

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2021; 40(1) 35-42

DOI:10.30782/jrv.m.842639

Tulareminin Serolojik Tanısı İçin In House Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Prototipi ve Mikroaglutinasyon Test (MAT) Antijeninin Geliştirilmesi

Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK¹, Osman Yaşar TEL^{1*},
Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE¹, Oktay KESKİN¹

1Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Eyyübiye Kampüsü, Eyyübiye, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Received 17-12-2020 Accepted 04-05-2021

Özet

Bu çalışmada, *Francisella tularensis* (F. tularensis)'e karşı gelişen antikorları saptamak için bir Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) prototipi ve kristal viyole boyalı bir mikroaglutinasyon test (MAT) antijeni geliştirildi. Ayrıca konfirme edici Western blot (WB) tekniği de serumlara uygulandı. Alınan sonuçlara göre MAT, ELISA ve WB testlerinin tanısal duyarlılıkları %100 olarak bulunurken, özgüllükleri sırası ile %100, %98 ve %96 olarak bulundu. Geliştirilen MAT ve ELISA ile 72 insan serumunda seropozitiflik oranı her iki teste de %4.2 olarak bulunurken, 190 koyun serumunda MAT ve ELISA seropozitifliği sırası ile %3.2 ve %4.7 olarak bulundu. Alınan sonuçlara göre ülkemizde tularemi insan ve hayvanlarda varlığını sürdüren bir enfeksiyondur. Ancak daha sağlıklı epidemiyolojik yorum yapabilmek için daha çok sayıda seruma ve farklı hayvan türleri ile çalışılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Sonuç olarak, ELISA ve konfirme edici Western blotting kombinasyonunun tulareminin serolojik tanısında kullanılabilir uygun bir kombinasyon olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: F. tularensis, MAT, ELISA, Western blot.

Abstract

Development of an in House Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Prototype and Microagglutination Test (MAT) Antigen for Serological Diagnosis of Tularemia

In this study, a microagglutination test (MAT) antigen stained by crystal violet and an in house Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) prototyp were developed in order to detect antibodies against *Francisella tularensis*. Besides, Western blot technique was used as the confirmatory test. According to the results, diagnostic sensitivity of MAT, ELISA and WB was 100%, while diagnostic specificities of these tests were 100%, 98% and 96%, respectively. Seropositivity rates of serum samples taken from 72 human were 4.2% for both tests. Seropositivity rates of 190 serum samples from sheep were 3.2% for MAT and 4.7% for ELISA. Results seem that tularemia exists in both humans and in animals. However, in order to make more definitive evaluation about the disease, more serum samples taken from various animal species are needed to be tested for this disease. As conclusion, it was thought that ELISA and confirmatory Western blot will be suitable combination for serologic diagnosis of tularemia.

Key Words: F. tularensis, MAT, ELISA, Western blot

Giriş

Tularemi, başta kemiriciler olmak üzere hayvanlarda patojenik olan ve ayrıca hayvanlardan insanlara geçerek farklı klinik tablolar oluşturan *Francisella tularensis* (F. tularen-

sis)'in neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Bakterinin doğal rezervuarları genellikle kemirici hayvanlardır. Bakteri, kemiricilerden bulaşarak ya da kene, sinek, sivrisinek gibi kan emici artropodlarla taşınarak doğada döngüsünü sürdürmektedir. Bazı kene türleri vektör olmak yanın-

* Corresponding author: Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Eyyübiye Kampüsü, ŞANLIURFA
GSM: +90 507 2356961 Tel: +90 414 3183941 e-posta: oyarasar@gmail.com

da etkeni aylarca vücudunda taşır. Etkenin rezervuar ve vektörleri bölgeden bölgeye farklılık gösterebilir.¹ Hastalığın yeterince tanınmaması ve bildirim eksikliği nedeniyle dünyada tularemi insidansı tam olarak bilinmemektedir.² Türkiye'deki duruma bakıldığında, tulareminin 2005 yılı öncesinde Marmara ve batı Karadeniz Bölgelerinde yaygın olmasına rağmen, 2009-2010 yıllarının ilk yarısında özellikle İç Anadolu Bölgesi olmak üzere diğer bölgelerden yeni vakalar rapor edildiği bildirilmiştir.³ Evcil çiftlik hayvanları arasında tularemiye en duyarlı tür koyunlardır ve hastalık koyunlarda kene enfestasyonlarına bağlı olarak mevsimsel bir özellik gösterir. Ancak hastalık kedi, tavşan, köpek, domuz ve atlarda da bildirilmiştir. Sığırların ise genellikle hastalığa dirençli olduğu bilinmektedir.

