

Brusellozun serolojik tanısında yeni bir yöntem: İmmuncapture aglutinasyon testi

Mehmet Özdemir, Metin Doğan, Bülent Baysal

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

Amaç: İnsanda brusellozun serolojik tanısında kullanılan çeşitli testler vardır. En sık kullanılanları Standart Tüp Aglutinasyon ve Coombs anti-brusella testleridir. Çalışmadaki amacımız immuncapture aglutinasyon testinin tanı değerini (Brucellacapt) Standart Tüp Aglutinasyon ve Coombs anti-brusella testi ile karşılaştırarak araştırmaktır. **Yöntem:** Klinik olarak bruselloz şüphesi olan 74 hastanın serumu çalışmaya dahil edildi. Bu serumlarda Rose Bengal, Standart Tüp Aglutinasyon, Coombs anti-brusella testi ve Brucellacapt testleri çalışıldı. **Bulgular:** Brucellacapt testi, Coombs anti-brusella testi ile uyumlu bulunurken SAT ile istatistik olarak uyumsuz sonuçlar verdiği saptandı ve bulunan titreler Brucellacapt testinde daha yüksek idi. **Sonuç:** İmmuncapture aglutinasyon testi (Brucellacapt), Coombs anti-brusella testine benzer sonuçlar vermektedir. Bu test brusellozun tanı ve takibinde blokan antikoları da tespit etmesi nedeniyle kullanılabilir bir testtir.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, immuncapture, serolojik tanı

A new method in the diagnosis of Brucellosis: Immuncapture agglutination test

Objective: The methods mostly used in the diagnosis of brucellosis are Standard Tube Agglutination and Coomb's anti-brucella test. The aim of this study is to investigate and compare immunocapture agglutination test with Standard Tube Agglutination and Coomb's anti-brucella test. **Methods:** 74 serum samples of brucellosis suspected patients were included in this study. Rose Bengal, Standard Tube Agglutination, Coomb's anti-brucella test and immunocapture agglutination tests were performed to these serum samples. **Results:** It was found that immunocapture agglutination test was correlated with Coomb's anti-brucella test but not with Standard Tube Agglutination. The titrations obtained with brucellacapt were higher compared to other methods. **Conclusion:** Immunocapture agglutination test gives similar results to Coomb's anti-brucella test. Brucellacapt is a convenient test for diagnosis and follow up of brucellosis with an advantage of detecting blocking antibodies.

Key words: Brucellosis, immunocapture, serological diagnosis

Genel Tıp Derg 2007;17(1):9-13

Bruselloz bir zoonoz olup, hayvanlardan insanlara bulaşarak bir çok sistemi tutan ve büyük farklılıklar gösteren klinik bulgularla seyreder. Yüksek ateş, splenomegali, gece terlemesi, eklem ağrısı gibi belirti ve bulgularla seyredebildiği gibi, romatizmal ve psikiyatrik hastalıkları taklit edebilen klinik tablolara da yol açabilen bir hastalıktır (1). *Brucella*, Gram negatif boyanan, hareketsiz, sporsuz, organizmadan yeni ayrıldıklarında mikrokapsüllü, aerop,

mikroaerofil, kokobasil şeklinde bir bakteridir (2). Kültürden mikroorganizmanın izole edilmesi hastalığın tanısını kesinleştirir fakat bu yöntemin duyarlılığı hastalığın evresine bağlı olarak %30 ile % 90 arasında değişmektedir (3). Kültür negatif olgularda klasik serolojik testlerle antikoların araştırılması Bruselloz tanısında önemli yer tutmaktadır (4,5). Hastalıkta antikolar iki hafta sonra oluşmaya başlar. Hayvancılıkla uğraşanlarda brusella bakterileriyle karşılaşmaya bağlı olarak hastalık olmaksızın 1/80 titrede antikor bulunabilir. IgM tipi antikolar bir haftada ortaya çıkıp üç ayda en yüksek düzeylere ulaşır. IgG antikoları ise üç haftada ortaya çıkar ve altı sekiz haftada en yüksek düzeylere ulaşır. Blokan antikolarının araştırılması için Coombs testine ihtiyaç vardır. Prezon olayının ortadan

Yazışma adresi: Dr. Mehmet Özdemir Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

