

# Mikro ve Makrotitrasyon ELISA Plaklarında Yapılan *Salmonella* Mikroaglutinasyon Testi Sonuçlarının Klasik Gruber-Widal Tüp Aglutinasyon Testi ile Karşılaştırılması

Mustafa BERKTAŞ<sup>1</sup>

Banur BOYNUKARA<sup>2</sup>

İclal BALCI<sup>3</sup>

Hamza BOZKURT<sup>1</sup>

M. Tefik YAVUZ<sup>1</sup>

A. Enes DALKILIÇ<sup>1</sup>

## ÖZET

Temmuz-Eylül 1995 ayları arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Hastanesi polikliniklerine başvuran Salmonelloz şüpheli 114 hastadan istenilen Gruber-Widal testi için alınan serumlarda klasik tüp yönteminin yanısıra mikrotitrasyon ve makroELISA plakları kuyucuklarında uygulanan mikroaglutinasyonla antikor titreleri saptanarak sonuçlar karşılaştırıldı. Tüm testlerde aynı bakteri süspansiyonları antijen olarak kullanıldı. Klasik Gruber-Widal aglutinasyon testi sonuçları ile makrotitrasyon ELISA plakları kuyucuklarında yapılan test sonuçları arasında % 97.93 (684 sulandırımın 670'inde), mikrotitrasyon ELISA plakları kuyucuklarında yapılan test sonuçları arasında ise % 96,20 (684 sulandırımın 658'inde), uygunluk bulundu.

Sonuç olarak; özellikle çok sayıda Gruber-Widal aglutinasyonu istenilen laboratuvarlarda daha ekonomik ve zaman kazandırıcı olması nedeni ile rutin işlemlerde makroELISA plaklarının, toplum taramalarında ise mikrotitrasyon plaklarının kullanılmasının uygun olacağı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** *Salmonella*, Tifo, Gruber-Widal, Mikroaglutinasyon, ELISA

## SUMMARY

### Comparison of the Results of *Salmonella* Microagglutination Test which Made in Micro and Macrotitration-ELISA Plates with Conventional Gruber-Widal Tube Agglutination Test

Conventional Gruber-Widal agglutination tests results were compared with those of *Salmonella* microagglutination tests which were made in the wells of micro and macrotitration-ELISA plates in typhoid fever suspected 114 patients sera. Patients sera were obtained from the out-patient clinics of the Research Hospitals of Yüzüncü Yıl University during June and September 1995. The same bacterial suspensions were used as antigen in all test procedures. 97.93 % and 96.20 % of appropriateness were found between the results of Gruber-Widal agglutination test and the macro and microplate method, respectively.

Consequently, we suggest that using of microplate method for the routine procedures and microplate method as a screening test instead of conventional Gruber-Widal agglutination test would be more economic and time-saving.

**Key Words :** *Salmonella*, Typhoid fever, Gruber-Widal, Microagglutination, ELISA

## GİRİŞ

Günümüzde, *Salmonella*'lara bağlı infeksiyonlar, bölgemizi de içine alacak biçimde ülkemizde hala önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. *Salmonella* cinsi bakterilerin oluşturduğu infeksiyonlar değişik klinik şekillerde görülürler. Bunlardan tifo ve özellikle *S. paratyphi A, B* ve *C* ile oluşan ve bakteriyemi ile seyreden paratifo enfeksiyonları en sık karşılaşılan ve toplum sağlığını en fazla tehdit eden salmonelloz şekilleridir (1,2). Böyle olgularda kan, dışkı ve idrar kültürleri ile etken mikroorganizma izole edilerek kesin

tanı konulabilmekte ise de, her olguda etkenin izolasyonu mümkün olmamaktadır (3,4). Bu nedenle tanıda serolojik bir test olan Gruber-Widal tüp aglutinasyon testi de kullanılmaktadır.

Enfeksiyonun tanısında günümüzde hala değerini koruyan Klasik Gruber-Widal tüp aglutinasyon yöntemi uygulanması zor, zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Uygulanması için en az her biri 6 tüpten oluşan 6 seri tüp gerekmektedir. Bu da her hasta için 36 deney tüpü ayrılması anlamına gelmektedir. Bu zorluklar düşünülerek geliştirilen lam aglutinasyonu ise

<sup>1</sup> Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

<sup>2</sup> Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.