Hastalığın klinik teşhisi zordur. Teşhis için laboratuvar muayeneleri gereklidir. Ancak *F. tularensis* laboratuvar bulaşması yönünden çok dikkatli olunması gereken bir etkidir. Eğer laboratuvar ortamında canlı bakteri ile çalışılıyorsa biyogüvenlik düzeyi III, şüpheli örneklerle çalışılıyorsa biyogüvenlik II düzeyinde çalışılması zorunludur.⁴ Bu nedenle seroloji hastalığın tanısında önemli bir tanısıl araç olarak kullanılmaktadır. *F. tularensis*'e karşı gelişen antikorlar aglutinasyon ve ELISA yöntemiyle saptanabilmektedir.⁵⁻⁸ Uzun yıllar etkene karşı gelişen antikorları saptamak amacıyla tüp aglutinasyon (TA) testi kullanılmıştır.^{5,7,9} Ancak TA testinin zaman alıcı olması, çok sayıda örneğin incelenmesine uygun olmaması ve tüketilen antijen miktarının fazlalığı gibi dezavantajları nedeniyle 1970'li yıllardan itibaren mikroaglutinasyon (MA) testi kullanılmaya başlanmıştır¹⁰⁻¹⁴ Günümüzde MA test antijeninin ticari olarak üretilmemesi nedeniyle "in-house" olarak hazırlanmaktadır ve belirli bir standardizasyonu bulunmamaktadır.^{13,14,18} Bu çalışmada, insanlarda ve hayvanlarda tulareminin serolojik tanısında kullanılacak güvenilir sonuçlar veren MAT antijeni ve duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir ELISA prototipinin geliştirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Araştırmaya Harran Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (HRÜ-HADYEK) tarafından 26.03.2018 tarih ve 2018/003 nolu oturumun 01-02 nolu kararınca onay alınmıştır.

Bakteriyel suş ve referans MAT antijeni: *F.tularensis* LVS aşısı suşu (ATCC 29648) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Aynur Karadenizli'den temin edildi. Temin edilen suş, içine %2 hemogloblin (Oxoid) solüsyonu içeren Cystine Kalp agarda (Difco) %5 CO₂ içeren inkübatörde üretildi. Referans MAT antijeni Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tularemi Referans Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Pozitif ve negatif kontrol serumları: Mikroaglutinasyon tes-

ti (MAT) sonuçları belli olan tularemi pozitif insanlara ait standart serumlar ve referans MAT antijeni, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tularemi Referans Laboratuvarı temin edildi. Bu serumların titreleri, 1:20, 1:80, 1:160, 1:640 ve 1:1280 idi. Bu serumlar çalışmada yapılacak MAT antijeni, ELISA ve Western blot testinde pozitif kontrol serumları olarak kullanıldı. Laboratuvarımız serum stoklarında bulunan ve referans MAT antijeni ile negatif bulunan, brucellosis yönünden de negatif olan insan serumları çalışmada negatif kontrol serumları olarak kullanıldı. Geliştirilen "in house" ELISA ve MAT antijeni, koyunlardaki seropozitifliğin saptanması amacı ile bölgedeki yetiştiriciler tarafından daha önceden anabilim dalımıza teşhis amacıyla getirilen ve halen derin dondurucuda saklanan koyun serum örnekleri kullanıldı. Ayrıca laboratuvar stoklarımızda bulunan Brucellosis negatif insan serumlarından 72 adedi tularemi yönünden ELISA ile test edilmek için kullanıldı. Laboratuvarımız serum stoklarında bulunan brucellosis yönünden pozitif insan serumu olası bir çapraz reaksiyonu değerlendirmek amacı ile kullanıldı.

MAT antijeninin hazırlanması: MAT antijeninin hazırlanmasında Brown ve ark.¹⁰ bildirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Bu amaçla, % 2 hemogloblin solüsyonu içeren Sistein kalp agarda üreyen *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS aşısı suşu 5-6 günlük olduktan sonra yüzeyindeki koloniler % 0.85 NaCl ve %0.5 formalin içeren FFTS içinde toplanarak stok antijen solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon yine aynı dilüent ile iki kez yıkanarak santrifüj edildikten sonra sediment kendi hacminin 5 katı FFTS ile süspanse edilerek + 4 °C ye stok MAT antijeni olarak kaldırıldı. MAT antijeninin boyanması için kristal viyole, safranin O ve malaşit yeşili olmak üzere üç ayrı boyanın kullanılabilirliği araştırıldı. Bunun için, reaksiyonun en rahat şekilde okunabildiği ve referans MAT antijeninin sonuçları ile paralellik gösteren antijen ve boyanın optimum konsantrasyonları belirlendi. MAT: Üretilen MAT antijeni ile tularemi yönünden referans pozitif serumlara, negatif serumlara ve brucellosis yönünden pozitif olan insan serumlarına standart prosedürlere göre MAT yapıldı.¹⁰ Bu amaçla çukur tabanlı ELISA dilüsyon pleytleri kullanıldı. Serumun titresi aglutinasyonun görüldüğü en son çukura tekabül eden serum sulandırması olarak kabul edildi. Testin titresi 1:20 ve üzeri olduğunda pozitif kabul edildi.

ELISA antijeninin hazırlanması: Bu amaçla, Yi ve Hackett¹⁵ bildirmiş olduğu Tri-Reagent yöntemi, modifiye edilerek LPS tabakasının izole edilmesinde kullanıldı. Bu amaçla, Sistin kalp agarda üreyen *F.tularensis* LVS suşunun kolonileri agar yüzeyinden steril tamponlu tuzlu su (PBS) ile toplandıktan sonra elde edilen kültürler benmari de 80°C'de 30 ısı ile inaktive edildikten sonra ölü bakteri süspanasyonu, +4°C'de 3.500 rpm' de santrifüj edilerek üstteki

besiyeri uzaklaştırıldı ve alttaki ölü bakteri peleti toplandı. Toplanan her bir gram bakteri peleti için 2 ml Tri-reagent kullanıldı. Karışım oda derecesinde 10-15 dakika tam bir homojenizasyon için bekletildi ve bu sürenin sonunda, faz seperasyonu yaratmak için her bir gram bakteri peleti için karışıma 300 µl kloroform eklendi. Süspansiyon vortekste hızlıca karıştırılarak 10 dakika daha inkübe edildi ve daha sonra 12.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Büyölece su ve organik fazlar ayrılacaktır. Su fazı yeni bir 1.5 ml.lik santrifüj tüpüne transfer edildi. Organik fazın üstüne 100 µl distile su eklenerek karışım tekrar 12.000 g'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Su fazı bir önceki su fazı ile kombine edilerek elde edilen bu ham LPS çözeltisi -20 °C de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

