

Bruselloz tanısında yeni bir yöntem: Brucella coombs gel test*

Hatice Türk Dağı, Duygu Fındık

Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

Özet

Amaç: Bruselloz Brucella cinsi bakterilerin etken olduğu, özellikle gelişmekte olan ülkelerde insanlarda ve hayvanlarda yaygın olarak görülen endemik bir zoonozdur. Brusellozun tanısında mikroorganizmanın kültürde üretilmesi altın standart olmasına rağmen izolasyon oranı çok düşüktür. Bu nedenle serolojik yöntemler daha sık kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı yeni geliştirilen Brucella Coombs Gel testi ile brusellozun serolojik tanısında standart yöntem olan Coombs'lu Standart Tüp Aglutinasyon testini (STA) karşılaştırmaktır.

Gereç ve yöntem: Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde bruselloz ön tanısı alan 74 hastanın serum örneği çalışmaya dahil edildi. STA (Spinreact, İspanya) testi 1/40-1/5120 arası dilüsyonlarda çalışıldı. 24 saat inkübasyondan sonra aglutinasyon görülmeyen tüplere Coombs testi uygulandı. Brucella Coombs Gel testi firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Her iki testte de 1/160 ve üstündeki titreler pozitif kabul edildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan 74 serum örneğinin 56'sında (%75.7) Coombs'lu STA testi ile 53'ünde (%71.6) Brucella Coombs Gel testi ile pozitiflik saptanmıştır. Coombs'lu STA testi ile karşılaştırıldığında Brucella Coombs Gel testinin duyarlılığı %94.6, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri %85.7 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak bu çalışmada, Brucella Coombs Gel testinin brusellozun tanısında ve takibinde kullanılan serolojik testlerden Coombs testi ile benzer performansa sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Bruselloz, Brucella Coombs Gel test, Coombs, Standart tüp aglutinasyon

Abstract

Objectives: Brucellosis caused by Brucella genus is an endemic zoonosis which is widely seen in humans and animals especially in developing countries. Although the growth of the microorganism in culture is a gold standard in diagnosis of brucellosis, the isolation rate is very low. Thus, the serological methods are commonly used. This study aims to compare the newly developed Brucella Coombs Gel test with standard tube agglutination (STA) test with Coombs that is the standard method in the serological diagnosis of brucellosis.

Material and methods: The serum samples of 74 patients diagnosed with brucellosis in the various clinics of Selçuk University, Faculty of Medicine Hospital were included in the study. STA test (Spinreact, Spain) was studied between 1/40-1/5120 dilutions. After 24 hours of incubation, Coombs test was applied to the tubes invisible agglutination. Brucella Coombs Gel test was performed in accordance with companies recommendations. >1/160 titers were considered as positive in both tests.

Results: 56 (75.7%) and 53 (71.6%) of 74 patients included in the study were positive in STA test with Coombs and Brucella Coombs Gel test respectively. When compared to STA test with Coombs, the sensitivity, specificity, positive predictive and negative predictive values of Brucella Coombs Gel test were 94.6%, 100%, 100% and 85.7% respectively.

Conclusion: Brucella Coombs Gel test has performance similar to Coombs test is serological test used in the diagnosis and monitoring of brucellosis

Keywords: Brucellosis, Brucella Coombs Gel test, Coombs, Standard tube agglutination

Genel Tıp Derg 2016;26(1):19-22

Alınan: 24.08.2015 / 12.02.2016 / Yayınlanma 29.04.2016

Yazışma adresi: Dr. Hatice Türk Dağı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Alaeddin Keykubad Kampüsü, Konya

E-posta: haticeturkdagi@yahoo.com

Giriş

Bruselloz, Brucella cinsi bakterilerin etken olduğu, özellikle gelişmekte olan ülkelerde insanlarda ve hayvanlarda yaygın olarak görülen endemik bir zoonozdur. Bruselloz, kontamine gıdalarla etkenin ağız yoluyla alınması, deri ve mukozadaki sıyrıklar yoluyla infekte hayvanlarla direkt temas veya infekte materyalin inhalasyonu ile bulaşır. Hastalık septisemik ateşli hastalık şeklinde görülebilir veya lokalize olarak kemik, doku ve diğer organları

tutabilir (1-3). Değişken semptomlar, ayırt edici fiziksel bulguların yetersizliği ve hastalığın hem akut ve hem de kronik aşamalarında subklinik ve atipik formların görülmesi brusellozda klinik tanıyı zorlaştırır. Bruselloz tanısında mikroorganizmanın kültürde üretilmesi altın standart olup hem bakteri tanımlanması hem de antibiyotik duyarlılık testine olanak sağlar (4, 5). Bruselloz tanısında nükleik asit amplifikasyon testleri ya da antijenlerin tespiti yeni bruselloz olguları için diagnostik olmakla birlikte DNA'nın başarılı bir tedaviden sonra bile olguların kanında bulunması bruselloz nüksünü belirlemek için yararlı değildir (6, 7). Brucella kültürünün zor, riskli ve bakterilerin izolasyon oranlarının düşük olması nedeniyle serolojik yöntemler daha sık kullanılmaktadır. Rose Bengal testi, standart tüp aglütinasyon testi (STA), Coombs'lu STA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ve immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) yaygın kullanılan serolojik testlerdir (8, 9). Rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmakta olan bu testlerin özgüllük ve duyarlılıkları farklılıklar gösterdiği için testlerin kombinasyonları kullanılmaktadır (10). Bu nedenle basit, hızlı ve kesin tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir (11). Bu çalışmanın amacı brusellozun serolojik tanısında standart yöntem olan Coombs'lu STA ile yeni geliştirilen Brucella Coombs Gel testini karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen bruselloz ön tanılı 74 hastanın serum örneği çalışmaya alındı. STA (Spinreact, İspanya) testi son dilüsyon 1/40-1/5120 olacak şekilde çalışıldı. 24 saat inkübasyondan sonra aglütinasyon vermeyen tüplere Coombs testi uygulandı. 1/160 ve üstündeki titreler pozitif kabul edildi.

