

KISA BİLDİRİ:
BRUSELLOZUN TANISINDA BRUCELLACAPT TESTİNİN
DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI

SHORT COMMUNICATION:
 EVALUATION OF DIAGNOSTIC VALUE OF BRUCELLACAPT
 TEST IN BRUCELLOSIS

Hikmet ALIŞKAN¹, Şule ÇOLAKOĞLU¹, Tuba TURUNÇ²
Yusuf Ziya DEMİROĞLU², Ayşe Canan YAZICI³, Hande ARSLAN²

ÖZET: Brusellozun serolojik tanısında sıklıkla tercih edilen yöntem olan standart tüp aglütinasyon (STA) testi, blokan antikor varlığını tespit edemediğinden yalnızca negatif sonuçların raporlanmasına yol açabilmektedir. Blokan antikorların saptanması ise ancak, zaman alıcı ve zahmetli olması nedeniyle birçok laboratuvarında rutin olarak uygulanmayan Coombs testi (anti-human globulin test) ile mümkün olmaktadır. Son yıllarda kullanıma giren ve oldukça pratik olan Brucellacapt testi (immunocapture agglutination), blokan antikor varlığından etkilenmeksizin brusellozda oluşan tüm antikorları tespit edebilmektedir. Bu çalışmada Brucellacapt testinin brusellozun serolojik tanısındaki değerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, kan kültürlerinden *Brucella melitensis* izolasyonu yapılan 25 brusellozlu hasta ile 31 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 56 birey dahil edilmiştir. Tüm bireylerden alınan serum örnekleri, STA, Coombs ve Brucellacapt testleri ile çalışılmış ve sınır titre değeri 1/160 olarak alınmıştır. Sonuç olarak kültür pozitif hastaların %40'ında (10/25) STA, %92'sinde (23/25) ise hem Coombs hem de Brucellacapt testleri pozitif ($\geq 1/160$) bulunmuştur. Kontrol grubunun hiçbirisinde bu testlerden herhangi birisi ile pozitiflik saptanmamıştır. Coombs ve Brucellacapt test sonuçlarının %100 uyum gösterdiği belirlenmiş ve kültür yöntemi referans alındığında Brucellacapt testinin duyarlılığı %92 (23/25), özgüllüğü ise %100 (31/31) olarak hesaplanmıştır. Bulgularımız Brucellacapt testinin bruselloz tanısında Coombs testi ile aynı yüksek performansa sahip olduğunu göstermekle birlikte, bu verilerin daha geniş ve kapsamlı çalışma gruplarıyla alınacak sonuçlarla desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Bruselloz, standart tüp aglütinasyon testi, Coombs testi, Brucellacapt.

ABSTRACT: Although standard tube agglutination (STA) test is the most preferred method for the serodiagnosis of brucellosis, it may yield false negative results because of its incompetence in detecting the blocking (non-agglutinating) antibodies. Blocking antibodies can be detected by Coombs' test (anti-human globulin test), which is

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (hikmetuncu@hotmail.com)

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

generally not performed in laboratories routinely since it is a time consuming and laborious method. Recently more practical Brucellacapt (immunocapture-agglutination) test is being used for the detection of total antibodies without any interference of the presence of blocking ones. The aim of this study was the evaluation of the value of Brucellacapt test in the serodiagnosis of brucellosis. Twenty-five brucellosis patients whose blood cultures yielded *Brucella melitensis* growth, and 31 healthy subjects as controls, were included to the study. Serum samples obtained from all of the 56 subjects have been searched by STA, Coombs' and Brucellacapt methods, and threshold titre was accepted as 1/160. As a result, 40% (10/25) of culture positive patients were found positive ($\geq 1/160$) by STA, whereas 92% (23/25) were positive ($\geq 1/160$) by both Coombs' and Brucellacapt tests. No positivity was detected in the control group by any one of those three tests. The agreement between Coombs and Brucellacapt methods was found as 100%, while the sensitivity and specificity of Brucellacapt test were estimated as 92% (23/25) and 100% (31/31), respectively, when the culture was accepted as reference method. Although our data have pointed out the high performance of Brucellacapt test in brucellosis serodiagnosis, confirmation with further data carried on extensive and comprehensive study groups, are needed.

