020;34(5).

186. Ji H, Chang L, Zhao J, Zhang L, Jiang X, Guo F, vd. Evaluation of ELISA and CLIA for Treponema pallidum specific antibody detection in China: A multicenter study. J Microbiol Methods. Kasım 2019;166:105742.

7. EKLER

7.1. Ek-1: Görsel Test



Giriş

- Katıldığınız bu çalışmada üç ayrı Sifiliz testinin sonuçları size sunulacaktır.
- Bu testlerin sonuçları üretici firmanın önerdiği yorumlama kriterlerine göre öznel olarak yapılmakta ve değerlendiriciler arasında yorum farkı olabilmektedir.
- Katıldığınız bu çalışmadaki amaç, verilen kriterler doğrultusunda yorumlandığında değerlendiriciler arasında farkın oranını saptamaktır.

Açıklamalar - 1

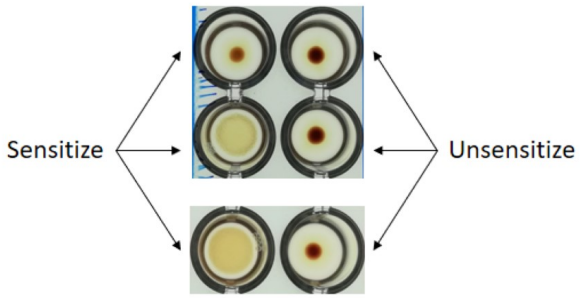
- Sizlere, burada, üç farklı markaya ait test sonuçları bölümler halinde sunulmuştur.
- Toplam 48 farklı testin sonuçlarını değerlendirmeniz beklenmektedir.
- Yanlılığı azaltmak amacıyla test markaları arası sonuç kıyaslaması yapılmaması önerilir.
- Her test markasına ait sonuçlardan önce o marka için kullanım kılavuzunda yer alan yorumlama kriterleri sizlere ekte sunulmuştur.

Açıklamalar - 2

- Çalışmada Treponema pallidum hemaglütinasyon (TPHA) ve Treponema pallidum partikül aglütinasyon (TPPA) testleri kullanılmıştır.
- Bu testlerin çalışma ilkeleri aynıdır ve antijen kaplı eritrositlerin (TPHA) ya da partiküllerin (TPPA) hasta serumunda bulunan özgül antikorlarla reaksiyona girmesine dayanır.
- Bu reaksiyonun sonucunda gelişen aglütinasyonun derecesi ile test sonucu değerlendirilir.
- Her bir testte pozitif ve negatif kontrollerin yanında, bu kontrol ve hasta serumu ile reaksiyon vermemesi beklenen başka bir kontrol daha bulunur.

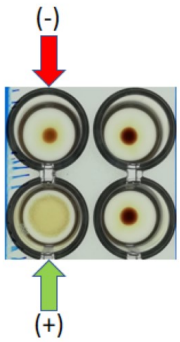
Açıklamalar - 3

- Bu kontrol, antijen ile kaplı olmayan eritrosit (TPHA) ya da partikülden (TPPA) oluşmaktadır ve "unsensitize" olarak adlandırılır.
- Bu "unsensitize" kuyusuna ait sonuç "sensitize (antijenle kaplı)" sonucun sağında gösterilmiştir.



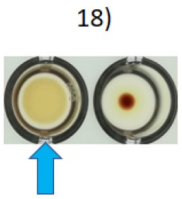
Yönerge - 1

- Her bir sayfada pozitif ve negatif kontroller bulunmakta olup sırasıyla yeşil ve kırmızı okla işaretlenmiş ve etiketlenmiştir.



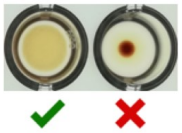
Yönerge - 2

- Mavi okla işaretlenmiş kuyu verilen kriterlere göre değerlendirmenizi istediğimiz sonuçtur.



Yönerge - 3

- Her bir sonuç kuyusunun sağında serumla reaksiyon vermeyen, "unsensitize" sonucu bulunmaktadır. Bu kuyu bir test içi kontroldür ve tarafınızdan değerlendirmeniz istenmez.



- Tüm kontrollerin gösterilmesindeki amaç, gerçek çalışma koşullarını mümkün olduğu kadar taklit edebilmektir.

Yönerge - 4

- Test sonuçları birbirinden bağımsızdır. Bu nedenle yanıtlama sırası sizin takdirinizdedir.
- **Hatırlatma:** Yanlılığı azaltmak amacıyla test markaları arası sonuç kıyaslaması yapılmaması önerilir.
- Testler farklı üreticiler tarafından geliştirilmiştir ve bu nedenle kullanılan solüsyonların renkleri de farklıdır. Bu durum, sonuçların değerlendirmesi açısından hiçbir anlam ifade etmemektedir.

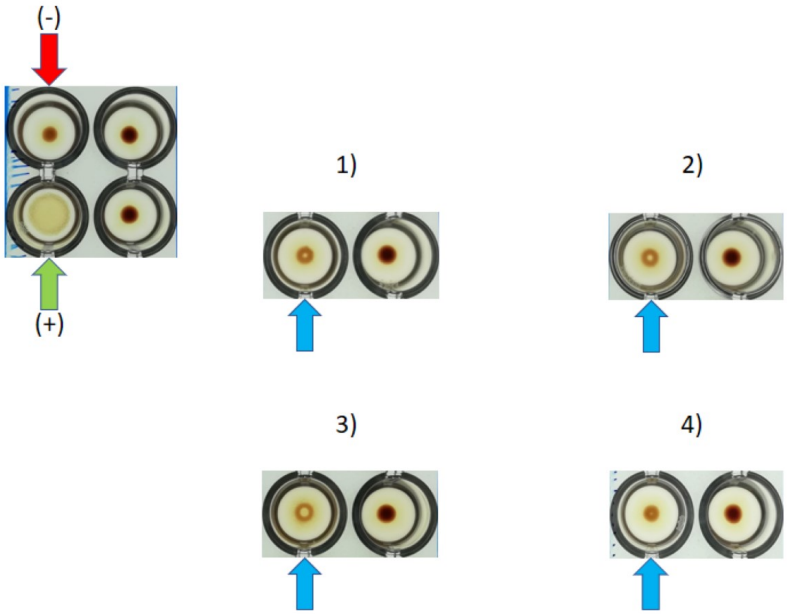
Yönerge - 5

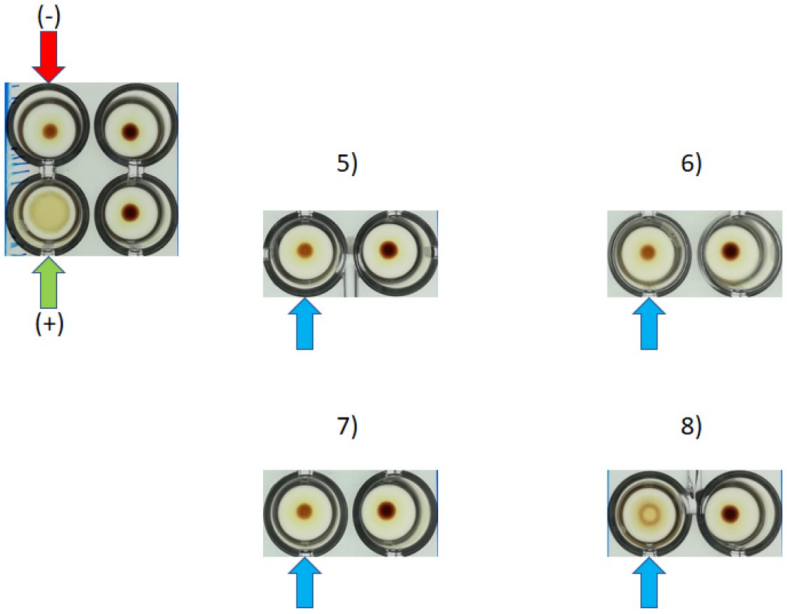
- Testleri değerlendirmekte kullanılacak kriterler kendilerine ait her bir bölüm başında ve elinizdeki cevap kağıdında orijinal şekliyle (İngilizce) yazılıdır.
- Sonuçlar üç kategoride değerlendirilecektir: Bunlar pozitif (+), belirsiz (±) ve negatiftir (-).
- **Hatırlatma:** Sizden beklenen pozitifliğin derecesi değil, sonucun salt pozitif, belirsiz ya da negatif olması şeklinde değerlendirmenizdir.
- Herhangi bir durumda Ertan Çakmak'a 05322563049 numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

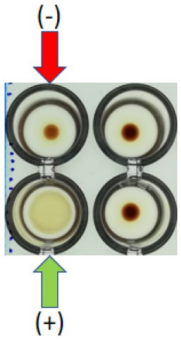
1. TPHA Testi

Omega IMMUTREP® TPHA

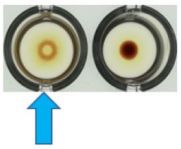
Screening Procedure
Agglutinated cells form an even layer over the bottom of the well. Non-agglutinated cells form a compact button in the centre of the well. Weakly agglutinated cells form a characteristic ring pattern. Agglutination of the Test Cells but not the Control Cells indicates the presence of specific antibody to **T.pallidum**. Absence of agglutination indicates that antibody is below the limit of detection of the system. Do not use the Control Cell pattern as an indication of a negative result since they give a more compact button of cells.
Agglutination of the Control Cells as well as the Test Cells indicates the presence of anti-cell antibody. In this event the test is not valid and should be repeated.