ELISA: İzole edilen antijenin çeşitli konsantrasyonları, MAT 1:1280 titredeki serumun çeşitli dilüsyonları ile karşılıklı titrasyonları (checkerboard analizi) yapıldıktan sonra belirlenen en uygun antijen konsantrasyonu, karbonat-bikarbonat buffer (pH 9.6) kaplama solüsyonu içinde sulandırılarak 96 gözlü pleytin (NUNC, 269620, Denmark) her kuyucuğuna 100µl olarak konuldu. Antijenle kaplanan pleytler bir gece 4 °C de beklediler. PBS solüsyonuna eklenen % 0.5 Tween 20 ile hazırlanan (PBS-T) pleytlerin 4 kez yıkanmasından sonra pozitif ve negatif serumlar ve laboratuvarımız serum koleksiyonunda bulunan serumlardan 72 insan ve 190 koyun test serumu 1:100 oranında dilüye edilerek pleyt kuyucuklarına primer antikor olarak 100 µl konuldu ve yıkama işleminin ardından HRPO ile işaretli rekombinant A/G konjugatı (Pierce 32490) PBST-T içinde 1:20.000 oranında dilüye edilerek eklendi. Yıkama işlemlerinin ardından üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu (pH 5.5) içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H₂O₂) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H₂SO₄ ilave edilerek pleytlerin otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Negatif serum OD'lerin ortalaması artı 3 standart deviasyon (SD) ELISA eşik değer olarak belirlendi. Referans pozitif serumların her birine 10 kez, negatif serumların her birine 5 kez ve brucellosis yönünden pozitif olan insan serumlarına da 10 kez ELISA uygulanarak ortalaması ve standart sapması alındı. Geliştirilen ELISA prototipinin duyarlılığı, (Gerçek Pozitif Sayısı)/(Gerçek Pozitif Sayısı+Yanlış Negatif Sayısı) X 100; özgülüğü (Gerçek Negatif Sayısı)/(Gerçek Negatif Sayısı+Yanlış Pozitif Sayısı) X 100 formülleri ile hesaplandı.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforesiz (SDS-PAGE):

SDS-PAGE elektroforezis standart yöntemlere göre uygulandı.¹⁶ F.tularensis'in üreyen kültürlerinden iki farklı antijen hazırlanarak SDS-PAGE ve Western blot tekniğinde kullanıldı. Bunlardan birincisi ELISA için kullanılan kısmı purifiye lipopolisakkarit (LPS) antijen ve diğerü tüm hücre lizatu (THL) şeklinde hazırlandı. THL hazırlanmasında, antijen FFTS içinde toplanıp bu solüsyonda 3 kez yıkanıp santrifüj edildikten sonra altta oluşan hücre peleti, tris tamponlama çözeltisi (TBS-T) (0,15 M NaCl, 0.050M Tris-HCl, %1 Tween 20) ile 1:4 oranında karıştırıldı. Bu karışımdan üç kısım, 5 kısım Laemmlı buffer (500mM Tris/HCl pH 6.8; % 4 (w/v SDS; % 10 (v/v gliserol; % 10 (v/v) 2-β-merkaptoetanol ve % 0.004 bromfenol mavisi) ile karıştırıldıktan sonra steril ependorf tüplerine konuldu ve 5 dakika süre ile kaynatıldı. LPS antijeni ise Laemmlı buffer ile 1:3 oranında karıştırıldıktan sonra kaynatıldı. Kaynatılıp soğutulan örnekler daha sonra tek büyük bir kuyuya 150 µl olarak yüklendi. Protein ladder olarak Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Lot 00655455) kullanılarak büyük kuyunun yanındaki küçük kuyucuğa 10 µl olarak yüklendi. Örneklerdeki proteinler %12 homojen akrilamit ayırıcı (resolving) jel ve % 4 akrilamit yükleme (stacking) jeli ile standart yöntemlere göre sabit 100V akımda ayrıştırıldılar. (EC 120 mini vertikal jel sistemi).

