

KÜLTÜR VE SEROLOJİK YÖNTEMLERİN İNSAN BRUSELLOZU TANISINDAKİ DEĞERİ

THE VALUE OF CULTURE AND SEROLOGICAL METHODS IN THE DIAGNOSIS OF HUMAN BRUCELOSIS

Hikmet ALIŞKAN¹

ÖZET: İnsan brucellozu çoklu organ tutulumu ile seyreden ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Enfeksiyonun ilk haftasında IgM antikorları, en erken ikinci haftasında ise IgG antikorları yükselir ve her ikisi de dördüncü haftada pik yapar. Antibiyotik tedavisi ile IgM ve IgG antikorlarının düzeyi düşmektedir. Hastadan alınacak detaylı öykü ve kan kültüründen bakterinin üretilmesi tanıda halen standart olan yöntemdir. Brusellozun kesin tanısı kan, kemik iliği ve doku örneklerinden bakterinin izole edilmesi ile konulmaktadır. Kan kültürünün duyarlılığı laboratuvar pratiğine, kullanılan yonteme ve kanda dolaşan bakteri miktarına göre değişmekle birlikte %15-70 aralığındadır. Kemik iliği kültürü, bakteri özellikle retiküloendotelyal sistemde yüksek konsantrasyonda olduğu için altın standart yöntemdir. Standart aglütinasyon testi (STA), insan brucellozunun doğrulanmasında en sık kullanılan serolojik yöntemdir. Klinik bulgular varlığında serokonversiyonun ya da $\geq 1/160$ titrelerin saptanması hastalığın tanısında yol göstericidir. Klinik olarak kuvvetle şüpheli hastalarda seropozitifliğin saptanamaması, enfeksiyonun çok erken dönemini, blokan (non agglutinating, incomplete) antikorların varlığını ya da prezon fenomenini düşündürmelidir. Enzim immün yöntemleri (ELISA), *Brucella* 'ya özgül IgG, IgM ve IgA antikorlarının düzeyini belirleyen, klinik yorumu daha kolay olan ve STA testinde yalancı negatiflik/pozitifliklere neden olan faktörleri ortadan kaldıran bir yöntemdir. Bu derleme yazıda brucellozun laboratuvar tanısında kültür ve serolojik yöntemlerin (Rose-Bengal, STA, Coombs', mercaptan testleri, "dipstick" yöntemi, akım yöntemi, ELISA ve brucellapt) kullanımı ve değeri tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Brucella, brucelloz, tanı yöntemleri, kültür, seroloji.

ABSTRACT: Human brucellosis is a potentially life-threatening multisystem disease. During the first week of infection, IgM antibodies against lipopolysaccharide antigens appear in the serum, followed by IgG antibodies as early as the second week. Both antibody isotypes peak during the fourth week, and the use of antibiotics was associated with a decline of both IgM and IgG class antibodies. The diagnosis of brucellosis is based on a detailed history obtained from the patients and the isolation of *Brucella* spp. from blood cultures are accepted as the standard method. The definitive diagnosis of brucellosis requires isolation of the bacterium from blood, bone marrow or tissue samples. Although the sensitivity of blood culture method varies depending on the individual laboratory practices, quantity of bacteria in blood and the methods used, it changes between 15-70 percent. Bone marrow culture is considered as the gold

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

standard for the diagnosis of brucellosis, since the relatively high concentration of *Brucella* in reticuloendothelial system enables the detection of the organism. The standard tube agglutination test (SAT) is the most widely used serologic test for the confirmation of human brucellosis. The detection of seroconversion or high antibody titers ($\geq 1/160$) are considered diagnostic together with a compatible clinical presentation. The lack of seropositivity in patients with strongly suspected clinical picture may be attributed to the performance of tests early in the course of infection, the presence of blocking antibodies (non-agglutinating, incomplete) or the so-called "prezone" phenomenon. Enzyme immunoassays (ELISA) which measure specific IgM, IgG and IgA antibodies, allow for a better interpretation of the clinical situation and overcome the false negativities/positivities which may arise in SAT. In this review article, the use and the values of culture methods and serological tests (Rose-Bengal test, SAT, Coombs' test, mercaptan-based tests, dipstick assay, flow assay, ELISA and brucellacapt) in the diagnosis of brucellosis have been discussed.

Key words: Brucella, brucellosis, diagnostic methods, culture, serology.

