

**İNDİREK HEMAGLUTİNASYON TESTİNİN
KOYUNLARIN SALMONELLA ABORTUS OVİS ENFEKSİYONLARININ
TEŞHİSİNDE KULLANILMASI VE SERUM AGLUTİNASYON TESTİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI ÜZERİNDE İNCELEMELER***

H. Basri Gülcü**

The studies on the application of the indirect haemagglutination test in the diagnosis of Salmonella abortus ovis infection in sheep and comparison with serum agglutination test

Summary: *In this study, an indirect haemagglutination (IHA) test for the diagnosis of S. abortus ovis infection of sheep was developed and compared with serum agglutination (SA) test. According to the results of standardization experiments of the IHA test; a) optimum polysaccharide concentration was 0.5 mg/ml, b) optimum adsorption temperature was 37°C, c) optimum adsorption time was 45 minutes, d) the most suitable erythrocyte was of fowl. The IHA test was found to be more sensitive than the SA test. Of 173 sera, 59 (34.1 %) gave the same titer in both tests. 78 sera (45 %) gave higher titer in IHA tests than SA tests and 36 sera (20.9 %) gave higher titer in SA tests than IHA tests.*

Özet: *Bu çalışmada, koyunların S. abortus ovis infeksiyonlarının teşhisi için bir indirek hemaglutinasyon (IHA) testi geliştirildi ve serum aglutinasyon (SA) testi ile karşılaştırılması yapıldı. IHA testinin standardizasyonu üzerinde yapılan çalışmalarda; a) optimal polisakkarid konsantrasyonunun 0.5 mg/ml, b) optimal adsorbsiyon ısısının 37°C, c) optimal adsorbsiyon süresinin 45 dakika, d) en uygun eritrositin tavuk eritrositleri olduğu saptandı. IHA testi SA testinden daha duyarlı bulundu. İncelenen 173 serumdan 59 tanesi (% 34.1) her iki test ile aynı titreyi verdi. Serumların 78 (% 45) IHA testi ile SA testinden daha yüksek titrede çalıştı. 36 serum (% 20.9) ise SA testinde IHA testinden daha yüksek titre gösterdi.*

Giriş

Koyunlarda yavru atmaya sebep olan etkenler arasında *S. abortus ovis* önemli bir yer tutar. Bu etkenden ileri gelen infeksiyonlarda

* Doktora tezinden özetlenmiştir.

** Dr. Araş. Gör., F.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

başlıca klinik belirti yavru atma olup, yavru atmaya sebep olan diğer hastalıklardan klinik olarak ayırmak imkansızdır. Kesin teşhis bakteriyolojik ve serolojik muayeneler sonucu konabilmekte, serolojik teşhiste ise sadece aglutinasyon testinin kullanıldığı bildirilmektedir (2, 3).

İndirek hemaglutinasyon testinin *S. abortus ovis* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanıldığı bugüne kadar bildirilmemekle beraber, diğer salmonella enfeksiyonlarının teşhisinde başarı ile uygulanmakta ve hatta aglutinasyon testinden daha duyarlı olduğu bilinmektedir (4, 5, 6, 8, 9, 11).

Bu çalışmada, indirek hemaglutinasyon testinin *S. abortus ovis* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılabilirliğini saptamak, teknikle ilgili standartları ortaya koymak ve bu testi serum aglutinasyon testi ile karşılaştırmak amaç edinilmiştir.

Materyal ve Metot

S. abortus ovis suşu: Antijen, antiserum ve polisakkarid hazırlamada kullanılan *S. abortus ovis* suşu Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi ve bütün karakterleri tekrar incelendi.

Serum numuneleri: Elaziğ Et ve Bahk Kombinasında kesilen çeşitli yaş ve ırklardan 173 adet dişi koyundan kesim esnasında steril tüplere ayrı ayrı kanları alındı, laboratuvarında usulüne uygun olarak serumları çıkarıldı, santrifüj edilerek -20°C de muhafaza edildi.