<sup>3</sup> Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.

daha çok toplum taramalarında önerilmekte, özgülük ve hassasiyetinin düşük olması nedeniyle pozitif olgulara tanı konulmadan önce testin mutlaka Klasik tüp aglütinasyon yöntemiyle tekrarlanması gerektiği bildirilmektedir (5).

Uygulanması kolay, daha az zaman alıcı ve daha ekonomik olan hızlı slayt ya da Mikroaglütinasyon yöntemleri *Brucella*, *Rickettsia*, *Yersinia*, *Francisella* ve *Legionella*'ların neden olduğu hastalıkların tanılarında kullanılmaktadır (6,7,8,9,10,11). Mikroaglütinasyon tekniğini *Brucella* antijenlerini safranin-O ile boyayarak uygulayan Brown ve ark. (12), uyumlu sonuçlar alarak testin çok sayıda yapıldığı laboratuvarlara önermişler, aynı zamanda kitle taramalarında kullanılmak üzere "kart aglütinasyon testi"ni bulmuşlardır.

Önerdiğimiz test yöntemlerinden MakroELISA Plak yöntemi uygulama kolaylığı ve zaman tasarrufu sağlaması yanında test maliyetini 1/3'e düşürmekte,

+ 2400 µl serum fizyolojik) hazırlandı. Her hasta serisinde 1. tüpler hariç diğer tüplere 0.5 ml miktarda serum fizyolojik (SF) konuldu. Daha sonra hasta serumlarının 1/25 sulandırımındaki ana dilüsyonundan her serideki 1. ve 2. tüplere 0.5 ml miktarlarda eklendi. Seri dilüsyonla tüplerdeki serum dilüsyonları 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 ve 1/800'e getirildi. Son olarak tüplere 0.5 ml miktarlarda boyalı antijen süspansiyonu (Cromatest, Knickerbocker Lab., Spain) eklenerek 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600 final dilüsyonlar elde edildi. Testte 1. seride *S. typhi* H, 2. seride *S. typhi* O, 3. seride *S. paratyphi* AH, 4. seride *S. paratyphi* AO, 5. seride *S. paratyphi* BH ve son seride ise *S. paratyphi* BO boyalı antijen süspansiyonları kullanıldı. Son tüpe 0.5 ml miktarlarda SF ve Antijen süspansiyonu konularak negatif kontrol tüpü olarak kullanıldı (Tablo 1).

MakroELISA plak yönteminde bir kez kullanılıp

TÜP NO	1	2	3	4	5	6	7
SF (%0.85 NaCl) (ml)	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Hasta serumu 1/25 ana dilüsyonu (ml)	0.5	0.5	-----	seri	dilüsyon	-----	0
Bakteri süsp 6 seri (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Final dilüsyon	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	Kontrol

**Tablo 1.** Klasik Gruber-Widal tüp aglütinasyon yönteminin şematik gösterimi.

Mikrotitrasyon Plak yöntemi ise yine bu avantajlar yanında maliyet yönünden 5 kat ucuzluk sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; çalışma kolaylığı, zaman ve malzeme tasarrufu sağlayan makroELISA ve mikrotitrasyon plak yöntemlerini, klasik Gruber-Widal tüp aglütinasyon yöntemine alternatif olarak sunmaktır.

### MATERYAL VE METOT

Araştırma, Temmuz-Eylül 1995 tarihleri arasında, Yüzüncü Yıl ve Gaziantep Üniversitesi Araştırma Hastaneleri polikliniklerine başvuran ve Gruber-Widal testi istenilen 114 hastayı kapsamaktadır. Hastaların 58'i (% 50.88) erkek, 56'sı ise kadın (% 49.12)'di.

İncelemeye alınan olguların yaş ve cinsleri de dikkate alınarak venöz kanları alındı. 15 dakika bekletildikten sonra santrifüjde 3000 rpm'de 10 dakika çevrilerek serumları ayrıldı. Serumlar ısıyla inaktive edildiğinde bazı termolabil aglütinlerin harap olabileceği dikkate alınarak inaktivasyon işlemi uygulanmadı. Tüm hasta serumları klasik yöntem yanında diğer iki yöntemle de çalışıldı.

