

---

## ÖZGÜN ARAŞTIRMA

---

# Anti-Tetanoz Antikorların Saptanmasında Ev Yapımı ELISA Tekniğinin İyileştirilmesi

## *Innovation of an In-House ELISA Test Kit for the Determination of Anti-Tetanus Antibodies*

Cemile Sönmez, Nilay Çöplü, Berrin Esen

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı

---

### ÖZET

**Amaç:** Tetanoz daha çok gelişmekte olan ülkelerde görülen aşı ile önlenabilir bir hastalıktır. Aşılama programlarının etkilerini görmek, toplumun immün durumunu değerlendirmek gibi çalışmalar için, anti-tetanoz antikor düzeylerini saptamaya yönelik serolojik testler yapılmalıdır. ELISA, tetanoz antikor düzeylerini belirlemede basit, hızlı ve ekonomik bir test olmakla birlikte çapraz reaksiyon veren antikorlardan etkilenerek koruyucu olmayan antikor düzeylerini saptamada yetersiz kalabilmektedir. Amacımız ELISA yöntemimizi, çapraz reaksiyon veren antikorların bloke edilmesi yolu ile koruyucu olmayan antikor düzeylerini saptayabilecek şekilde iyileştirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Seçilen 322 serum örneği ev yapımı ELISA 1 yöntemi ile test edilmiştir. Serumlar ELISA 1 yöntemi ile saptanan antikor düzeylerine göre koruyucu olmayan düzey olan 0.01 IU/ml ve altı, 0.01-0.1 IU/ml arası, 0.1-1 IU/ml arası, 1-10 IU/ml arası ve 10 IU/ml'nin üzerindeki düzeyler olacak şekilde gruplandırılmıştır. Altın standart olan fare nötralizasyon testi (NT) ile toplam 52 serum çalışılmış olup, bu gruba 0.01 IU/ml'nin altındaki antikor düzeyine sahip serumların tümü (n=25) ve diğer gruplardan randomize seçilen serumlar (n=27) dahil edilmiş ve ev yapımı ELISA 2 yöntemi ile tekrar çalışılmıştır.

**Bulgular:** NT ve ELISA 1 testlerinin 1.0 IU/ml ve üzerinde uyumlu olduğu, altındaki düzeylerde ise ELISA 1 testinin NT'ye göre daha yüksek antikor düzeyi saptadığı gözlenmiştir. ELISA 2 yönteminin sonuçları NT ile karşılaştırıldığında güvenilir düzeyin 0.5 IU/ml'ye indiği gözlenmektedir.

**Sonuç:** ELISA 2 yöntemi ile ölçülebilen en düşük antikor titresi 0.5 IU/ml'dir. ELISA 2 yönteminin 0.01 IU/ml ve altındaki antikor düzeylerini saptayabilmesi için başka tekniklerin üzerinde çalışılması gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** Clostridium tetani, tetanoz ELISA, tetanoz antitoksik antikor

## SUMMARY

**Objective:** Tetanus is a vaccine preventable disease that is seen mostly in the developing countries. In order to evaluate the efficacy of vaccination programmes or to evaluate the immune status of the population, anti-tetanus antibody levels must be investigated by serological studies. ELISA test is a simple, rapid and economical test for the detection of tetanus antibody titers. However, the results may be affected by cross reactive antibodies or low levels of antibodies may remain undetected. Our aim was to improve an in-house ELISA kit by blocking the cross reacting antibodies and enable the detection of low levels of antibodies.

**Materials and Methods:** The selected 322 serum samples were tested for the presence of anti-tetanus antibodies by an in-house ELISA method, named as ELISA 1. The sera were grouped according to the levels detected by ELISA 1 test as  $\leq 0.01$  IU/ml, 0.01-0.1 IU/ml, 0.1-1 IU/ml, 1-10 IU/ml, >10 IU/ml. A total of 52 sera were tested for tetanus antibody levels by the gold standard mouse neutralization (NT) test. Sera with antibody levels below 0.01 IU/ml (n=25) and the sera randomly selected from the other groups (n=27) were included in the neutralisation test group. Samples tested with neutralization were later also tested by the modified ELISA 2 method.

