

Tularemi Mikroaglutinasyon Testi İçin Tetrazolyum Mavisi ile Boyalı *Francisella tularensis* Antijeninin Geliştirilmesi

Development of a Novel *Francisella tularensis* Antigen Stained with Tetrazolium-blue for Tularemia Microagglutination Test

Bekir ÇELEBİ, Selçuk KILIÇ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tularemi Referans Laboratuvarı, Ankara.
Public Health Institution of Turkey, National Tularemia Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 01.04.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.05.2013

ÖZET

Tulareminin laboratuvar tanısında, *Francisella tularensis*'in kültürden izolasyonu referans yöntem olmakla birlikte, yüksek güvenli ve donanımlı laboratuvar koşulları gerektirmesi ve duyarlılığının düşük olması gibi nedenlerle, tanıda serolojik testler tercih edilmektedir. *F.tularensis*'e karşı oluşan özgül antikorların tespitinde birçok yöntem kullanılabilirle birlikte, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan mikroaglutinasyon testi (MA) halen en yaygın olan serolojik tanı yöntemidir. Bu çalışmada, MA testinde oluşan reaksiyonun daha iyi görünmesi ve sonucun daha kolay değerlendirilebilmesi amacıyla *F.tularensis* tüm hücrelerinin tetrazolium mavisi ile canlı olarak boyanmasına dayanan MA test antijeninin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, %9 koyun kanı eklenmiş sistein kalp agarda üretilen *F.tularensis* NCTC 10857 suşu plak yüzeyinden kazınarak serum fizyolojik (SF) içine toplanmış ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Stok antijen hazırlamak için süspansiyondaki bakteri hücre yoğunluğu spektrofotometre ile $OD_{600}=1.5$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Bakteri hücrelerini boyamak amacıyla son konsantrasyonu %1 olacak şekilde hazırlanan tetrazolyum mavisi (BTC [3,3'-(3,3'-Dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl) bis [2,5-diphenyl-2H-tetrazolium dichloride], T4375 Sigma-Aldrich) süspansiyona eklenmiştir. Boyanın hücreye absorpsiyonunu sağlamak için 37°C'de beş saat inkübasyona bırakılmıştır. Takiben, boyalı canlı bakteri hücre süspansiyonuna formaldehit eklenerek kimyasal olarak inaktive edilmiştir. Tekrarlayan santrifüj işlemleriyle boya ve formalin fazlalığı uzaklaştırılmış ve çökelti üzerine %0.4 formaldehit içeren SF eklenmiştir. Hazırlanan yeni antijenin (BTC-Ag) MA testinde kullanılacak olan optimum konsantrasyonu, titresi bilinen (1/128) standart serum örneği kullanılarak plak titrasyon yöntemiyle belirlenmiştir. BTC-Ag'nin MA testindeki performansı, *F.tularensis* antikor pozitif 100 olgu ile tularemi negatif 100 olguya (bunlardan 50'si bruselloz seropozitif) ait serum örneği ile değerlendirilmiş ve sonuçlar standart yöntem olan saf-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Selçuk Kılıç, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı, Refik Saydam Kampüsü, Adnan Saygun Caddesi No: 55, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 565 5435, E-posta (E-mail): mdskilic2003@yahoo.com

ranin-O ile boyalı MA test antijeniyle karşılaştırılmıştır. Her iki antijen ile MA test sonuçları, tularemi seropozitif ($\geq 1/20$ titrelerde ve ± 1 dilüsyon farklılığı normal olarak kabul edildiğinde) ve seronegatif örneklerde %100 uyumlu olarak bulunmuş; BTC-Ag ile *Brucella* spp. karşı önemli bir çapraz reaksiyon görülmemiştir. BTC-Ag'nin doğruluğu, duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, geliştirdiğimiz BTC ile boyalı MA test antijenin, safranin-O ile boyalı antijenlere göre daha iyi aglütinasyon paterni vermesi ve reaksiyonun daha kolay değerlendirilmesi gibi avantajları olduğu belirlenmiş; tularemi serolojisinde kullanılabilir özellikte olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Tularemi; *Francisella tularensis*; antijen; tetrazolyum mavisi; mikroaglütinasyon.