Aglutinasyon antijeni: *S. abortus ovis*'in 24 saatlik buyyon kültüründen yassı şişelerdeki agarlara ekim yapılacak 37°C de bir gece inkubasyona bırakıldı. Üreyen bakteriler steril fizyolojik tuzlu su ile toplanarak kaynamakta olan su banyosunda 2 saat bıraktıldı. Daha sonra içine koruyucu olarak % 0,3 formalin ilave edildi ve sterilite kontrolü yapıldı. Steril fizyolojik tuzlu su ile ml sinde 2 milyar bakteri olacak şekilde sulandırılarak testlerde kullanıldı (1).

Antiserum hazırlanması: *S. abortus ovis* anti-O serumu Aksoycan'ın (1) bildirdiği metoda göre tavşanlardan elde edildi ve tüp aglutinasyon testi ile titreleri saptandıktan sonra -20°C de muhafaza edildi.

Polisakkarid hazırlanması: İndirek hemaglutinasyon testlerinde kullanılan *S. abortus ovis* polisakkaridi Smith ve ark.'nın (9) bildirdiği yöntemle göre aşağıdaki şekilde hazırlandı:

1- *S. abortus ovis*, içinde agar bulunan yassı büyük şişelerde 18-20 saat üretildi.

2- Şişelerdeki üreme fizyolojik su ile ayrı ayrı tüplere toplandı ve Gram boyama yöntemiyle kontaminasyon kontrolleri yapıldıktan sonra hepsi bir araya toplandı.

3- Süspansiyon, santrifüjle 3 defa fizyolojik tuzlu su kullanılarak yıkandı.

4- Tortuya 50 ml fizyolojik su konarak homojen bir süspansiyon yapıldı.

5- Süspansiyona 68°C sıcaklıktaki % 90 lık fenolden 100 ml katıldı ve 68°C deki su banyosuna konarak 30 dakika devamlı karıştırıldı.

6- Karışım soğuduktan sonra 3000 dev/dak 30 dakika santrifüj edildi.

7- Oluşan 3 tabakadan en üstte bulunan bir pipet yardımıyla dikkatlice alındı.

8- Buna 2,5 ml % 20 lik sodyum asetat ve 50 ml absolut alkol ilâve edildi.

9- Karışım +4°C de bir gece bekletildi.

10- Oluşan presipitat 2500 dev/dak da 15 dakika santrifüj edildi.

11- Meydana gelen tortu 20 ml distile suda eritildi.

12- Solüsyon dializ tüpüne konularak akan çeşme suyuna karşı 48 saat dialize edildi ve daha sonra 2.5 ml miktarlarında steril şişelere konarak liyofilize edildi.

Test için kullanılacağı zaman bir şişe içeriği tartıldı ve 2 ml 0,02 N NaOH içinde critildikten sonra 37°C de 2 saat bırakıldı. İçine bir damla brom timol mavisi kondu ve pH sı N HCl ile nötralize edildi. Fizyolojik su ile çeşitli konsantrasyonlarda (0,5 - 1 - 1,5 - 2 mg/ml) sulandırılarak denemelerde kullanıldı.

Eritrosit türleri: İndirek hemaglutinasyon testinin standardizasyonu için tavuk, koyun ve sığır eritrositleri ayrı ayrı denendi. Bu hayvanlardan alınan sitratlı kan örnekleri 3 er defa fizyolojik su ile yıkanarak sansibilizasyon için hazırlandı.

Eritrositlerin sansibilizasyonu: Smith ve ark.'nın (9) bildirdiği metoda göre her eritrosit türü için ayrı ayrı aşağıdaki işlem yapıldı:

1- Yıkanmış eritrositlerden 0,1 ml alınarak 5 ml fizyolojik su ile süspansiyon yapıldı.

2- Bu süspansiyona 1 ml polisakkarid (0.5 mg/ ml) katıldı.

3- Zaman zaman hafifçe çalkalanarak 37°C de 1 saat inkube edildi.