**Results:** NT and ELISA 1 test results correlated well for the sera with antibody level  $\geq 1.0$  IU/ml. However, for antibody levels below 1.0 IU/ml, ELISA 1 test results were higher than NT results. The results of ELISA 2 method was better than ELISA 1 test when NT results were considered as the gold standard. When ELISA 2 results were compared to NT results, the lowest reliable detection limit was decreased to 0.5 IU/ml.

**Conclusion:** The lowest antibody detection limit for ELISA 2 method was 0.5 IU/ml. In order to detect antibody levels 0.01 IU/ml and below, further studies should be performed to improve the in-house ELISA method.

**Key Words:** *Clostridium tetani*, Tetanus ELISA, Tetanus antitoxic antibody

## GİRİŞ

Tetanoz, *Clostridium tetani* ekzotoksini ile gelişen ve aşı ile önlenebilen bir hastalıktır (1). Daha çok aşılama programlarının efektif uygulanmadığı ülkelerde, sosyoekonomik yönden geri kalmış, kalabalık, kötü hijyene sahip kesimlerde ve kırsal bölgelerde görülmektedir (2-5). Tetanoz için riskli gruplar yeni doğanlar, aşılanmamış popülasyon ve özellikle üreme çağındaki kadınlar, intravenöz ilaç bağımlıları, yaşlılar ve immun yetmezliği olanlardır (6,7). Hastalığın kalıcı bağışıklık bırakmaması, yalnızca aşı ile immun cevabın oluşabilmesi epidemiyolojik olarak önemli bir özelliğidir.

Ülkemizde neonatal tetanoz eliminasyon programı başarı ile yürütülmüş olup, tetanoza karşı uygulanan aşuların etkinliğinin ölçülmesi ve yaşlı ya da immun yetmezliği olan bireylerdeki bağışık durumun saptanmasında serolojik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (8).

Tetanoza karşı oluşan antikorların saptanmasın-

da en sık uygulanan serolojik yöntemler; altın standart olan in-vivo toksin nötralizasyon testi (NT), indirekt hemaglutinasyon testi (İHA), counter-immün-elektroforez (CIE), radio immünoassay (RIA) ve enzyme-linked immunabsorbent assay'dir (ELISA) (8). NT altın standart olup canlı hayvan kullanımı gerektiren, zahmetli bir testtir (8). ELISA, tetanoz antikor düzeylerini belirlemede basit, hızlı ve ekonomik bir test olmakla birlikte bazı ELISA yöntemleri çapraz reaksiyon veren antikorlardan etkilenecek düşük düzeydeki antikorları saptamada yetersiz kalabilmektedir (9-11). Geliştirmiş olduğumuz in house ELISA yöntemi (ELISA 1), yüksek düzeyde antikor varlığında NT ile uyumlu olup, düşük düzeyde ise NT'den yüksek antikor düzeyleri vermektedir. Bu çalışmadaki amacımız ELISA 1 yöntemini çapraz reaksiyon veren antikorların bloke edilmesi yolu ile düşük düzeydeki antikorları saptayabilecek şekilde iyileştirmektir.

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

Çalışma, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Laboratuvarlarında, Japon Uluslararası İşbirliği Kuruluşu [Japan International Cooperation Agency (JICA)] desteği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen serum örnekleri 2000 yılında Samsun ilinden toplanmıştır. Ev yapımı ELISA 1 yöntemi ile 322 toplanan serum örneği test edilmiştir. Serumlar, ELISA 1 yöntemi ile saptanan antikor düzeylerine göre 0.01 IU/ml'nin altı, 0.01-0.1 IU/ml, 0.1-1 IU/ml arası, 1-10 IU/ml arası ve 10 IU/ml'nin üzerindeki düzeyler olacak şekilde gruplandırılmıştır. Antikor düzeyi 0.01 IU/ml'nin altında olan serumların tümü (n=25) ile diğer gruplardan randomize seçilen serumlar (n=27) altın standart olan fare nötralizasyon testi (NT) ve ev yapımı ELISA 2 yöntemi ile çalışılmıştır (toplam n= 52) Sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