ABSTRACT

The isolation of *Francisella tularensis* in cultures is the reference method for the laboratory diagnosis of tularemia. However, due to the limitations such as the low sensitivity and need for high safety level and equipped laboratories, serologic methods are frequently used as diagnostic tools. *F.tularensis*-specific antibodies may be demonstrated by several methods, however microagglutination test (MA) remains the most common method with its high sensitivity and specificity. The aim of this study was to develop a novel MA test antigen prepared from whole *F.tularensis* cells and stained with tetrazolium-blue for more clear and easier evaluation. *F.tularensis* NCTC 10857 strain was cultured on the cysteine heart agar supplemented with 9% sheep blood and bacterial cells were harvested by scraping, collected in physiological saline (PS) and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. For preparing stock antigen suspension cell concentration was adjusted to $OD_{600}=1.5$, spectrophotometrically. Tetrazolium-blue solution (BTC [3,3'-(3,3'-Dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl) bis [2,5-diphenyl-2H-tetrazolium dichloride], T4375 Sigma-Aldrich) at the final concentration of 1% was added to cell suspension and incubated at 37°C for 5 hours for absorption. Then, the living cells were chemically inactivated by formaldehyde. Repeating centrifugations were performed to discard excess dye and formaline, then 0.4% formaline saline was added on the sediment. Optimum concentration of this novel antigen (BTC-Ag) for MA test was determined by plate titration method by using standard serum sample with a known MA titer (1/128). The performance of BTC-Ag in MA test was evaluated by using 100 patient sera positive for *F.tularensis* antibodies, and 100 tularemia negative patient sera (of them 50 were seropositive for brucellosis). All of the results were compared with standard MA test in which safranin-O stained antigen (SO-Ag) was used. There was 100% agreement between the two tests performed with BTC-Ag and SO-Ag in tularemia seropositive (in $\geq 1/20$ titers and when ± 1 dilution variation was accepted as normal) and seronegative sera. No significant cross reactivity with *Brucella* spp. was observed. Accuracy, sensitivity and specificity of BTC-Ag were found to be 100%. In conclusion, newly developed BTC-Ag for MA test provides better agglutination patterns resulting in a clear supernatant in wells, thus provides easy evaluation for the agglutination reaction, and is expected to facilitate tularemia serodiagnosis.

Key words: Tularemia; *Francisella tularensis*; antigen; tetrazolium blue; microagglutination.

GİRİŞ

Francisella tularensis'in etken olduğu tularemi, dünya çapında dağılım gösteren ve farklı klinik belirtilerle seyreden zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır¹. Tulareminin kesin tanısı, altın standart yöntem olan kültürden etkenin izole edilmesiyle konulmaktadır. Ancak, bakterinin üreme için sülfidril bileşikler içeren zengin besiyerlerine gereksinim duyması ve kültür işlemlerinin yüksek güvenli laboratuvar gerektirmesi nedeniyle tularemi tanısı genellikle serolojik yöntemlerle konulmaktadır¹⁻³. *F.tularensis*'e karşı gelişen anti-

korlar aglutinasyon ve ELISA yöntemiyle saptanabilir³⁻⁶. Uzun yıllar etkene karşı gelişen antikorları saptamak amacıyla tüp aglutinasyon (TA) testi kullanılmıştır^{1,4,5}. 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 başlanmıştır⁷⁻¹¹. Günümüzde MA test antijenin ticari olarak üretilmemesi nedeniyle "in-house" olarak hazırlanmaktadır ve belirli bir standardizasyonu bulunmamaktadır^{10,11}. Antijen-antikor kompleksinin daha kolay görülmesi için *F.tularensis* tüm hücre antijeni; bakterinin kimyasal inaktivasyonu takiben metilen mavisi, kristal moru veya safranin-O ile boyanmaktadır^{1,9-11}. Ancak tüm hücre yapısının boyaları yeterli oranda absorbe etmemesi nedeniyle mikropatlarda aglutinasyonun değerlendirilmesinde sıkıntılar yaşanmaktadır^{8,10}.

