

## SİĞİR SERUMLARINDA MİKROAGLÜTİNASYON TESTİ (MAT) İLE BRUCELLA ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

### The Detection of Brucella Antibodies with Microagglutinationtest (MAT) in the Bovine Sera

Turgay ŞEYDA\* Fuat AYDIN\*\* Oktay GENÇ\*\*\*  
M.Ali GÜLER\*\*\* Ethem BAZ\*\*\*\*

#### ÖZET

Bu çalışmada aşısız ve brucellosis şüpheli 280 adet siğir kan serumu Rose Bengal Plate Test (RBPT), Tüp Aglütinasyon Test (TAT) ve Mikroaglütinasyon Test (MAT) ile incelenmiştir.

Test edilen 280 siğir kan serumundan RBPT'de 167 (%59.7), TAT'de 184 (%65.7), MAT'de 209 (%74.6) pozitif reaksiyon saptanmıştır.

Sonuç olarak; MAT brucella antikor titrelerinin belirlenmesi için daha az zaman, kısa inkübasyon ve daha az antijen kullanımı gerektirdiğinden TAT'a tercih edilmelidir.

**Anahtar Sözcükler:** Brucella abortus, Siğir serumu, RBPT, TAT, MAT.

#### SUMMARY

In this study, a total of 280 non-vaccinated and brucellosis suspected blood serum samples obtained from cows were examined with Rose Bengal Plate Test (RBPT), Tube Agglutination Test (TAT) and Microagglutination Test (MAT).

Among 280 blood serum samples examined, 167 (59.7%), 184 (65.7%) and 209 (74.6%) samples were determined as positive in RBPT, TAT and MAT respectively.

It was concluded, the MAT preferred to the detection of brucella antibody titers because it requires less time to perform, has a shorter incubation time, and uses less antigen than the TAT.

**Key Words:** Brucella abortus, Bovine sera, RBPT, TAT, MAT.

## GİRİŞ

Brucellosis, ülkemiz siğir ve hayvan yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen hayvanlarda yavru atma, kısırılık ve süt veriminde düşüklük yaparak büyük ekonomik kayıplara yol açan; insanlar için de bulaşıcı olan, enfeksiyöz karakterde zoonoz bir hastalıktır (1-3).

Brucella enfeksiyonu, Brucella grubu bakteriler tarafından oluşturulmakta; B. abortus genellikle siğirlerde atıklara sebep olmaktadır. Aynı zamanda erkek hayvanların testis, epididimis ve seminal vesiküllerinde de yangısel nekrotik değişmelere yol açarlar. Siğir brucellosisinde klinik ve otopsi bulgularıyla kesin tanı konamaz. Bunun için bakteriyolojik ve serolojik testlerden yararlanılır (1).

Enfeksiyonun tanımında etken izolasyon ve identifikasyonu önemli olmasına karşı materyal teminindeki güçlükler etken izolasyonunun zaman alıcı ve zor oluşu indirekt yöntemlerin daha fazla kullanılmasına yol açmıştır. İndirekt yöntemler arasında kan serumu, süt ve süt serumu ile yapılan serolojik testler bulunmaktadır.

Teşhis, kontrol ve eradikasyon programlarında kullanılan başlıca serolojik testler; Rose Bengal Plate Test (RBPT), Tüp Aglütinasyon Testi (TAT), Komplement Fiksasyon Testi (KFT), Brucella Ring Test (BRT), İndirekt Hemoliz Test (IHT), Anti-globulin Test (Coombs), Merkaptoetanol Test (MET), Radio İmmunoassay (RIA) ve ELISA gibi yöntemlerdir (1-4).

Bir aglütinasyon testi olan RBPT, hem laboratuvarında ve hem de tarama testi olarak sahada kullanılmaktadır. Rose Bengal boyası ile boyanmış ve pH 3.65'e ayarlanmış antijenin bu asidik pH derecesi serumdaki IgM aktivitesini engelleyerek IgG'lerin (özellikle IgG 1) reaksiyona katılmalarına yardımcı olurken nonspesifik aglutininlerin etkinliğine de engel olur (2,4,5).