ELISA plaklarının antijen ile kaplanması aşamasında Japonya'dan temin edilen tetanoz toksini (LD 50/ml, Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University, Kagawa, Japan) ve referans serum olarak ise yine Japonya'dan temin edilen tetanoz antitoksin (50 IU/ampül NIID, Japan) kullanılmıştır.

Tetanoz toksini, antijen içeriği 2µg/ml olacak şekilde bikarbonat tampon (pH 9.6) ile sulandırıldıktan sonra, medium binding kapasiteli ELISA plaklara (Greiner, no:655001, Germany) 100 µl/kuyucuk olacak şekilde konulmuş ve +4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Plaklar phosphate buffer saline/Tween 20 (PBS-T) ile üç kez yıkanmıştır. Block Ace solüsyonuyla (Japan), referans serum ve hasta serumlarına sekiz kez iki kat artan seri dilüsyon uygulanmıştır. Dilüe edilen serumlar antijen kaplanan plaklara 100 µl/kuyucuk olacak şekilde eklenmiş ve çalkalayıcı ortamda (Labsystem, Helsinki, Fin-

land) 1 saat 22°C'de inkübe edilmiştir. PBS-T ile üç kez yıkandıktan sonra 3000 kez sulandırılmış anti human IgG alkelen fosfataz (Seikagaku Kogyo, Japan) konjugat 50 µl/kuyucuk olacak şekilde konulmuş ve tekrar 1 saat 22°C'de inkübe edilmiş ve yıkanmıştır. Substrat aşamasında; p-nitrophenyl-phosphate-1 (Wako, Tokyo, Japan) Na dietanolamine tamponda (Sigma-Aldrich D8885) 1mg/ml olacak şekilde sulandırılarak 200µl/kuyucuk olacak şekilde uygulanmıştır ve inkübasyon süresi (1 saat 22°C) sonunda tepkimeyi durdurmak için 3M NaOH, 50µl/kuyucuk olacak şekilde dağıtılmıştır. Plakların optik dansiteleri 405/630nm dalga boyunda ELISA okuyucusu (Labsystem) kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar Paralel Line Assay software programı kullanılarak değerlendirilmiştir (12).

İkinci ELISA yönteminde plakların kaplanması ELISA 1 yönteminde olduğu gibi yapılmıştır. Yıkanmış plaklara %0.5 bovine serum albumin (BSA) içeren PBS, 100 µl/kuyucuk olacak şekilde dağıtılarak 22°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Referans ve hasta serumlarının dilüsyonu %0.5 BSA-% 0.05 Tween 80 içeren PBS ile yapılmış ve ELISA 1 yönteminde anlatıldığı şekilde 100µl/kuyucuk olacak şekilde aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra konjugat aşaması, substrat aşaması, tepkimeyi durdurma aşaması, okutma aşaması ve sonuçların değerlendirilmesi birinci yöntemde anlatıldığı şekilde uygulanmıştır.