GİRİŞ

Bruselloz, *Brucella* türlerinin neden olduğu çoklu sistem tutulumu ile seyreden bir hastalıktır. Bulaştan sonraki 2 hafta-3 ay içinde özgül olmayan semptomlar ortaya çıkar. *Brucella* türleri intrasellüler olarak özellikle retiküloendotelial sistemde (RES) yerleşmektedir. Brusellozun klinik görünümü, sık görülmeyen prezentasyonları nedeniyle yanlış değerlendirilebilir. Atipik lezyonları olan nadir olgular yayınlarda bildirilmektedir ve bu durum tanının laboratuvar testleri ile desteklenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Hastadan alınacak detaylı öykü ve bakterinin üretilmesi tanıda halen standart olan yöntemdir¹.

Bruselloz tanısında iki önemli kriter vardır: 1. *Brucella* türlerinin izolasyonu; 2. Klinik bulgular eşliğinde kanda *Brucella*'ya özgül yüksek titrede antikor varlığı (Standart tüp aglütinasyon testinde $\geq 1/160$, Coombs' testinde $\geq 1/320$ titreler). Serokonversiyonun gösterilmesi de tanıda önemli olan bir diğer kriterdir².

Eritrosit sedimentasyon hızı düzeyinin bruselloz tanısındaki değeri azdır. Sıklıkla görülen hematolojik bulgular arasında lökopeni, anemi ve trombositopeni sayılabilir. Diğer vücut materyalleri, örneğin beyin omurilik sıvısı (BOS), merkezi sinir sistemi (MSS) bulguları olduğu zaman değerlendirilebilir. Karaciğer ve lenf nodu biyopsileri gibi kemik iliği biyopsileri de tipik olarak kazeöz olmayan granülomlar gösterir¹.

Bruselloza ait semptom ve bulguları iki aydan kısa süren olgular akut, 2 ay-1 yıl süren olgular subakut, 1 yıldan uzun süren olgular ise kronik olarak tanımlanmaktadır³. Relaps, tedavi sonrasında hastalık semptom ve bulgularının yeniden ortaya çıkması ve/veya kan kültür pozitifliği olarak kabul edilmektedir. Relapsların çoğu tedavi sonrası 3-6 ay arasında meydana gelir. Fokal hastalığın tanımı ise, enfeksiyon semptom ve bulgularının en az bir anatomik bölgede yedi günden uzun süre devam etmesidir⁴.

BRUSELLOZ TANISINDA KÜLTÜR YÖNTEMİ

Brusellozun kesin tanısı kan, kemik iliği, doku biyopsisi ve BOS gibi örneklerden bakterinin izole edilmesi ile konulur². Kan ve kemik iliği kültürleri sıklıkla akut fazda pozitifdir¹. Kan kültürünün duyarlılığı laboratuvar pratiğine,

kullanılan yöntemde, kanda dolaşan bakteri miktarına ve bakteri türüne göre değişmekle birlikte pozitiflik oranı %15-70 aralığındadır². Duyarlılık, lizis santrifügasyon yönteminin kullanılması ile artmaktadır⁵. Kemik iliği kültürü, bakteri özellikle RES'de yüksek konsantrasyonda olduğu için altın standart yöntemdir ve pozitiflik zamanı (4.2 gün) kan kültürüne (5.8 gün) göre daha erkendir^{2,6}. Buna karşılık, invazif ve ağırlı bir girişim olması nedeniyle sık tercih edilen bir yöntem değildir. *Brucella* türleri, standart bifazik (katı ve sıvı) veya Castaneda kültür yöntemleri ile izole edilebilir. Otomatize kan kültür sistemleri *Brucella* izolasyonunda güvenle kullanılabilir⁷. Organizma oldukça yavaş üremektedir, bu nedenle inkübasyonu 4-6 haftaya uzatılmalıdır. BACTEC kan kültür sistemi ile bakteri, ilk yedi gün içerisinde, yaklaşık %90 oranında izole edilmektedir⁸. Negatif sonuç alınan kültürlerde 2-3 hafta sonrasında mutlaka pasajların yapılması önerilmektedir⁹. Laboratuvar çalışanlarına aerosol yolu ile bulaşabileceği için tüm çalışmalar biyolojik güvenlik kabininde yapılmalıdır.

Tanımlama: *Brucella* türleri, sporsuz, zayıf boyanan, Gram negatif minik kokobasillerdir. %5 kanlı, çikolata ve BCYE (buffered-charcoal-yeast extract agar) besiyerlerinde ürer, MacConkey ve EMB agarda üremezler. Aerop olması nedeniyle üremesi için ortamda oksijen varlığı gereklidir. Oksidaz, katalaz, üreaz testleri pozitifdir⁹. *Brucella* türleri, fuksin ve tiyonin boyalarının farklı konsantrasyonlarında üreme, safranin inhibisyonu, H₂S üretimi, üreaz testinin pozitiflik zamanı, CO₂'li ortamda üreme, Tblisi ve Weybridge faj lizisi özelliklerine göre alt türlere (*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis*, *B.neotomae*, *B.pinnipediae* ve *B.cetaceae*) ve biovarlara (*B.melitensis* 1-3; *B.abortus* 1-6, 9; *B.suis* 1-5) ayrılmaktadır².