Bu çalışmada, MA testinde oluşan reaksiyonun daha iyi görünmesi ve sonucun daha kolay değerlendirilebilmesi amacıyla *F.tularensis* tüm hücrelerinin canlı olarak boyanmasına dayanan mikroaglutinasyon test antijeninin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

F.tularensis Tüm Hücre Antijeninin Hazırlanması ve Boyanması

F.tularensis NCTC 10857 suşu, %9 koyun kanı eklenmiş sistein kalp agara (CHAB) inoküle edildikten sonra %5 CO₂'li ortamda 35°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Üremeyi takiben hücre kazıyıcı ile besiyeri yüzeyindeki bakteriler steril serum fizyolojik (SF) içine toplandı. Bakteri süspansiyonuna iki kez SF ile santrifügasyon ve yıkama işlemi uygulanarak stok antijen süspansiyonu elde edildi.

Canlı bakteri süspansiyonundaki hücre konsantrasyonu OD₆₀₀=1.5 olacak şekilde ayarlandı ve üzerine %5 tetrazolyum mavisi (BTC [3,3'-(3,3'-Dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl) bis [2,5-diphenyl-2H-tetrazolium dichloride], T4375 Sigma-Aldrich) stok boyasından son kontrastrasyonu %1 olacak şekilde eklendi. Boyanın bakteri hücrelerine absorbe olması için 37°C'de beş saat inkübe edildi. İnaktivasyon için boyalı bakteri süspansiyonuna son konsantrasyonu %0.4 olacak şekilde formaldehit eklenerek 4°C'de bir gece bekletildi. Formalinli bakteri süspansiyonu iki kez santrifügasyon ve yıkama işlemine tabi tutuldu. Sterilite kontrolü için bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak CHAB besiyerine yayıldı ve 7-10 gün süreyle inkübe edildi.

Optimum Antijen Konsantrasyonunun Belirlenmesi

MA testinde kullanılacak antijenin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, titresi bilinen standart serum (1/128 titrede pozitif) ile plak titrasyon yöntemi uygulandı. Bu amaçla iki adet U-tabanlı mikropatlarda 50 µl PBS (pH= 7.2) ile serum örneğinin 1/8-1/1024 arasında iki katlı seri dilüsyonları hazırlandı. Son çukurlara antijen kontrolü için serum örneği yerine PBS konuldu. Serum dilüsyonlarının üzerine eşit hacimde 1/4-1/34 dilüsyonlardaki BTC boyalı antijen eklendi; böylece serum örneğinin son dilüsyonları 1/16-1/2048 olarak elde edildi. Nemli ortamda 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben aglutinasyon değerlendirildi^{7,10}.

Hasta Serumı Örnekleri

BTC ile boyalı antijenin performansının değerlendirilmesi amacıyla, *F.tularensis* antikor pozitif 100 hasta serumu örneği ($\geq 1/80$ titre), bruselloz pozitif 50 hasta serumu örneği ve başka nedenlerle kurumumuza başvuran 50 olgudan alınmış toplam 200 serum örneği çalışmaya dahil edildi. Tularemi pozitif örnekler aynı zamanda çapraz reaksiyonları değerlendirmek için brusella aglütininleri yönünden incelendi¹². BTC ile boyalı antijenin etkinliği (duyarlılık ve özgüllük), referans yöntem olarak safranin-O ile boyalı antijenlerle yapılan MA testi ile karşılaştırıldı^{1,9,10}.