Tüp aglütinasyon testi (TAT), Brucellosis'in serolojik tanısında eskiden beri başvurulan en önemli testlerden biri olup günümüze dek bu yöntemden geniş çapta yararlanılmıştır (1,3-6).

\* Dr., KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\* Doç.Dr. KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\*\* Arş.Gör.,KAÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

\*\*\*\*Vet. Hek. KAÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars-TÜRKİYE

Yapılan çalışmalarda TAT'de IgM'lerin, IgA, IgG 1 ve IgG 2'lerden daha yüksek reaksiyon verdiği, bu sebeple TAT'ın akut brucellosis olgularının serolojik tanısında kroniklere oranla daha etkili olduğu bulunmuştur. Hastalığın erken dönemlerinde özellikle yüksek titrelili serumlarda prozon ve diğer bloke fenomenler nedeniyle testte negatif sonuç elde edilebilir. TAT makro veya mikro olarak uygulanmaktadır (7-9). Makro TAT fazla miktarda serum tüp, pipet ve antijen gerektirdiği için çok sayıda örneğin işlenmesinde dezavantaja sahiptir. Ayrıca TAT'ın fazla spesifik olmadığı bildirilmekte ve buna sebep olarak koaglutininler ve non-spesifik aglutininlerin spesifiteyi etkilediği ileri sürülmektedir (4,5).

Brucella grubu mikroorganizmalar ile ortak antijenik yapıya sahip olan bazı bakteriler (Y. enterocolitica 0:9, E. coli 0:116 ve 0:157, F. tularensis, N grubu Salmonella'lar özellikle S. urbana ve C. fetus vs.) koaglutininlerin nedeni olarak gösterilmiştir. Non-spesifik aglutininlerin nedeni henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen bu durum serum glikoproteinlerinin desializasyonuna bağlı olarak serumda bulunan IgM'lerin modifiye olması ve bu serumlarla yapılan TAT'de IgM'lerin brucella antijenleri ile non-immun reaksiyon vermeleri ile açıklanmıştır (10).

Mikroaglutinasyon Testi (MAT)'nin az miktarda serum ve antijen gerektirmesi, uygulandığı mikroyapılarda çok sayıda örneğin değerlendirilmesi gibi avantajlara sahip olduğu bildirilmiştir (6,7,10,11). MAT sonuçlarının okunması sırasında oluşabilecek güçlüklerde antijenin boyanması ile ortadan kaldırılmıştır. MAT'de antijenin boyanması için çeşitli boya maddelerinden (Safranin-0, Trifeniltetrazolium klorid vs.) yararlanılmıştır (4,6,7,11). Araştırmacılar (6,7,11), Safranin-0 ile boyalı antijenle yapılan MAT'de sonuçların daha net değerlendirildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Safranin-0 ile boyanarak duyarlılığı artırılan antijenin kullanımı ile aglutininlerin erken tanısının mümkün olabileceği belirtilmiştir (11).

Bu çalışmada, sığır brucellosisinin serolojik tanısında MAT'nin rolünü saptamak ve tanıda kullanılan diğer serolojik testlerle (RBPT,TAT) karşılaştırılmasını yaparak duyarlılık derecesini belirlemek amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Serumlar:

*Test serumları:* Çalışmada; Kars merkez ve çevre köylerden aşısız ve brucellosis'ten şüpheli sığırlardan alınan toplam 280 adet kan serumu kullanılmıştır.

*Standart serumlar:* KAÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 'ndan sağlanan, titresini TAT ile 1/640 olarak belirlenen serumdan pozitif kontrol; negatif kontrol serum için ise sağlıklı bir hayvandan elde edilen ve serolojik testlerle de (RBPT, TAT) reaksiyon vermeyen serum kullanılmıştır.

### Antijenler:

*Rose Bengal Plate Test Antijeni:* RBPT'de Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen B. abortus S 99 suşundan hazırlanan boyalı antijen kullanılmıştır.