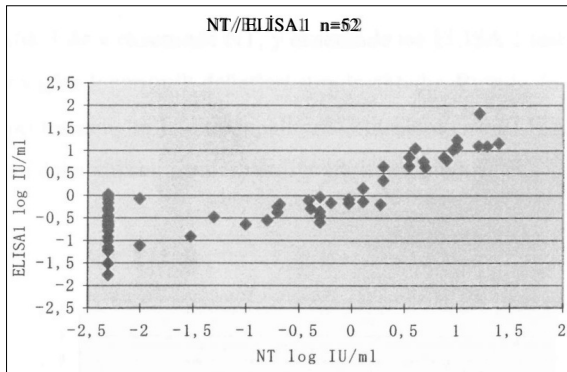
Nötralizasyon testinde (NT) deney hayvanı olarak 17-22g Swiss albino fareler ve standart tetanoz antitoksini (50 IU/ampül) kullanılmıştır. Bu antitoksinde 0.01 IU/ml solüsyon hazırlanmıştır ve tetanoz toksini (LD50/ml) ile beş değişik titrede karşılaştırılarak iki dizi standart solüsyon oluşturulmuştur. Dizilerden biri erkek, diğeri dişi fareler için kullanılmıştır. Serum örnekleri gelatin phosphate buffered saline (G-PBS) ile dilüe edilerek, 500 µl tetanoz toksini (LD50/ml) içeren

tüplere eklenmiştir. Her serum için üç ayrı dilüsyon kullanılmıştır. Serum örnekleri ve standart solüsyonlar toksin ile karşılaştırıldıktan sonra oda ısısı ve karanlıkta iki saatlik inkübasyona bırakılmıştır ve sonra farelere 0.4 ml subkutan olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu takip eden 5 gün boyunca günde iki kez tetanoz toksinine bağlı belirtiler incelenmiş, belirtiler ve ölüm zamanlaması standart solüsyonların enjekte edildiği farelerin belirti ve ölüm zamanlaması ile karşılaştırılarak anti-tetanoz antikor titreleri hesaplanmıştır.

## BULGULAR

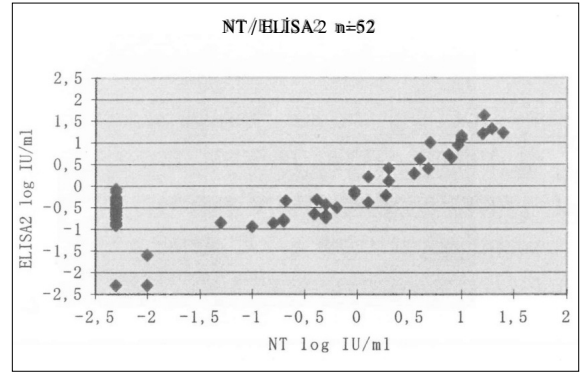
Çalışmada 52 serumun NT, ELISA 1 ve ELISA 2 yöntemleriyle saptanan antitoksik antikor düzeylerinin karşılaştırılması Grafik 1-4'de sunulmaktadır.

Birinci grafikte NT ve ELISA 1 yönteminin sonuçları karşılaştırılmaktadır. İki testin 1.0 IU/ml ve üzerinde uyumlu olduğu, altındaki düzeylerde ise ELISA 1 yönteminin NT'ye göre daha yüksek antikor düzeyleri verdiği gözlenmektedir.



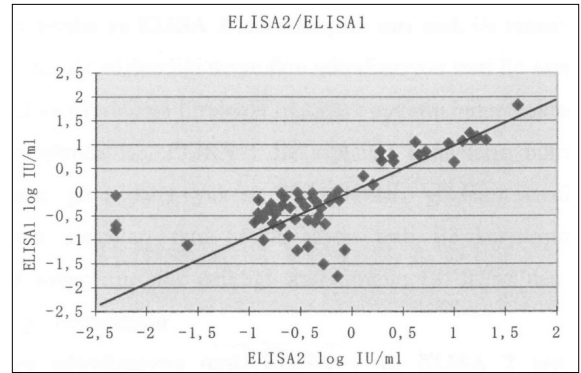
**Grafik 1:** NT ve ELİSA 1 test sonuçlarının karşılaştırılması

Grafik 2'de NT ve ELISA 2 yönteminin sonuçları karşılaştırılmaktadır. Burada da 0.5 IU/ml ve üzerinde iki testin uyumlu olduğu, altındaki antikor düzeylerinde ise ELISA 2 testinin NT'ye göre daha yüksek antikor düzeyleri verdiği gözlenmektedir.