4- Bu sürenin sonunda eritrositler santrifüjle fizyolojik tuzlu su kullanılarak 2 defa yıkandı.

5- Eritrosit tortusuna 9,9 ml fizyolojik su konarak % 1 lik süspansiyon hazırlandı ve testlerde kullanıldı.

Bu işlemler, 0.5 mg/ ml lik polisakkarid konsantrasyonu yerine 1 - 1,5 - 2 mg/ ml lik konsantrasyonlar kullanılarak ve 60 dakikalık adsorbsiyon süresi yerine de 15, 30, 45 dakikalık süreler kullanılarak ayrı ayrı yapıldı.

IHA testinin yapılışı ve değerlendirme: Serumlar fizyolojik su içinde 1/5, 1/10, 1/20, 1/2560 a kadar 2 katlı sulandırıldı. Her serum dilusyonundan 0.2 ml aglutinasyon tüplerine kondu ve üzerlerine eşit miktarda % 1 lik sansibilize eritrosit ilave edilerek 1/10, 1/20, 1/40, 1/5120 lik sulandırmalar elde edildi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C de tavuk eritrositleri kullanıldığında bir saat, koyun ve sığır eritrositleri kullanıldığında 2 saat inkube edildi (7). Bu sürenin sonunda sonuçlar değerlendirildi. Kontrol olarak içeriği aşağıda belirtilen 4 tüp kullanıldı.

1. Sansibilize eritrosit + kontrol pozitif serum (1/5)
 2. Sansibilize eritrosit + kontrol negatif serum (1/5)
 3. Sansibilize eritrosit + fizyolojik tuzlu su
 4. Normal eritrosit (% 1) + fizyolojik tuzlu su
- Değerlendirme Stavitsky (10) yöntemine göre yapıldı.

Optimal adsorbsiyon ısı: Denemeler süresince 37°C lik inkubasyon ısı sabit tutularak optimal polisakkarid konsantrasyonu, optimal adsorbsiyon süresi ve uygun eritrosit türü saptandı. Daha sonra 22°C ve 37°C de testler yapılarak alınan sonuçlar karşılaştırıldı ve optimal adsorbsiyon ısı tesbit edildi.

Bulgular

1- *İndirek hemaglutinasyon testinin standardize edilmesi*

a) *Uygun eritrosit türü:* En uygun eritrosit türünü tesbit etmek amacıyla denenen sığır, koyun ve tavuk eritrositleri arasında en yük-

sek titreler tavuk ve koyun eritrositleriyle elde edildi. Tavuk eritrositleri, sonuçların daha erken okunması ve kolay temin edilmesi dolayısıyla tercih edildi.

b) *Optimal polisakkarid konsantrasyonu* : Optimal polisakkarid konsantrasyonunu saptamak amacıyla kullanılan dört farklı konsantrasyondan (0.5 - 1 - 1.5 - 2 mg/ml) en uygun olarak 0.5 mg/ml bulunmuştur.

c) *Optimal adsorbsiyon süresi* : Denenen 4 ayrı süreden (15, 30, 45, 60 dakika) 45 dakika yeterli bulunmuştur. 15 ve 30 dakikalık süreler yetersiz olup, 60 dakika ise bazı denemelerde aynı, bazı denemelerde ise daha düşük titre vermiştir.

d) *Optimal adsorbsiyon ısı* : Uygun eritrosit türü, optimal polisakkarid konsantrasyonu ve optimal adsorbsiyon süreleri saptandıktan sonra optimal adsorbsiyon süresini tespit etmek amacıyla denemeler 22°C ve 37°C de tekrar edildi ve 37°C de daha yüksek titre edildi.

Standardizasyon ile ilgili sonuçlar Tablo 1-4 de gösterilmiştir.

Yukarıdaki standardizasyon denemelerinden elde edilen sonuçlara göre; en uygun polisakkarid konsantrasyonu 0.5 mg/ml, en uygun adsorbsiyon süresi 45 dakika, en uygun eritrosit türü tavuk eritrositi, en uygun adsorbsiyon ısı 37°C olarak saptanmıştır.