Western blot testi:

Elektroforez ile ayrılan proteinlerin immünolojik olarak saptanması Towbin ve ark.¹⁷ bildirdiği yöntemle yapıldı. Moleküler standart olarak transfer sonrası nitroseluloz membranda herhangi bir saptama işlemi yapılmaksızın gözlemlenen Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific) kullanıldı. Antijenler yukarıda bahsedildiği şekilde SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra 0.2µm por çaplı nitroseluloz membrana (NM) (Sigma) 20V sabit akımda 1.5 saat süreyle standart yöntemlere göre transfer edildiler (EC 140 Mini Blot Module). NM, kapatma (blocking) çözeltisi ile (TBS-T) çözeltisinde hazırlanmış % 5 yağsız süt tozu (BLOTTO) ve % 0.02 sodium azide) bloklandıktan sonra strip tarzında şerit olarak kesildi. şeritler yıkama solüsyonunda (TBS-% 0.2 Tween 20) yıkandıktan sonra primer antikor olarak pozitif referans serumların 1/200 oranında ve negatif serumun 1/50 oranında dilüsyon çözeltisinde (TBS; % 1 süt tozu; % 0.2 Tween 20) 1 saat süre ile inkübe edildiler. İnkübasyonun sonunda konjugat olarak alkalın fosfataz ile işaretlenmiş Rekombinant A/G proteini (Thermo Scientific, 32391) önerilen dilüsyonda kullanıldı. Yıkama işleminin ardından substrat hazırlandı. Bu amaçla, daha önceden hazırlanan BCIP

(Sigma) solusyonu (%100 dimetilformamid çözeltisinde 50 mg/ml bromo kloro indolil fosfat), NBT (Roche) solusyonu % 70 dimetilformamid (Sigma) çözeltisinde 50 mg/ml nitro blue tetrazolium klorid) ve alkaline fosfataz buffer (0.1 M Tris-HCl; 0.1 M NaCl; 5 mM MgCl₂ pH 9.5) çözeltileri oda ısısına getirildiler. Substratın hazırlanmasında 66 µl NBT solusyonu 10 ml AP çözeltisi ile karıştırıldı daha sonra 33 µl BCIP çözeltisi eklendi ve oluşan karışım substrat olarak antijen bantların üzerini örtecek şekilde ilave edildi. Bantların gözlenmesinin ardından reaksiyon, distile suyla yapılan yıkama ile durduruldu. Tipik LPS merdiven görüntüsü pozitif olarak kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada reaksiyonların daha rahat okunması ve standart MAT pozitif serumu ile aynı sonucu göstermesi baz alındığında, MAT antijeni üretiminde boya olarak kristal viyole

Tablo 1. Test MAT antijeninin standart serumlar ile MAT sonuçları

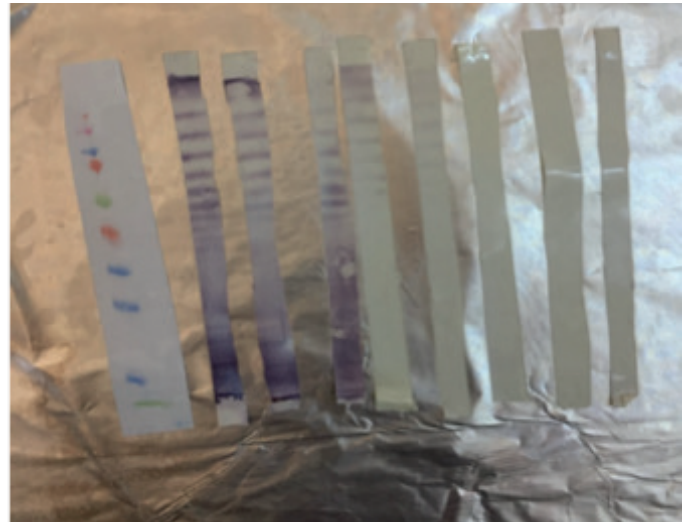
Plyet konumu	Referans pozitif MAT titresi	Referans MAT antijeni ile referans pozitif serumlardan alınan sonuçlar	Test MAT antijeni ile referans pozitif serumlardan alınan sonuçlar
A	1:1280	1:1280	1:1280
B	1:20	1:20	1:20
C	1:640	1:640	1:320
D	1:80	1:80	1:80
E	1:1280	1:1280	1:1280
F	1:640	1:640	1:640
G	1:160	1:160	1:160
H	Brucella+	1:10	1:10
	1:1280		

Tablo 3. İnsan ve koyun serumlarının Ftularensis yönünden MAT ve ELISA sonuçları

serum	MAT		ELISA	
	pozitif	negatif	pozitif	negatif
insan	3 (%4.2)	69 (%95.8)	3 (%4.2)	69 (%95.8)
Koyun	6 (%3.2)	184 (%96.8)	9 (% 4.7)	181 (%95.3)

seçildi. Ayrıca, kristal viyole ve safranin O, malaşit yeşiline göre bir titre daha ileride sonuç verdi. Üretilen MAT antijeni ile referans pozitif serumların MAT testi yapıldı. Alınan sonuçlar Tablo 1' de gösterildi. Buna göre tüm pozitif serumlar yeni geliştirilen MAT antijeni ile pozitif bulunduğundan testin duyarlılığı %100 olarak bulundu. Brucellosis yönünden pozitif olan serum her iki MAT antijeni ile tanısal seviyenin altında (1:10) yanıt verdi. Tularemi yönünden