Gram negatif bakteri tanımlamasında kullanılan ticari hazır kitlerde *Brucella* türleri tanımlanamamaktadır. Bakteri API 20NE tanımlama sisteminde yanlışlıkla *Moraxella phenylpyruvica*; COMBO tip 5 (Dade-Microscan) sisteminde *Moraxella*; *Haemophilus-Neisseria* tanımlama panelinde (Dade-Microscan) ise *Haemophilus influenzae* biotip IV olarak tanımlanmaktadır⁹.

Antijenik yapı: Antikor yanıtında dominant olan antijen lipopolisakkarit yapısındaki antijenlerdir. "Smooth" faz türleri (S-LPS) bir lipid A (aminoglikozun iki tipinden oluşur) molekülü, ayırt ettirici yağ asitleri (β-hidroksimiristik asit hariç), glukoz, mannoz ve kinovozamine içeren bir kor bölgesi ve 4-formamido-4,6-dideoksimannoz (A epitopunun dominant olduğu türlerde α-1,2 ile, M dominant türlerde α-1,3 ile bağlıdır) rezidülerinin yaklaşık 100 tanesinin homopolimerizasyonu ile oluşan bir O zincir yapısından meydana gelmektedir. LPS epitoplarının şeklini farklı bağlantılar etkilemektedir. A dominant tipler basil şeklindedir ve beş adet ardışık α-1,2 ile bağlı rezidülerden oluşurken, M dominant tipleri karışık yapıdadır ve α-1,3 ile bağlı dört rezidüden meydana gelmektedir. Dış ve iç membran, sitoplazmik ve periplazmik protein antijenleri de mevcuttur. LPS'de bulunan 4-amino, 4-6 dideoksimannoz yapısı, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O157, *Escherichia hermanni*, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae* O-1, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Stenotrophomonas maltophilia* ile çapraz reaksiyonlardan sorumludur¹⁰.

BRUSELLOZ TANISINDA SEROLOJİK TESTLER

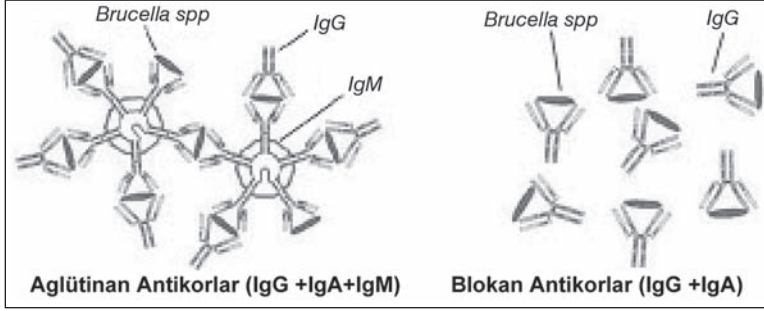
Lipopolisakkaritlere karşı oluşan IgM antikorları, enfeksiyonun ilk haftasında, IgG antikorları ise en erken ikinci haftada yükselir. Her iki antikor tipi de dördüncü haftada pik yapar ve antibiyotik tedavisi ile düzeyleri azalır². Tedavi sonrasında IgG düzeyleri IgM'e göre daha hızlı düşüş gösterir. IgG'nin hızlı düşüşü başarılı bir tedavinin göstergesi iken, düşme olmaması veya sonrasında tekrar yükselme olması durumunda klinik olarak relaps varlığından bahsedilebilir¹¹. Kronik hastalıkta IgG, IgA ile birlikte altı aydan uzun süre yüksek kalabilir². Ancak bu kriterler kesin değildir; antikor profili her zaman klinik ile uyumlu olmayabilir ve titreler uzun süre yüksek düzeylerde kalabilir.

