

SALMONELLOZİS'Lİ HASTALARDA LAM VE TÜP AGLÜTİNASYON (WİDAL) TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Bülent BAYSAL, Dr. Mahmut BAYKAN, Dr. İ. Halil ÖZEROL, Dr. İnci TUNCER

S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Çalışmamızın amacı, *Salmonella* (*typhi* ve *paratyphi*) infeksiyonlarının serolojik hızlı teşhisinde lam aglütinasyon ve tüp-dilüsyon aglütinasyon testlerinin karşılaştırmalı incelenmesi idi. Lam aglütinasyon testi ve tüp-dilüsyon aglütinasyon testi sonuçlarının istatistikî karşılaştırması anlamsızdı. Bu yüzden *Salmonella* (*typhi* ve *paratyphi*) infeksiyonlarının hızlı serolojik tanısında Widal testi yerine basit bir lam aglütinasyon testinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Salmonellozis, lam testi, Widal testi.*

SUMMARY

The Comparison of Slide Agglutination and Tube-dilution Agglutination (WIDAL) Tests in the Patients with Salmonellosis

The purpose of our study was to compare the use of slide agglutination and tube-dilution agglutination test (Widal test) in the diagnosis of *Salmonella* (*typhi* and *paratyphi*) infections. It was found that both techniques gave similar diagnostic results and differences between them were statistically insignificant. We, therefore, concluded from our studies that a simple slide agglutination test might be suitable for testing a large number of blood specimens instead of Widal testing for infection with *Salmonella* (*typhi* and *paratyphi*).

Key Words: *Salmonella infections, slide agglutination test, Widal test (tube-dilution agglutination test).*

GİRİŞ

Salmonella'lar, sindirim yolu ile alındıklarında insan ve hayvanlarda hastalıklara yol açarlar. İnsanlara hastaların veya kontamine kümes hayvanların feçes ya da idrarları ile kirlenen su ve sütlerin içilmesi, kontamine kümes hayvanı et, yumurta veya yumurta ürünlerinin yenmesi ile bulaşır. Direkt kontakt veya inhalasyonla da bulaşabilirler. Genellikle kısa süreli, kendi kendine iyileşebilen bakteriyemi, lokal infeksiyonlar, tifo ve paratifo gibi hastalıklara sebep olurlar (1,2,3,4).

S.typhi ve *S.paratyphi A* ile *S.schottmülleri* primer olarak insanlar için infektiftir (6,7). Bu mikroorganizmaların bulaşmasında kaynak genellikle insandır (4). Bunlara rağmen *salmonella*'ların çoğu (özellikle *S.enteritidis*) hayvanlar için patojendir (6). Bu hayvanlar; kümes hayvanları, domuz, kedi, evcil hayvanlar (kaplumbağadan papağana kadar) insan infeksiyonları için rezervuar görevi yapar.

Salmonella infeksiyonunun 2.nci ve 3.ncü hafta-

larında serum aglütininleri hızla yükselir. 7-10 gün aralıklarla hastadan iki kan örneği alınırsa antikor titrelerindeki artış tesbit edilebilir. Widal testi *S.typhi*'nin "O" ve "H" ve "Vi" antijenleri, *S.paratyphi A* ve B, *S.typhimurium* "O" ve "H" antijenleri kullanılarak yapılır (8). Aşılınmamış hastalarda serolojik tanı kriteri; "O" antikorları titresinde 4 katlık bir artışın veya hastalığın 2. nci veya 3. ncü haftasında yapılan bir tek serolojik deneyde "O" antikorlarının 1/50'den daha yüksek titrelerde bulunduğu saptanmasıdır (9). Bununla birlikte sağlıklı ve aşılınmamış kişilerin %5'inde 1/50 dilüsyonlarda "O" antikorları bulunabilmektedir (9). "O" antikorları titresindeki artış sadece *Salmonella typhi* infeksiyonu değil, D grubundan herhangi bir *Salmonella* türü (*S.enteritidis*, *S.panama* vs.) ile olan infeksiyonları da düşündürür (9). "O" antikorları, "H" antikorlarından daha önce ortaya çıkar ve genellikle yüksek titrelerde dir. Konvalesan dönemde ise "H" antikorları daha yüksek titrelere ulaşır. "O" antikorları titresinde $\geq 1:160$ veya akut dönemle 2-3 hafta sonraki serum titreleri arasından 4 katlık bir titre artışı