Klasik yöntemde her hasta serumu için her biri 7 serolojik tüp içeren 6 seri kullanıldı. Önce hasta serumlarının 1/25 ana dilüsyonu (100 µl hasta serumu

atılan plaklar kullanıldı. Çalışmada MakroELISA plaklarının 1. kuyucukları boş bırakılarak 2,3,4,5,6 ve 7. kuyucuklara otomatik pipetler kullanılarak 200'er µl miktarlarda SF konuldu. Sonra 1. ve 2. kuyucuklara Klasik yöntem için hazırlanan ana dilüsyondan 200'er µl eklenerek 2 ve 6. kuyucuklar arasında seri dilüsyon yapıldı. Bu suretle 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600'lük final dilüsyonlar elde edildi. Son kuyucuğa 200 µl miktarlarda SF ve bakteri süspansiyonu konularak negatif kontrol kuyucuğu olarak hazırlandı.

Mikrotitrasyon plaklarıyla yapılan çalışmada da yine plaklar bir kez kullanıldı. Deneyde mikrotitrasyon plaklarının 1. kuyucukları boş bırakılarak 2-7'inci kuyucuklara 100'er µl miktarlarda SF konuldu. Sonra hazırlanan ana dilüsyondan 1. ve 2. kuyucuklara 100'er µl eklenerek 2. ve 6. kuyucuklar arasında seri dilüsyon yapıldı ve 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 ve 1/800 dilüsyonlar elde edildi. Boyalı bakteri süspansiyonundan tüm kuyucuklara 100'er ml miktarlarda eklenerek 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600 final dilüsyonlar elde edildi. Son kuyucuğa 100'er µl miktarlarda SF ve bakteri süspansiyonu konularak negatif kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı.

Bakteri süspansiyonu katılan tüm test tüpleri ve plaklar iyici karıştırıldıktan sonra, test tüpleri 2 saat

37°C'de sonra gece boyu oda ısısında, plaklar ise firma önerilerine uyularak 37°C etüvde 24 saat inkübe edildi ve ertesi gün aglütinasyon olup olmadığı araştırıldı. Önce tüm kontrol tüplerine bakıldı. Sonra bir ışık kaynağı önünde üst kısımdaki sıvının berraklığı,

olup ortalama yaş 36.7 idi. Tablo 2'de Klasik yöntem ve Mikroaglütinasyon yöntemleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen aglütinasyon titrelerinin dağılımı gösterilmektedir.

YÖNTEM	TİTRASYON DEĞERLERİ							
	Negatif	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	Toplam
<b>Gruber-Widal Testi</b>								
<i>S. typhi</i> H	17	41	38	11	5	2	-	114
<i>S. typhi</i> O	43	32	30	4	4	1	-	114
<i>S. paratyphi</i> AH	101	9	4	-	-	-	-	114
<i>S. paratyphi</i> AO	112	2	-	-	-	-	-	114
<i>S. paratyphi</i> BH	19	56	22	14	2	1	-	114
<i>S. paratyphi</i> BO	108	6	-	-	-	-	-	114
<b>MakroELISA Plak</b>								
<i>S. typhi</i> H	17	40	38	11	6	2	-	114
<i>S. typhi</i> O	43	33	29	4	4	1	-	114
<i>S. paratyphi</i> AH	102	10	2	-	-	-	-	114
<i>S. paratyphi</i> AO	113	1	-	-	-	-	-	114
<i>S. paratyphi</i> BH	18	56	24	12	3	1	-	114
<i>S. paratyphi</i> BO	109	5	-	-	-	-	-	114
<b>Mikrotitrasyon Plak</b>								
<i>S. typhi</i> H	19	40	37	8	8	2	-	114
<i>S. typhi</i> O	43	33	29	3	5	1	-	114
<i>S. paratyphi</i> AH	102	8	4	-	-	-	-	114
<i>S. paratyphi</i> AO	112	2	-	-	-	-	-	114
<i>S. paratyphi</i> BH	17	58	25	10	3	1	-	114
<i>S. paratyphi</i> BO	109	5	-	-	-	-	-	114

Tablo 2. Üç Yöntemle Elde Edilen Değerlerin Dağılımı.

sedimentin ve aglütine olmuş partiküllerin karakteri ve miktarı yönünden incelendi. Klasik yöntemde negatif reaksiyonda süspansiyonun görünümünün değişmediği ve tüplerin dip kısmına parmakla vurulduğunda tipik girdap hareketi görülürken, pozitif reaksiyonda aglütinasyonun yanı sıra üstteki sıvı kısımda değişik derecelerde berraklaşma görüldü. Bir sonraki tüpte aglütinasyon görülmeyen en yüksek pozitif serum dilüsyonu sonuç olarak kaydedildi.