Rose-Bengal testi: Bu yöntem, duyarlılığı yüksek, hızlı sonuç veren, uygulaması kolay, maliyeti oldukça düşük olan bir plak aglütinasyon testidir. *B.abortus*'un asit tampondaki süspansiyonu kullanılmaktadır. Aglütinan olan ve olmayan antikorları tespit etmektedir. Rose-Bengal testi, hastalık döneminden bağımsız olarak duyarlılığı yüksek olan bir yöntemdir. Ayrıca hızlı sonuç vermesi ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle insan brusellozunun tanısında tarama testi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Testin özgüllüğü %75-91 aralığında değişmektedir¹². Brusellozun endemik olduğu bölgelerde, hastalıkla tekrar karşılaşma durumunda veya yeni geçirilmiş enfeksiyon hikayesi olan bireylerde tanıda tek başına kullanılması uygun değildir¹². *Brucella*'nın LPS yapısına bakıldığında, bu patojenin sepsis, şok ve disemine intravasküler koagülasyon yapma kapasitesi oldukça düşüktür, bu yüzden tedavideki birkaç günlük gecikme prognozu etkilememektedir. Kesin tanı için diğer serolojik testlerin sonucu beklenmelidir.

Standart tüp aglütinasyon testi (STA, Wright): İlk kez Wright ve arkadaşları tarafından 1897 yılında bruselloz tanısında kullanılan STA testinin diğer yöntemlere göre daha standart olduğu ifade edilmiştir¹¹. Tüm dünyada bruselloz tanısı için kullanılan en yaygın yöntemdir. 1/10-1/2560 aralığında dilüsyonları hazırlanan serum örneğinin üzerine *B.abortus* antijeni eklenir. 37°C'de 24 saat sonunda aglütinasyon varlığı değerlendirilir¹³. Aglütinasyonun derecesi; 0=aglütinasyon yok, 1+ = %25, 2+ = %50, 3+ = %75, 4+ = %100 şeklinde skorlanır¹¹. En son aglütinasyonun tespit edildiği serum dilüsyonu (>%50, skor >2+) pozitif titre olarak değerlendirilir¹³. STA testi ile bakterinin yüzeyindeki özellikle S-LPS'ye karşı oluşan total antikorlar tespit edilmektedir. IgG, IgM ve IgA antikorları bu yöntemle belirlenirken, özellikle IgM antikorları daha belirgindir¹¹. STA testinin dezavantajı, çok fazla sayıdaki serum örneklerinin taranmasındaki zorluktur. Ayrıca, diğer Gram negatif bakterilerle gösterdiği çapraz reaksiyonlar nedeniyle yorumlanması bazen sıkıntı yaratmaktadır. STA ile negatiflik saptandığında; ya enfeksiyonun çok erken dönemi, ya blokan (non-agglutinating, incomplete) antikorların varlığı veya prezon fenomeni söz konusu olabilir. Bu durum, kompleman birleşmesi testi, 2-merkaptotanol (2-ME) testi veya Coombs' testi (anti-insan globulini ile muamele) uygulanarak giderilebilir².

Prezon fenomeni: Bu olay, hasta serumunda antikor fazlalığı nedeniyle düşük sulandırılarda aglütinasyonun görülmemesi olarak tanımlanır. Young ve arkadaşlarının¹¹ çalışmasında, pozitif serumların %6'sında prezon fenomeninin olduğu, sıklıkla düşük titrede (1:20), nadiren de >1:80 dilüsyonlarda rastlanabileceği bildirilmiştir.

Blokan antikorlar: Brusellozda iki tür antikor oluşmaktadır: a) Akut brusellozda oluşan IgG, IgM ve IgA yapısındaki aglütinan antikorlar; b) Daha çok kronik olgularda rastlanan IgG ve IgA yapısındaki blokan ya da eksik (non-agglutinating, incomplete) antikorlar (Şekil 1). Bu olayın mekanizması tam olarak bilinmemektedir. *Brucella* eksik antikorları ile antijenin sensitize parçası spontan olarak bağlanmakta, ancak aglütinasyon görülmemektedir¹⁴. Yüksek devirde santrifüj sonrasında ve anti-insan globulin IgG muamelesi ile blokan antikorların bağlanması sağlanmaktadır. Serum örneğinde blokan antikorların varlığının saptanması için kullanılan yöntem şu şekilde uygulanmaktadır: 1) İlk tüpe 0.8 mL dilüent ve 0.2 mL hasta serumu konur ve 0.25 mL seri dilüsyonu yapılır; 2) Üzerine antijen eklendikten sonra, karıştırılır ve 37°C'de 48 saat su banyosunda inkübe edilir; 3) Blokan antikor yokluğunda, bütün tüplerde 4+ aglütinasyon meydana gelirken blokan antikor varlığında prezonu takiben tüplerde aglütinasyon görülür¹¹.



Şekil 1. Brusellozda oluşan aglütinan ve blokan antikorlar.