(-)
(+)
1)
2)
3)
4)

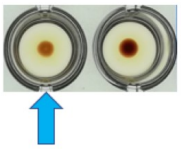

(-)
(+)
5)
6)
7)
8)



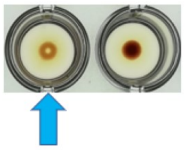
9)



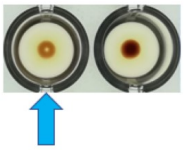
10)

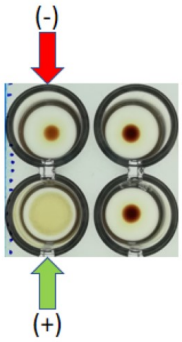


11)

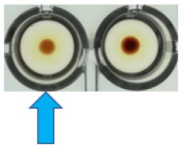


12)

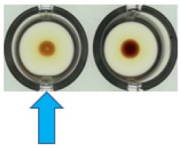




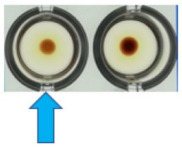
13)



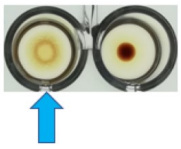
14)



15)



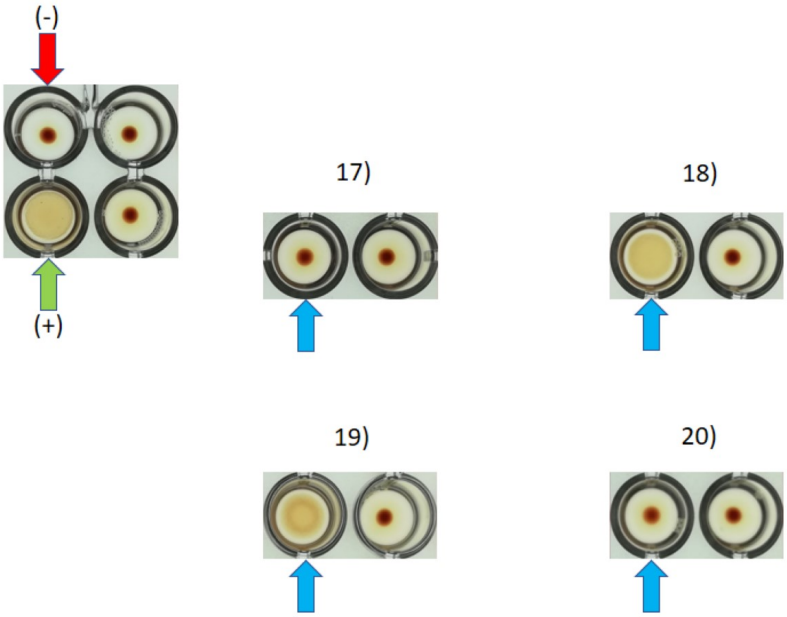
16)

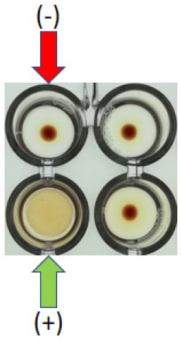


2. TPHA Testi

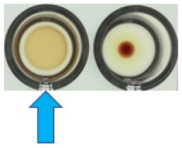
SpinReact TPHA

Degree of hemagglutination	Reading	Result
Smooth mat of cells covering entire well bottom, sometimes with folded edges	4+	Reactive
Smooth mat of cells covering part of the well bottom	3+	Reactive
Smooth mat of cells surrounded by a red circle	2+	Reactive
Smooth mat of cells covering less area and surrounded by a smaller red circle	1+	Reactive
Button of cells having a small hole in centre	±	Borderline
Definite compact button of cells, sometimes with a very small hole in the centre.	-	Negative

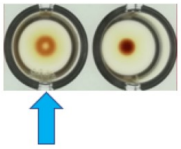




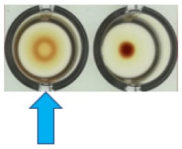
21)



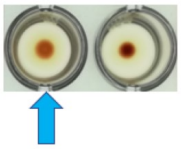
22)

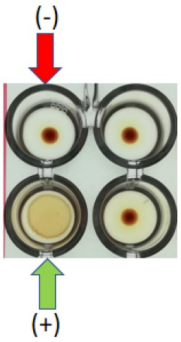


23)

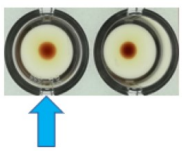


24)

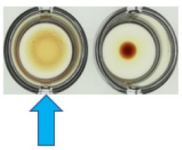




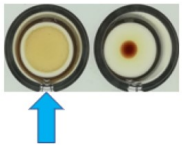
25)



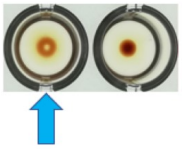
26)

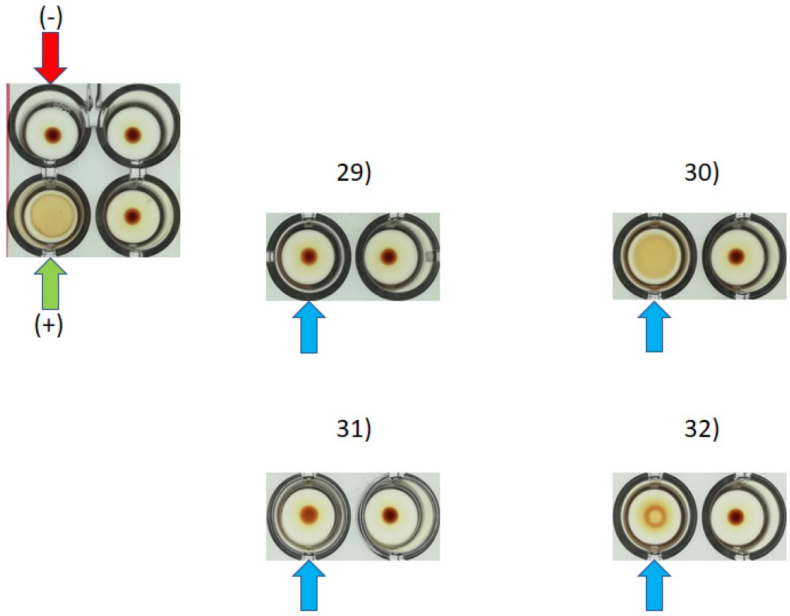


27)



28)

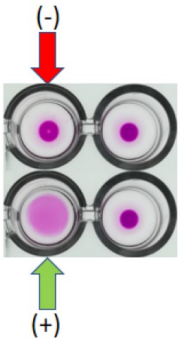




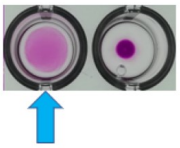
TPPA Testi

SERODIA - TP•PA

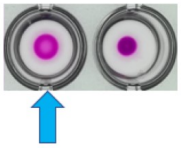
Settling Patterns of Particles	Reading	Interpretation
Particles are concentrated in the shape of a button at the center of the well with a smooth round outer margin.	(-)	Non-Reactive
Particles are concentrated in the shape of a compact-ring with a **very small** "hole" in the center and a smooth round outer margin..	(-)	Non-Reactive
Particles are concentrated in the shape of a compact ring with a "hole" in the center and a smooth round outer margin.	(±)	Inconclusive
Defined large ring with a rough multiform outer margin and peripheral agglutination.	(+)	Reactive
Agglutinated particles spread out covering the bottom of the Well uniformly, edges sometimes folded.	(++)	



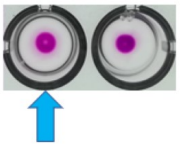
33)



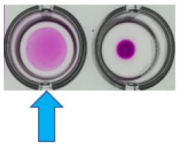
34)

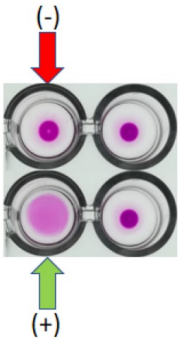


35)

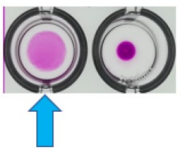


36)

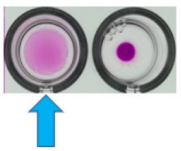




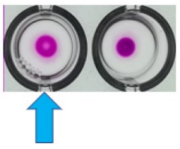
37)



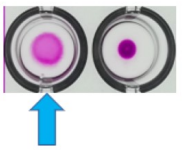
38)

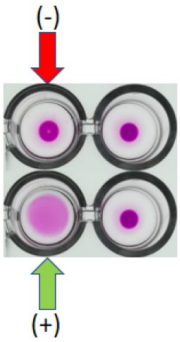


39)

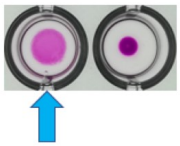


40)

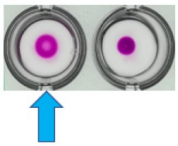




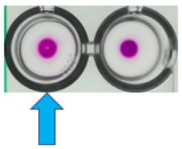
41)



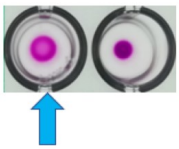
42)

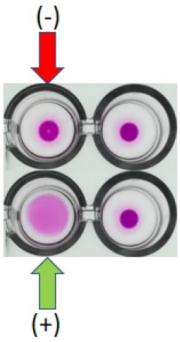


43)

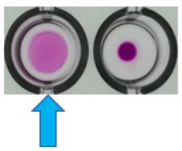


44)

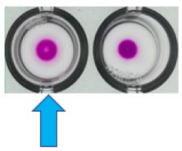




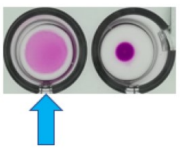
45)



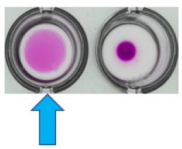
46)



47)



48)



Katılımınız için teşekkür ederiz.

Ad Soyad:……

Sifiliz tanısında kullanılan TPHA ve TPPA Test Sonuçlarının Öznel Sınaması

"Düşük düzey pozitif örneklerin doğrulanmasında Treponema pallidum Hemaglütinasyon, Treponema pallidum Partikül Aglütinasyon ve "Chemiluminescence immunoassay" testlerinin performansının değerlendirilmesi"

Adlı doktora tez çalışması kapmasında hazırlanmıştır.

Tez sahibi: Ertan Çakmak

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Alpay Özbek

DEÜ, MİK AD. Aralık 2019

Giriş

Katıldığınız bu çalışmada üç ayrı Sifiliz testin sonuçları size sunulacaktır.