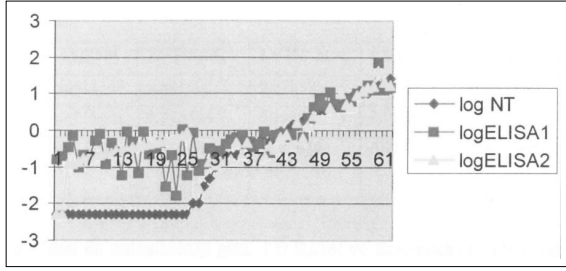
**Grafik 2:** NT ve ELİSA 2 test sonuçlarının karşılaştırılması

Grafik 3'de ELISA 1 ve ELISA 2 yöntem sonuçları karşılaştırılmaktadır. İki testin 1.0 IU/ml ve altındaki düzeylerde uyumsuz olduğu gözlenmektedir.



**Grafik 3:** ELISA 1 VE ELISA 2 test sonuçlarının karşılaştırılması

Grafik 4'de NT, ELISA 1 ve ELISA 2 yöntemleriyle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmaktadır. NT ile saptanan değerler 1.0 U/ml ve üzerindeki düzeylerde ELISA 1 ile uyumlu bulunmakta, 1.0 IU/ml değerinin altında ise, ELISA 1 ile saptanan sonuçların NT sonuçlarına göre daha yüksek buldukları gözlenmektedir. ELISA 2 yönteminin sonuçları NT ile karşılaştırıldığında ise güvenilir sonuçların elde edildiği sınır düzeyin 1.0 IU/ml'den 0.5 IU/ml'ye düştüğü gözlenmektedir.



**Grafik 4:** Fare nötralizasyon, ELISA 1 ve ELISA 2 test sonuçlarının 10 tabanına göre logaritmik değerleri

NT, ELISA 1 ve ELISA 2 yöntem sonuçlarının karşılaştırmalı korelasyon katsayıları Tablo 1’de sunulmaktadır. NT ve ELISA 1 yönteminin 1.0 IU/ml ve üzerindeki antikor düzeylerinde olan serum örneklerinde korelasyon katsayısı 0.844602’dir. Aynı yöntemlerin 1.0 IU/ml’nin altındaki antikor düzeylerine sahip serumlarda korelasyon katsayısı ise 0.37889’dır. NT ve ELISA 2 korelasyon katsayısının 0.5 IU/ml ve üzerindeki antikor düzeylerine sahip serumlarda korelasyon katsayısı tablo 1’deki en yüksek değer olan 0.959651’e ulaştığı gözlenmektedir.

## TARTIŞMA

Tetanoz hastalığı *Clostridium tetani* tarafından salınan potent bir ekzotoksin tarafından oluşturulan nöromusküler disfonksiyon ile kendini gösteren bir entoksikasyondur (4). Tetanoz hastalığından sonra genellikle bağışıklık meydana gelmemektedir. Çünkü hastalığı oluşturabilecek toksin miktarı, immun cevabı sağlayacak miktardan azdır (13). Aşı, tetanoz toksoidi olup bazı nörolojik ve nadiren görülen hipersensitivite yan etkileri dışında kontrendikasyon taşımamaktadır (14). Tetanoz hastalığı acil müdahale gerektirdiğinden tanı esas olarak öykü ve fizik

muayene ile konur, laboratuvar tanısına rağbet edilmez. Bununla birlikte, serolojik testler serosurveyans çalışmalarında ve bu çalışmaların sonuçlarının aşı politikalarına yön vermede kullanılmasında önemlidir. Bu amaçla fare nötralizasyon testi (NT), counter immün elektroforez (CIE), radioimmunoassay (RIA) ve enzyme linked immunabsorbent assay (ELISA) gibi serolojik yöntemler kullanılır (8).