MA Testi ve Yeni Geliştirilen Antijen ile MA Testinin Validasyonu

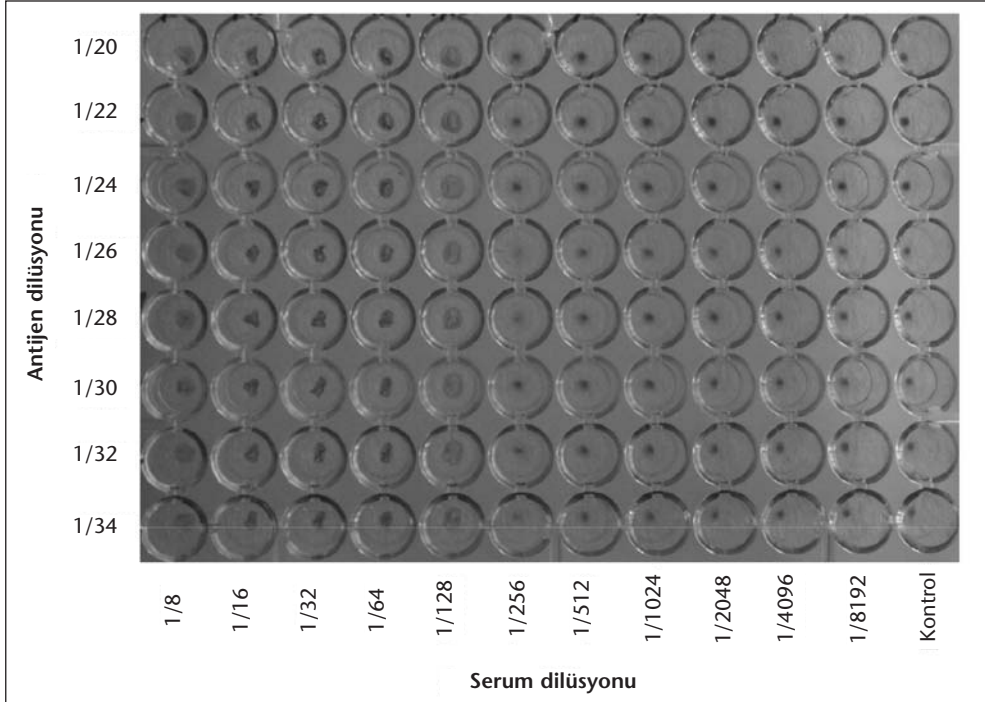
U-tabanlı mikrop plaklarda serum örneklerinin iki katlı seri dilüsyonları (1/10-1/5120) hazırlandı. Serum içermeyen son çukurlar antijen kontrol için kullanıldı. Üzerine eşit miktarda boyalı antijenler eklendi ve böylece 1/10 ve 1/20480 serum dilüsyonları elde edildi. Mikroplağın üzeri kapatılarak 37°C'de nemli ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Aglütinasyon reaksiyonu çıplak gözle ve okuma aynasında değerlendirildi. Antijen-antikor kompleksinin çukurlarda "dantela veya şemsiye" tarzında çökmesi ve süpernatanın tümüyle berrak olması pozitif; çukurun merkezinde toplanmış boyalı dilüentin çevrelediği düzgün kenarlı düğme tarzında çökelti varlığı negatif olarak değerlendirildi^{7,10}.

BTC antijeniyle tularemi MA testinin validasyonu için doğruluk, duyarlılık, özgüllük, kesinlik (çalışma içi ve çalışmalar arası) ve doğrusallık çalışmaları yapıldı¹³. MA testinin doğruluk çalışması için üç gün üst üste üç adet yüksek pozitif, üç adet düşük pozitif ve üç adet negatif serum olmak üzere toplam dokuz adet serum örneği kullanıldı. Test sonuçları "Doğruluk= Uyumlu sonuç/Toplam test sayısı x 100" formülüne göre hesaplandı. Duyarlılığın belirlenmesi amacıyla pozitif ve düşük pozitif 20 serum örneği ile test çalışıldı. Özgüllüğün saptanması için negatif 20 serum örneği test edildi.

MA testinin üretilebilirliği ve tekrarlanabilirliği (kesinliği) değerlendirmek için yüksek titrede pozitif ($\geq 1/2560$), orta titrede pozitif (1/320-1/1280) ve düşük titrede pozitif (1/80-1/160) olmak üzere dokuz kontrol örneği kullanıldı. Örnekler günde üç kez (çalışma içi kesinlik) ve üç kez üç farklı günde çalışılarak (çalışmalar arası kesinlik) aynı titrelerin elde edilip edilmediği araştırıldı. Kesinlik, elde edilen test sonuçlarının uyumluluğu olarak değerlendirildi. Yeni antijen ile MA testinin doğrusallığını saptamak için iki pozitif serum örneği dört dilüsyonda olacak şekilde iki ayrı günde çalışıldı¹³.

BULGULAR

Çalışmamızda, optimum antijen konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan plak titrasyon işleminde, hem pozitiflik hem de antijen kontrol çukurundaki negatif reaksiyona göre değerlendirme yapılmıştır. Bu amaçla 1/128 titrede pozitiflik saptandığı ve antijen kontrol çukurunda dipte düğme şeklinde-düzgün-keskin kenarlı çökmenin olduğu 1/30 dilüsyonu optimum çalışma konsantrasyonu olarak saptanmıştır (Şekil 1). Bu antijen dilüsyonunda standart serumun antikor titresi 1/128 olarak saptanırken, negatif reaksiyon çok net olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. 1/128 titrede pozitif serum örneğinin mikropalak titrasyonu. Serum yerine PBS içeren kontrol sütununda 1/30 titredeki antijen dilüsyonunda düğme benzeri çökeltme (negatif görünüm).