Bu testlerin sonuçlarının değerlendirilmesi belirli kriterler dahilinde öznel olarak yapılmaktadır ve bu durumda değerlendiriciler arasında yorum farkı olabilmektedir.

Katıldığınız bu çalışmadaki amaç, verilen kriterler ışığında sonuçların yorumlanmasında değerlendiriciler arasındaki farkın oranını saptamaktır.

Bu veriler, ölçütlerin tekrar yorumlamasına ve kullanılan testlerin gerçek performansını saptanmasına yardımcı olacaktır.

Açıklamalar

Sizlere, burada, üç farklı markaya ait test sonuçları bölümler halinde sunulmuştur.

Toplam 48 sonuç değerlendirmeniz beklenmektedir.

Bu sonuçlar birbirinden bağımsızdır.

Yanlılığı azaltmak amacıyla testler arası sonuç kıyaslaması yapılmaması önerilmektedir.

Testlere ait kullanım kılavuzları sizlere ekte sunulmuştur.

Çalışmada Treponema pallidum hemaglütinasyon (TPHA) ve Treponema pallidum partikül aglütinasyon (TPPA) testleri kullanılmıştır.

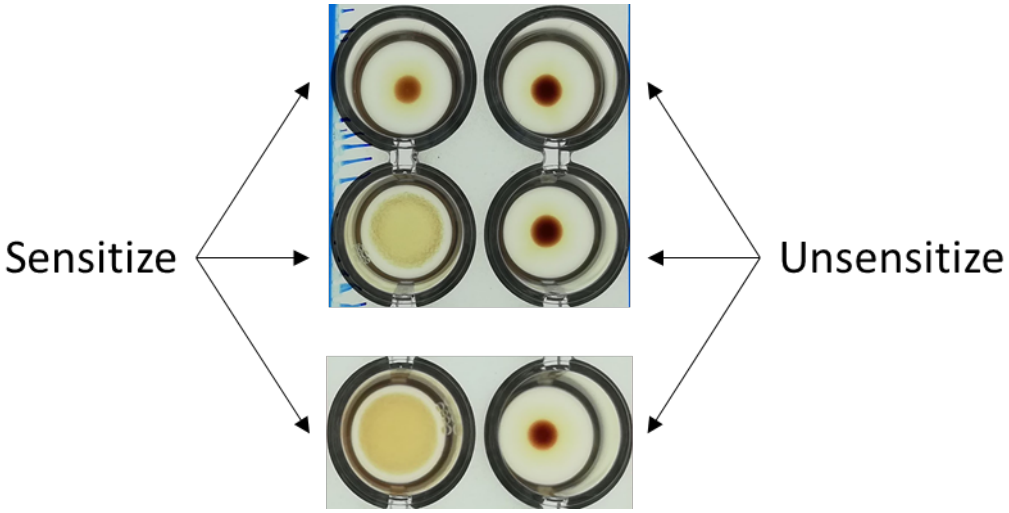
Bu testlerin çalışma ilkeleri aynıdır ve antijen kaplı eritrositlerin (TPHA) ya da partiküllerin (TPPA) hasta serumunda bulunan özgül antikorlarla reaksiyona girmesine dayanır.

Bu reaksiyonun sonucunda gelişen aglütinasyonun derecesi ile test sonucu değerlendirilir.

Her bir testte pozitif ve negatif kontrollerin yanında, bu kontrol ve hasta serumu ile reaksiyon vermemesi beklenen başka bir kontrol daha bulunur.

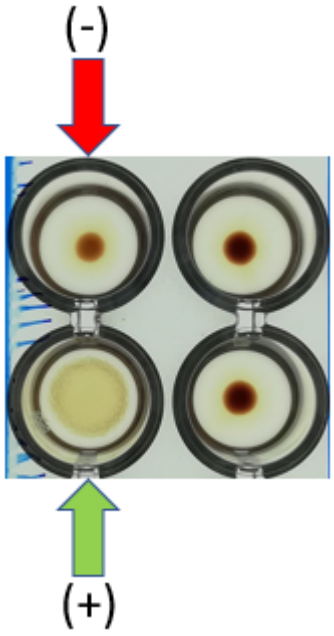
Bu kontrol, antijen ile kaplı olmayan eritrosit (TPHA) ya da partikülden (TPPA) oluşmaktadır ve "unsensitize" olarak adlandırılır.

Bu "unsensitize" kuyusuna ait sonuç "sensitize (antijenle kaplı)" sonucun sağında gösterilmiştir.



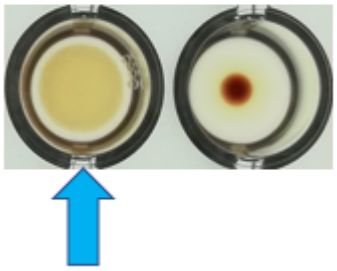
Yönerge

Her bir sayfada pozitif ve negatif kontroller bulunmakta olup sırasıyla yeşil ve kırmızı okla işaretlenmiş ve etiketlenmiştir.

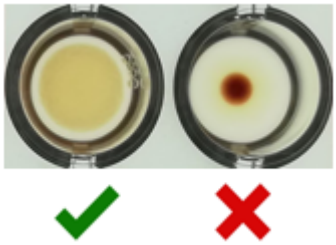


Mavi okla işaretlenmiş kuyu verilen ölçütler ve tecrübeniz ışığında değerlendirmenizi istediğimiz sonuçtur.

18)



Her bir sonuç kuyusunun sağında serumla reaksiyon vermeyen, "unsensitize" sonucu bulunmaktadır. Bu kuyu sonucu bir test içi kontroldür ve tarafınızdan değerlendirmeniz istenmez.



Test sonuçları birbirinden bağımsızdır. Bu nedenle yanıtlama sırası sizin takdirinizdedir.

Hatırlatma: Yanlılığı azaltmak amacıyla testler arası sonuç kıyaslaması yapılmaması önerilmektedir.

Testler farklı üreticiler tarafından geliştirilmiştir ve bu nedenle kullanılan solüsyonların renkleri de farklıdır. Bu durum sonuçların değerlendirmesi açısından hiçbir anlam ifade etmemektedir.

Testleri değerlendirmekte kullanılacak kriterler kendilerine ait her bir bölüm başında ve elinizdeki cevap kağıdında orijinal şekliyle (İngilizce) yazılıdır.

Her bir test sonucu, üretici tarafından önerilen kendisine ait kriterler ışığında değerlendirmeniz beklenmektedir.

Sonuçlar üç kategoride değerlendirilecektir: Bunlar pozitif (+), belirsiz (±) ve negatiftir (-).

Hatırlatma: Sizden beklenen pozitifliğin derecesi değil, sonucun salt pozitif ya da başka bir şey olması şeklinde değerlendirmenizdir.

Herhangi bir durumda Ertan Çakmak'a 05322563049 numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

Test Değerlendirme Kriterleri

Omega IMMUTREP® TPHA

Screening Procedure

Agglutinated cells form an even layer over the bottom of the well. Non-agglutinated cells form a compact button in the centre of the well. Weakly agglutinated cells form a characteristic ring pattern. Agglutination of the Test Cells but not the Control Cells indicates the presence of specific antibody to **T.pallidum**. Absence of agglutination indicates that antibody is below the limit of detection of the system. Do not use the Control Cell pattern as an indication of a negative result since they give a more compact button of cells.

Agglutination of the Control Cells as well as the Test Cells indicates the presence of anti-cell antibody. In this event the test is not valid and should be repeated.

Test Değerlendirme Kriterleri

Spinreact TPHA

Degree of hemagglutination	Reading	Result
Smooth mat of cells covering entire well bottom, sometimes with folded edges	4+	Reactive
Smooth mat of cells covering part of the well bottom	3+	Reactive
Smooth mat of cells surrounded by a red circle	2+	Reactive
Smooth mat of cells covering less area and surrounded by a smaller red circle	1+	Reactive
Button of cells having a small hole in centre	±	Borderline
Definite compact button of cells, sometimes with a very small hole in the centre.	-	Negative

Test Değerlendirme Kriterleri

SERODIA - TP•PA

Settling Patterns of Particles	Reading	Interpretation
Particles are concentrated in the shape of a button at the center of the well with a smooth round outer margin.	(-)	Non-Reactive
Particles are concentrated in the shape of a compact-ring with a **very small** “hole” in the center and a smooth round outer margin..	(-)	Non-Reactive
Particles are concentrated in the shape of a compact ring with a “hole” in the center and a smooth round outer margin.	(±)	Inconclusive
Defined large ring with a rough multiform outer margin and peripheral agglutination.	(+)	Reactive
Agglutinated particles spread out covering the bottom of the Well uniformly, edges sometimes folded.	(++)	

1)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
2)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
3)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
4)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
5)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
6)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
7)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
8)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
9)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
10)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
11)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
12)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
13)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
14)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
15)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
16)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
17)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
18)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
19)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
20)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
21)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
22)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
23)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
24)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)

Notlar:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

25)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
26)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
27)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
28)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
29)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
30)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
31)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
32)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
33)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
34)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
35)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
36)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
37)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
38)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
39)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
40)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
41)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
42)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
43)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
44)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
45)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
46)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
47)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)
48)	☐ (+)	☐ (±)	☐ (-)

Notlar:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

IMMUTREP® TPHA Ref OD221/OD071/OD081

Treponema pallidum haemagglutination test for the Serodiagnosis of Syphilis.

Store at 2°C to 8°C. DO NOT FREEZE.

For in-vitro diagnostic use only.