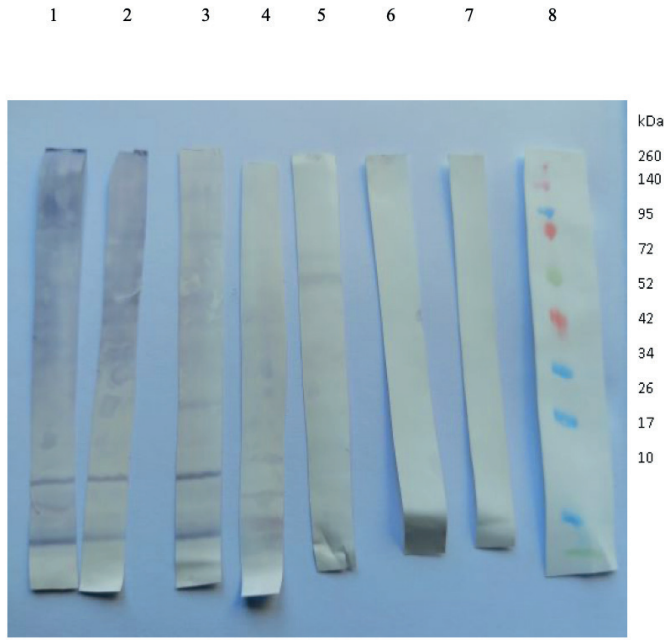
referans MAT antijeni ile negatif bulunan 50 negatif serumun tümü geliştirilen yeni MAT antijeni ile negatif bulunduğundan testin özgüllüğü %100 olarak bulundu (veri gösterilmiyor). Tablo 1' de gösterilen sonuçlara göre kristal viyole ile boyanmış MAT antijeninin referans antijenle ve referans pozitif serum titreleri ile benzer sonuç verdiği ve gösterdiği %100 duyarlık ve özgüllük oranı ile hastalığın tanısında güvenle kullanılabilecek bir test olduğu sonucuna varılarak, testin özgüllük ve duyarlılığının %100 e yakın olduğunu bildiren bir çok araştırmacı ile benzer sonuçlar alınmıştır.5,10,12,14,18 Geliştirilen ELISA prototipinde eşik değeri 0,284 olarak belirlendi ve belirlenen bu değer baz alınarak, 7 pozitif serumun 10 kez test edilmesi ile elde edilen 70 OD'nin tümü eşik değerinin üstünde olduğundan testin duyarlılığı (sensitivitesi) %100 olarak bulundu. Testin özgüllüğü test edilen 50 negatif serumun 5 kez test edilmesi ile elde edilen 250 OD'nin 5'i eşik değerinin üstünde olduğundan testin özgüllüğü (spesifitesi) % 98 olarak bulundu. Bu çalışmada, laboratuvar stoklarımızda bulunan serumlardan brucellosis yönünden negatif 72 insan serumu ve 190 koyun serumu geliştirdiğimiz ELISA ile test edildiler. Seropozitiflik oranları Tablo 3' de gösterildi. Bu sonuçlara göre insanlarda MAT seropozitiflik % 4.2 iken koyunlarda %3.2; insanlarda ELISA pozitiflik yine %4.2 iken koyunlarda %4.7 olarak bulundu. WB testinde antijen olarak kısmi purifiye LPS antijeni (Şekil 1) ve tüm hücre lizati kullanılmıştır (Şekil 2). LPS nin kulanıldığı blot tipik LPS merdiven görüntüsünü verirken tüm hücre lizatının kullanıldığı blotta saptanan protein bantları bu tipik görüntüyü vermedi. Blot 140 kDa-17 kDa arasında değişen bir takım immunojenik bileşenler gösterdi.



Şekil 1. İnsan serumlarının Ftularensis LPS- Western blot sonuçları 1. Protein ağırlık standartları. 2. 1/1280 tirdedeki serum. 3. 1/640 tirdedeki serum. 4.1/ 160 tirdedeki serum. 5. 1/20 tirdedeki serum. 6-8 arası negatif insan serumları. 9. Brucella pozitif serum.

WB testinde kullanılan tüm seropozitif serumlar pozitif yanıt verirken (%100 duyarlılık) , 50 negatif serumun iki-

sinde çapraz reaksiyon veren bantların görünmesi (serum örneklerinden biri Şekil 1 de 6. Stripte görülmektedir) ile testin özgüllüğü %96 olarak saptanmıştır.



Şekil 2. İnsan serumlarının *F.tularensis*'in tüm hücre lizatının kullanıldığı- Western blot sonuçları 1: 1/1280 titedeki serum. 2:1/640 titedeki serum. 3:1/160 titedeki serum. 4: *Brucella* pozitif serum. 5-7: Negatif insan serumları. 8. Protein ağırlık standartları

Tartışma

F.tularensis, infeksiyonun alınma yoluna bakılmaksızın insanlarda ve bazı memeli hayvanlarda çok ciddi ölümcül infeksiyonlar yapan bir ajandır. Yapılan çok sayıda çalışmanın da gösterdiği gibi hastalığın tedavisindeki başarı antibiyotiklerin zamanında verilmesine bağlıdır. Tedavinin 14 günden fazla gecikmesinin çoğunlukla başarısız bir tedavi ile sonuçlandığı bildirilmektedir.¹⁹ Bu durum da hastalığın erken güvenli bir tanısının ne kadar hayati bir durum olduğunu ortaya koymaktadır. Hâlihazırda hastalığın teşhisinde en yaygın olarak kullanılan serolojik test MAT'dır. Testin, pratik, kolay uygulanan, ekonomik ve sofistike laboratuvarlara ihtiyaç göstermemesi testin çok geniş çaplı kullanılmasına neden olmuştur. Ancak ülkemizde standardize, ticari bir MAT antijeni yoktur ve laboratuvarlar "in house" olarak ihtiyaç halinde kendi antijenlerini üretmektedirler. Çalışmamızda iki farklı katyonik boya olan kristal viyole ve malaşit yeşili, referans Safranin O boyası ile birlikte kullanılarak MAT antijeni üretildi. Antijen-antikör kompleksinin daha kolay görülmesi için *F. tularensis* tüm hücre antijeni, bakterinin kimyasal inaktivasyonunu takiben metilen mavisi, kristal moru veya safranin-O ile boyanmaktadır.^{9,10,13,14,18} Geliştirilen Tetrazolyum Mavisi ile boyanmış *F. tularensis* MAT antijeninin insan serumları ile standart safranin-O ile boyalı antijenlere göre daha iyi aglutinasyon paterni vermesi ve reaksiyonun daha kolay de-