2- İndirek hemaglutinasyonun serum aglutinasyonla karşılaştırılması :

Denemeye sokulan 173 serumdan 12 tanesi her iki test ile reaksiyon vermedi. serumların 33'ünde aglutinasyonla titre elde edilememesine karşın indirek hemaglutinasyonla 1/10 ila 1/320 arasında değişen titreler elde edildi. İndirek hemaglutinasyonla titre vermeyen 23 serumun aglutinasyon titreleri 1/10 ila 1/40 arasında bulundu. Geri kalan 105 serumda ise aglutinasyon titreleri 1/10 ila 1/160, indirek hemaglutinasyon titreleri 1/10 ila 1/320 arasında değişmekteydi. Ayrıca tavşanlardan elde edilen pozitif serumun aglutinasyon titresi 1/1280, indirek hemaglutinasyon titresi 1/2560 olarak bulundu.

İncelenen 173 serumun 59'u (% 34.1) her iki test ile aynı neticeyi vermiştir. Serumların 78'inin (% 45) indirek hemaglutinasyon titresi aglutinasyon titresinden daha yüksek çıkmıştır. Geri kalan 36 serumda (% 20.9) ise aglutinasyon titresi indirek hemaglutinasyon titresinden daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 1. Koyun eritrositleri ile 37°C lik adsorbsiyon ısısında alınan sonuçlar

Polisakkarid yoğunluğu (mg/ml)	Süre (dak.)	Serum dilusyonları*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5	15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	45		+	+	+	+	+	+	+	+	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1	15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	45	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1,5	15	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	60	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2	15	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

* = 1/5.2ⁿ

İndirek hemaglutinasyonun serum aglutinasyonla karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlar Çizelge 5 de gösterilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma ile *S. abortus ovis* enfeksiyonlarının teşhisinde IHA testinin somatik serum aglutinasyon testinden daha duyarlı olduğu ortaya konulmuştur. Bu bakımdan bulgular önceki çalışmalardan elde edilen sonuçları doğrular niteliktedir. Nitekim sığırların *S. dublin*, kanatlıların *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. virchow* ve *S. bredeney* enfeksiyonlarının teşhisinde IHA testinin serum aglutinasyon testinden daha duyarlı olduğu ve daha yüksek titreler verdiği bildirilmektedir (4, 5, 9, 11).

Tablo 2. Sığır eritrositleri ile 37°C lik adsorbsiyon ısısında alınan sonuçlar

Polisakkarid yoğunluğu (mg/ml)	Süre (dak.)	Serum dilusyonlar*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5	15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1	15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	45	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1,5	15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	45	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	45	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

* = 1/5.2ⁿ

Standardizasyon çalışmaları sonunda elde edilen 0,5 mg/ml lik optimal polisakkarid konsantrasyonu ve 37°C lik optimal adsorbsiyon ısısı ile uygun eritrosit türü olarak saptanan tavuk eritrositleri diğer araştırmacıların elde ettikleri sonuçlarla benzerlik göstermektedir (, 7, 9).

Optimal adsorbsiyon süresi olarak tespit edilen 45 dakikalık süre diğer araştırmacıların tespit ettikleri 60 dakikalık adsorbsiyon süresi ile aynı olmamasına karşın birbirlerine yakın değerler olup, bu farkın adsorbsiyon esnasındaki çalkalamadan kaynaklandığı kanaatine varılmıştır. Nitekim, Smith ve Harvey (7) eritrositlerin maksimum hassaslaşması üzerine çalkalamanın etkisinin süreden daha önemli olduğunu belirterek, karışımı her 10 dakikada bir çalkalamak suretiyle

Tablo 3. Tavuk eritrositleri ile 37°C lik adsorbsiyon ısısında alınan sonuçlar

Polisakkarid yoğunluğu (mg/ml)	Süre (dak.)	Serum dilusyonları*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5	15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	30	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1	15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	30	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1,5	15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	30	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	60	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