### BULGULAR

Bu çalışmanın kapsamına 114 hasta alınmıştır. Olguların 58'ini (% 50.88) erkekler, 56'sını ise (% 49.12) kadınlar oluşturmaktaydı. Yaş dağılımı 5-63 yaş arası

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Klasik yöntemle yapılan Gruber-Widal aglütinasyon testi yeni yöntemlerle karşılaştırıldığında; MakroELISA Plak yöntemiyle yapılan testlerde bizim için tanı kriteri olan 1/200 ve daha yukarı titrelerdeki aglütinasyonlarda tam uyumlu sonuçlar alınmıştır. MakroELISA Plak yöntemi, Klasik yöntemle karşılaştırıldığında toplam 684 dilüsyonun 670 (% 97.83)'sinde uygunluk saptanırken, 14 (% 2.07) dilüsyonda bir alt ya da bir üst dilüsyonlar elde edilmiştir. Bu yöntemle uygun sonuç alınmayan 14 olguda elde edilen değerlerin Klasik yöntemle karşılaştırması Tablo 3'de verilmiştir.

OLGU SAYISI	Klasik Yöntemle Alınan Aglütinasyon Değeri	MakroELISA Yöntemiyle Alınan Değer
1	-	1/50
2	1/50	-
3	1/50	1/100
1	1/100	-
3	1/100	1/50
1	1/100	1/200
1	1/200	1/100
2	1/200	1/400

Tablo 3. Klasik Gruber-Widal yöntemine uygunluk göstermeyen 14 olgunun MakroELISA Plak yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Tablo 3'de de görüldüğü gibi tanıda önemli olan titrelerden sadece bir olguda 1/200 yerine 1/100 titre saptanmış, bunun dışındaki titrelerde klasik yöntemle tam uygunluk saptanmıştır.

Tablo 4'de Mikrotitrasyon plakları ile yapılan çalışmada Klasik yöntemle uygunluk göstermeyen titrasyon değerleri verilmektedir.

96.20 uygunluk tespit edilmiş olup, tanı kriteri olan titreler gözönüne alındığında bu oranlar daha da yükselmektedir. Kalitatif olarak değerlendirme yapıldığında ise, MakroELISA plak yönteminin Klasik Widal yöntemi ile daha fazla uygunluk gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle, Klasik yöntemle nazaran (kolay uygulanma, ucuzluk ve daha kısa zamanda

OLGU SAYISI	Klasik Yöntemle Alınan Aglutinasyon Değeri	Mikrotitrasyon Plak Yöntemiyle Alınan Değer
2	-	1/50
1	-	1/100
4	1/50	-
4	1/50	1/100
5	1/100	1/50
1	1/100	1/200
3	1/200	1/100
5	1/200	1/400
1	1/200	1/50

**Tablo 4.** Klasik Gruber-Widal yöntemine uygunluk göstermeyen 26 olgunun Mikrotitrasyon Plak yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.

Mikrotitrasyon Plak yönteminin Klasik yöntemle karşılaştırılmasında tanı kriteri olan titrelerde, klasik yöntemle 1/200 titrede aglutinasyon görülen iki tüpten birisinde 1/50, diğerinde ise 1/100 titrede aglutinasyon saptanmış olup bunun dışında tam uygunluk görülmüştür.

Uygulanması kolay, daha az zaman alıcı ve daha ekonomik olan hızlı slayt ya da Mikroaglutinasyon yöntemleri *Brucella*, *Rickettsia*, *Yersinia*, *Francisella* ve *Legionella*'ların neden olduğu hastalıkların tanılarında kullanılmaktadır (6,7,8,9,10,11).

Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda; Brown ve ark.(12), Safranin-O ile boyanmış *Brucella* antijenleri ile yaptıkları mikroaglutinasyon testinin tüp aglutinasyon testi ile uyumlu sonuçlar gösterdiğini doğrularak bu yöntemi çok sayıda serumla çalışan laboratuvarlar için önermişlerdir. Moyer ve ark.(13) ise Bruselloz taramalarında kullanılan serolojik testlerin karşılaştırmasını yaptıkları çalışmaları sonucunda, Mikroaglutinasyon yöntemi ile 1/80 ya da daha yüksek titreler alındığında testin Klasik Tüp Aglutinasyon yöntemiyle tekrarlanması gerektiğini bildirmişlerdir.