ğerlendirilmesi gibi avantajları olduğunu, elde edilen antijenin doğruluğu, duyarlılığı ve özgüllüğünün %100 olarak saptandığını bildirmişlerdir.¹⁸ Mikroaglutinasyon Testi için Safranin-O-boyalı antijen geliştirmişlerdir. Sato ve ark.¹⁴ mikroaglutinasyon testini tüp aglutinasyon testiyle karşılaştırdıkları çalışmada, mikroaglutinasyon testinin tulareminin erken ve spesifik serolojik tanısında yararlı bir araç olduğunu bildirmişlerdir.

Tulareminin serolojik teşhisinde aglutinasyon testlerinin

Tablo 2. Referans serumların ELISA OD değerleri ortalamaları

Test edilen serum	Ortalama OD±Standart sapma
F.tularensis MAT 1:20	0,63±0,147
F.tularensis MAT 1:80	0,858±0,33
F.tularensis MAT 1:160	1,54±0,22
F.tularensis MAT 1:640	2,65±0,42
F.tularensis MAT 1:1280	3,02±0,52
F.tularensis MAT Negatif	0,164±0,04
Brucella abortus SAT 1:1280	0,180±0,03

dışında indirekt immunofloresans, ve ELISA gibi testler uygulanmaktadır. Carlsson ve ark.²⁰ *F. tularensis*'ten elde ettikleri lipopolisakariti kullandıkları ELISA'nın tüp aglutinasyon testinden 10 kez daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Çok sayıda araştırmacı ELISA'nın, hastalığın serolojik teşhisinde rutin olarak en çok uygulanan MAT'dan daha duyarlı olduğunu bildirmektedirler.²¹⁻²³ Dünya sağlık teşkilatı (DSÖ, WHO) kısa sürede sonuç veren ELISA'yı tulareminin serolojik teşhisinde önermektedir.⁹ Bu çalışmada, ELISA testinin duyarlılığı (sensitivitesi) %100 olarak bulundu. Testin özgüllüğü test edilen 50 negatif serumun 5 kez test edilmesi ile elde edilen 250 OD'nin 5'i eşik değerinin üstünde bulunduğundan testin özgüllüğü (spesifitesi) % 98 olarak bulundu. Schmitt ve ark.²⁴ kısmen saflaştırılmış lipopolisakkaridlerin antijen olarak kullanıldığı ELISA testinin duyarlılığının %99 özgüllüğünün %97,1 olduğunu bildirmişlerdir. Chaignat ve ark.²⁵ ticari ELISA kitleri ile yaptıkları çalışmalarında testin duyarlılığını %94.8-%97 arasında ve özgüllüğünü %91.5 ve % 96.8 aralığında bulmuşlardır. Bevanger ve ark.²⁶ OMP ile kapladıkları in house ELISA'da duyarlılığı %95.7 ve özgüllüğü %96 olarak bulmuşlardır. Porsch -Özçürümez ve ark.¹³ yaptıkları çalışmada ELISA'nın tanısallık ve özgüllüğü % 98 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları tüm bu araştırmacıların sonuçları ile büyük ölçüde benzerlik göstermekte ve ELISA'yı tanısallık duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olarak tanımlanmasına neden olmaktadır. Referans tularemi pozitif serumların her birine 10 kez ve negatif serumların her birine 5 kez ayrıca brucellosis yönünden pozitif olan seruma 10 kez ELISA yapılarak alınan optik dansitelerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 2' de gösterildi.

Alınan sonuçlara göre MAT titreleri ile ELISA OD değerleri arasında serum titrelerine göre yüksek derecede uyum görülmektedir. Bu durumun ELISA sonuçlarından hastanın MAT titresi hakkında bir fikir edinilebileceğini düşündürmektedir.

ELISA'nın arka sinyal oranının düşük olması, pozitif ve negatif OD değerleri arasındaki farkın büyük olması, geliştirilen ELISA prototipinin önemli avantajlarını oluşturmuştur. Brusellosis yönünden pozitif serumun eşik değer altında kalması da çapraz reaksiyonun gözardı edilebilecek minimal bir seviyede olduğunu göstermektedir. Ayrıca ELISA prototipinde sekonder konjugat olarak rekombinant A/G-HRPO kullanıldığından bu ELISA ile sadece insanlar değil diğer türdeki hayvanların serolojik teşhisinde yapılabiliyor olması önemli bir sonuçtur. Bu bağlamda laboratuvar stoklarımızda bulunan serumlardan brusellosis yönünden negatif 72 insan serumu ve 190 koyun serumu geliştirdiğimiz ELISA ile test edildiler. Seropozitiflik oranları Tablo 3' de gösterildi.