* = 1/5.2

Tablo 4. Tavuk eritrositleri, 0,5 mg/ml polisakkarid konsantrasyonu ve 45 dakikalık adsorbsiyon süresinde alınan sonuçlar

Adsorbsiyon ısı	Serum dilusyonları*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22°C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

* = 1/5.2^a

minumum adsorbsiyon süresini 30 dakika olarak tespit etmişler ve adsorbsiyon süresinin 60 dakikaya çıkarılması halinde çalkalama işleminin daha uzun aralıklarla yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Tablo 5. İndirek hemaglutinasyon testinin serum aglutinasyon testi ile karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlar

Nümunce adedi	Aglutinasyon titresi	İndirek hemaglutinasyon titresi
12	---	—
15	—	1 / 10
12	—	1 / 20
5	---	1 / 40
1	—	1 / 320
9	1 / 10	—
9	1 / 10	1 / 10
20	1 / 10	1 / 20
8	1 / 10	1 / 40
2	1 / 10	1 / 80
13	1 / 20	—
4	1 / 20	1 / 10
27	1 / 20	1 / 20
9	1 / 20	1 / 40
1	1 / 20	1 / 80
1	1 / 20	1 / 160
1	1 / 20	1 / 320
1	1 / 40	—
1	1 / 40	1 / 10
8	1 / 40	1 / 20
8	1 / 40	1 / 40
3	1 / 40	1 / 80
2	1 / 80	1 / 80
1	1 / 160	1 / 160

Sonuç olarak IHA testi, kısa zamanda sonuç alınması ve daha yüksek titre vermesi bakımından *S. abortus ovis* enfeksiyonlarının teşhisinde serum aglutinasyon testine üstünlük sağlamaktadır.

Kaynaklar

1. **Aksoycan, N.** (1968). *Salmonella'lar. Sağlık Hizmetinde Mikrobiyoloji*. A.Ü. Tıp Fak. Yayınları, No: 180, 945-1018.
2. **Arda, M., Minbay, A., ve Aydın, N.** (1982). *Özel Mikrobiyoloji*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları: 386.
3. **Eroğlu, M.** (1971). *Koyunlarda salmonella enfeksiyonları, Koyun Hastalıkları*. Pendik Kont. Araş. Enst. Yayınları, 3: 39-45.
4. **İstanbuluoğlu, E. ve Arda, M.** (1979). *İndirek hemaglutinasyon testinin kanatlıların Salmonella gallinarum enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılması, plate test ve serum aglutinasyon testi ile karşılaştırılması üzerinde incelemeler*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 26(1-2): 98-110
5. **Sapre, V.A. and Mehta, M.L.** (1967). *Indirect hemagglutination test for diagnosis of salmonellosis in poultry*. Indian Vet. J., 44: 647-652.

6. **Sieburth, J. McN.** (1957). *Indirect hemagglutination studies on salmonellosis of chickens.* J. Immunol., 78: 380-386.
7. **Smith, P.J. and Harvey, C.N.** (1977). *Diagnosis of bovine salmonellosis. I. Development of an indirect haemagglutination test.* Br. Vet. J., 133:474-482.
8. **Smith, P.J., Harvey, C.N. and Hebert, C.N.** (1977). *Diagnosis of bovine salmonellosis. II. Application of the indirect haemagglutination test to the diagnosis of Salmonella dublin infection.* Br. Vet. J., 133:509-517.
9. **Smith, P.J., Larkin, M. and Brooksbank, N.H.** (1972). *Bacteriological and serological diagnosis of salmonellosis of fowls.* Res. Vet. Sci., 13:460-467.
10. **Stavitsky, A.B.** (1954). *Micromethods for the study of proteins and antibodies I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells.* J. Immunol., 72:360-367.
11. **Wray, C., Morris, J.A. and Sojka, W.J.** (1975). *A comparison of indirect haemagglutination tests and serum agglutination tests for the serological diagnosis of Salmonella dublin infection in cattle.* Br. Vet. J., 131:727-737.