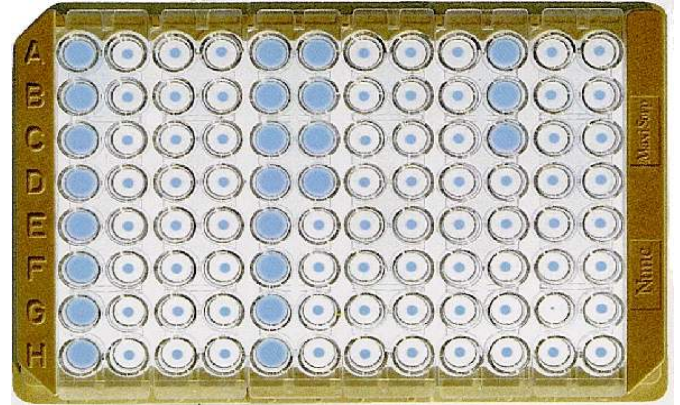
e-posta: mehmetozdem@yahoo.com

kaldırılması için dilüsyonların oldukça ileri oranlarda yapılması gerekmektedir (6). Son yıllarda “sandwich ELISA” sistemine dayanan immunocapture aglütinasyon testi kullanıma girmiştir. Brucellacapt yönteminde, kuyucuklar insan kaynaklı IgG, IgM, IgA antikorlarına karşı antikorlarla (Coombs antikorları) kaplıdır. Test brusellaya karşı oluşan üç antikor da tespit eder. Brucellacapt, kuyucuklarda gerçekleşen ve Coombs antiserumu ile yapılan brusella aglütinasyon testidir.

Yöntem

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen bruselloz şüpheli 74 hastanın serum örneği çalışmaya dahil edildi. Hasta serumları için Rose Bengal testi (Tulip Diagnostics Ltd, India), Standart Tüp Aglütinasyon (SAT) (Tulip Diagnostics Ltd, India), Coombs anti-brusella (Tulip Diagnostics Ltd, India) testleri çalışıldı. Bu testlerden herhangi birinde aglütinasyon izlenince serumlar tekrar çalışıncaya kadar -20°C de saklandı. Immunocapture testi, SAT, Coombs anti-brucella testleri her serum örneğinde eş zamanlı olarak çalışıldı. Dilüsyonlar 1/5120 oranlarına kadar yapıldı. Immunocapture aglütinasyon testi şu şekilde çalışıldı: Bütün reaktifler oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Mikroplakta ilk kuyucuğa 95 µl, diğer kuyucuklara 50 µl serum dilüenti konuldu. İlk kuyucuğa 5 µl serum pipetleyip karıştırıldı. Bu kuyucuktan 50 µl alıp sıra ile dilüsyon yaparak en son 50 µl dışarı atıldı. Bütün kuyucuklara 50 µl Brucella antijeni ilave edildi. Üzerini kutuda bulunan koruyucu bant ile kapatıp kuyucuklarda bulunan sıvının kurumaması ve gerekli reaksiyonun gerçekleşmesi için plak nemli ortamda 18-24 saat 37°C’de inkübe edildi. Sonuçlar ilk kuyucuk 1/40 titrasyon olmak üzere 1/5120 titrasyona kadar dilüsyon yapıldı ve kuyucuklar gözle değerlendirildi. İncelenen serumda brusella antikorları yoksa antijenler duvara bağlanmadan dibe çöktüğünden mavi nokta şeklinde görüldü. Mavi nokta şekli negatif, kuyucuğun iç yüzeyine yapışık homojen mavi görüntü pozitif olarak değerlendirildi (şekil 1). Bu üç yöntemle bulunan titrelerde 1/160 ve üzeri değerler pozitif kabul edildi. Sonuçlar, SPSS for Windows10.0 programının paired t test metoduyla analiz edildi.

Şekil 1. Brucellacapt testinde pozitif ve negatif reaksiyonlar



Bulgular

Bu çalışmadaki 74 hastadaki dört farklı test ile çalışılan serumlarda elde edilen sonuçlar tablo 1’de, Immuncapture ve STA testi karşılaştırması tablo 2’de ve Immuncapture ve Coombs testi karşılaştırması tablo 3’de verilmiştir.