aktif infeksiyon, "H" antikorları $\geq 1/10$ ise eski infeksiyon ya da immünizasyon, "Vi" antikorları titresi $> 1/5$ ise taşıyıcılık var denir. Yüksek titredeki "O" ve "H" antikorları A, C veya nontifooid D grubundan bir organizma ile eskiden geçirilmiş bir infeksiyon halinde kros reaksiyon verebilir. Tifo-paratifo ile aşılınmayı izleyen 6 aylık dönemde yüksek titreler oluşabilir. Milyer tüberküloz ve nonspesifik ateşli hastalıklarda (anamnestik reaksiyon) da Widal testi pozitif sonuç verir. Bunun aksine immün yetmezliği olanlarda, antibiyotik tedavisine erken başlanan hastalarda titre artışı olmayabilir (10).

Kültür evrelerini geride bırakmış kırsal kesimden gelen ve Salmonellozis ön tanısı olan hastaların serolojik olarak hızlı tanıları önemlidir. Çalışmamızda Salmonellozis tanılı hastaların aynı serumlarıyla lam ve tüp-dilüsyon (Gruber-Widal testi) testleri çalışılarak sonuçların istatistikî değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji bakteriyoloji laboratuvarına çeşitli polikliniklerden gönderilen Salmonellozis ön tanılı hastalardan i.v. olarak 5'er ml kan alındı. Serumları ayrılarak lam ve tüp aglütinasyon testleri yapıldı. Lam aglütinasyon testinde Cromatest febrile antijen kit'i kullanıldı. Oda ısısına getirilen reagen ve serumlar; 2 damla serum üzerine 1 damla reagen damlatarak ve yavaş dairevi hareketlerle çevrilerek test uygulandı. Bir dk sonra aglütinasyon verip vermediği çıplak gözle ve bir lupla incelendi.

Tüp-dilüsyon aglütinasyon testinde; alınan 6 adet deney tüpünden 1.nciye 1.9 ml, diğerlerine 1.0 ml serum fizyolojik (SF) kondu. Birinci tüpe 0.1 ml hasta serumu eklenip karıştırıldı. Bir ml çekilerek 2.nci tüpe aktarıldı. Bu işleme devam ederek 6.nci

tüpte 1.0 ml kalacak şekilde son 1.0 ml dışarı atıldı. Bu şekilde 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 ve 1/640 dilüsyonlar elde edildi. Her tüpe 1 damla reagen (Cromatest reagen) damlatıldı. Oda ısısında bir saat bekletildi. 35-37°C de 16-18 saat inkübe edildikten sonra makroskopik aglütinasyon araştırıldı.

BULGULAR

Salmonellozis ön tanısı olan 67 hastanın lam aglütinasyon ve Widal testi sonuçları tablo-1'de gösterilmiştir. Tablo'da görüldüğü gibi 1/20 üzerindeki TO, TH, AO, AH, BO, BH pozitifliği lam aglütinasyonunda 19 (%28.35), 22 (%32.83), 7 (%10.44), 4 (%5.97), 21 (%31.34) ve 20 (%29.85) iken Widal testinde 26 (%38.80), 17 (%25.37), 6 (%8.95), 1 (%1.49), 26 (%38.80) ve 14 (%20.89) olarak tesbit edilmiştir.

Lam aglütinasyon ve Widal testlerinin 'oranlar arası önemlilik testi' ile istatistikî analizi yapılmış, 1/20 ve üzerindeki TO, TH, AO, AH, BO ve BH titrilerinin kendi aralarında önemli bir fark göstermedikleri ($p>0.05$) tesbit edilmiştir (Tablo-2).

TARTIŞMA

Salmonellozis'de serolojik çalışmalar teşhise yardımcı olabilmekte ancak çoğu vakada infeksiyonun seyri sırasında aglütinin titrelerinde artış görülmediğinden düşük diagnostik önem arz etmektedir. Özellikle diğer Gram negatif basillerle meydana gelen infeksiyonlarda kros reaksiyon veren antijenlerden dolayı nonspesifik aglütinin yükselmeleri ile karşılaşılacaktır. Antimikrobiyal tedavi aglütinin oluşmasını etkilediğinden, hastalığın erken dönemlerinde antibiyotik tedavisine başlanan hastalarda aglütinin oluşmamakta veya diagnostik seviyelerin altında saptanmaktadır. Tedavisiz hastaların sadece %50'sinde önemli bir aglütinin titre artışı

Tablo 1: Salmonellozis ön tanılı 67 hastada Widal ve Lam aglütinasyon test sonuçları.