Coombs' (anti-insan globulin) testi: Blokan antikorları ve prezon fenomenini ortadan kaldırarak aglütinasyon testinin duyarlılığını artıran bir yöntemdir. STA testindeki tüplerin yüksek devirde santrifüj edilmesi sonrasında üzerlerine anti-insan IgG (Coombs' serumu) damlatılmaktadır. Bu yöntem iki farklı şekilde uygulanabilir:

a) STA testindeki tüpler 2000 xg'de 15 dakika santrifüj edilir, süpernatant atılır ve kalan antijen PBS (phosphate-buffered saline) (pH: 7.2) ile karıştırılır. Santrifüj ve yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir. Son yıkamadan sonra 0.9 mL PBS ve 0.1 mL anti-insan IgG eklenir. 37°C'de 24 saat inkübe edilir. STA Coombs' serumu eklendikten sonraki titreler kaydedilir¹¹.

b) Yukarıdaki işlemler aynı şekilde uygulanır. Santrifüj işlemi 3000 xg'de 20 dakika yapılır. En son yıkamadan sonra süpernatant atılır ve üzerine 15 µl Coombs' serumu eklenir. 37°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda sonuçlar değerlendirilir¹³.

Merkaptan testleri: 2-ME ve dithiothreitol (DTT) kullanılarak yapılan bu yöntemde, IgM antikorlarının disülfid bağları indirgenmektedir. Serum örneğinin bu maddelerle muamele edilmesi sonrasında IgM yapısındaki antikorlar aktivitesini

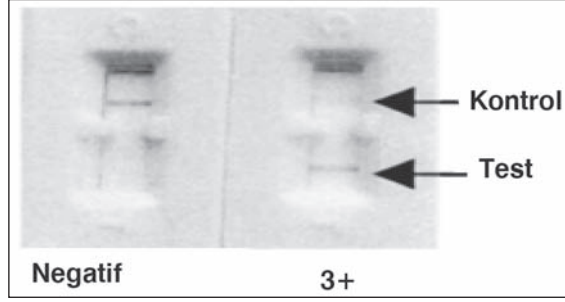
kaybederken, IgG yapısındaki antikorlar etkilenmemektedir¹¹. STA'ya göre bir tüp azalma anlamlı kabul edilir. STA testi ile total antikor düzeyi belirlenirken, 2-ME ve DTT testleri ile IgG antikorları tespit edilmektedir. 2-ME testi inaktif formun aktif kronik enfeksiyondan ayırt edilmesinde kullanılabilir. Relaps gelişen olgularda IgG ve IgA yüksekliği, bu yöntemle Coombs' ve ELISA yöntemine göre daha iyi tespit edilmektedir¹⁵. Dikkat edilmesi gereken nokta, kalan titrenin sadece IgG'yi değil, IgA varlığını da ifade ettiğidir⁴.

“Dipstick” testi: *Brucella*'ya özgül IgM'nin tespiti akut brusellozun kronik olgulardan ayırt edilmesini sağlar. Bu yöntem, kolorometrik bir yöntem olup, hızlı sonuç verir ve kolay uygulanabilir. 5 µL hasta serumu ile 250 µL reaktif karıştırılır. Antijen kaplı strip ile üç saat inkübe edilir. Kırmızı boyanmış antijen bandının görülmesi testin pozitifliğini göstermektedir (Şekil 2). Boyanmanın şiddetine göre 1+’den 4+’e kadar derecelendirilir. Smiths ve arkadaşlarının¹⁶ yapmış oldukları çalışmada, testin özgüllüğü %98.6; duyarlılığı ise hastalığın ilk iki aylık dönemi için %89, 2-4 ay için %83.1, 4-6 ay için %32.6 ve >6 ay süre için %29.8 olarak bulunmuştur. Hastalık öyküsü kısa olan akut bruselloz olgularının tanısında kullanılabilir. Hastalık öyküsü uzun olan olgularda özgül IgM yanıtı azalacağı için, dipstick testi negatif sonuç verebilir. Test sonucu negatif olan serum örnekleri diğer yöntemlerle (Coombs' veya kültür yöntemi gibi) doğrulanmalıdır. Özel eğitilmiş personel gerektirmeyen bu testin reaktiflerinin uzun süreli oda ısısında saklanabilmesi de avantajları arasındadır¹⁷.



Şekil 2. Dipstick testinde kırmızı bant görülmesi pozitif, görülmemesi negatif olarak değerlendirilir.

Akım yöntemi (Flow Assay): *Brucella*'ya özgül IgG ve IgM antikorlarını tespit eden immünokromatografik bir yöntemdir. Bu yöntemin STA ve 2-ME'e göre daha duyarlı olduğu belirtilmektedir¹⁸. Yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı %96 ve %100, özgüllüğü %96 ve %99 olarak bildirilmiştir^{19, 20}. Hızlı, kolay uygulanabilir ve ekipmana ihtiyaç göstermeyen bu yöntemde, bir damla serum örneği kullanılarak 10-15 dakika içinde sonuç alınabilmektedir (Şekil 3). Akut, persistan ve kronik olguların takibinde kullanılabilir. Akut veya subakut olgularda IgM flow assay orta düzeyden (2+) çok güçlüye (4+) kadar boyanma gösterirken, IgG zayıf boyanmadan (1+) orta düzeye (2+) kadar boyanma gösterir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde IgG 2+ iken, IgM 1+ boyanma gösterir.