NT altın standart olup 0.001 IU/ml gibi düşük düzeydeki titrelerin ölçülmesinde kullanılabilir, buna karşılık canlı hayvan gerektirdiği için tercih edilmemektedir (15,16). ELISA insan serumunda tetanoz antitoksininin saptanmasında fare nötralizasyon testine alternatif olarak geliştirilmiştir (10). Test güvenilir, ucuz, hızlı ve pratik olup fazla sayıda örnekle çalışma olanağı sağlaması ve analizlerin kısa sürede sonuçlanması da avantajları arasındadır. Yöntemin en önemli dezavantajı düşük antikor düzeylerini çapraz reaksiyon veren antikorlar nedeniyle saptayamamasıdır (17).

Bu çalışmada 322 serum örneği ELISA 1 yöntemi ile test edilmiştir. ELISA 1 yönteminin sonuçları incelendiğinde koruyucu olmayan düzeyde antikor saptanan serum bulunmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle ve ELISA 1 yönteminin güvenilirliğini araştırmak amacıyla bazı serumlarda altın standart olan NT uygulanmış ve 1.0 IU/ml ve altındaki değerlerde ELISA 1 yönteminin iyileştirilmesi gerektiği saptanmıştır. ELISA testinin iyileştirilmesinde testi etkileyen diğer antikorların bloke edilmesinin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle ELISA 2 yöntemi ile teste başlarken ilk yıkama aşama-

**Tablo 1.** NT, ELISA 1 ve ELISA 2 test sonuçlarının serum titrelerine göre korelasyon katsayıları

	Toplam	≥1.0 IU/ml	<1.0 IU/ml	≥0.5 IU/ml	<0.5 IU/ml
NT-ELISA 1	0.811348	0.844602	0.37889	0.927033	0.268836
NT-ELISA 2	0.719651	0.913584	0.133072	0.959651	-0.00239
ELISA1-ELISA 2	0.731274	0.905482	-0.00679	0.939766	-0.06909

sından sonra plaklar 1 saat %0.5'lik BSA içeren PBS ile muamele edilmiştir. Ayrıca nonspesifik reaksiyonların önlenmesi için serum dilüsyonları %0.5'lik BSA ve %0.05'lik Tween 80 içeren PBS ile hazırlanmıştır.

ELISA 2 test sonuçları NT test sonuçları ile karşılaştırıldığında iki test arasındaki uyumun gözlemlendiği antikor titre değerinin 0.5 IU/ml'ye düştüğü gözlenmektedir (Grafik 2). Bu sonuç testte yapılan değişikliklerin non-spesifik reaksiyonların önlenmesinde kısmen başarılı olduğunu düşündürmektedir.

ELISA 1 ve ELISA 2 test sonuçlarının arasındaki uyum incelendiğinde 1.0 IU/ml ve üzerindeki antikor titreleri açısından iki test uyumlu iken, bu değer altındaki titrelerde uyumsuz oldukları gözlenmektedir (Grafik 3). Grafik 2 göz önünde tutulduğunda bulgular ELISA 2 testinin, düşük antikor titrelerini saptamada daha başarılı olduğunu düşündürmektedir. ELISA 1 yöntemi, NT ile uyumlu olduğu yüksek antikor titrelerinde ELISA 2 ile de uyumludur. Bu bulgu ise her iki testin de yüksek antikor titrelerini saptamada güvenilir olduğunu göstermektedir.

Üç testin antikor titreleri, NT testi ile elde edilen antikor titrelerinin düşükten büyüğe sıralandığı grafikte, 1.0 IU/ml ve üzerinde tüm testler uyumlu bulunurken, ELISA 2 ve NT'nin uyumlu olduğu sınırın 0.5 IU/ml'ye indiği ve yapılan değişikliklerin başarılı olduğu gözlenmektedir (Grafik 4).