Yapılan Test	Tüp - dilüsyon aglütinasyon testi											Lam aglüt.			
	<1/20	1/20	(%)	1/40	(%)	1/80	(%)	1/160	(%)	21/160	(%)	>1/20 top	(%)	>1/20	(%)
S.typhi-O (TO)	41	3	4.47	12	17.91	7	10.44	3	4.47	1	1.49	26	38.80	19	28.35
S.typhi-H (TH)	50	4	5.97	7	10.44	5	7.46	1	1.49	-	0.00	17	25.37	22	32.83
S.paratyphi A-O (AO)	61	2	2.98	4	5.97	-	0.00	-	0.00	-	0.00	6	8.95	7	10.44
S.paratyphi A-II (AH)	66	1	1.49	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	0.00	1	1.49	4	5.97
S.paratyphi B-O (BO)	41	5	7.46	11	16.41	5	7.46	4	5.97	1	1.49	26	38.80	21	31.34
S.paratyphi B-II (BH)	53	3	4.47	4	5.97	3	4.47	4	5.97	-	0.00	14	20.89	20	29.85

Tablo 2: Lam ve Tüp aglütinasyon testlerinde tesbit edilen $\geq 1/20$ titre değerlerinin istatistik sonuçları.

TO	LAM TESTİ		Sonuç	
	(+)	(-)		
T (+)	19	22	41	z=0.63
Ü				
P (-)	18	8	26	p>0.05
Topl.	37	30	67	

TH	LAM TESTİ		Sonuç	
	(+)	(-)		
T (+)	17	22	39	z=1.15
Ü				
P (-)	15	13	28	p>0.05
Topl.	32	35	67	

AO	LAM TESTİ		Sonuç	
	(+)	(-)		
T (+)	6	7	13	z=0.82
Ü				
P (-)	5	49	54	p>0.05
Topl.	11	56	67	

BO	LAM TESTİ		Sonuç	
	(+)	(-)		
T (+)	21	26	47	z=1.20
Ü				
P (-)	18	2	20	p>0.05
Topl.	39	28	67	

BH	LAM TESTİ		Sonuç	
	(+)	(-)		
T (+)	14	20	34	z=0.32
Ü				
P (-)	18	15	33	p>0.05
Topl.	32	35	67	

AH	LAM TESTİ		Sonuç	
	(+)	(-)		
T (+)	1	4	5	z=0.63
Ü				
P (-)	3	59	62	p>0.05
Topl.	4	63	67	

gözlenmekte, tedavi görenlerin %60'ında antikor oluşması azalmaktadır. Serolojik metodlarla teşhisi etkileyen bir diğer konu aşılama değildir. Aşılı kişilerde anti-O aglütinini yükselir (3,11). Ayrıca ateşli hastalıkların seyri sırasında nonspesifik titre artışları olabilmektedir (3). Widal testinin en büyük dezavantajları nonspesifliği ve S.typhi dışında diğer anti-jenlere maruz kaldıktan sonra da pozitif reaksiyon vermeye yatkın oluşudur. İzole edilen salmonella serotiplerinden ≤ 2 'sinin S.typhi olduğu ve ≥ 98 gibi çoğunluğu kros reaksiyon veren salmonellaların oluşturması, S.paratyphi A antikorlarının %30 vakadan daha azında tesbit edilmesi testin diagnostik değeri olup olmadığı konusunda tereddütler yaratır (12). Literatürde Widal reaksiyonunun diagnostik kriterlerinin yorumunda gerçek bir fikir birliği yoktur. Bazı yazarlar (13) "O" antikor titrelerinin, "H" antikor titrelerinden daha spesifik bir parametre olduğunu bildirirken diğerleri immünizasyon ya da nontyphoid salmonella gastroenteritinden sonra görülen şüpheli titre yükselmelerine dikkati