INTRODUCTION AND INTENDED USE

Syphilis is a complex disease which is normally sexually transmitted. The causative organism, **Treponema pallidum** cannot be grown on conventional laboratory culture media or in the tissue culture. Infection is normally diagnosed by detecting antibodies specific for **T. pallidum** in the patient's serum or CSF. Antibody becomes detectable at about 3-4 weeks following exposure, and may remain at detectable levels for long periods after treatment. Two groups of antibodies are formed: one reacting with the non-treponemal antigens used in the VDRL/Carbon Antigen and RPR tests, and the other reacting with the specific antigens of **T.pallidum**. Antibody to non-treponemal antigens is found (normally) in active disease and the levels subside after successful treatment. Specific antibody persists long after the infection has been successfully treated. It is necessary to test for both groups of antibody since the non-treponemal antibody may arise for reasons other than Syphilitic infection.

IMMUTREP TPHA is a specific, sensitive passive haemagglutination test for the detection of antibodies to **Treponema pallidum in serum or CSF.**

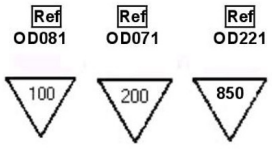
For professional use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

IMMUTREP TPHA comprises T. pallidum sensitised formalised tanned fowl erythrocytes; unsensitised formalised tanned fowl erythrocytes, diluent and control sera. When diluted positive samples are mixed with sensitised erythrocytes, antibody to the sensitising antigen causes agglutination of the cells. The cells form a characteristic pattern of cells in the bottom of a microtitration plate well. In the absence of antibody, they form a compact button in the well.

This test has been calibrated to WHO Reference Serum for Serodiagnostic tests for Treponemal Infections- Ref 3-1980 +/- one double dilution to ensure the correct sensitivity.

CONTENTS



Test	**Cells**	**8.5ml**	**2x8.5 ml**	**2x33 ml**

T. Pallidum antigen coated preserved fowl erythrocytes (approx 0.36% w/v) in buffer. Working Strength.

Control	**Cells**	**8.5ml**	**2x8.5ml**	**2x33 ml**

Preserved fowl erythrocytes (approx 0.36% w/v) in buffer. Working Strength.

DIL	**20ml**	**2x20ml**	**3x57ml**

Diluent. Selected rabbit serum (approximately 0.4%) in buffer. Working Strength.

Control	**+**	**1ml**	**1ml**	**9ml**

Positive Control. Serum prediluted (1/20) in buffer containing antibodies to T. pallidum. Working Strength.

Control	**–**	**1ml**	**1ml**	**9ml**

Negative Control. Serum prediluted (1/20) in buffer free of antibodies to T. pallidum. Working Strength.

CELL DROPPERS	**2**	**2**	**0**
INSTRUCTION LEAFLET	**1**	**1**	**1**

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Dynex M24A U-well microtitration plates are recommended. Microtitration droppers to deliver 25µl or Micropipettes to deliver 10, 25, 75, 100µl and 190µl volumes.

Note: 75µl droppers do not fit and are not supplied for bottles in the 850 Test Kit.

PRECAUTIONS

IMMUTREP TPHA reagents contain material of human origin and have been tested and confirmed negative for HCV, HIV I and HIV II antibodies, and HBsAg by approved procedures at single donor level. Because no test can offer complete assurance that products derived from human source will not transmit infectious agents it is recommended that the reagents within this kit be handled with due care and attention during use and disposal. All reagents should, however, be treated as potential biohazards in use and for disposal. Do not ingest.

IMMUTREP TPHA reagents do not contain dangerous substances as defined by current UK Chemicals (Hazardous Information and Packaging for Supply) regulations. All reagents should, however, be treated as potential biohazards in use and disposal. Final disposal must be in accordance with local legislation.

IMMUTREP TPHA reagents contain 0.095% sodium azide as a preservative which may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. On disposal, flush with large quantities of water.

STORAGE

Reagents must be stored upright at temperatures between 2°C to 8°C.

The kit will perform within specification until the stated expiry date as determined from date of product manufacture and stated on kit and components. Expiry date is the last day of the month on the bottle and the kit label. Do not use reagents after the expiry date.

Exposure of reagents to excessive temperatures should be avoided. Do not expose to direct sunlight.

DO NOT FREEZE ANY OF THE REAGENTS as this will cause irreversible damage.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Obtain a sample of venous blood from the patient and allow a clot to form and retract. Centrifuge clotted blood sample and collect clear serum. Fresh serum samples are required.

Obtain a sample of CSF from the patient.

Do not use haemolysed, contaminated or lipaemic samples for testing as this will adversely affect the results.

Samples may be stored at 2°C to 8°C for up to 48 hours prior to testing. If longer storage is required, store at –20°C for up to 1 year. Thawed samples must be mixed prior to testing.

Do not repeatedly freeze-thaw the specimens as this will cause false results.

REAGENT PREPARATION

All reagents should be brought to room temperature (20°C to 25°C) and fully resuspended prior to use. Do not induce foaming.

The Cell Droppers are provided for use with the Test and Control Cell suspensions. These droppers dispense 75µl drops and these integral droppers should be placed on their corresponding suspensions as follows:

Red Dropper – Test Cells
White Dropper – Control Cells

LIMITATIONS OF USE

The use of samples other than serum or CSF have not been validated in this test.

No serological haemagglutination test can discriminate between antibody due to **T.pallidum** infection and antibody due to infection with other pathogenic treponemes, i.e. **T.pertenue** and **T.carateum**.
No other interfering factors have been specifically identified however positive results should be confirmed, eg. by FTA-Abs, and complemented by clinical findings.

There is no reuse protocol for this product.

A low or suspected positive result should be re-assessed. Diagnosis should not be made solely on the findings of one clinical assay. When making an interpretation of the test it is strongly advised to take all clinical data into consideration.

The test may also be negative in early active Syphilis or in late latent Syphilis. To complete the profile of results to aid the physician, it is also recommended that a VDRL/Carbon Antigen or RPR test is performed on the patient's sample since these tests will detect an active case of Syphilis. OMEGA's IMMUTREP VDRL, IMMUTREP CARBON ANTIGEN and IMMUTREP RPR are available for this purpose.

ASSAY PROCEDURE

Allow samples and reagents to reach room temperature and ensure that samples and all reagents are fully resuspended before use. Samples do not require any pretreatment.

QUALITATIVE (SCREENING) PROCEDURE

Each test requires 4 wells of a microtitre plate.
1. Dispense Diluent into the microtitration plate as follows:
- 25µl in rows 1, 3 & 4 and 100µl in row 2.
2. Dispense 25µl of each sample into a well in row 1.
- Mix well and transfer 25µl from row 1 to row 2.
- Mix well and transfer 25µl from row 2 to row 3.
- Mix well and discard 25µl from row 3.
- Transfer 25µl from row 2 to row 4.
- Mix well and discard 25µl from row 4
3. Add 75µl of well mixed Control Cells to row 3.
4. Add 75µl of well mixed Test Cells to row 4.
   Tap plate gently to mix.
   The final dilutions in row 3 and 4 are 1/80.
5. Cover and let stand at room temperature for 45 to 60 minutes (alternatively the plates can be left overnight).
6. Examine for agglutination patterns.

Note: Kit controls are prediluted and should be added directly into individual wells in row 3 and 4 (no diluent required).

ALTERNATIVE ONE WELL DILUTION PROTOCOL FOR SCREENING.

1. Dispense 190µl of diluent into row 1
2. Dispense 10µl of sample to row 1 and mix
3. Discard 150µl from row 1
4. Add 25µl from row 1 to row 2
5. Add 75µl of well mixed Test Cells to row 1
   Add 75µl of well mixed Control Cells to row 2
   Tap plate gently to mix.
   The final dilutions in wells in rows 1 and 2 are 1/80.
6. Cover and let stand at room temperature for 45 to 60 minutes (alternatively the plates can be left overnight).
7. Examine for agglutination patterns.

QUANTITATIVE PROCEDURE

If it is intended to routinely quantitate positive results the screening procedure may be modified by omitting the Control Cells and preparing only one final dilution. Most samples will be negative or genuinely positive, and the Control Cells may be used in the quantitative procedure below.
1. Prepare dilutions in a microtitration plate as follows:
- For each sample, dispense 25µl of diluent into each well in one column of the plate. For titrations of controls dispensing should commence from row 3.
- Transfer 25µl from row 2 of the original screening plate to row 1 of the quantitative plate.
- Mix and discard 25µl.
- Transfer 25µl from row 2 of the original screening plate to row 2 of the quantitative plate.
- Prepare 25µl doubling dilutions from row 2 to row 8 (for controls doubling dilutions should commence from row 3).
2. Add 75µl of well mixed Control Cells to row 1.
3. Add 75µl of well mixed Test Cells to rows 2 to 8.
4. Mix by gentle tapping.
   The final dilutions in row 1 and row 2 are 1/80.
5. Cover and let stand for 45 to 60 minutes at room temperature (or overnight).

   Note: Kit controls are prediluted and 25µl should be added directly into individual wells in rows 1, 2 and 3 with doubling dilutions commencing from row 3 (no diluent is required in row 1 or row 2).

RESULTS AND INTERPRETATION

Kit controls or known level value samples should be tested with each test run. The kit negative control should give a negative result after 45 minutes. The kit positive control should give a positive result after 45 minutes. If levels of controls or users known samples do not give expected results, test results must be considered invalid.

Screening Procedure
Agglutinated cells form an even layer over the bottom of the well. Non-agglutinated cells form a compact button in the centre of the well. Weakly agglutinated cells form a characteristic ring pattern. Agglutination of the Test Cells but not the Control Cells indicates the presence of specific antibody to **T.pallidum**. Absence of agglutination indicates that antibody is below the limit of detection of the system. Do not use the Control Cell pattern as an indication of a negative result since they give a more compact button of cells.
Agglutination of the Control Cells as well as the Test Cells indicates the presence of anti-cell antibody. In this event the test is not valid and should be repeated.

Should the test not be valid the test should be repeated after first performing an absorption of the test serum. To achieve this, dilute the test serum 1/4 with Control Cells and allow to stand at room temperature for 45-60 minutes. After centrifuging the sample (1000rpm/5 mins) dilute the supernatant 1/5 in Diluent. Test this dilution directly, without any further dilution, using Test and Control Cell suspensions. A confirmatory FTA ABS test is also recommended.