Testler arasındaki korelasyon katsayıları incelendiğinde, beklendiği gibi, ELISA 1'in 1.0 IU/ml'nin altındaki antikor titrelerinde NT ile uyumsuz olduğu görülmektedir. NT ile ELISA 2 arasındaki korelasyon katsayısı 0.719651 şeklindedir. Bu değer ELISA 1'in korelasyon katsayısından düşüktür. Ancak 0.5 IU/ml ve üzerinde 0.959651 değerine ulaşmaktadır. Bu bulgular ELISA 2'nin ELISA 1'e göre daha düşük

titreleri doğru olarak saptayabildiğini düşündürmektedir. İki ELISA yöntemi arasındaki korelasyon katsayıları karşılaştırıldığı zaman ELISA 1'in 1.0 IU/ml ve üzerindeki antikor titrelerinde ELISA 2 ile uyumlu olduğu, altındaki değerlerde ise güvenilirliğinin düşük olduğu saptanmıştır (Grafik 2).

Bugüne kadar çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda düşük düzeyde anti-tetanoz antikorlarının varlığında, NT ile ELISA testi sonuçlarının farklılık gösterebileceği bildirilmektedir. Bunun nedeni ise ELISA'nın hem simetrik, hem de asimetric (fonksiyonel olarak monovalan) antikorları saptaması, NT'nin ise sadece nötralizasyon kapasitesine sahip simetrik antikorları saptamasına bağlanmıştır (18). Bu çalışmanın sonuçları da bu görüşü desteklemektedir.

Dokmetjian ve arkadaşlarının (19) gerçekleştirdiği bir çalışmada regresyon çizgisinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde fare nötralizasyon testi ile 0.1 IU/ml'ye karşılık gelen ELISA sonucunun bu değerden 2.22 kat yüksek olduğu gözlenmiş, bu bulgular düşük toksin nötralizasyon kapasitesine sahip asimetric antikor içeren serum örnekleri ile uyumlu bulunmuştur. Bunun nedeni olarak; toksine bağlanmak için simetrik ve asimetric antikorların yarıştığı ancak asimetric moleküllerin, antikorların paratoplarına sıkıca bağlanma kapasitesinde olmalarından dolayı simetrik antikorların bağlanmasını engelleyerek blokaja neden olduğu ve bunun sonucunda da nötralizan antikorların saptanmasının engellendiği görüşü öne sürülmektedir. Çalışmadan sonuç olarak ELISA testinin, nötralizan ve nötralizan olmayan antikorları birbirinden ayırt edemediği ve 0.222 IU/ml'nin altındaki titreleri yakalamada başarısız olduğu bulunmuştur (19). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da yine bulgularımızla uyumludur.

Enfeksiyon riskinin değerlendirilmesinde özellikle, koruyucu titreye yakın antikor düzeylerinde, metotların güvenilirliği çok önemlidir. Simonsen ve arkadaşlarının (20) bir çalışmasında yüksek ve orta düzeyde nötralizan tetanoz antikor içeren serum örneklerinde ELISA ve NT testlerinin uyumlu olduğu, 0.16 IU/ml'nin altındaki titreleri saptamada ise her iki test sonuçlarının uyumlu olmadığı saptanmıştır. Bu bulgular da bizim bulgularımız ile uyumludur.

Sonuç olarak ELISA yöntemi pratik, otomatize edilebilen, çok sayıda örneğin birden çalışılabileceği, ucuz bir yöntem olması ve 0.5 IU/ml ve üzerindeki antikor titrelerini saptamada güvenilir olması nedeniyle kullanıma uygun bir testtir. Fare nötralizasyon testi ise canlı hayvan ve deneyimli personel gerektirmesi, uzun zaman alması, fazla miktarda serum gerektirmesi gibi nedenlerle çok sayıda örneğin çalışılabilmesi için uygun bir test olarak kabul edilmemektedir (21).

ELISA 2 yöntemi ile ölçülebilen en düşük antikor titresi 0.5 IU/ml'dir. Bu titrenin koruyucu olmayan antikor titresi olan 0.01 IU/ml ve altına inebilmesi için başka tekniklerin üzerinde çalışılması gereklidir.