Türkiyede ise, Alaçam ve Akman (14), 1982 yılında yaptıkları bir çalışmada Mikroaglutinasyon yönteminde Safraninle boyanmış *S. typhi* O ve H antijenlerini kullanmışlar ve Klasik Widal yöntemiyle uyumlu sonuçlar alarak yöntemlerinin Klasik yöntemden daha kolay, daha ekonomik ve daha objektif olduğunu bildirmişlerdir. Daha önce *Brucella* Wright aglutinasyonuna alternatif olarak yaptığımız benzer çalışmada da MakroELISA ve Mikrotitrasyon Plak yöntemi ile Klasik Wright Tüp Aglutinasyon deneyleri arasında % 95.48 oranında uygunluk saptanmıştır (15).

Sonuç olarak; Kantitatif olarak Klasik Gruber-Widal yöntemi ile MakroELISA plak yöntemi arasında % 97.93, Mikrotitrasyon Plak yöntemi arasında ise %

yapılabilme gibi) bir çok avantajları olan bu 2 yeni yöntemi, özellikle çok sayıda serumla çalışılan laboratuvarlar ya da toplum taramalarında kullanılmak üzere Klasik Gruber-Widal Tüp Aglutinasyon yöntemine alternatif olarak sunuyoruz.

#### KAYNAKLAR

1. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları, İzmir, Doğruluk Matbaacılık, s:24-46, 1992.
2. Gorbach SL: Typhoid fever and Salmonellosis. In: Wyngaarden JB, Smith LH, ed. Cecil Textbook of Medicine: Philadelphia, WB Saunders Company, p:1507-1513, 1982.
3. Huckstep RL: Typhoid fever, In: Conn RB ed., Current Diagnosis. Philadelphia, WB Saunders Company, p:132-138, 1985.
4. Zwaydk P: Enterobacteriaceae: *Salmonella*. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB ed. Zinsser Microbiology. Norwalk-Connecticut, p:616-620, 1984.
5. Schroeder SA: Interpretation of serologic test for typhoid fever. JAMA, 206:839-840, 1968.
6. Welch H, Mickle FL: A rapid slide test for the serologic diagnosis of typhoid and paratyphoid fevers, Am J Pub Health, 26:248-255, 1936.
7. Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ: Manuel of Clinical Microbiology (5th ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC., p: 373, 450, 456, 461, 1040, 1991.
8. Farshy CE, Klein GC: Detection of antibodies to legionnaires disease organism by microagglutination and microenzyme linked immunosorbent assay tests, J Clin Microbiol, 7:327-331, 1978.
9. Harrison TG and Taylor AG: A rapid microagglutination test for the diagnosis of *Legionella pneumophila* (serogrup 1) infection, J Clin Pathol, 40:77-

82, 1982.

10. Sonnenwirth AC: Serologic tests in Infectious Diseases-II. In: Sonnenwirth AC, Jarett L. ed., Gradwhol's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. St. Louis, p: 2299-2305, 1980.

11. Klein GC, Jones WL: Upper limit for normal titer for detection of antibodies to *Legionella pneumophila* by the microagglutination test, J Clin Microbiol, 10:754-755, 1979.

12. Brown SL, Klein GC, Kinney FTMc, Jones WL: Safranin-O stained antigen microagglutination tests for detection of *Brucella* antibodies, J Clin Microbiol, 13: 398-400, 1981.

13. Moyer NP, Evans GM, Pigott NE, Hudson JD, Farshy CE, Feeley JC, Hausler JrWJ: Comparison of serologic screening tests for Brucellosis, J Clin Microbiol, 25:1969-1972, 1987.

14. Alaçam R, Akman M: Tifo kuşkulu hastaların serumlarında Klasik Widal ve Mikroaglutinasyon yöntemleri ile antikor aranması, Mikrobiyol Bült, 18:160-163, 1984.

15. Balcı İ, Güngör S, Berктаş M: Mikro ve makrotrasyon-ELISA plaklarında yapılan Brusella mikroaglutinasyon testi sonuçlarının klasik Wright aglutinasyon testi ile karşılaştırılması, Türk Mikrobiyol Cem Derg. 23(2): 1993'de baskıda.