Enfeksiyonun prevalansını belirlemeye yönelik, evcil hayvanlarda klinik hastalıkların bildirim ve prevalansına dair bilgiler oldukça kısıtlıdır.²⁷ Bu durum hastalığın hayvanlardaki durumu ve insanlar için oluşturduğu risk faktörlerini sağlıklı bir şekilde değerlendirmeyi sınırlamaktadır. Şeyda T.²⁸ Kars il merkezi ve kırsalındaki koyunlarda tularemi seropozitifliği MAT ile %3,54 ve ELISA ile %7,8 olarak bulmuştur. Büyük ve ark.²⁹ yine Kars Yöresine ait çoban köpekleri ve Ankara Yöresine ait pet köpeklerinde MAT pozitifliği %4,11 oranında saptamışlardır. Bayram ve ark.³⁰ yaptıkları çalışmada insanlar ve o kişilere ait sığır, koyun ve keçilerden aldıkları serumlarda MAT ile pozitiflik araştırmışlardır. Sonuçta insanlarda %3,6, hayvanlarda ise genel olarak %9,4 seropozitiflik saptamışlardır. Çeşitli araştırmacıların sonuçları dikkate alındığında çalışmamızda bulunan sonuçlarla büyük benzerlik bulunmaktadır. Ancak Karataş Yeni,³¹ 5 farklı yerleşim yerinden topladığı 401 koyun serum örneğinde MAT ile %27,6 pozitiflik saptamıştır. Çalışmamızda alınan sonuçlarla çok farklı olan bu sonucun nedeni, kullanılan test tekniğine, seropozitiflik olarak kabul edilen titreye, test serumlarının alındığı sürede olası bir salgın durumunun varlığına bağlı olabilir.

Bevanger ve ark.²¹ *F.tularensis*'in dış membran (OM) proteinlerini antijen olarak kullandıklarında WB testinde daha az OM proteinlerini saptamışlar, ancak 12 hastada 43 kDa luk bir antijene kuvvetli bir yanıt aldıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 43 kDa luk belirgin bir antijene rastlanılmamış ancak her iki antijenden hazırlanan blotta da 17-26 kDa arasında kuvvetli reaksiyon veren bantlar saptanmıştır. Antijenin hazırlanma yöntemi ve jele yükleme miktarının da bu farklılıklara neden olabileceği düşünülmüştür. Çalışmada LPS ile hazırlanan blotta bru-

sellosis yönünden müspet olan serum ile bir pozitiflik saptanmazken, tüm hücre lizatı ile olan blotta Brusellosis li serum örneğinde molekül ağırlığı küçük olan birkaç bant görülmüştür. Daha çok antijenik komponent içeren tüm hücre lizatında çapraz yanıt verecek antijenik bileşenlerin LPS tabakası ile yapılan blotta göre daha fazla olma ihtimali oldukça mantıklıdır. Bu nedenle konfirme edici WB yapılacağında antijen olarak LPS'yi seçmek olası çapraz reaksiyonları azaltacaktır. WB testinde kullanılan tüm seropozitif serumlar pozitif yanıt verirken (%100 duyarlılık), 50 negatif serumun ikisinde çapraz reaksiyon veren bantların görünmesi (Serum örneklerinden biri Şekil 1' de 6. Stripte görülmektedir) ile testin özgüllüğü %96 olarak saptanmıştır. WB ile ilgili araştırmacıların farklı sonuçlar elde ettiği görülmektedir. Schmitt ve ark.²⁴ Western blot testinde ise duyarlılığın %100 özgüllüğün %99,6 olduğunu bildirmişlerdir. Porsch-Özçürümez ve ark.¹³ WB'un tanısal duyarlılık ve özgüllüğünün % 100 olarak bulmuşlardır. Öbür yandan Chaignat ve ark.²⁵ WB'un duyarlılığını % 93.3 ve özgüllüğünü % 83 olarak bulmuştur. Değerlerdeki farklılıkların başlıca antijenin hazırlanması ve saf olup olmadığı ile yakın ilişkisinin bulunduğu düşünülmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak, çalışmada insanlarda ve hayvanlarda tulareminin serolojik tanısında kullanılacak güvenilir sonuçlar veren MAT antijeni ve duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir ELISA prototipi geliştirilmiştir. Bu testlerin çok daha fazla pozitif ve negatif serumlarla saha validasyonunun yapılmasının, testlerin güvenilirliği, tekrarlanabilirliği açısından büyük bir önemi olacaktır. Geliştirilen bu testlerin zaman zaman insanlarda salgınlar yapan çok önemli bir zoonoz olan ve ülkemizde insanlarda endemik seyreden bu enfeksiyonun teşhisine, sahada çeşitli hayvan türlerinde hastalığın yaygınlığının saptanmasına çok büyük yararları olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Hr. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18072 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Çelebi G. Tularemi Sempozyumu, 2004. Erişim Tarihi: 19.03.2018: <http://www.klimik.org.tr/bilgimerkezi/tularemi/tularemi-yrd-doc-dr-guven-celebi-zonguldak-karaemas-universitesi-tip-fakultesi-infeksiyon-hastaliklari-ve-klinik-mikrobiyoloji-anabilim-dali/>
2. Şahin İ. Tulareminin Bulaş Yolları In: Francisella tularensis ve Tularemi, eds. Gürcan Ş. Nobel Tıp Kitabev-