Quantitative Procedure
As screening procedure. The titre is the highest dilution showing agglutination. The Reactive Control serum should produce a titre within one doubling dilution of 1/2560. The starting dilution for the quantitative procedure is 1/80.
Titres of 1/164000 have been detected with **IMMUTREP TPHA** with no prozone (Hook) effect.

TROUBLESHOOTING

Hemagglutination tests are sensitive to the effects of heat, direct sunlight and vibration. Keep away from such sources during test incubation periods.

Do not allow saliva to contaminate the samples or reagents as this will cause erroneous results.

Use a separate disposable tip for each sample to prevent cross contamination.

Replace caps on all reagents immediately after use.

Do not allow reagent to run down the sides of the well. Prior to the start of the assay bring all reagents to room temperature (20°C to 25°C). Gently mix all reagents by gentle inversion or swirling.

For use by operatives with at least a minimum of basic laboratory training.

Do not use damaged or contaminated kit components.

Kit components are matched and should not be interchanged.

EVALUATION DATA

Samples were tested at a European reference centre. These samples originated from Antenatal Clinics, Genito – Urinary Medical Clinical and Public Health Laboratories.

	Positive Samples	Negative Samples	Total
Syphilis Positive	203	3	206
Syphilis Negative	3	669	672
	206	672	878

This study demonstrates:
A sensitivity of 98.5%
A specificity of 99.6%
Reproducibility of **IMMUTREP TPHA** is 100% (+/- one doubling dilution).

REFERENCES

1. Tomizawa, T.and Kasamatsu, S. Jap. J. Med. Sci. Biol. 19,305 (1966).
2. Rathlev, T., Brit. J. Vener. Dis., 43,181 (1967).
3. Tringali, G., Ann. Sc. Pav., 12,311 (1970).
4. Uete, T., Fukazawa., S., Ogi. K. and Takeuchi, Y., Brit., J. Vener. Dis., 47,73 (1971)
5. Garner, M.F., Backhouse, J. L, Daskalopoulos, G. and Walsh, J.L., 48,474 (1972)
6. Johnston, N.A., Brit. J. Vener. Dis. 1972, 48,474 (1972)
7. Sequeira, P.J.L. and Eldridge, A. E., Brit. J. Vener. Dis. 43,242 (1973)
8. Lensinski, J., Krach, J. and Kadziewics, E., Brit. J. Vener. Dis. 50, 33 (1974)
9. O'Neill, P., Warner, R.W. and Nicol, C.S., Brit. J.Vener. Dis. 49,427 (1973)
10. Young. H., Henrischen, C. and Robertson, D.H.H., Brit. J. Vener. Dis. 50,341 (1975)

8010 Issue 5A Revised May 2015

© Omega Diagnostics Ltd 2015.

OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 AND ISO 13485 CERTIFIED COMPANY

SPINREACT

CE TPHA

TPHA

Microplate hemagglutination

Qualitative determination of anti-Treponema pallidum antibodies
IVD

Store at 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination) is an indirect hemagglutination test for the qualitative and semi-quantitative detection of specific anti-*T. pallidum* antibodies in human serum. Stabilized avian erythrocytes sensitised with an antigenic *T. pallidum* solution, agglutinates in the presence of anti-*T. pallidum* antibodies to give a characteristic patterns.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Syphilis is a venereal disease caused by *T. pallidum* infection. *T. pallidum* transmission occurs by direct contact with a productive lesion. The incubation period is about 20 days and the disease progress trough 3 different stages with different symptomatology. The anti-*T. pallidum* antibodies appears in the first stage and may persist in the 85-90% of treated patients after they have been treated and cured.

REAGENTS

R1: Test Cells (TC)	Stabilized avian erythrocytes sensitised with T.pallidum (Nichols) antigens, Preservative, pH 7,2.
R2: Control Cells (CC)	Stabilized suspension of avian erythrocytes, Preservative, pH, 7,2.
R3: Diluent (DIL)	Phosphate buffered saline, pH 7,2, T.pallidum (Reiter) extract, Preservative.
Control +	Immune human serum prediluted 1:20. Preservative
Control -	Animal serum, Preservative

PRECAUTIONS

Components from human origin have been tested and found to be negative for the presence of HBsAg, HCV, and antibody to HIV (1/2). However handle cautiously as potentially infectious.

CALIBRATION

The reagent sensitivity is calibrated against the 1st International Standard for Syphilitic serum (WHO).

STORAGE AND STABILITY

All the kit components will remain stable until the expiration date printed on the label, when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not freeze: frozen reagents could change the functionality of the test.
Store the vials in vertical position. Horizontal position may cause cellular clusters.
Reagents deterioration: Presence of clusters, particles and turbidity.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- U-well microtitration plates.
- Pippetes 25-75 µL.

SAMPLES

Fresh serum or plasma. Stable 8 days at 2-8°C or 3 months at –20°C.
The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing. Do not use highly hemolized or lipemic samples.

PROCEDURE

Qualitative method

1. Allow the reagents and sample to reach room temperature.
2. Dilute serum 1:20 with Diluent (10 µL serum + 190 µL Diluent)
3. Pipette into adjacent wells of a microtitration plate (Note 1):

Sample 1:20 or Controls (µL)	25	25
Control Cells (µL)	75	--
Test Cells (µL)	--	75

4. Mix thoroughly the microplate till the complete homogenisation of the mixing reaction.
5. Cover the microplate and incubate at room temperature for 45-60 min. (Note 2).
6. Examine macroscopically the agglutination patterns of the cells.

Semi-quantitative method

1. Make two fold dilutions of the prediluted 1:20 sample in Diluent.
2. Test each dilution as described in the qualitative method.

READING AND INTERPRETATION

Read the results by comparing the agglutination patterns of the Test Cells with the Control Cells (Note 3). Readings are scored and reported according to the following criteria:

Degree of hemagglutination	Reading	Result
Smooth mat of cells covering entire well bottom, sometimes with folded edges	4+	Reactive
Smooth mat of cells covering part of the well bottom	3+	Reactive
Smooth mat of cells surrounded by a red circle	2+	Reactive
Smooth mat of cells covering less area and surrounded by a smaller red circle	1+	Reactive
Button of cells having a small hole in centre	±	Borderline
Definite compact button of cells, sometimes with a very small hole in the centre.	-	Negative

The Negative Control should not show any agglutination pattern with both Test Cells and Control Cells.
The Positive Control should only show agglutination patterns with Test Cells.
Any agglutination pattern showed by Control Cells indicates the presence of non-specific antibodies and cannot be interpreted. Samples with a borderline pattern should be retested and reported as negatives if the same pattern is reproduced.
Reactive samples should be tittered following the semi-quantitative method. The serum titer is defined as the highest dilution showing reactive result.
Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

QUALITY CONTROL

Positive and Negative controls are recommended to monitor the performance of procedure, as well as a comparative pattern for a better result interpretation.
All result different from the negative control result, will be considered as a positive.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Analytical sensitivity:** 0.05 IU/mL against the 1st International Standard for human syphilitic plasma IgG and IgM NIBSC 05/132 .
2. **Prozone effect:** No prozone effect was detected up to titers ≥1/163840 (Note 4)
3. **Diagnostic sensitivity:** 99.5 %
4. **Diagnostic specificity:** 100 %

INTERFERENCES

Bilirubin (20 mg/dL), hemoglobin (10 g/L), lipids (10 g/L) and rheumatoid factors (300 IU/mL), do not interfere. Other substances may interfere[5].

NOTES

1. Mix vigorously or on a vortex mixer the vials of both Test and Control Cells immediately before use.
2. Keep the microplate away from the vibrations, heat and direct sunlight.
3. The agglutination pattern of the Control Cells should not be used as a reference for negative results since Control Cells give more compact button than do the Test Cells.
4. Sera with a high level of antibodies may give agglutination patterns with very folded edges.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The TPHA test cannot discriminate antibodies anti-*T. pallidum* from antibodies to other pathogenic treponemas. It is recommended that all positive results be confirmed by alternative procedures as FTA-Abs.
- False positive results have been described with samples of patients with mononucleosis, leprosy, borreliosis, autoimmune diseases and drug addiction.
- The TPHA test is not useful in determining the effectiveness of the therapy, since the antibodies level remains long time after the disease has been clinically cured and the test remains positive.

BIBLIOGRAPHY

1. Paris hamelin et al. Feuillets de Biologie 1983: 24(133): 35-42.
2. Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1966; 19: 305-308.
3. Tomizawa T et al. Jap L Med Sci Biol 1969; 22: 341.
4. Sandra A Larsen et al. A manual of Test for Syphilis American Public Health Association 1990: 1-192.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed AACC Press, 1995.

PACKAGING

Ref.: 1200408 100 test

Cont.

Test Cells (TC): 1 x 7.5 mL
Control Cells (CC): 1 x 7.5 mL
Diluent (DIL): 2 x 10 mL
Control + : 1 x 1 mL
Control - : 1 x 1 mL

SPINREACT,S.A./S.A.U Ctra.Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com

SERODIA®-TP•PA

REAGENTS FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO *Treponema pallidum*

Part No. 1626 (100 test)
Part No. 1633 (220 test)

INTENDED USE

Serodia®-TP•PA is a qualitative gelatin particle agglutination assay intended to be used for the detection of *Treponema pallidum* antibodies in human serum or plasma as an aid in the diagnosis of syphilis. This product is not cleared or approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in screening blood or plasma donors.

SUMMARY AND EXPLANATION

The identification of *Treponema pallidum* antibodies aids in the diagnosis of syphilis caused by the microorganisms belonging to the genus *Treponema* and provides epidemiological information on syphilis.