Key words: *Brucellosis, Standard tube agglutination test, Coombs' test, Brucellacapt.*

GİRİŞ

Ülkemizin endemik bir zoonozu olan bruselloz, çeşitli klinik örneklerden, özellikle de kan ve kemik iliğinden *Brucella* türlerinin izolasyonu ile tanımlanmaktadır¹⁻³. Kan kültür yönteminin pozitiflik oranı, hastalığın süresine, etken olan *Brucella* türüne, dolaşımdaki bakteri miktarına, kullanılan yöntem ve hastanın daha önce antibiyotik tedavisi alıp almadığına göre değişiklik gösterir ve %15-70 oranları arasında bildirilmektedir¹⁻⁴. Bakteriyolojik doğrulama yokluğunda tanı serolojik olarak, kanda yüksek veya artan titrelerde özgül *Brucella* antikorlarının saptanması ve karakteristik öykü, klinik semptom ve bulgularla birlikte değerlendirilmesiyle konulur². Brusellozun laboratuvar tanısında, günümüzde uygulamaya giren birçok serolojik yöntemin varlığına rağmen, tüm dünyada en yaygın olarak Rose-Bengal ve standart tüp aglütinasyon (STA) testleri tercih edilmektedir^{1,2}. Ancak STA testi çoğunlukla blokan antikorlar (incomplete, non-aglütinan) olarak tanımlanan ve özellikle kronik olgularda rastlanan IgG ve IgA tipindeki antikorları tespit edememektedir. Bu sorunun giderilmesinde sıklıkla Coombs (antihuman globulin test) yöntemi kullanılır. Ancak zaman alıcı ve zahmetli bir test olan Coombs yöntemi, bir çok laboratuvar tarafından rutin olarak uygulanmamaktadır. Buna karşın 2000 yılından bu yana kullanılan ve oldukça pratik olan Brucellacapt testi (immunocapture agglutination), blokan antikor varlığından etkilenmeksizin brusellozda oluşan total antikorları tespit edebilmektedir⁵⁻⁸. Bu çalışmada, Brucellacapt testinin brusellozun serolojik tanısındaki performansının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, kan kültürü pozitif 25 brusellozlu hasta ve 31 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 56 birey dahil edildi. Kan kültürlerinden *Brucella* spp. izolasyonu Bactec 9050 (Becton Dickinson, Maryland, ABD) sistemi ile yapılmış ve tüm isolatlar *B. melitensis* olarak tanımlanmış idi.

Tüm bireylerden alınan serum örneklerine STA, Coombs ve Brucellacapt testleri uygulandı ve sınır titre 1/160 olarak alındı. STA ve Coombs testi daha önceden tarif edildiği şekilde yapıldı⁶. *B.abortus* antijeni, Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi (Ankara)'nden, anti-insan globulini ise Lorne Laboratories Ltd. (İngiltere)'den temin edildi. Brucellacapt testi üretici firmanın (Vircell, Granada, İspanya) önerileri doğrultusunda çalışıldı. Kısaca; çalışma plağının anti-insan immünoglobulinleriyle kaplanmış tüm çukurlarına sulandırım sıvısı eklenerek serum örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin çift katlı sulandırımları hazırlandı. Üzerlerine boyalı *B.abortus* süspansiyonundan eklendi ve ışıktan uzak nemli ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kuyucuğun tabanında yayılma varsa test pozitif, düğme şeklinde çökme varsa negatif olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, sınır titre değeri ($\geq 1/160$) dikkate alındığında; kültür pozitif 25 hastanın 10'unda (%40) STA, 23'ünde (%92) ise hem Coombs hem de Brucellacapt testleri pozitif bulunmuştur. Kontrol grubunun hiçbirisinde bu testlerden herhangi birisi ile pozitiflik saptanmamıştır. Coombs ve Brucellacapt testleri arasında %100 uyum olduğu izlenmiş ve kültür yöntemi referans alınarak yapılan değerlendirmede Brucellacapt testinin duyarlılığı %92 (23/25), özgüllüğü ise %100 (31/31) olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Çeşitli faktörlere bağlı olarak kültürden *Brucella* spp. izolasyon oranının düşük olması, brusellozun tanısında serolojik yöntemlerin kullanımını ön plana çıkarmaktadır^{1,2}. İzolasyon başarısızlığı durumunda, klinik bulgular ve semptomlar varlığında 1/160 ve üzeri (hatta yüksek endemik ülkelerde 1/320 ve üzeri) titrelerde STA pozitifliği bruselloz tanısında yardımcıdır^{9,10}. *Brucella* serolojisinde yalancı negatif sonuçlara yol açan blokan antikorların ortaya çıkma sıklığı ise göz ardı edilemeyecek düzeydedir^{11,12}. Bu nedenle STA testinin Coombs serumu kullanılarak tekrar edilmesi ya da diğer yöntemlerin kullanılması (örn.ELISA) önerilmektedir¹¹. Son yıllarda kullanıma giren Brucellacapt yöntemi, *Brucella*'ya karşı oluşan total antikorları (IgG, IgM ve IgA), dolayısıyla da blokan antikorları tespit edebilmektedir^{5,6}.