Tularemi pozitif 100 ve negatif 100 serum örneğinde BTC ile boyanmış yeni antijen (BTC-Ag), referans yöntem olan safranin-O ile boyalı antijen (SO-Ag) ile karşılaştırıldığında; testin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur (Tablo I). Tularemi pozitif 100 serum örneğinde BTC-Ag; SO-Ag ile yapılan testlerdeki sonuçlar ± 1 dilüsyon farklılığı normal olarak kabul edildiğinde ($\geq 1/20$ titrelerde) %100 uyumlu olarak bulunmuştur. Her iki boyalı antijen ile 97 örnekte aynı serum dilüsyonunda ve üç örnekte ise (MA titresi $\geq 1/2560$) BTC-Ag ile bir üst dilüsyonda pozitiflik saptanmıştır.

MA testinin özgüllüğünü değerlendirmek için brusellozlu olgulardan ve başka nedenlerle kurumuza başvuran bireylerden alınan toplam 100 serum örneğinin analizinde sa-

Tablo I. BTC-Ag ve SO-Ag ile Yapılan MAT Sonuçlarının Karşılaştırılması

MA BTC antijeni	MA Safranin-O antijeni		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	103	0	103
Negatif	0	97	97
Toplam	103	97	200

MAT: Mikroaglutinasyon testi; BTC-Ag: Tetrazolyum mavisi ile boyalı antijen; SO-Ag: Safranin-O ile boyalı antijen (referans yöntem).

Tablo II. Tularemi ve Bruselloz Pozitif Serum Örneklerinde BTC-Ag ile Elde Edilen MAT Antikor Titreleri

Enfeksiyon	Sayı	MAT titresi		Çapraz reaksiyon titresi (Resiprokal)						
		<i>F.tularensis</i>	<i>Brucella</i>	<i>F.tularensis</i>				<i>Brucella</i>		
				1/20	1/40	1/80	1/160	1/10	1/20	1/40
Tularemi	2	1/10.240							1	1
	9	1/5120						1	1	
	16	1/2560						1	1	
	25	1/1280						1	1	
	17	1/640						1	1	
	15	1/320						1	1	
	11	1/160						1		
	5	1/80								
Bruselloz	6		1/10.240							
	9		1/5120							
	15		1/2560		1					
	11		1/640		1					
	9		1/320	1						

BTC-Ag: Tetrazolyum mavisi ile boyalı antijen; MAT: Mikroaglutinasyon testi.

BTC-Ag: Tetrazolyum mavisi ile boyalı antijen; MAT: Mikroaglutinasyon testi.

dece bruselloz pozitif üç örnekte çok düşük titrelerde aglütininler (çapraz reaksiyon) saptanmıştır (Tablo II). Tularemi pozitif (MAT $\geq 1/80$) 100 örneğin 13 (%13)'ünde *B.abortus* antijeniyle 1/10-1/40 titrelerde çapraz reaksiyon gözlenirken, bruselloz pozitif (MAT $\geq 1/160$) 50 örneğin 3 (%6)'ünde her iki *F.tularensis* antijeni ile çapraz reaksiyon saptanmıştır (Tablo II). Bu sonuçlara göre tek başına BTC-Ag ile MA testinin özgüllüğü ele alındığında %97 olarak değerlendirilmiştir. Tularemi pozitif serum örneklerindeki *B.abortus* antijeni ile reaksiyonların ihmal edilebilir düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Validasyon çalışmalarında BTC-Ag ile MA testinin doğruluğu, duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Üretilirlik ve tekrarlanabilirlik çalışmasında gün içi ve günler arasındaki testlerdeki ± 1 dilüsyon farklılığı normal olarak kabul edildiğinde; MA test sonuçlarının %100 tekrarlanabilir olduğu tespit edilmiştir. Hiçbir serum örneğinde > 1 dilüsyon titre farklılığı gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