Serological tests for syphilis were first used in 1906 with the development of the nontreponemal (reagin) test by Wasserman.[1] Soon, many tests were developed each with its own modification of a lipoidal antigen, a crude alcohol extract of liver, heart, or other animal organs. The earliest tests were based on the complement fixation procedure of Bordet and Gengou.[2] All nontreponemal tests measure both immunoglobulin G (IgG) and M (IgM) anti-lipid antibodies formed by the host in response both to lipoidal material released from damaged host cells early in infection and to lipid from the cell surfaces of the treponeme itself.[3] The nontreponemal tests for syphilis in use today are flocculation tests using the basic antigen formula of the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) test, which contains cardiolipin, cholesterol, and lecithin.[4] The rapid plasma reagin (RPR) test uses a stabilized suspension of VDRL antigen to which charcoal particles have been added.[4] The antigen is not attached to these particles, but the charcoal is trapped in the lattice formed by the antigen-antibody complex when reactive serum is added. Because of either the lipidic nature of the antigen or some unusual property of the antibodies, the antigen-antibody reaction remains suspended, and flocculation occurs, rather than agglutination or precipitation as in most other serologic tests.[4]

Two treponemal tests have attained standard status for confirmatory syphilis serological testing. The FTA-ABS test is an indirect immunofluorescent antibody test. The FTA-ABS test is sensitive and must be well controlled. The 1+ reading of the standard control, correct conjugate dilution and proper adjustment of the fluorescent microscope are critical to the reliability and reproducibility of the test results. Hemagglutination (MHA-TP) tests using treponemal antigen for *T. pallidum* have gained acceptance since their emergence in mid 1960's [5-7] as a confirmatory procedure following a reactive nontreponemal assay or as a screening procedure. This Serodia®-TP•PA test uses the same treponemal antigen as the MHA-TP, but offers the advantage of gelatin particles, which eliminate non-specific reactions with plasma samples.

PRINCIPLE OF THE TEST

The Serodia®-TP•PA test is based on the agglutination of colored gelatin particle carriers sensitized with *T. pallidum* (Nichols Strain) antigen. Serum or plasma samples are serially diluted in Sample Diluent in microplate wells. Sensitized Gelatin Particles are added to respective wells and the contents of the plate mixed by hand or on a tray mixer. The mixture is incubated stationary for 2 hours at room temperature. Serum or plasma containing specific antibodies will react with the antigen-sensitized colored gelatin particles to form a smooth mat of agglutinated particles in the microtitration tray. A compact button formed by the settling of the non-agglutinated particles characterizes negative reactions. The test is designed to be used exclusively with microtitration techniques. The agglutination patterns and interpretation of the test are clear cut and easy to read visually or with the aid of a tray viewer.

MATERIALS SUPPLIED

The kit contains sufficient reagents to perform 100 or 220 qualitative tests. Each kit contains the following reagents and accessories:

Table 1

	REAGENTS				
MAXIMUM ASSAYS	Reconstituting Solution (liq) (A)	Sample Diluent (liq) (B)	Sensitized Particles (lyo) (C)	Unsensitized Particles (lyo) (D)	Positive (Reactive) Control (liq) (E)
100 (20X5)	1 vial X 8 mL	1 vial X 29 mL	5 vials X 0.6mL*	5 vials X 0.6mL*	1 vial X 0.5mL
220 (55X4)	1 vial X 18mL	1 bottle X 60mL	4 vials X 1.5mL*	4 vials X 1.5mL*	1 vial X 0.5mL

* Reconstitution Volume per vial

A. Reconstituting Solution:
Aqueous solution of 0.05M Phosphate Buffer containing 0.2M NaCl, 0.6% normal rabbit serum, and 0.06% sodium azide, at pH 7.00-7.60. The solution is used for reconstituting the Sensitized and Unsensitized Particles.

B. Sample Diluent:
The solution is used for diluting human specimens in the assay. Aqueous solution of 0.05M Phosphate Buffer containing 0.9M NaCl, 2% normal rabbit serum, 0.1% rabbit testicular extract, and 0.1% sodium azide at pH 6.70-7.30.

C. Sensitized Particles:
Lyophilized preparation of colored gelatin particles sensitized with Treponemal pallidum antigen. At the time of use, add the Reconstituting Solution to the volume indicated on the Particles vial label and in Table 1 above. The rehydrated reagent contains a 1% suspension of sensitized gelatin particles and 0.8% (w/v) sodium azide as preservative.

D. Unsensitized Particles:
Lyophilized preparation of colored gelatin particles. At the time of use, add the Reconstituting Solution to the volume indicated on the Particles vial label and in Table 1 above. The rehydrated solution contains a 1% suspension of unsensitized gelatin particles and 0.8% (w/v) sodium azide as preservative.

E. Positive (Reactive) Control Serum:
This liquid serum containing rabbit antibodies to *T. pallidum* should demonstrate a titer of 1:320 final dilution ± one doubling dilution, when tested according to the procedure described below. Control contains 0.099% sodium azide as preservative.

F. Dropper: 2 pcs. in 100 and 220 Test Kits - To dispense approximately 25 µL per well. One dropper to be used exclusively for dispensing reconstituted Sensitized Particles and the other dropper for dispensing the Unsensitized Particles.

G. Non-Reactive Control Serum: Vial and directions for use provided in separate packaging with this kit.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Polystyrene microplate with "U" shaped wells. Plates should be free from dust, lint, and scratches.
2. Micro-pipette with tips - to dispense 25 µL and 100 µL - for dispensing and diluting serum samples.
3. Pipettes - 1.0 mL serological for reconstitution.
4. Tray mixer (automatic vibratory shaker) - optional
5. Tray viewer - optional

PRECAUTIONS

1. For *in vitro diagnostic use* only.
2. All reagents should be brought to room temperature before use.
3. Proper plate mixing, after the addition of all reagents, is important. Use an automatic vibratory plate mixer or tap the plate sharply with your finger to assure proper mixing. The use of a rotator, such as those used for RPR card test, will not provide adequate mixing.
4. During incubation, cover the microplate with an empty plate or a microplate cover and keep free from vibration.
5. Do not intermix reagents from different kit lots.
6. Ideally, the lyophilized reagents in this kit should be used on the same day as reconstituted. However, when stored at 2-10°C they have a reconstituted stability of 7 days.
7. Some reagents contain small amounts of sodium azide as preservative. Sodium azide may react with lead or copper plumbing, which may result in the formation of highly explosive metal azides. If these reagents are to be disposed of in a laboratory sink, flush with generous amounts of water to avoid azide build-up.
8. Do not pipette patient specimens by mouth (use precision pipettes). All solutions should be handled as if capable of transmitting HIV, Hepatitis or other potentially infectious agents, and disposed of as potential biohazards at "Biosafety Level 2" as recommended in the "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories", 1999 or latest edition.[8]
9. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination.

STORAGE

Store all reagents at 2-10°C both before and after opening or reconstitution. DO NOT FREEZE. Reconstituted Sensitized and Unsensitized Particles should be used within 7 days. Liquid reagents are stable through the labeled expiration date. Do not use reagents after the expiration date marked on the kit.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Human serum is the specimen of choice for this kit [4], however EDTA, Sodium Citrate or Heparin plasma may be used when serum cannot be obtained. Specimens containing erythrocytes or other visible matter should be centrifuged prior to testing to prevent interference with test results. Store patient serum samples in a refrigerator at 2-8°C if testing is done within 5 days. Sera may be frozen and thawed only once. Heat-inactivation is not necessary for the patient sera. However, previously heat-treated (56°C for 30 minutes) sera may be used. Do not inactivate or freeze plasma. Test plasma samples within 48 hours.

PREPARATION OF REAGENTS

1. Reconstituting Solution, Sample Diluent and Positive (Reactive) Control are liquids ready for use and require no reconstitution.

2. Sensitized Particles and Unsensitized Particles must be reconstituted with the Reconstituting Solution using the volume listed on the vials (See Table 1). Once opened, dispense the appropriate amount of Reconstituting Solution. Mix the reconstituted reagents thoroughly and allow them to stand at room temperature for at least 30 minutes prior to use. Mix particles again prior to dispensing. When the particles are reconstituted, write the date reconstituted plus 7 days out-date on the label. The particles should not be used past this 7 day reconstituted date.

ASSAY PROCEDURE (See Table 2)

Four wells are required for each patient sample and Control(s) run in this assay. Wells # 1 & 2 are for dilution of sample, Well #3 for Unsensitized Particles and Well # 4 for Sensitized Particles. The Positive (Reactive) and Non-Reactive Controls should be included in each assay run.

1. Place 4 drops (100 µL) of Sample Diluent in Well #1, and 1 drop (25 µL) in Wells #2 through #4 using a calibrated pipette dropper.

2. Using a micropipette, add 25 µL of patient specimen or Positive or Non-Reactive Control Sera into Wells #1.

3. Mix the contents of Well #1 by filling and discharging the micropipette 5 or 6 times. Then, using the micropipette, transfer 25 µL of the diluted solution from Well #1 into Well #2. Mix the contents of Well #2 in the same manner as stated above and transfer 25 µL into Well #3. Following the same procedure, mix the contents of Well #3 and transfer 25 µL into Well #4, mix and discard the 25 µL of solution remaining in the pipette after mixing Well #4.

4. Place 1 drop (25 µL) of Unsensitized Particles in Well #3, and 1 drop (25 µL) of Sensitized Particles in Well #4 using the droppers supplied in the kit.

5. Mix the contents of the wells thoroughly (for approximately 30 seconds) using a plate mixer (automatic vibratory shaker). DO NOT USE A ROTATOR. Then cover the plate with an empty plate or microplate cover, and let stand at room temperature (15-30°C) for 2 hours before reading. The incubation can be extended to overnight without any perceptible difference in patterns.