Klinik olarak kuvvetle şüpheli bruselloz olgularında STA ile negatif sonuç alındığında, klinisyen-laboratuvar iletişimi sağlanıyorsa testin Coombs' serumu ile tekrar edilmesi mümkün olmaktadır; ancak bu durum zaman ve reaktif kaybına yol açmaktadır. Çalışmamızda kültür pozitif hastaların sadece %40'ında (10/25) STA testinin pozitif ($\geq 1/160$) saptanması, yüksek (%100) özgüllüğe rağmen duyarlılığın düşük (%40) olduğunu vurgulamaktadır. Nitekim STA ile pozitif olarak saptanan hasta sayımız, Coombs testinin kullanılmasıyla 10'dan (%40) 23'e (%92) yükselmiştir.

Brucellacapt testinin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde; Orduna ve arkadaşları⁵ Brucellacapt ve Coombs testlerinin duyarlılığını (sınır titre 1/160 olarak alındığında) sırasıyla %95.1 ve %91.4, özgüllüğünü ise %81.5 ve %96.2

olarak bulmuşlardır. Bu yazarlar eşik değerini 1/320 olarak aldıklarında duyarlılığın düştüğünü (sırasıyla %91.5 ve %82.9), özgüllüğün ise yükseldiğini (sırasıyla %97.4 ve %100) bildirmişlerdir⁵. Casao ve arkadaşları⁶, Brucellacapt ve Coombs testlerinin duyarlılığını sırasıyla, %96 ve %100 olarak bulmuşlar ve STA'ya göre (%73) oldukça yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Serra ve arkadaşları⁷, brusellozlu 42 hastada Brucellacapt ve Coombs testlerinin duyarlılığını sırasıyla %100 ve %95 olarak bildirmişlerdir. Ardıç ve arkadaşları¹³ ise Coombs testini referans, sınır titreyi de 1/160 olarak aldıklarında, duyarlılık ve özgüllük değerlerinin Brucellacapt testi için sırasıyla %97.3 ve %55.6 olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda sınır titre değeri 1/160 olarak alındığında, Coombs ve Brucellacapt testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin aynı olduğu (sırasıyla; %92 ve %100) bulunmuştur. Duyarlılık oranlarımız diğer çalışmalarla paralellik göstermekle birlikte, özgüllük oranlarımızın daha yüksek bulunmasının, çalışma grupların seçimi ve sayısal farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bulgularımız, brusellozun serolojik tanısında duyarlılığı yükseltmek için STA ve Coombs testinin birlikte uygulanması yerine, daha hızlı ve pratik olan Brucellacapt testinin kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca laboratuvarımız için maliyet hesabı yapıldığında, STA ve Coombs testine göre çok düşük bir fark tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Brucellacapt testinin bruselloz tanısında yüksek performans gösterdiğine işaret eden bu bulgularımızın, daha geniş ve kapsamlı çalışma gruplarıyla alınacak sonuçlarla desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Young EJ. *Brucella* species, pp: 86-92. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, New York.
2. Shapiro DS, Wong JD. *Brucella*, pp: 625-31. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 1999, 7th ed. ASM Pres, Washington, DC.
3. İseri S, Bulut C, Yetkin MA, Kınıklı S, Demiröz AP, Tülek N. Comparison of the diagnostic value of blood and bone marrow cultures in brucellosis. Mikrobiyol Bul 2006; 40: 201-6.
4. Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. J Clin Microbiol 1999; 37: 3437-42.
5. Orduna A, Almaraz A, Prado A, et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 4000-5.
6. Casao MA, Navarro E, Solera J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. J Infect 2004; 49:102-8.
7. Serra J, Velasco J, Godoy P, Mendoza J. Can the Brucellacapt test be substituted for the Coombs' test in the diagnosis of human brucellosis? Enferm Infec Microbiol Clin 2001; 19:202-5.
8. Gomez MC, Rosa C, Geijo P, Escribano MA. Comparative study of the Brucellacapt test versus the Coombs' test for *Brucella*. Enferm Infec Microbiol Clin 1999; 17: 283-5.
9. Mert A, Özaras R, Tabak F, et al. The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46: 241-3.
10. Yıldız F, Tanyel E, Hatipoglu CA, Ertem GT, Tülek N, Oral B. Evaluation of *Brucella* tube agglutination test in patients with brucellosis patients with bacterial infections other than brucellosis and healthy subjects. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 211-7.

11. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352: 2325-36.
12. Colak H, Usluer G, Ozgunes I, Karagüven B, Barlas S. Comparison of the Wright, indirect Coombs' and enzyme immunoassay IgG methods for the diagnosis of chronic brucellosis. *Mikrobiyol Bul* 1992; 26: 56-60.
13. Ardic N, Ozyurt M, Sezer O, Erdemoglu A, Haznedaroglu T. Comparison of Coombs' and immunocapture-agglutination tests in the diagnosis of brucellosis. *Chin Med J (Engl)* 2005; 18: 252-4.