F.tularensis'in lipopolisakkaritlerine karşı gelişen antikorlar (IgM, IgG ve IgA) hemen hemen eş zamanlı olarak semptomların başlangıcından sonraki 6-10 gün içerisinde belirlemekte ve genellikle semptomların başlangıcından 1-3 hafta sonra saptanabilir düzeylere ulaşmaktadır¹⁴⁻¹⁷. *F.tularensis* antikorları sıklıkla tüm hücre antijeninin kullanıldığı aglutinasyon testleriyle saptanmaktadır^{1,16,17}. 1971 yılında Gaultney ve arkadaşları⁷ tarafından akut ateşli bakteriyel hastalıkların (tifo, bruselloz, tularemi vb.) serolojik tanısında kullanılmak üzere TA testinin mikropalaklardaki modifikasyonu tanımlanmıştır. Boyalı antijenlerin kullanıldığı MA testinin, TA testine göre duyarlılığının daha yüksek olması, da-

ha az antijen harcanması, oda ısısında inkübe edilmesi, daha kısa sürede (18-24 saat) ve kolay değerlendirilebilmesi gibi avantajları vardır⁷⁻¹¹.

MA testinde aglutinasyonun değerlendirilmesini kolaylaştırmak amacıyla bakteri hücresinin boyanması gereklidir. Bu amaçla, sıklıkla azin grubu boyalardan olan safranin-O tercih edilmektedir. Ayrıca, triamino trifenil metan boyaları olan metilen mavisi ve kristal moru da kullanılmaktadır¹¹. Ancak boyama işlemi, bakteri hücresinin inaktivasyonunu (ısı ve/veya kimyasal) takiben yapılmaktadır. Bu uygulama nedeniyle bakterinin yeterli boyayı alamaması MA testinde değerlendirme sorunlarına neden olabilmektedir. MA testinin mikropalak çukurlarında ve küçük hacimlerde (50 µl) uygulanması nedeniyle, antijen-antikor kompleksine bağlı çökelti tam oluşamamakta ve üstteki sıvı berraklaşmamaktadır^{1,9}. *F.tularensis* hücrelerinin indirgenme özelliğine sahip başka bir boya ile canlı olarak boyanması ile MA testindeki bu olumsuzluklar önlenabilir. *Brucella* süt testi antijeninin boyanması amacıyla 1950'li yıllarda hematoksilin dışında tetrazolyum türevlerinin kullanılması gündeme gelmiştir^{18,19}. Bu çalışmada; indirgendiğinde renkli diformazan oluşturan renksiz bir tetrazolyum bileşiği olan BTC, *F.tularensis* antijenini boyamak için kullanılmış ve inaktive olarak kullanılan *Brucella* antijeninin aksine, tularemi MA test antijeninin boyanma özelliğini artırmak amacıyla canlı hücre boyama yöntemi tercih edilmiştir. BTC ve safranin-O ile boyalı antijenlerle yapılan MA testlerinde %100 uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ek olarak; üç örnekte BTC ile elde edilen titrelerin safranin-O antijenine göre bir titre daha yüksek olması canlı boyama işleminin daha etkili olduğunu göstermektedir.

MA testinin duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği antijen konsantrasyonuna bağlı olup, uygulama için antijenin optimum konsantrasyonun belirlenmesi ve referans bir antijen ve/veya yöntemle karşılaştırılarak validasyon çalışmalarının yapılması gereklidir. Bu amaçla, yeni geliştirilen BTC MA test antijeni (BTC-Ag), referans yöntem olarak safranin-O ile boyalı MA antijeni (SO-Ag) ile karşılaştırılmıştır^{1,9,10}. SO-Ag ile karşılaştırıldığında BTC-Ag'nin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır (Tablo I). Ancak, antijenlerin etkinlikleri ayrı ayrı incelendiğinde, tularemi negatif 100 serum örneğinin üçünde (bruselloz MAT $\geq 1/160$ titre) BTC-Ag ve SO-Ag özgüllüklerinin düşük (%97) olduğu görülmektedir (Tablo II). *Brucella* spp. ile *F.tularensis* arasında ortak antijenik yapılar nedeniyle serolojik testlerde çapraz reaksiyonların varlığı tularemi hastalığının ilk tanımlandığı yıllarda dikkat çekmiştir^{4,5}. S-tipi koloni oluşturan *Brucella* türlerinin lipopolisakkaritlere bağlı O-polisakkarit zincirindeki 4-amino, 4-6 dideoksimannoz (N-acil-D-perozamin) bölgesinin *F.tularensis*'in yüzey antijenleriyle benzer olması bu çapraz reaksiyonlardan sorumludur²⁰. Bu antijenik benzerlik aglutinasyon, ELISA ve hızlı kromatografik testlerde özgüllüğü etkileyen önemli bir faktördür^{1,3-5}. Her iki antijenle de aynı sonuçların alınması canlı boyama yönteminin antijen kalitesinde bir azalmaya neden olmadığını göstermektedir.