çekmektedirler (14). "H" antikor titrelerinde kaydedilen titre artışlarının daha yararlı olduğunu söyleyen yazarlar da vardır. Bunu destekleyen deliller; "H" antikorlarının "O" antikorlarından erken ve daha sık görüldüğü belirtilmektedir. Bu görüşe karşı çıkanlar "H" titrelerinin nonspesifik olduğunu, aşılama sonra da persistan olarak yüksek kaldığını ve romatoid artrit, romatizmal ateş, ülseratif kolit, multipl myeloma, sistemik lupus eritematosus ve akut glomerulonefrit gibi immünolojik komponenti olan hastalıklarda yanlış pozitifliklerin sık olduğunu belirtmekte ve bu yüzden güvenilemeyeceğini yazmaktadırlar (13).

Widal testi Salmonella typhi'nin "O", "H" ve "Vi", S.paratyphi A,B ve S.typhimurium'un "O" ve "H" antijenlerine karşı yükselen antikorları tesbit eder. Genellikle "O" antijenlerine karşı gelişen anti-O aglütinini titreleri "H" antijenlerine karşı gelişen anti-O aglütinini titreleri, "H" antijenlerine karşı gelişen anti-H aglütinini titrelerinden daha önemlidir. Anti-O aglütinini titreleri hastalığın ilk haftası içinde ortaya çıkar,

giderek artarak 3.ncü haftada pik yapar (4,8). Hastalığın akut fazı ve konvalesan fazlarında serumda tesbit edilen minimal anti-O titreleri önemsizdir. Titre artışında 4 katlık bir yükselme anlamlı kabul edilmekte (4) ancak test sonucunu etkileyecek birçok faktör (hastalığın devresi, evvelce aşılama, antibiyotik kullanılmış olması, kros reaksiyon veren antikorların bulunması ve bazı ateşli hastalıklar) olduğu düşünülerek sonuç dikkatli yorum gerektirmektedir (8). Widal testinin genellikle eksik ya da hatalı uygulanması, ticari antijen kitlerinin standardizasyon eksikliği ve laboratuvarlar arası teknik çeşitlilikler de testin diagnostik değerinin azalmasına katkıda bulunur (15).

Zuerlein ve Smith'(16) in yaptıkları bir araştırmada kültürü pozitif hastalara Widal testi uygulanmış Salmonella enteritidis C2 enterokolitis teşhisi konan hastalarda PA <1/20 ve PB <1/20 titreleri ve S.enteritidis B enterokoliti teşhisi konan bir grupta TO=1/40 ve TH=1/40 bulunurken diğer grupta PA<1/20, PB=1/40, TO=1/160 ve TH=1/40 olarak tesbit edilmiştir. aynı hastaların tedavi sırasında ve konvalesan devrede tesbit edilen provizyonel diagnostik titreler TO %4 (3/84) (titre dağılımları; ≤1/20 %84, 1/40 %8, 1/80 %4 ve 1/160 %4), TH %1 (1/81) (titre dağılımları; ≤1/20 %88, 1/40 %5, 1/80 %5 ve 1/160 %1), PA %1 (1/76) (titre dağılımları; ≤1/20 %97, 1/40 %0.1/80 %1 ve 1/160 %1) ve PB %0 (0/76) (titre dağılımları; ≤1/20 %96, 1/40 %3, 1/80 %1 ve 1/160 %0) olarak tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre tüm titrelerin sadece %5'inde diagnostik seviyeler belirlenmiştir.

Carter ve Schoen (17), febril aglütinin panelleri uyguladıkları bir seride incelenen TO, TH, AO, AH,

BO ve BH antikorlarının muhtemel diagnostik titrelerde olmayan (≤1/80) hastaların %61 ve diagnostik seviyelerindeki (≤1/80) hastaların %6 olduğu tesbit edilmiştir.

Chart ve ark. (18,19) nın yaptıkları bir araştırmada civciv serumlarında S.enteritidis antikorlarının tesbiti amacıyla S.pullorum antijen suspanسیونunun kullanıldığı bir rapid slide aglütinasyon testi kullanılmış, ELISA ve mikroantiglobulin testleri ile karşılaştırılmıştır. Son iki teste göre rapid slide test daha az duyarlı bulunmuş ancak maliyetler karşılaştırılarak rapid slide testinin kullanılması tavsiye edilmiştir.

