

BEYİN OMURİLİK SIVISINDAKİ BAKTERİYEL ANTİJENLERİN BELİRLENMESİNDE, LATEKS AGLÜTİNASYON VE KOAGLÜTİNASYON YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

COMPARATIVE EVALUATION OF LATEX AGGLUTINATION AND COAGGLUTINATION FOR DETECTION OF BACTERIAL ANTIGENS IN CEREBROSPINAL FLUID

Ergin AYASLIOĞLU**, Tuncay Hasip SÖZEN*, Şengül ÖZKAN***

Özet: Çalışmamızda, bakteriyel menenjit tanısı almış hastalara ait beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinde, bakteriyel antijenleri belirlemek amacı ile lateks aglütinasyon ve koaglütinasyon yöntemleri uygulanmıştır. Kültür ile etkenin tespit edildiği 20 BOS örneğinin, lateks aglütinasyon ile 18'inde (% 90) pozitif sonuç alınırken, koaglütinasyon ile 12'sinde (% 60) pozitif sonuç alınmıştır. Her iki yöntem arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). İlk BOS örneklerinde kültür ile etkenin tespit edildiği 7 olguda, tedavi başladıktan 32-48 saat sonra alınan BOS örneklerinin ise lateks aglütinasyon ile tümünde pozitif sonuç alınırken koaglütinasyon ile 4'ünde pozitif sonucu alınmıştır.

Summary: The latex agglutination and coagglutination tests were used to demonstrate specific bacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. Latex agglutination was more sensitive than coagglutination. It detected 90% (18/20) of culture positive CSF specimens, whereas coagglutination detected 60% (12/20). Antigens were also detected by latex agglutination in seven of seven additional cerebrospinal fluid specimens after 32-48 hours of antimicrobial therapy, but four of seven by coagglutination.

G İ R İ Ş

Bakteriyel menenjitler en kısa süre içerisinde tanı ve tedavisi zorunlu ciddi enfeksiyonlardır. Bu nedenle etiyolojik teşhisin erken ve doğru yapılmasının önemi büyüktür. Son yıllarda, beyin omurilik sıvısı içindeki bakteriyel

* Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyojoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı.

** Uzm. Dr., Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyojoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı.

*** Uzm. Dr., Sami Ulus Çocuk Hastanesi, Bakteriyojoloji Laboratuvarı.

antijenlerin belirlenmesini esas alan değişik immunolojik yöntemler geliştirilmiş ve bakteriyel menenjitlerin tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler hızlı sonuç vermeleri nedeniyle beyin omurilik sıvısı alınımından kısa bir süre sonra etken mikroorganizmanın belirlenmesini, böylece hem hastaya, hem yakınlarına uygun antibiyotik tedavisinin erken olarak başlatılmasını sağlamaktadırlar (1, 2, 3).

Countercurrent immunelektroforez (CIE), lateks aglütinasyon, koaglütinasyon, ELISA bakteriyel menenjitlerin tanısında kullanılmakta olan immunolojik yöntemlerdir. Lateks aglütinasyon ve koaglütinasyon özel laboratuvar koşulları gerektirmeyen, rutinde uygulanabilir yöntemler olup, CIE ve ELISA'ya göre daha hızlı sonuç vermeleriyle dikkat çekmişlerdir (1, 4, 5).

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya beyin omurilik sıvısı örneklerinde kültür veya gram boyama ile etkenin tespit edildiği 25 bakteriyel menenjit vakası alınmıştır. Bu vakalara ait - 20°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiş beyin omurilik sıvısı örneklerinde, bakteriyel antijenleri belirlemek amacıyla koaglütinasyon ve lateks aglütinasyon yöntemleri uygulanmıştır.

Lateks aglütinasyon testinde Wellcogen; *H. influenzae*-b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* A, C, Y, W 135, *N. meningitidis* B/E. coli K1 kitleri kullanılmıştır (6).

Koaglütinasyon testinde, beyin omurilik sıvısında bakteri kapsül antijenlerini belirlemek üzere hazırlanmış, *H. influenzae*-b, *S. pneumoniae* (83 tip), *N. meningitidis* A, B, C, Y, W 135 ve *S. agalactiae*'nin kapsül antijenlerini belirleyecek dört ayrı miyza bulunan "Phadabact CSF Test" kiti kullanılmıştır (7).