### İletişim / Correspondence

Cemile Sönmez  
Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı  
Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü  
Cemal Gürsel caddesi No:18  
Sıhhiye - Ankara  
Tel: 0312 458 23 74  
e-mail: cemilesonmez2004@yahoo.com

### Kaynaklar

1. Tekeli E. Tetanoz. In: Topçu W, Söyletir G, Doğanay M eds. *İnfeksiyon Hastalıkları*. 1. basım. İstanbul: Nobel Tıp Yayınları 1996:903-8.
2. Sipahioğlu Ü, Özek U. Tetanozda prognoz ve prognoza etki eden faktörler. *İnfek Derg* 1990; 4:591-6.
3. Onul B. *İnfeksiyon Hastalıkları*. 1. baskı. Ankara: A.Ü.T.F. yayımları, 1953:669-714.
4. Sözen T. Tetanoz hastalığında mortaliteye etki eden faktörler. *Ankara Tıp Mecmuası* 1988; 41:95-104.
5. Barlett JG. *Clostridium tetani*. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Backlow NR eds. *Infectious Diseases*. Washington DC: Saunders Company 1992:1580-2.
6. Birengel S. Klostridial enfeksiyonlar. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı; 15-19 Ekim 2001; Adana: Türkiye 2001: 122-6.
7. Chaudhry R, Dhawan B, Mohanty S. Tetanus in the elderly: a forgotten illness. *The Lancet* 2001; 357:1805.
8. Atabey N, Gökoğlu M. Çeşitli yaş gruplarında tetanoza karşı saptanan antitoksin düzeyleri. *Mikrobiyoloji Bül* 1990; 24:133-40.
9. Sesardic D, Corbel M. Testing for neutralising potential of serum antibodies to tetanus and diphtheria toxin. *The Lancet* 1992; 340:737-8.
10. Moire E, Valleria A, Seagroatt and Johanna T. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. *J Biol Stand* 1983; 11:137-44.
11. Gentili G, Pini C, Collotti C. The use of an immunoenzymatic assay for the estimation of tetanus antitoxin in human sera: a comparison with seroneutralization and indirect haemagglutination. *J Biol Stand* 1985; 13:53-9.
12. Coplu N, Esen B, Gozalan A, et al. Tetanus antibody assay combining in-house ELISA and particle agglutination test and its serosurvey application in a province in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2004; 57:97-102.
13. Akyol G, Baysal B. Toplumun çeşitli gruplarında tetanoza karşı antitoksin seviyelerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 1994; 28:365-9.
14. Hacıbektaşoğlu A, Pahsa A, Serbest S, Barut A, Demiröz P. Tetanoz aşısı yapılanlarda tetanoz antitoksin düzeylerinin araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Dergi* 1991; 48:181-9.
15. Aggerbeck H, Pederson B, Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time resolved fluorescence immunoassay. *Journal of Immunological Methods* 1996; 190:171-83.

16. Ramshorst V. Titration of Diphtheria and Tetanus Antitoxins in Sera of Low Titre. *Bull Wld Health Org* 1971; 45:213-8.
17. William P. *Fundamental Immunology*. 2nd ed. London:Raven Pres,1998:331-4.
18. German M, Bizini B, German A. Immunity to tetanus: tetanus antitoxin and anti-BIIb in human sera. *Journal of Biological Standardization* 1987; 15:223-30.
19. Dokmetjian J, Vale C, Calcagno M. A possible explanation for the discrepancy between ELISA and neutralizing antibodies to tetanus toxin. *Vaccine* 2000; 18:2698-703.
20. Simonsen O, Bentzon W, Heron I. ELISA for the routine determination of antitoxic immunity to tetanus. *Journal of Biological Standardization* 1986; 14:231-9.
21. Pelczar M, Chan E, Krieg N. *Microbiology Concepts and Applications*. 1st ed. London: Education press, 1986:527-55.