*Brucella Abortus Tüp Aglutinasyon Antijeni:* TAT'de Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü tarafından B. abortus S 99 suşundan hazırlanan standart B. abortus aglutinasyon antijeni kullanılmıştır.

*Mikroaglutinasyon Test Antijeni:* MAT'de kullanılan antijen, Brown ve ark (7)'nin bildirdikleri yöntemle göre B. abortus S 99 suşundan Safranin-0 ile boyanarak hazırlanmıştır.

*Rose Bengal Plate Test (RBPT):* Bu testte kan serumlarından birer damla (0.03 ml) temiz, yağsız, çizgisiz lam üzerine konulmuş, bir damla da (0.03 ml) RBPT antijeni konarak cam bagetle iyice karıştırılmış ve 4-5 dakika içinde aglutinasyon verenler pozitif ve vermeyenler negatif kabul edilmiştir.

*Tüp Aglutinasyon Testi (TAT):* Bu test Brown ve ark (7)'nin bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Bu test için, serumun bir seri tüpte iki katlı sulandırılması yapılarak üzerine Brucella abortus tüp aglutinasyon antijeninden eşit miktarda konulmuş ve 37 °C'lik su banyosunda 48 saat inkübasyondan sonra tüplerin dibinde dantela şeklinde bir çöküntü reaksiyonun pozitif olduğunu göstermiştir. Dantelanın görüldüğü son tüpteki sulandırma, serum titresini olarak kabul edilmiştir.

*Mikroaglutinasyon Testi (MAT):* Bu test, Brown ve ark (7)'nin insanlarda

Brucella antikorlarını saptamak amacıyla kullanıldığı yöntemin sığırlara adapte şekliyle uygulanmıştır. Testte 96 çukurlu (U) tabanlı, polystyrene mikropate'ler kullanılmıştır.

Başlangıçta tüplerde serumun 1:10'luk dilüsyonları (0.1 ml serum + 0.9 ml dilüent) yapılmıştır. Stok antijen süspansiyonu % 0.5 Formalin ve % 0.005 Safranin içeren (% 0.5'lik stok solüsyondan) % 0.85'lik FTS'da 1:10 dilüsyonlu 50 µl serum, geriye kalan diğer gözlemlere de % 0.85'lik FTS'dan 25 µl konulmuştur. Serum otomatik pipetle seri şekilde dilüe edilmiş ve tüm gözlemlere 25 µl antijen ilave edilmiştir. Böylece serumun dilüsyonu 1:20 ile 1:40.960 arasında düzenlenmiş, pleyt plastik bir koruyucu ile kapatılmış ve 20 saniye shaker'de vertikal olarak karıştırılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu pleytler flore-

sans lamba ışığı altında okuma aynası ile okunmuş ve değerlendirilmiştir. Düğme tarzında çöküntüler negatif ve dantela benzeri çöküntüler pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 1).

### BULGULAR

**RBPT Sonuçları:** Çalışmada incelenen 280 sığır serumundan 167'si (%59.7) pozitif ve 113'ü (%40.3) negatif bulunmuştur (Tablo 1).

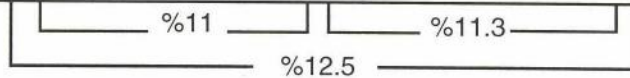
**TAT Sonuçları:** Bu testte incelenen 280 sığır serumundan 184'ü (%65.7) pozitif ve 96'sı (%34.3) negatif bulunmuştur (Tablo 1).

**MAT Sonuçları :** İncelenen 280 serumdan 209'u (%74.6) pozitif ve 71'i (25.3) ise bu testte negatif bulunmuştur (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan serum örneklerinin RBPT, TAT ve MAT sonuçları.  
**Table 1.** RBPT, TAT and MAT results of serum samples.

Serum sayısı	RBPT		TAT		MAT	
	+	-	+	-	+	-
280	167 (59.7)*	113 (40.3)	184 (65.7)	96 (34.3)	209 (74.6)	71 (25.3)

\* yüzde oranı



Çalışmada incelenen serumların TAT ve MAT titrelerine göre dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırlarda görülen Brucella abortus enfeksiyonları sadece klinik yönden değil, insan ve çeşitli hayvan türleri için enfeksiyon kaynağı olduklarından da önem taşımaktadır (1,3,5).