Lateks aglütinasyon testi için kullanılan Wellcogen miyarları bakteriyel antijenlere karşı antikorlarla kaplı polystren lateks partikülleri içerirler. Bu partiküller homolog antijen varlığında kuvvetle aglütine olmaktadır.

Koaglütinasyon testinde ise tavşanlardan elde edilen spesifik antikorlar, stafilkokların yüzeyindeki protein A'ya bağlanmıştır. Süspansiyon halindeki bu stafilkoklar taşıdıkları antikorlara özgül antijen ile karşılaştırıldıklarında aglütine olmaktadır.

B U L G U L A R

Çalışmamızda, 24 olguda koaglütinasyon (Coaglütinasyon; COA) ve lateks aglütinasyon (LA) birlikte, bir olguda ise sadece COA uygulanmıştır. Bu 25 olgunun 22'sinde kültürde bakteri üretilirken, 3'ünde ise sadece gram boyama ile etken tespit edilmiştir.

Tablo 1

Kültürde Etken Tespit Edilen Olgularda LA ve COA Sonuçları

| Etken | Kültür (+) | LA (+) | COA (+) | COA (+) | COA (+) |
|---------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Olgular | Olanlar | | | |
| Meningokok | 11 | 9 | 82 | 4 | 36 |
| Pnömonokok | 5 | 5 | 100 | 4 | 80 |
| H. influenzae | 4 | 4 | 100 | 4 | 100 |
| Streptokok | 1 | - | - | 1 | 100 |
| Toplam | 21 | 18 | 90 | 13 | 62 |

(Kültürde etken tespit edilen olguların 21'inde ilk BOS örneği alınmıştır).

Kültürde meningokok üreyen 11 olgunun LA ile 9'unda, COA ile 4'ünde pozitiflik saptanmıştır. COA'nın pozitif olduğu 4 bos örneği de, N. meningitidis A, C, Y, W 135 test lateksi ile pozitiflik saptanan BOS örnekleridir. N. meningitidis B/E. coli K1 test lateksi pozitif sonuç alınan 5 BOS örneğinin hiçbirinde COA ile pozitiflik saptanamamıştır.

Kültürde pnömonokok üreyen 5 BOS örneğinin LA ile 5'inde, COA ile 4'ünde pozitiflik saptanmıştır. Bir BOS örneğinde COA ile hem S. pneumonia, hem de H. influenzae-b miyarlarında aglütinasyon görülmüştür.

Kültürde H. influenzae üreyen 4 BOS örneğinin 4'ünde hem COA, hem de LA ile pozitif sonuç alınmıştır.

BOS kültüründe streptokok üreyen 1 bakteriyel menenjit olgusunda COA ile pozitif sonuç alınmıştır. B grubu streptokok test lateksi olmadığı için bu olguda LA uygulanmamıştır.

Sadece Gram boyama ile etken tespit edilen 3 olguda ise LA ile 2'sinde, COA ile 1'inde pozitiflik saptanmıştır.

Kültür ile etken tespit edilen 20 olgunun 18'inde LA ile pozitif sonuç alınırken, 12'sinde COA ile pozitif sonuç alınmıştır. İki yöntem arasındaki farklılık Fisher Exact testine göre değerlendirildiğinde ($p < 0.005$) anlamlı fark olduğu saptanmıştır.

İlk BOS örneklerinde kültürde üreme tespit edilen, LA ve COA ile pozitif sonuç alınmış 6 olguda, tedavi başlangıcından 32-48 saat sonra alınan BOS örnekleri ve kültürde H. influenzae üreyen ilk BOS örneği alınmayan 1 olguda, tedavi başlangıcından 48 saat sonraki BOS örneği alınarak LA ve COA uygulanmıştır. Bu 7 BOS örneğinin 7'sinde LA ile pozitif sonuç alınırken COA ile 4 örnekte pozitif sonuç alınmıştır.