6. Place the plate onto a flat surface, preferably with a white background, and visually observe the pattern of agglutination in each well. A plate viewer may be used to aid in enhancing the visual interpretation. Carefully place the microplate on a plate viewer with indirect lighting. Observe the agglutination pattern for each patient and Control(s) wells. Ensure each of the Unsensitized Particle wells is non-reactive and interpret the agglutination pattern of the Sensitized Particles using the criteria shown in Table 4:

Table 2

WELL #	1	2	3	4	
Sample Diluent (µL) / Specimen (µL)	100 / 25)	25 / 25)	25 / 25)	25 / 25)	Discard
Specimen Dilution	1:5	1:10	1:20	1:40	
Unsensitized Particles (µL)			25		
Sensitized Particles (µL)				25	
Final Dilution			1:40	1:80	
Mix, cover plate, and Incubate for 2 hours					
Interpretation					

QUALITY CONTROL

1. The Positive (Reactive) Control should be processed at least once on the day of testing or when a batch of specimens is run and should yield a positive reaction. The Positive (Reactive) Control Serum may be titered to confirm the 1:320 endpoint, ± one doubling dilution, as additional quality control for the assay. To titer the Control, follow the Titration Procedure described below.

2. A Non-Reactive Control should be run at least once on the day of testing or when a batch of specimens is run and should yield a negative reaction. A separate Non-Reactive Control is provided with the kit or an in-house specimen can be used. If the Non-Reactive Control is not with the kit or more is needed, the control can be obtained from the Technical Service Dept.

3. Confirm that the reaction with Unsensitized Particles (1:40 final dilution) is Negative (-) for each patient sample.

4. When titering the Positive (Reactive) Control Serum, confirm that the titer of the Positive (Reactive) Control Serum is 1:320 ± one doubling dilution, (final dilution) for the Sensitized Particles for each assay run. (See Table 3)

5. If an assay does not meet Quality Control parameters listed above, the patient results from that assay should not be reported.

Titration Procedure for Positive (Reactive) Control (See Table 3)

1. Use a "U" shaped microplate sideways. One row (12 Wells) is necessary to test one Positive (Reactive) Control dilution series.

2. Place 4 drops (100 µL) of Sample Diluent into Well #1 and 1 drop (25 µL) into Wells # 2 through # 12.

3. Using a micropipette, add 25 µL of Positive (Reactive) Control Serum into Well #1. Mix by filling and discharging the micropipette 5 or 6 times with the solution in Well #1. Then transfer 25 µL of the diluted solution in Well #1 with a micropipette and transfer it into Well #2. Mix well again and transfer 25 µL into Well #3. Repeat mixing and transfer respectively through Well #12 to obtain serial doubling dilutions. Discard the 25 µL of the solution remaining in the pipette after mixing Well #12.

4. Place 1 drop (25 µL) Unsensitized Particles into Well #3, and 1 drop (25 µL) of Sensitized Particles into Wells # 4 through # 12 using the droppers supplied in the kit.

5. Mix the contents of the wells thoroughly (for approximately 30 seconds) using a plate mixer (automatic vibratory shaker). DO NOT USE A ROTATOR. Then cover the plate with an empty plate or microplate cover, and place it on a level surface. Allow it to stand at room temperature (15-30°C) for 2 hours before reading. The incubation can be extended to overnight without any perceptible difference in patterns.

Table 3

Well #	1	2	3	4	5	6	7 - 11	12	
Sample Diluent (µL): (B) / Reactive Control (µL) (E)	100 / 25)	25 / 25)	25 / 25)	25 / 25)	25 / 25)	25 / 25)	Continue serial dilution in Wells 7 through 12.	25 / 25)	Discard
Dilution	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160		1:10,240	
Unsensitized Particles (µL) (D)			25						
Sensitized Particles (µL) (C)				25	25	25		25	
Final Dilution			1:40	1:80	1:160	1:320		1:20,480	
Mix, cover plate, and incubate for 2 hours									
Interpretation									

INTERPRETATION OF RESULTS

Place the plate onto a flat surface, preferably with a white background, and visually observe the pattern of agglutination in each well as described below. Note: A plate viewer may be used to aid in enhancing the visual interpretation.

Carefully place the microplate on a plate viewer (with indirect lighting), and read the agglutination patterns of the Unsensitized and Sensitized Particles for each specimen and Controls. Readings are scored using the criteria described in Table 4 below:

Table 4

Settling Patterns of Particles	Reading	Interpretation
Particles are concentrated in the shape of a button at the center of the well with a smooth round outer margin.	(-)	Non-Reactive
Particles are concentrated in the shape of a compact-ring with a **very small** "hole" in the center and a smooth round outer margin..	(-)	Non-Reactive
Particles are concentrated in the shape of a compact ring with a "hole" in the center and a smooth round outer margin.	(±)	Inconclusive
Defined large ring with a rough multiform outer margin and peripheral agglutination.	(+)	Reactive
Agglutinated particles spread out covering the bottom of the Well uniformly, edges sometimes folded.	(++)	

REACTIVE: A specimen showing Non-Reactive with Unsensitized Particles (final dilution 1:40) but demonstrating a reaction of + or ++ at any dilution 1:80 or over with Sensitized Particles is interpreted as Reactive in this test. The endpoint titer is determined as the highest serum dilution showing a + or ++ reactive pattern. If a serum sample demonstrates a positive reaction with both the Sensitized and Unsensitized Particles, retest using the Absorption Procedure described below. A reactive treponemal test indicates past or present infection and usually remains reactive for life.

INCONCLUSIVE/INDETERMINATE: A specimen showing Non-Reactive with Unsensitized Particles (final dilution 1:40) but demonstrating a plus/minus reaction with Sensitized Particles at a 1:80 final dilution, is regarded as inconclusive or indeterminate. In such cases, it is recommended that the assay be re-run, or another sample drawn and assayed in two weeks. The result of the repeated test should be reported if found to be Reactive or Non-Reactive. Repeated inconclusive results should be reported as Inconclusive for further follow-up and/or confirmed by other methods such as FTA-ABS.

NON-REACTIVE: Regardless of the reaction pattern with Unsensitized Particles, a specimen showing Non-Reactive with Sensitized Particles at a 1:80 final dilution is regarded as Non-Reactive in this test. A Non-Reactive result indicates no past or present infection, but during incubating-stage syphilis, a Non-Reactive result may also occur.

ABSORPTION PROCEDURE

In most cases, test samples do not show agglutination with Unsensitized Particles. However, if a test sample produces agglutination with both Unsensitized and Sensitized Particles, it should be re-tested after using the following absorption procedure:

1. Place 0.95 mL of reconstituted Unsensitized Particles in a small test tube.
2. Add 50 µL of test specimen and mix thoroughly using tube mixer and incubate at room temperature for 20 - 30 minutes (mix manually 1 or 2 times).
3. Centrifuge for 5 minutes at 2,000 rpm. Place 50 µL of supernatant (absorbed at a 1:20 ratio of test specimen to Unsensitized Particles) to Well #3 of the microplate.
4. Add 1 drop (25 µL) of Sample Diluent into Well #4 of the microplate using a micropipette, transfer 25 µL of Well #3 (absorbed 1:20 diluted sample) into Well #4. Mix completely by filling and discharging the micropipette 3 or 4 times with fluid in Well #4, in order to make a doubling dilution, and then discard the 25 µL of solution remaining in the pipette after mixing.
5. Place 1 drop (25 µL) of Unsensitized Particles in Well #3 and 1 drop (25 µL) of Sensitized Particles in Well #4.
6. Follow the original procedure and read the patterns.

LIMITATIONS

1. The Serodia®-TP•PA test is specific for detecting *Treponema pallidum* antibodies in serum or plasma samples. It does not detect *T. pallidum* directly.
2. As with all serological tests for syphilis, interpretation of results obtained with the Serodia®-TP•PA syphilis Antibody test must be used in conjunction with the patient's clinical symptoms, medical history and other clinical and/or laboratory findings to produce an overall clinical diagnosis.
3. Specimens giving inconclusive results in the assay should be re-tested. A repeated inconclusive specimen should be reported as Inconclusive for follow-up and another specimen drawn in two weeks for testing and/or confirmed by other methods, such as FTA-ABS.
4. The Serodia®-TP•PA is less sensitive than the fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-ABS) test in untreated primary syphilis but compares favorably in all other stages of syphilis.
5. All treponemal tests tend to remain reactive following treponemal infection; therefore, they should not be used to evaluate response to therapy. Because of the persistence of reactivity, probably for the life of the patient, the treponemal tests are of no value to the clinician in determining relapse or re-infection in a patient who has had a reactive Serodia®-TP•PA result.
6. The Serodia®-TP•PA may be reactive in a small percentage (less than 1%) of normal or healthy persons; these false-positive results are often transient, their cause unknown. False positive Serodia®-TP•PA results may occur in association with other underlying illnesses.
7. The Serodia®-TP•PA may be reactive in persons from areas where yaws or pinta was, or is, endemic.
8. The Serodia®-TP•PA, as do all laboratory tests, performs best in populations at risk for the disease for which the test has been developed.
9. Samples from patients with HIV, Leprosy, Toxoplasmosis, H. pylori, and drug addiction may react, on occasion, with either the sensitized or the unsensitized particles, causing false-positive or inconclusive results.

EXPECTED RESULTS

Studies performed on 175 normal male and female and 171 normal pregnant female populations indicated a reactive rate of 2.6% (9/346) from people located in the Southeast United States. Six of these donors were also reactive on RPR testing. The population ranged in age from 14 to 40 years of age. The rate of reactivity will vary according to geographic location and social demographics of the population.

One hundred percent (100%) of samples tested from both treated and untreated patients in both the primary and secondary stages of the disease were detected by the Serodia®-TP•PA test. Samples from individuals with autoimmune disease, Toxoplasmosis, H. pylori, IV drug users, and HIV demonstrated an 11.4% (18/158) reactive rate. These same samples were also reactive by the MHA-TP Hemagglutination assay.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Studies were conducted which compared the Serodia®-TP•PA to SERA-TEK MHA-TP, using a total of 422 sera specimens from patients referred by physicians for testing as suspected positive for syphilis based on symptoms and history. A total of 425 specimens from healthy donors considered as normal population, randomly collected including both males and females, were also evaluated. One site used 253 pregnant women as their normal population; and the other site collected and tested 57 suspected positive specimens from pregnant women. These specimens were tested by the sites using a routine RPR test and SERA-TEK MHA-TP test in order to assess the performance of the Serodia®-TP•PA kit.