Sığır brucellosis'inin tanısında serolojik testler çok önem taşımaktadır. Bu amaçla en çok Plate Test (PT), Rose Bengal Plate Test (RBPT) ve Seroaglutinasyon Tes-

tinden (SAT) yararlanılmaktadır (1,5).

Brucellosis'in serolojik tanısında çeşitli yöntemler açıkça ortaya konulduktan sonra Tüp Aglutinasyon Testi (TAT) tanı için en geçerli yöntem olmuştur. TAT serum aglutininlerinin tayini ve ölçümü amacıyla tercihan kullanılmışsa da nonspesifik antikorlardan ileri gelen olumsuzluklar, fazla miktarda serum, tüp, pipet ve antijen gerektirdiği için çok sayıda örneğin işlenmesinde de önemli bir dezavantaja sahip olması gibi bazı olumsuzlukları bildirilmiştir (4,7). MAT, De Mello ve De Mello, Elek ve Jizy, Gaultney ve ark. tarafından tanımlanmış, az miktarda serum ve an-

tijenin kullanılması, uygulandığı mikropleytlerde çok sayıda örneğin değerlendirilmesi gibi avantajlara sahip olduğu bildirilmiş, bu teknikle *F. tularensis* antikorları araştırılmış (10-13), daha sonra insanlarda *Brucella* antikorlarının araştırılmasında yararlanılmıştır (6). MAT'de sonuçlarının okunması sırasında oluşabilecek güçlükler antijenin boyanması ile ortadan kaldırılmış, araştırmacılar Safranin-0 ile boyalı antijenle yapılan MAT'de sonuçların daha net değerlendirildiğini bildirmişlerdir (4,7,11).

Safranin-0 ile boyanarak duyarlılığı artırılan antijenin düşük konsantrasyonlarının kullanılması ile erken aglütinilerin bulunmasına neden olmuştur (11). Ayrıca makroteknikle genellikle yüksek antikor seviyeleri saptanmasına karşılık, mikroteknikle genellikle düşük antikor seviyelerini saptamada bir fark olduğu bildirilmektedir (7).

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan serum örneklerinin TAT ve MAT titreleri.

**Table 2.** Tat and MAT titres of serum samples

Titre	TAT	MAT
Negatif	96*	71
1/20	12	15
1/40	33	36
1/80	36	39
1/160	51	55
1/320	32	34
1/640	12	15
1/1280	8	10
1/2560	-	3
1/5120	-	2
Toplam	184**	209

\* : Serum sayısı

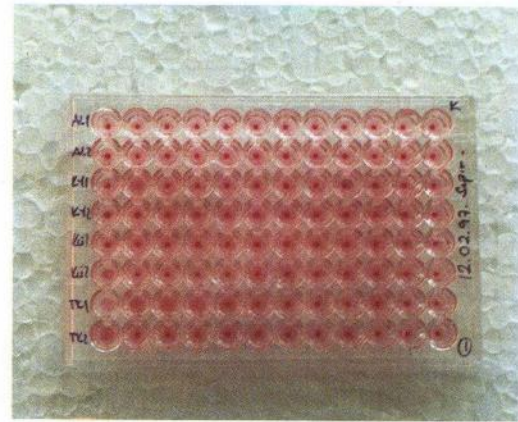
\*\* : Toplam pozitif serum sayısı

Bu çalışmada, brucellosis'in serolojik tanısında yararlanılan TAT ile MAT'de elde edilen titre düzeyleri karşılaştırılmış ve MAT'nin TAT'e göre duyarlılığı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan serum örnekleri brucellosis olduğu bilinen birimlerden aşısız, infekte sürülerden alınmıştır. Çalışmada kullanılan 280 adet siğir serumuna uygulanan üç serolojik test sonucu elde edilen pozitiflikler; RBPT'de 167 (%59.7), TAT'de 184 (%65.7), MAT'de 209 (%74.6) olarak bulunmuştur.