Tablo 2

**Tedavi Başladıktan 32-48 Saat Sonra Alınan BOS Örneklerinde
LA ve COA Sonuçları**

| Etken | BOS Örneği Sayısı | COA (+) Olanlar | LA (+) Olanlar |
|---------------|-------------------|-----------------|----------------|
| Pnömonokok | 3 | 1 | 3 |
| H. influenzae | 4 | 3 | 4 |
| Toplam | 7 | 4 | 7 |

TARTIŞMA

Lateks aglütinasyon ve koaglütinasyon, günümüzde beyin omurilik sıvısı içindeki bakteriyel antijenlerin belirlenmesinde kullanılmakta olan yöntemlerdir. Bu testler kolay uygulanabilir ve hızlı sonuç veren yöntemler olup beyin omurilik sıvısı alınımından kısa bir süre sonra etken mikroorganizmanın belirlenmesini sağlamaktadır. Bakteriyel menenjitli 57 vakalık serimizdeki lateks aglütinasyon ile aldığımız sonuçları daha önce bildirmiştik (8). 24 olguda ise her iki test birlikte uygulanmış ve bu iki yöntemin mukayesesi yapılmıştır.

Drow ve ark. (9), beş ayrı merkezde olmak üzere menenjitlerin tanısında koaglütinasyon yöntemini kullanmış ve sensitivite değerlerini H. influenzae için % 97 (100-80), pnömonokok için % 71 (100-50), meningokok için % 58 (100-0) olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda koaglütinasyon ile sensitivite değerleri H. influenzae için % 100, S. pneumoniae için % 80 ve M. meningitidis için % 36 olarak saptanmıştır. LA'da olduğu gibi COA da beyin omurilik sıvısında H. influenzae antijenini saptamakta yüksek sensitivite göstermiştir. N. meningitidis antijenini belirlemekte ise LA'dan çok daha başarısız bulunmuştur. LA, N. meningitidis B/E. coli K1 ile aglütinasyon veren 5 BOS örneğinde, COA ile pozitiflik saptanamamıştır. Tilton ve ark. (10), N. meningitidis B üreyen BOS örneklerinde lateks aglütinasyon ile % 80, koaglütinasyon ile % 44 oranında pozitiflik saptamışlardır. Onların da kabul ettiği gibi LA ile N. meningitidis B antijeni belirlemekteki daha yüksek sensitivite değerlerinin koaglütinasyon kitlerinde poliklonal antikorlar kullanıldığı halde, Wellcogen N. meningitidis B/E. coli K1 test lateksinde monoklonal antikorların kullanılmasıyla açıklamak mümkündür.

Yapılan çalışmalarda lateks aglütinasyonun, koaglütinasyona göre daha sensitif olduğu değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (10, 11, 12, 13). Bizim sonuçlarımız da bunu desteklemektedir. İlk BOS örneklerinden LA ve COA veya kültür ile etken tespit edilen 7 olguda 36-48 saatlik tedaviyi takiben alınan BOS örneklerinin tümünde LA ile pozitif sonuç alınırken, COA ile 4'ünde pozitif sonuç alınmıştır. 3 BOS örneğinde, LA ile halen antijen saptanırken, COA ile antijen

belirlenememiştir. Welch ve Hensel de (14) antibiyotik tedavisi başlanan 7 olgudan alınan kontrol BOS örneklerinde LA ile tümünde, COA ile 4'ünde pozitiflik saptamışlardır. LA, COA'ya göre daha sensitif olmasına rağmen, kültür ve gram boyamanın negatifleştiği kontrol BOS örneklerinde COA ile de pozitif sonuçlar alınabilmektedir.

Son yıllarda yenidoğanlarda, B grubu streptokokların, yani *S. agalactiae*'nin oluşturduğu menenjitlere sık olarak rastlandığı bildirilmiştir (15). Beyin omurilik sıvısında LA ve COA ile grup B streptokok antijenini de belirlemek mümkündür. Lateks aglütinasyon için sensitivite değerlerini Rabalais ve ark. (16), % 90, Baker ve ark. (17), % 92 olarak bildirmişlerdir. Drow ve ark. (59) ise, COA ile BOS örneklerinin % 75'inde grup B streptokok antijenini belirlemişlerdir. Çalışmamızda COA ile kültürde etkenin tespit edildiği bir olguda B grubu streptokok antijenini belirledik. Bu olguda B grubu streptokok test lateksi olmadığı için LA uygulanamamıştır.