- leri, İstanbul, 2009; 75.
3. Tularemi Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi. Erişim Tarihi:11.5.2013. <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekut-uphane/kitaplar/Tularemi%20Saha%20Rehberi.pdf>.
 4. Çelebi B. Tularemi: Laboratuvar tanı, In: III. Zoonotik Hastalıklar Sempozyum Kitabı, Türkiye, 2010; 13-18.
 5. Francis E, Evans AC. Agglutination, cross-agglutination, and agglutinin absorption in tularaemia. Public Health Rep. 1926; 41(26): 1273-1295.
 6. Kılıç S, Çelebi B, Yeşilyurt M. Evaluation of a commercial immuno-chromatographic assay for the serologic diagnosis of Tularemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74(1): 1-5.
 7. Ransmeier JC, Ewing CL. The agglutination reaction in Tularemia. J Infect Dis. 1941; 69: 193-205.
 8. Viljanen MK, Nurmi T, Salminen A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen for IgM, IgA, and IgG antibodies to Francisella tularensis: comparison with bacterial agglutination test and ELISA with lipopolysaccharide antigen. J Infect Dis. 1983; 148(4): 715-720.
 9. World Health Organization. WHO guidelines on tularemia. 2007. Geneva, Switzerland. Erişim Tarihi: 19.03.2018. <http://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf>
 10. Brown SL, Mckinney FT, Klein GC, et al. Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for Francisella tularensis antibodies. J Clin Microbiol. 1980; 11(2): 146-148.
 11. Gaultney JB, Wende RD, Williams RP. Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. Appl Microbiol. 1971; 22(4): 635-640.
 12. Massey ED, Mangiafico JA. Microagglutination test for detecting and measuring serum agglutinins of Francisella tularensis. Appl Microbiol. 1974; 27(1): 25-27.
 13. Porsch Özcürümez M, Kischel N, Priebe H, et al. Comparison of Enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11(6): 1008-1015.
 14. Sato T, Fujita H, Ohara Y, et al. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. J Clin Microbiol. 1990; 28(10): 2372-2374.
 15. Yi EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram negative bacteria. Analyst. 2000; 125(4): 651-6.
 16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-685.
 17. Towbin ST, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76: 4350-4354.
 18. Çelebi B, Kılıç S. Tularemi mikroagglütinasyon testi için tetrazolyum mavisi ile boyalı Francisella tularensis antijeninin geliştirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2013; 47(3): 514-522.
 19. Çelebi G, Baruönü F, Ayoğlu F, et al. Tularemia, a re-emerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment response. Jpn J Infect Dis. 2006; 59: 229-234.
 20. Carlsson HE, Lindberg AA, Lindberg G, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. J Clin Microbiol. 1979; 10(5): 615-621.
 21. Bevanger L, Maeland JA, Naess AI. Agglutinins and antibodies to Francisella tularensis outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of Tularemia. J Clin Microbiol. 1988; 26(3): 433-437.
 22. Eliasson H, Olcén P, Sjöstedt A, et al. Kinetics of the immune response associated with Tularemia: comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay, a tube agglutination test, and a novel whole-blood lymphocyte stimulation test. Clin Vac Immun. 2008; 15(8): 1238-1243.
 23. Spletstoeser W, Guglielmo-Viret V, Seibold E, et al. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human Tularemia and detection of Francisella tularensis-specific antibodies in sera from different mammalian species. J Clin Microbiol, 2010; 48(5): 1629-1634.
 24. Schmitt P, Spletstoeser W, Porsch Özcürümez ME, et al. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of Tularemia. Epidemiol Infect. 2005; 133: 759-766.
 25. Chaignat V, Djordjevic-Spasic M, Ruettger A, et al. Performance of seven serological assays for diagnosing Tularemia. BMC Infectious Diseases. 2014; 14: 234-239.
 26. Bevanger L, Maeland JA, Naess AI. Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43,000-molecular-weight Francisella tularensis outer membrane protein for the diagnosis of Tularemia. J Clin Microbiol. 1989; 27(5): 922-926.
 27. Otlu S. Hayvanlarda Tularemi araştırmaları ve dünyadaki durum. In: Francisella tularensis ve Tularemi, eds. Gürcan Ş, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009; 161-168.
 28. Şeyda T. Kars bölgesinde koyunlarda Tularemi in-

feksiyonunun insidensi üzerinde serolojik ve kültürel çalışmalar. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Doktora Tezi, 1996.

29. Büyük F, Şahin M, Çelebi Ö, et al. Kars ve Ankara yöresine ait köpeklerde Francisella tularensis antikorlarının araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg. 2012; 69(2): 83-88.
30. Bayram Y, Özkaçmaz A, Parlak M, et al. Van ili ve çevresinde risk altındaki insan ve hayvan gruplarında Tularemi seroprevalansı. Mikrobiyol Bul. 2015; 49(4): 532-541.
31. Karataş Yeni D. Francisella tularensis'in Muhtemel rezervuar hayvanlar ve koyunlarda laboratuvar tanısı. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Doktora Tezi, 2013.