Salmonellozis ön tanılı hastalarda Widal testi ile tesbit ettiğimiz 1/20 üzerindeki TO, TH, AO, AH, BO, BH pozitiflikleri sırasıyla 26 (%38.80), 17 (%25.37), 6 (%8.95), 1 (%1.49), 26 (%38.80) ve 14 (%20.89) olup diagnostik seviyelerdeki titreler (≥1/160) %4.47 ile %5.97 arasında değişmekteydi. Sonuçlarımız hem Zuerlein ve Smith'(16) in hem de Carter ve Schoen'(17) in bulgularına uymaktadır.

Bugün için en güvenilir salmonellozis teşhis metodu, S.typhi'nin lipopolisakkarit antijenlerine karşı gelişen antikorların ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay) ile tesbit edilmesidir. Ancak pahalı ve rutin kulanıma henüz hazır değildir (18,19).

Sonuç olarak serolojik tiplemenin, salmonella cinsi bakterilerin identifikasyonunu sağlayarak epidemiyolojik araştırmalara imkan sağladığı ancak teşhiste fazla önemli olmadığını ve acil durumlarda tüp-dilüsyon aglütinasyon testi yerine lam aglütinasyon testinin kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Medical microbiology. Appleton & Lange, Lebanon 1989: 210-212.
2. Farmer JJ, Howard BJ, Weisfelt AS. Enterobacteriaceae. In: Howard BJ, Klaus J, Weisfelt AS, Rubin SJ, Tilton RC, eds. Clinical and pathogenic microbiology. St Louis: CV Mosby Company, 1987: 289-328.
3. Hook EW. Salmonella species (including typhoid fever). In: Mandel GI, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone, 1990: 1700-1716.
4. Hornick RB. Nontyphoid salmonellosis. In: Hoepflich PD, Jordan MC, eds. Infectious diseases. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1989: 710-716.
5. Howard BJ, Rees JC. Host-Parasite interactions. Mechanisms of pathogenicity. In: Howard BJ, Klaus J, Weisfelt AS, Rubin SJ, Tilton RC, eds. Clinical and pathogenic microbiology. St Louis: CV Mosby Company, 1987: 9-34.
6. Guerrant RL. Principles of syndromes of enteric infection. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone, 1990: 837-851.
7. Brachman PS. Transmission and principles of control. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone, 1990: 155-158.
8. Vural S, Çetin ET, Tuzlacı U, Tuğ T. Klinik teşhiste laboratuvar. İstanbul: Nurettin Uycan Basım Sanayii A.Ş., 1986: 39.

9. Vural S, Çetin ET- Tuzlacı U, Tuğ T. Klinik teşhiste laboratuvar. İstanbul: Nurettin Uycan Basım Sanayii A.Ş., 1986: 157-158.
10. Washington JA. The clinician and the microbiology laboratory: Bacteria, fungi and parasites. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone, 1990: 160-193.
11. Hornick RB. Typhoid fever. In: Hoeprich PD, Jordan MC, eds. Infectious diseases. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1989: 717-724.
12. Human salmonella isolates-United States 1982. MMWR 1983; 57: 598-600.
13. Senewiratne B, Chir B, Senewiratne K. Reassessment of the Widal test in the diagnosis of typhoid. Gastroenterology 1977; 73:233-236.
14. Schroeder SA. Interpretation of serologic tests for typhoid fever. JAMA 1968; 206: 639-640.
15. Maxwell S. Serological diagnosis of salmonella infections. The Lancet 1989; 334; 456.
16. Zuerlein TJ, Smith PW. The diagnostic utility of the febrile agglutinin tests. JAMA 1985; 254: 1211-1214.
17. Carter PK, Schoen I. Quality control experiences with febrile agglutinins in serum. Am J Clin Pathol 1970; 53: 364-369.
18. Chart H, Rowe B, Baskerville A, Humphrey TJ. Serological tests for Salmonella enteritidis in chickens. Vet Rec 1990: 128;20.
19. Chart H, Rowe B, Baskerville A, Humphrey TJ. Serological tests for Salmonella enteritidis in chickens. Vet Rec 1990: 128; 92.