BTC-Ag'nin validasyonu için referans örnekler ile doğruluk, duyarlılık, özgüllük, üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik (kesinlik ve doğrusalılık) parametreleri araştırılmıştır. Validasyon çalışmalarında BTC-Ag'nin doğruluğu, duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak bulun-

muştur. Üretilbilirlik ve tekrarlanabilirlik çalışması, MA testinin gün içinde ve farklı günlerde yapılan uygulamalarda aynı sonuçları verdiğini göstermiştir. Tekrarlanabilirlik için ayrı günler ve gün içi uygulamalardaki bazı serum örneklerinde ± 1 dilüsyon farklılığı saptanmış olup, bu farklılıklar teknik uygulamaya ve kısmen de serum örneğine bağlı olarak değerlendirilmiştir (Tablo II). MA testinin kolay uygulanabilmesi, çok sayıda örneğin oldukça kısa sürede çalışılabilmesi, ekonomik olması ve kolay değerlendirilmesi gibi avantajları söz konusudur. Canlı bakterilerin BTC ile boyanmasına dayanan yeni MA test antijeninin duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bazı serum örneklerinde safranin-O ile boyalı antijene göre kısmen daha yüksek titreler elde edilmesi ve pozitif reaksiyonun daha kolay ayırt edilebilmesi BTC antijeninin en önemli avantajı olarak tanımlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. WHO guidelines on tularemia. 2007, Geneva, Switzerland. Available at: <http://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf>
2. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1105: 1-29.
3. Kilic S, Celebi 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.
4. Francis E, Evans AC. Agglutination, cross-agglutination, and agglutinin absorption in tularaemia. *Public Health Rep* 1926; 41(26): 1273-95.
5. Ransmeier JC, Ewing CL. The agglutination reaction in tularemia. *J Infect Dis* 1941; 69: 193-205.
6. 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): 715-20.
7. Gaultney JB, Wende RD, Williams RP. Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. *Appl Microbiol* 1971; 22(4): 635-40.
8. Massey ED, Mangiafico JA. Microagglutination test for detecting and measuring serum agglutinins of *Francisella tularensis*. *Appl Microbiol* 1974; 27(1): 25-7.
9. Brown SL, McKinney FT, Klein GC, Jones WL. Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for *Francisella tularensis* antibodies. *J Clin Microbiol* 1980; 11(2): 146-8.
10. Sato T, Fujita H, Ohara Y, Homma M. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* 1990; 28(10): 2372-4.
11. Porsch-Ozcürümmez M, Kischel N, Priebe H, Splettstösser W, Finke EJ, Grunow R. 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): 1008-15.
12. Marrodan T, Nenova-Poliakova R, Rubio M, et al. Evaluation of three methods to measure anti-Brucella IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol* 2001; 50(8): 663-6.
13. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A, Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Sharp SE (ed), 2009. ASM Press, Washington, DC.
14. Koskela P, Salminen A. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. *J Clin Microbiol* 1985; 22(6): 973-9.
15. Kirimanjeswara GS, Olmos S, Bakshi CS, Metzger DW. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunol Rev* 2008; 225(1): 244-55.

16. 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): 433-7.
17. Bevanger L, Maeland JA, Kvan AI. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1(2): 238-40.
18. Genest P, Lahaye L, Filion R. On the use of a tetrazolium blue antigen and centrifugation in the *Brucella abortus* ring test. Can J Comp Med Vet Sci 1956; 20(3): 86-93.
19. Sykes JA. Color development in tetrazolium-stained *Brucella abortus* antigens. Am J Hyg 1956; 63(3): 288-93.
20. Stanfield CA, Taylor PW, Morgan HR. Some important antigenic relationships in the serological diagnosis of brucellosis. Am J Clin Pathol 1952; 22(3): 211-7.