Bu üç testin pozitiflikleri saptamada sırasıyla RBPT-TAT %11, RBPT-MAT %12.5, TAT-MAT %11.3 oranında fazlalıklar belirlenmiştir.

Çalışmada siğir brucellosis'inin saptanmasında 1/40 eşiğine göre TAT ile %72, MAT ile %94 serum pozitif sonuç vermiştir. TAT ile 1/2560 ve 1/5120 seviyesinde herhangi bir titre elde edilemezken, MAT ile 3+2 toplam 5 serumda bu titrelerde sonuç alınmıştır.

Çalışma sonucunda, pozitiflikleri saptamada MAT'nin daha duyarlı olduğu, antikor titrelerinin belirlenmesi için daha az zaman, kısa inkübasyon ve daha az antijen kullanımı gerektirdiğinden TAT'e tercih edilebilir sonucuna varılmıştır.



**Resim 1.** MAT'de pozitif ve negatif sonuçlar  
**Figure 1.** Positive and negative results of MAT

### KAYNAKLAR

1. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N.: Özel Mikrobiyoloji, bakteriyel infeksiyöz hastalıklar, AÜ Vet. Fak. Yay, No, 386, AÜ Basımevi, Ankara, 1992.
2. B.Güllüce, M., Leloğlu, N.: Kars ve çevresinde, sığır serumlarında brucella antikorlarının araştırılması için ELISA ve diğer metotların karşılaştırılması. Vet. Hek. Dern. Derg. 64(4): 27-33, 1993.
3. İzgür, M., Akay, Ö., Candaş, A., İnan, A., Ayhan, H., Esendal, Ö.: Ankara'da brucellosis'in prevalensi üzerinde bir çalışma. Etlik Vet. Mikrob. Derg. 6(3): 117-126, 1988.
4. Yardımcı, H., Esendal, Ö., Küçükkayan, U.M., Erdemoğlu, A.: Koyun brucellosis'inin serolojik teşhisinde dithiotheitol ve EDTA'nın kullanılması. AÜ Vet. Fak. Derg. 42: 241-245, 1992.
5. İzgür, M., Akay, Ö., Arda, M., Erdeğer, J.: Sığır brucellosis'inin teşhisinde EDTA ve 56 °C'de aglütinasyon testlerinin kullanılması. AÜ Vet. Fak. Derg., 39(1-2): 191-200, 1992.
6. Brown, S.L., Mc Cinnery, F.T., Klein, G.C., Jones, W.L.: Evaluation of a Safranin-0 stained antigen microagglutination test for Francisella tularensis antibodies. J. Clin. Microbiol. 11:146-148, 1980.
7. Brown, S.L., Klein, G.C., McKinney, F.T., Jones, W.L.: Safranin-0 stained antigen microagglutination test for detection of brucella antibodies. J. Clin. Microbiol., 13(2): 398-400, 1981.
8. De Mello, M.T., De Mello, A.M.: Microtechnique for serological diagnosis of brucellosis. Comparison with the agglutination and the surface fixation test. An. Microbiol., 14:108-125, 1966/67.
9. Elek, P., Vızıy, L.: New agglutination methods for the diagnosis for brucellosis using stained antigens. An. Microbiol., 14: 127-132, 1966/67.
10. Behan, K.A., Klein, G.C.: Reduction of brucella species and Francisella tularensis Cross-Reacting agglutinins by dithiothreitol. J. Clin. Microbiol., 16(4): 756-757, 1982.
11. Sato, T., Fujita, H., Ohara, Y., Homma, M.: Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. J. Clin. Microbiol., 28(10): 2372-2374, 1990.
12. Gaultney, J.B., Wende, R.D., Williams, R.P.: Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. Appl. Microbiol., 22: 635-640, 1971.
13. Şeyda, T.: Kars bölgesinde koyunlarda tularemia infeksiyonunun insidensi üzerinde serolojik ve kültürel çalışmalar. KAÜ Vet. Fak. Derg., 2(1): 49-60, 1996.