The two clinical study sites selected to perform the testing are located in the Southeastern United States. One facility is a state department of health clinic whose routine population consists of prenatal testing of pregnant females and patients for transmitted disease testing and treatment. The second facility is a university hospital microbiology and immunology laboratory whose general population of all ages consists of blood donors, routine general testing, and infectious disease referrals. All specimens used in this study were serum samples since potential non-specific reactions may occur using plasma with animal cell-based particles used in the reference tests.

The following Tables demonstrate the performance of the Normal and Suspected Positive groups pulled from each site's general population. In each population, the RPR reactive and negative samples are shown using the Serodia®-TP•PA test compared to the SERA-TEK MHA-TP test. Relative sensitivity and specificity determinations were made with 95% Confidence Intervals ( ) calculated by the exact method.

Indeterminate interpretations (+/-) in the MHA-TP (3 samples) and Serodia®-TP•PA (1 sample) tests were treated as a positive result for the calculations of sensitivity and specificity below.

NORMAL POPULATION

		SERODIA +	SERODIA -
RPR REACTIVE	MHA-TP +	6	0
	MHA-TP -	0	4
RPR NONREACTIVE	MHA-TP +	3	1
	MHA-TP -	0	411

Relative Sensitivity = 6 / 6 plus 3 / 4 = 90% (C.I. = 55.5 - 99.7%)
Relative Specificity = 4 / 4 plus 411 / 411 = 100% (C.I. = 99.1 - 100%)

SUSPECTED POSITIVE SYPHILIS PATIENTS

		SERODIA +	SERODIA -
RPR REACTIVE	MHA-TP +	387	0
	MHA-TP -	6*	5
RPR NONREACTIVE	MHA-TP +	23	0
	MHA-TP -	0	1

* FTA-ABS results were also positive on these samples

Relative Sensitivity = 387 / 387 plus 23 / 23 = 100% (C.I. = 99.1 - 100%)
Relative Specificity = 5 / 11 plus 1 / 1 = 50% (C.I. = 21.1 - 78.9%)

Six (6) samples from the testing groups resulted in "false positive" results as compared to the reference MHA-TP test. Further evaluation confirmed these samples reactive by FTA-ABS IFA.

Documented Positive Primary and Secondary Samples:

An additional panel of 100 documented VDRL and RPR reactive syphilis sera, obtained from patients medically diagnosed with primary and secondary stage infection, was sent blinded for evaluation to assess the inter-laboratory performance of the Serodia test. Half of the patients were on penicillin therapy at the time the blood sample was drawn. This panel consisted of specimens from 27 treated-primary infection, 23 untreated-primary infection, 24 treated-secondary stage, and 26 untreated-secondary stage patients. Both laboratories identified all samples reactive and demonstrated equivalent reactive interpretations of the Serodia results to the reference MHA-TP titers. Incubating-stage syphilis samples were not specifically identified and tested in these studies.

Potential Cross Reactors:

To evaluate potential interference, 174 samples confirmed positive for each respective disease condition, were assayed in the Serodia®-TP•PA and MHA-TP tests. The bulk of the samples were obtained from each laboratory's routine testing population based on diagnostic condition. Thirty-five specimens were purchased as medically diagnosed for Systemic Lupus Erythematosus (SLE), HIV, Toxoplasmosis, H. pylori, Arthritis, and drug addiction. The total number of disease condition categories and reactive results obtained is listed in the following table. The Serodia®-TP•PA test showed no difference in results as compared to MHA-TP, in the samples evaluated. Serodia®-TP•PA reactive patients were also reactive with the reference MHA-TP assay, but further FTA-ABS evaluation was not performed.

Category	Number Tested	Serodia TP-PA Number Reactive
Drug Users	10	1
Toxo (IgM & IgG)	21	2
SLE	23	0
HIV	81	19
H. pylori	10	1
Arthritis	19	1
Lyme Disease	10	0

REPRODUCIBILITY:

Studies were performed in both laboratories to demonstrate the Inter-day, Inter-Lot, and Intra-Assay reproducibility of the Serodia® TP-PA Test kit. Three lots of kits were used in each laboratory for the Inter-Day testing with a panel of 3 reactive samples at different titers, three non-reactive, and the Reactive Control Serum from the kit. The panel samples were serially diluted into tubes each day and run in duplicate for 5 days on the 3 lots of kits. The Intra-Assay testing was run on one lot with the 6 panel sera samples run 10 times each in each laboratory. The same thirty-five potential cross-reacting samples (above) were sent to each site for evaluation. These purchased samples were diagnosed with other diseases, such as: SLE, HIV, Toxoplasmosis, H. pylori, Arthritis, and drug addiction. Both laboratories identified the same 33 samples as non-reactive and two as reactive in the Serodia test. In all cases, the Intra-Assay, Inter-Lot, Inter-Lab, and Inter-Day reproducibility was 0% C.V. for the Negatives and no greater than +/- one titer for reactive sera and the Reactive Control.

BIBLIOGRAPHY

1. Wassermann, A., Neisser, A., Bruck, C., *Eine serodiagnostische reaktion bei Syphilis*, Dtsch Med Wochenschr, 32:745-6, 1906.
2. Bordet, J., Gengou, O., *Sur l'existence de substances sensibilisatrice dans la plupart des serums antimicrobiens*, Ann Inst Pasteur, 15:289, 1901.
3. Matthews, H.M., Yang, T.K., Jenkin, H.M., *Unique lipid composition of Treponema pallidum (Nichols virulent strain)*, Infect Immun, 24:713-19, 1979.
4. Larsen, S.A., Hunter, E.F., Kraus, S.J., Manual of Tests for Syphilis, Public Health Service Publication no. 411, Washington, D.C. Government Printing Office, 1990.
5. Rathlev, T., *Hemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic Treponema pallidum*, WHO Document, WHO/VDT/RES, L77:65, 1965.
6. Tomizawa, T. and Kasamatsu, S., *Hemagglutination tests for diagnosis for Syphilis*, A preliminary report, Jap J Med Sci Bio, 19:305-308, 1966.
7. Rathlev, T., *Hemagglutination test utilizing pathogenic Treponema pallidum for the Serodiagnosis of Syphilis*, Brit. J. Ven. Dis, 43:181-185, 1967
8. US Department of Health and Human Services, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition, Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, May 1999. (May be obtained from: Government Printing Office at (202)512-2356 or Superintendent of Documents, U.S. GPO, Washington, D.C. 20402)

FUJIREBIO Diagnostics, Inc.

Distributed By:
Fujirebio Diagnostics, Inc.
Malvern, PA, USA
(610) 240-3800
(888) 499-9998

Manufactured by FUJIREBIO INC. Tokyo, Japan

Part No.: 000-976 06/2006
Printed in U.S.A.

7.2. Ek-2: Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk. 01.03.2018
Sayı : 212

Sayın Doç.Dr.Özgen Alpay ÖZBEK,

Kurulumuz tarafından 01.03.2018 tarih ve 3833-GOA protokol numaralı 2018/06-15 karar numarası ile görüşülen **"Düşük Düzey Pozitif Örneklerin Doğrulanmasında Treponema Pallidum Hemaglütinasyon, Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon ve "Chemiluminescence İmmunoassay" Testlerinin Performansının Değerlendirilmesi"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3833-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Düşük Düzey Pozitif Örneklerin Doğrulanmasında Treponema Pallidum Hemaglütinasyon, Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon ve "Chemiluminescence İmmunoassay" Testlerinin Performansının Değerlendirilmesi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Özgen Alpay ÖZBEK Tıbbi Mikrobiyoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2018/06-15**	**Tarih:01.03.2018**
	Doç.Dr.Özgen Alpay ÖZBEK'in sorumlusu olduğu "**Düşük Düzey Pozitif Örneklerin Doğrulanmasında Treponema Pallidum Hemaglütinasyon, Treponema Pallidum Partikül Aglütinasyon ve "Chemiluminescence İmmunoassay" Testlerinin Performansının Değerlendirilmesi**" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

7.3. Ek-3: Özgeçmiş

ERTAN ÇAKMAK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

18 Eylül 2007 - Şu Anda (16 yıl)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.24 / 4.0

02 Eylül 2004 - 18 Eylül 2007 (3 yıl 1 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: 556
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.23 / 4.0

18 Eylül 1999 - 20 Haziran 2003 (3 yıl 10 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR. (İÖ)
Diploma Numarası: 315
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 63.71 / 100.0

01 Eylül 1996 - 01 Ekim 1998 (2 yıl 2 ay)
Ön Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU, TIBBİ LABORATUVAR PR.
Diploma Numarası: 874
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 64.81 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

11 Temmuz 2007 - Şu Anda (16 yıl 2 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

F. TUZUN, H. OZKAN, M. CETİNKAYA, E. YUCESOY, O. KURUM, B. CEBECİ, E. CAKMAK, A. OZKUTUK, P. KESKİNOGLU, B. BAYSAL, A. KUMRAL & N. DUMAN, Is European Medicines Agency (EMA) sepsis criteria accurate for neonatal sepsis diagnosis or do we need new criteria?, PLOS ONE, 2019, 1932-6203, 14, 6.

Bildiriler

E. ÇAKMAK, Z. YÜCE, İ. M. A. ÖKTEM & Y. H. ABACIOĞLU, Hepatit C Virusu Kor (Core) Proteinin Prokaryot Ve Memeli Hücrelerine Klonlanıp Eksprese Edilmesi [PP-086], Poster Sunumu, 7.Ulusal Moleküler Ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 05 Haziran 2012, 08 Haziran 2012, 313 - 313.

E. ÇAKMAK, İ. M. A. ÖKTEM & Y. H. ABACIOĞLU, Hepatit C virusunun özyapı proteininin prokaryotik hücrede ifade ettirilerek saflaştırılması, Sözlü Sunum, 3. Ulusal Viroloji Kongresi, 09 Aralık 2007, 13 Aralık 2007.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0