Şekil 3. Akım yöntemi ile alınan negatif ve pozitif sonuçlar.

Enzim immün yöntemi (ELISA): Bu yöntem IgG, IgM ve IgA düzeylerinin belirlenmesine olanak sağlar. Klinik yorumu daha iyidir. Çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğü STA'ya göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo I). Nörobruselloz tanısında üstündür²¹. Yapılan çalışmalarda farklı bakteriyel antijenlere (örn. korpusküler antijen, S-LPS veya protein antijenleri) karşı gelişen antikorların saptanabildiği belirtilmektedir^{3,4,11, 22}.

Tablo I. Akut ve Kronik Brusellozun Tanısında Kullanılan Bazı Yöntemlerin Karşılaştırması

Yöntem	Akut Bruselloz		Kronik Bruselloz	
	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Kan ve kemik iliği kültürü	53	100	5	100
STA ≥ 160	92	100	45	100
ELISA IgG ≥ 1.600 mg/dL	98	98	100	98
ELISA IgM ≥ 100 mg/dL	100	36	82	36
ELISA IgA ≥ 100 mg/dL	99	89	89	100

Akut brusellozda özgül IgM tek başına veya IgG ve IgA ile birlikte yükselirken, kronik brusellozda tek başına IgG veya IgG+IgA birlikte yükselmektedir²³. Anti-*Brucella* IgA, hastalığın erken döneminde oluşmakta, ilk ay süresince önemli bir yükselme göstermekte, ancak daha sonra IgG'den daha düşük düzeylerde kalmaktadır^{4,24}. *Brucella*'da IgA yanıtı, STA testi düşünüldüğünde minimal öneme sahiptir ve bu konuda yapılan çalışmalar yetersizdir⁴. Buna karşın akut olgularda, IgM ELISA testinin duyarlılığı %80 iken, IgG ve IgM'nin birlikte saptanmasının duyarlılığı %90-100 arasında saptanmaktadır³. Subakut olgularda IgM'nin performansı azalırken, IgG daha iyi sonuç vermektedir; bazı olgularda ise her ikisi de negatif olabilir³. Memiş ve arkadaşlarının²⁵ çalışmasında, bakteriyemik olan bruselloz olgularında STA testinin performansı (duyarlılık %95.6, özgüllük %100), ELISA yöntemine göre (duyarlılık ve özgüllük IgG için %45.6 ve %97.1; IgM için %79 ve %100; IgG ve IgM birlikte %94.1 ve %97.1) daha iyi bulunmuştur. Yapılan çalışmalar, akut brusellozda IgG₁ düzeyinin diğer IgG alt tiplerine göre daha fazla yükseldiğini,

kronik olgularda ise IgG₄ düzeylerinin diğerlerine göre daha yüksek olduğunu göstermiştir²². Dolayısıyla tanının zor olduğu durumlarda, IgG₄ dominantlığı yardımcı bir belirleyici olabilir.

Akut bruselloz olgularının %5-40'ında relaps gelişmekte ve bu olgularda her zaman kültür pozitifliği olmayabilmektedir²⁶. Bu durumda klinik bulgular ve serolojik testler önem arz eder¹⁵. Yapılan bir çalışmada, relaps olguları Coombs' testi/IgG ile %83; IgA ile %58; STA ile %25 oranında tespit edilmiş, IgM ile tespit edilememiştir. ELISA IgG, IgA ve Coombs' titrelerindeki yükselme relapsın iyi bir göstergesi iken, IgM titresinde yükselme olmamaktadır^{4,15}. Bazen klinik olarak relaps gelişimi olduğu halde, hiç bir serolojik bulgu saptanmayabilir. Relaps sırasında serolojik değişikliğin meydana gelme zamanı hastadan hastaya değişmektedir. Hastaların %40'ında relaps zamanında en düşük titre saptanmaktadır, sonrasında serolojik değişiklikler başlamaktadır. Akut hastalığın tedavisinden sonra 1.ve 3. aylarda serolojik takip yapılmalıdır. IgG titresindeki her yükselme relapsın belirtisi olabilir¹⁵. Arıza ve arkadaşlarının⁴ relaps olgularını izledikleri çalışmalarında, hastalığın ilk 6 ayı içerisinde, ELISA IgG titresinin Coombs' testi ile, ELISA IgM'in STA ile benzer olduğu, ELISA IgA titresinin ise IgG ELISA/Coombs' ve IgM ELISA/STA titreleri arasında yer aldığı bildirilmektedir. IgG ve IgA ELISA düzeyleri ile DTT aglütinasyon düzeyleri benzer uyum göstermektedir ve bu veri 2-ME ve DTT testlerinin gerçekten IgM'i inaktive ettiğini ispatlamaktadır⁴.