Koaglütinasyon da lateks aglütinasyon gibi hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Koaglütinasyon miyazlarının hazırlanması teknik olarak daha basittir ve hazırlanan miyazlar La miyazlarına göre daha stabildir, daha uzun süre kullanılmaktadırlar (3). Bu yöntemde de lateks aglütinasyonda olduğu gibi, ortaya çıkan en büyük problem nonspesifik reaksiyonlar ve yanlış pozitifliklerin görülebilmesidir. Bu nedenle, bu yöntem ile alınan sonuçlar da, klinik bulgularla birlikte kullanılmalı ve her zaman rutin mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan kültür ve Gram boyama yöntemleri ile birlikte değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Dougherty JM: Cerebrospinal Fluid Cultures and Analysis. *Ann Emer Med*, 15 (3): 317-323, 1986.
2. Kaplan SL: Antijen detection in cerebrospinal fluid-Pros and cons. *Am J Med*, 75 (suppl. 1B): 109-118, 1983.
3. Tilton CR: Immunoserology in Clinical Microbiology Laboratory, Clinical and Pathogenic Microbiology, I. Edition (Ed: Carson ED, Bircher S) Washington, The C.V. Mosby Company, 1987, s. 105-120.
4. Martin WJ: Rapid and reliable techniques for the laboratory detection of bacterial meningitis. *Am J Med*, 28: 119-123, 1983.
5. Mordí WT, Wilkinson A: Bedside and rapid bacteriology. *Br Med J*, 292 (6520): 573-575, 1986.
6. Wellcogen H: Influenzae b (ZL21), *S. pneumoniae* (ZL22), *N. meningitidis* A, C, Y W135 (ZL23), *N. meningitidis* B/E. coli K1 (ZL24). (Latex test to detect bacterial antigens.) Wellcome Diagnostics, Dartford England DAI 5AH.
7. Phadebact CSF Test 20. (Directions for Use.) Pharmacia Diagnostics, Uppsala Sweden, 1983.
8. Ayaşlıoğlu E, Sözen TH, Özkan Ş: Bakteriyel menenjitli olgulara ait beyin omurilik sıvısı örneklerinde, lateks agglutinasyon yöntemi ile bakteriyel antijenlerin belirlenmesi. *Mikrobiyol Bül*, 27: 20-26, 1993.
9. Drow DL, Welch DF et al: Evaluation of the Phadebact CSF Test for detection of four most common causes of bacterial meningitis. *J Clin Microbiol*, 18 (6): 1358-1361, 1983.

10. Tilton RC, Dias F et al: Comparative evaluation of three commercial products and counterimmuno-electrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 20 (2): 231-234, 1984.
11. Coovadia YM, Naidu KK: Evaluation of Bactigen latex agglutination and Phadabact coagglutination for detection of bacterial antigens in cerebrospinal fluid. *J Clin Pathol*, 38: 561-565, 1985.
12. Ingram DL, Pearson AW et al: Detection of bacterial antigens in body fluids with the Wellogen H. influenzae b, S. pneumoniae, and N. meningitidis (A, C, Y, W135) latex agglutination tests. *J Clin Microbiol*, 18 (15): 1119-1121, 1983.
13. Marcon MJ, Hamoud AC et al: Comparative laboratory evaluation of three antigen detection methods for diagnosis of H. influenzae type b disease. *J Clin Microbiol*, 19 (3): 333-337, 1984.
14. Welch DF, Hensel D: Evaluation of Bactogen and Phadebact for detection of H. influenzae type b antigen in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 16 (5): 905-908, 1982.
15. Çetin ET, Derbentli Ş: Akut bakteriyel menenjit etkenleri. *Klimik Dergisi*, 1 (2): 5-8, 1988.
16. Rabalais GP, Bronfin DR et al: Evaluation of a commercially available latex agglutination test for rapid diagnosis of group B streptococcal infection. *The Pediatr Infect Dis J*, 6 (2): 177-181, 1987.
17. Baker CJ, Rench MA: Commercial latex agglutination for detection of group B streptococcal antigen in body fluids. *J Pediatr*, 102 (3): 393-395, 1983.