İstatistiksel incelemede kullanılan paired t test metoduyla üç testin sonucunun uyumu analiz edildi:

Grup I (SAT), Grup II (Coombs) ve Grup III (Brucellacapt). Grup I-II arasında yapılan analiz sonuçlarına göre % 95 güven aralığında paired t- testi sonuçlarına göre t değeri -6,103, korelasyon 0,491, p=0,000 bulundu. Buna göre Grup I-II arasındaki değerler istatistik olarak uyumlu bulunmamıştır. Grup I-III arasında % 95 güven aralığında yapılan paired t- testi analiz sonuçlarına göre t değeri -6,666, korelasyon 0,442, p=0,000 bulundu. Buna göre Grup I-III arasındaki değerler istatistik olarak uyumlu bulunmamıştır. Grup II-III arasında % 95 güven aralığında yapılan paired t- testi sonuçlarına göre t değeri -1,756, korelasyon 0,901, p=0,083 bulundu. Buna göre Grup II-III arasındaki değerler istatistik olarak uyumlu bulunmuştur

Tartışma

Brucella aglütinasyon testleri brusellozun teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Rose Bengal deneyi tarama amacıyla kullanılan testlerdendir. Olumlu bulunan testler tüp aglütinasyon ve dilüsyon deneyleriyle yeniden değerlendirilmelidir. Aglütinasyon deneylerinde olumsuz sonuçlarla karşılaşılmaması sık karşılaşılan olaylardır. Blok antikorlar varsa bunu ortaya çıkarmanın yollarından biri Coombs.

Tablo 1. Çalışılan hasta serumlarının testlere göre sonuçları

Rose Bengal		SAT		Coombs		Immuncapture	
Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
51	23	28	46	53	21	57	17

Tablo 2. SAT ve Brucellacapt metoduyla çalışılan serum titrelerinin ilişkisi

Brucellacapt titre	SAT titre sayısı									
	0	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
0	9									
20										
40	3									
80	1	1		1						
160	3	1								
320	5		5	2		2				
640	2		1	3	1					
1280	2			1	4	1				
2560					2	4				
5120	3		1	2	1	2	4	2	5	

Tablo 3. Coombs ve Brucellacapt metoduyla çalışılan serum titrelerinin ilişkisi

Brucellacapt titre Sayısı	Coombs titre Sayısı									
	0	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
0	8			1						
20										
40	3									
80	1		1	1						
160				1	3					
320				5	5	4				
640	1				3	3				
1280						4	3	1		
2560					1	1	4			
5120					3	1	2	4	9	1

deneyidir (4). Brucellacapt deneyi ise “sandwich ELISA” metoduna dayalı immunocapture aglütinasyon testi olup antijen antikor birleşmesini gösteren bir testtir. Bu yeni testin yalancı

negatifliklerin ortaya çıkartılmasındaki etkinliği ve rutin kullanımda yerinin araştırılması önem arz etmektedir

Laboratuvarımızda yaptığımız bu çalışmada 1/160 ve üzeri titreler pozitif kabul edildiğinde Brucellacapt testi ile Coombs testleri arasında istatistiksel uyumluluk bulunmuştur. İki hastada brucellacapt testinin pozitif bulduğu serum titresini Coombs testi negatif bulmuştur. Pozitif bulunan serumlardaki titreler brucellacapt ile daha yüksek saptanmaktadır. Bu durum pozitif titrelerin kabul edilmesinde, pozitiflik değerinin ne olması gerektiğini tartışmaya açmaktadır. Serum tüp aglütinasyon testi ile karşılaştırıldığında inkomplete antikorlar sebebiyle uyumsuzluk söz konusudur. Bu istatistiksel uyumsuzluk SAT ile Coombs arasında da görülmektedir.

Ordun ve arkadaşlarının (7) 78 akut ve 4 kronik hastadan alarak 884 serum örneğinde yapmış oldukları çalışmada, başlangıç serumlarında, brucellacapt testi ve Coombs testleri ile 82 hasta pozitif bulunurken, SAT ile 75 hasta pozitif bulunmuştur. 1/160 ve üzeri titreler pozitif alındığında brucellacapt testi, Coombs testi ve SAT'nin sensitivite sırasıyla, % 95.1, % 91.5 ve % 65.8 bulunmuştur. Serum titrasyonları da brucellacapt testinde daha yüksek saptanmıştır. Bu da çalışmamızdaki sonuçlarla uyumludur.