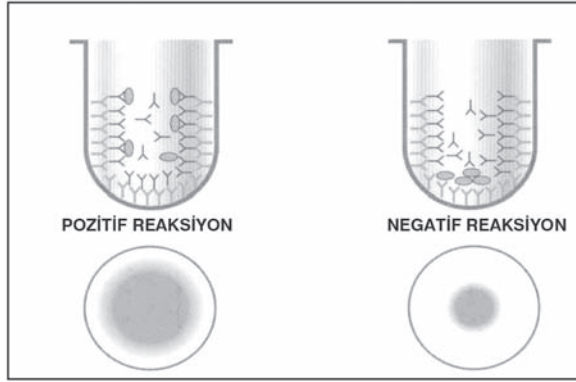
Kronik olgularda başlangıç titresinden bağımsız olarak IgG düzeyi yüksek kalmaktadır. Klinik olarak iyileşmeye rağmen, IgG titresi uzun süre kalıcı olabilir ve bu sıklıkla başlangıç titresinin yüksekliği ile ilişkilidir⁴. IgG, IgM ve IgA'nın ELISA ile tespiti STA ve 2-ME aglütinasyona göre daha özgündür. Fokal odaklı hastalarda IgG ve IgA düzeyleri daha yavaş düşmektedir, zira bu hastalarda klinik iyileşme daha yavaş meydana gelmektedir. Hastanın başvurusundaki IgG düzeyleri hastalığın süresini belirleyen en önemli faktör olup, tedaviden 12 ay sonrasına kadar relaps gelişmeksizin kanda yüksek titreler tespit edilebilmektedir⁴.

Serolojik çalışmalardaki en büyük sıkıntılardan birisi çapraz reaksiyonların varlığıdır ve bu durum S-LPS antijeninin kullanıldığı ELISA yöntemi için de geçerlidir. Geliştirilen yarışmalı (kompetitif) ELISA yönteminin özgüllüğü ise daha yüksektir; zira S-LPS'nin O-polisakkaritinde sık olarak yer alan epitopa karşı özgül monoklonal antikorların kullanılmasıyla çapraz reaksiyonların sıklığı azaltılmıştır. Bu yöntemin IgG'yi tespit etmedeki duyarlılığı %98.3, özgüllüğü %99.7 olarak bulunmuştur²⁷.

ELISA yöntemi, diğer aglütinasyon yöntemlerine göre daha çok pozitiflik, daha yüksek titreler ve farklı sınıf antikorları tespit etme avantajına sahiptir; ancak katı fazın ve anti-globulinin yapısına bağlı olarak farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu durum yöntemin duyarlılığını, özgüllüğünü ve uygulanabilirliğini etkilemektedir³. Ayrıca, antikor profili her zaman klinikle uyumlu olmayabilir ve titreler uzun süre pozitif kalabilir. ELISA testleri, aglütinasyon yöntemlerine göre daha pahalı, donanım ve deneyim gerektiren testlerdir. Araj ve arkadaşlarının²⁸ yaptığı karşılaştırmalı bir çalışmada, RB ve STA yönteminin basit, güvenilir ve ucuz

oldukları için akut bruselloz olgularında kullanılabileceği, kronik ve komplike olgularda bu yöntemlerin olguların %7'sini kaçırabileceği ve dolayısıyla bu hastalarda ELISA yönteminin tercih edilebileceği vurgulanmıştır.

Brucellacapt testi: Son yıllarda geliştirilmiş olan bir hemaglütinasyon yöntemidir. Kuyucuklar insan kaynaklı IgG, IgM ve IgA antikorlarına karşı antikorlarla (Coombs' antikorları) kaplıdır (Şekil 4). Kuyucuklarda sulandırılan hasta serumu üzerine boyalı *B.abortus* antijeni damlatılır ve 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrasında reaksiyon değerlendirilir. *Brucella*'ya karşı oluşan her üç antikor ve blokan antikorları da tespit ettiği için saptadığı titreler STA ve Coombs' yöntemine göre daha yüksek, duyarlılık ve özgüllüğü de bu yöntemlere göre daha fazladır²⁹. Bu yöntemde tüm *Brucella*'ya karşı oluşan (özellikle S-LPS) antikorlar bulunmaktadır. Orduna ve arkadaşları²⁹ Brucellacapt ve Coombs' testlerinin duyarlılığını, eşik titresi 1/160 olarak alındığında sırasıyla %95.1 ve %91.4, özgüllüğünü ise %81.5 ve %96.2 olarak bildirmiş; eşik titresi 1/320 olarak alındığında duyarlılığın sırasıyla %91.5 ve %82.9, özgüllüğün ise %97.4 ve %100 olduğunu ifade etmişlerdir. Ardıç ve arkadaşları³⁰ Coombs' testini referans test, eşik titresini ise 1/160 olarak kabul ettiklerinde, duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerlerinin Brucellacapt testi için sırasıyla, %55.6, %90 ve %83.3 olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar eşik titresini 1/320 olarak aldıklarında bu değerlerin sırasıyla, %100, %59.1, %88.6 ve %100 olduğunu vurgulamışlardır³⁰.



Şekil 4. Brucellacapt yönteminde pozitif ve negatif reaksiyon.

Diğer serolojik testler arasında yer alan kompleman birleşmesi, radioimmünassay ve floresan antikor yöntemleri ise kompleks, zaman alıcı, radyasyon zararlı, zor ve okunması subjektif olan testler olup, rutin laboratuvarlarda bruselloz serolojisinde tercih edilen yöntemler değildir.

KAYNAKLAR

1. Sauret JM, Vilissova N. Human brucellosis. J Am Board Fam Pract 2002; 15: 401-6.
2. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med 2005; 2: 2325-36.
3. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z et al. Diagnostic value of *Brucella* ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. J Chemother 2001;13: 54-9.

4. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis 1992; 14: 131-40.
5. Yakupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. J Clin Microbiol 1999; 37: 3437-42.
6. İşeri S, Bulut C, Yetkin MA ve ark. Brusellozda kan ve kemik iliği kültürlerinin tanı değerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bül 2006; 40: 201-6.
7. Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. J Clin Microbiol 1997; 37: 3437-42.
8. Ozturk R, Mert A, Kocak F. The diagnosis of brucellosis by use of BACTEC 9240 blood culture system. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44: 133-5.
9. Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, et al (eds). Miscellaneous Fastidious Gram-Negative Bacilli, pp: 429-548. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6th ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.
10. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 1997; 3: 213-21.
11. Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev Infect Dis 1991; 13: 359-72.
12. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero JD. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 221-5.
13. Casao MA, Navarro E, Solera J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. J Infect 2004; 49: 102-8.
14. Bilgehan H. Brusellozda aglütinasyon blokajının Coombs deneyi ile ortaya çıkarılması, s: 228. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 1995, 2.baskı. Barış Yayınları, İzmir.
15. Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallares R, Gudiol F. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. J Infect Dis 1988; 157: 5.
16. Smiths HL, Basahi MA, Diaz R, et al. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 4179-82.
17. Altuglu I, Zeytinoglu A, Bilgic A, et al. Evaluation of *Brucella* dipstick assay for the diagnosis of acute brucellosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44: 241-3.
18. Zeytinoglu A, Turhan A, Altuglu I, et al. Comparison of *Brucella* immunoglobulin M and G flow assay with serum agglutination and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of brucellosis. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 180-4.
19. Smiths HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. Clin Diagn Lab Immun 2003; 1141-6.
20. Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, et al. Use of *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. Am J Trop Med Hyg 2004; 70: 688-94.
21. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. J Hyg 1986; 97: 457-69.
22. Araj GF, Kaufmann AF. Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA to *Brucella melitensis* major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. J Clin Microbiol 1989; 27: 1909-12.
23. Araj GF. Profiles of *Brucella*-specific immunoglobulin G subclasses in sera of patients with acute and chronic brucellosis. Serodiag Immunother Infect Dis 1988; 2: 401-10.
24. Ciftci C, Ozturk F, Oztekin A, et al. Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis. Mikrobiyol Bul 2005; 39: 291-9.
25. Memish ZA, Almuneef M, Mah MW, Qassem LA, Osoba AO. Comparison of the *Brucella* standard agglutination test with the ELISA IgG and IgM in patients with *Brucella* bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44: 129-32.

26. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A, et al. Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *J Infect* 1998; 36: 85-92.
27. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3245-8.
28. Araj GF, Kattar MM, Fattouh LG, Bajakian KO, Kobeissi SA. Evaluation of the PANBIO *Brucella* immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12: 1334-5.
29. 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.
30. 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; 118: 252-4.