Casao ve arkadaşlarının (6) yaptığı bir çalışmada 123 serum örneğinde brucellacapt testi ile Coombs testi arasında uyumluluk oranı çok yüksek değil iken, bizim çalışmamıza benzer şekilde titrasyonlarda yükseklik bulunmuştur. SAT testi ile uyumları ise düşük bulunmuştur. Brucellacapt testi ve Coombs testleri arasında korelasyon ($r=0.14$), brucellacapt testi ile SAT arasında korelasyon ($r=0.0$), Coombs ile SAT arasında korelasyon ($r=0.8$) bulunmuştur. En yüksek korelasyon SAT ve Coombs arasında olduğu saptanmıştır.

Ardıç ve arkadaşlarının (8) yapmış oldukları bir çalışmada 1/160 ve üzeri titreler pozitif kabul edildiğinde Coombs ve SAT'nin her ikisinde de %80 pozitiflik bulunurken brucellacapt testinde %87'lik pozitiflik bulunmuştur.

Prado ve arkadaşlarının (9) yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada immunocapture-aglütinasyon testi (Brucellacapt), SAT ve Coombs anti-Brucella testi, IgG, IgA ve IgM ELISA testleri ile karşılaştırılmıştır. Tanısal amaçlı test olarak immunocapture-aglütinasyon testi (Brucellacapt) ile Coombs anti-

brucella testinin duyarlılık ve özgüllüklerinin benzer olduğu saptanmış, tedavinin izlenmesinde de bu iki testle saptanan antikor titreleri birbirine yakın bulunarak; elde edilen sonuçların birbiriyle iyi bir korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır (9).

Gomez ve arkadaşlarının (10) yapmış oldukları çalışmada ise Brucellacapt testi ve Coombs testi arasında negatif ve pozitif serum örneklerinde direkt bir korelasyon görülmüştür. Pozitif serumlarda Brucellacapt testi ile Coombs testi titreleri arasında ise bir veya iki dilüsyon aralığında benzer sonuçlar alınmıştır (10)

Serra ve arkadaşlarının (11) yapmış oldukları başka bir çalışmada brusellozun tanı ve takibinde Brucellacapt ve Coombs testinin sensitivite ve spesifisite bakımından arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir ve brusellozlu hastaların takibinde sonuçların benzer olduğu kanaatine varılmıştır(11).

Sonuç

Bu üç yöntem içinden serum örneklerinde en yüksek titre veren yöntem Immunocapture aglütinasyondur. Bu test tüp aglütinasyonu ve Coombs anti-brusella testini bir arada yapmaktadır ve brusellaya karşı oluşan IgG yanında, IgM, IgA antikorlarını da tespit eder. Brusellozun klinik takibinde 1/160 ve daha yüksek titreler önemlidir. Bu titreyi değiştirebileceği için inkomplete antikorların da tespiti önem kazanmaktadır. Immunocapture aglütinasyon (brucellacapt) yönteminin blokan antikorları da yakalayarak yüksek titrede antikor tespit etmesi brusellozun tanı ve takibinde tedavinin izlenmesi açısından güvenle kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

Kaynaklar

1. Gotuzzo E, Cellillo C. Brucella. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases. 2nd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1992; 1513-21.
2. Bilgehan H. Çeşitli Patojen Bakteriler. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir : Barış Yayınları, 2002; 475-8.
3. Baysal B. Brusellozun Laboratuvar Tanısı. In: Cengiz T editor. Prof. Dr. Kemal Özsan Tıp Günleri-1 Bruselloz Simpozyumu özet kitabı;54-6.
4. Bilgehan H. Bruselloz Tanısında Aglütinasyon. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Barış Yayınları, 2002; 223-8.
5. Baysal B. Brucella. In: Ustaçelebi Ş (ed.); Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Ankara Güneş Kitabevi 1999:571-7.

6. Casao MA, Navarro E, Solerab J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect* 2004; 49: 102-8.
7. Ordun A, Almaraz A, Prado A, Purificacio M, Gutierrez N, Garcia-Pascual A, et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:4000-5.
8. 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* 2005;118:252-4.
9. Prado A, Gutierrez P, Duenas A. Serological follow-up of brucella patients using an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt), Coombs anti-Brucella and LPS-ELISA tests. *Clin Microbiol Infect* 2001;1:13-94.
10. 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.
11. Serra J, Velasco J, Godoy P, Mendoza C. Can the Brucellacapt test be substituted for the Coombs test in the diagnosis of human brucellosis? *Enferm Infec Microbiol Clin* 2001;19:202-5.