Brucella Coombs Gel testi (ODAK, İSLAB, Türkiye) firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Serum örnekleri serum dilüent ile dilüsyon pleytinde 1/20'den 1/2560'a kadar dilüe edildi. Her dilüsyona eşit hacimde brucella antijeni eklendi ve son dilüsyon ilk tüpte 1/40 son tüpte 1/5120 olacak şekilde değerlendirildi. Dilüe edilmiş serumlar, içinde anti-human IgG eklenmiş jel matrisi bulunan mikrotüplere pipetlendi. 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve aglütinasyon değerlendirildi. Pembe renkli brucella antijenleri tüpün dibine çökmüşse negatif, pembe renkli antijen-antikor kompleksi jelin üstünde kalırsa pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. 1/160 ve üstündeki titreler pozitif kabul edildi.

Brucella Coombs Gel testinin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD) Coombs'lu STA testi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Tablo 1. Coombs'lu Standart Tüp Aglütinasyon Testi ve Brucella Coombs Gel Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Coombs'lu STA	Brucella Coombs Gel Test Dilüsyonları									
	<1/40	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	Toplam
<1/40	15									15
1/40		2								2
1/80			1							1
1/160			1	2	1					4
1/320			2	2	3	1				8
1/640				1	3	9	1			14
1/1280						1	9	2		12
1/2560							3	7	2	12
1/5120								1	5	6
Toplam	15	2	4	5	7	11	13	10	7	74

BULGULAR

Çalışmaya alınan 74 hastanın 56'sında (%75.7) Coombs'lu STA testi ile 53'ünde (%71.6) Brucella Coombs Gel testi ile pozitiflik saptanmıştır. 18 hasta her iki testte de negatif olarak tespit edilirken üç hasta Coombs'lu STA testi ile pozitif Brucella Coombs Gel Testi ile negatif olarak be-

lirlenmiştir. Coombs'lu STA testi ile karşılaştırıldığında Brucella Coombs Gel Testi'nin duyarlılığı %94.6, özgüllüğü %100, PPD %100 ve NPD %85.7 olarak bulunmuştur. Coombs'lu STA ve Brucella Coombs Gel testleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması tablo 1'de sunulmuştur.

Tartışma

Brusellozun dünya çapında yaygınlığı ciddi halk sağlığı sorunları ve ekonomik kayba neden olmaktadır. Multisistem tutulum, değişken ve sıra dışı klinik hastalığın tanısında önemli zorluklar oluşturmaktadır. Tanıda Brucella'ya özgü testlere ek olarak non-spesifik hematolojik ve biyokimyasal testler kullanılmaktadır (4, 12). Serolojik testler hızlı, güvenli ve hassastır ve bu nedenle rutin klinik uygulamada daha çok tercih edilir. Bruselloz tanısında kullanılan standart serolojik test, STA testidir. Testin en önemli dezavantajı hastalığın erken döneminde, blokan antikorlar varlığında ve prezon olayında yalnızca negatif sonuçlar çıkmasıdır. Blokan veya inkomplet antikor varlığında Coombs serumu (anti-human globulin) kullanılarak seropozitifliğin ortaya çıkması sağlanır (13, 14). SAT ve Coombs testlerinin emek yoğun olması ve 24-48 inkübasyon gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı kısa zamanda güvenilir sonuç veren testler geliştirilmektedir.

Son zamanlarda geliştirilen Brucellacapt testi immunocapture aglütinasyon tekniği ile kuyucuklarda gerçekleştirilen bir Coombs'lu brusella aglütinasyon testidir (13, 14). Brucellacapt titreleri hastalığın evresinden bağımsız enfeksiyon aktivitesinin iyi bir belirteçidir. Brucellacapt titreleri başarılı antibiyotik tedavisinden sonra SAT titrelerine göre belirgin bir düşüş gösterir (15). Hindistan'da yapılan bir çalışmada 48'i kültür ile doğrulanmış 211 bruselloz şüpheli hastada; STA sadece 21 (%9.9), Coombs 69 (%32.7), Immunocapture 76 (%36) hastada pozitif olarak bulunmuştur. Immunocapture tekniğinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %97.29 ve %97.08 olarak saptanmıştır (16). Türkiye'den bir çalışmada Immunocapture testinin duyarlılığı %90.6, özgüllüğü %76.3, PPD %64.2 ve NPD %65.9 olarak bulunmuştur. Brucellacapt testi ve Coombs testinin uyumu düşük bulunmuştur (17).

ELISA testleri anti-Brucella IgM ve IgG antikorlarını tespit etmek için rutin klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır. ELISA akut SAT'a benzer sonuçlar göstermektedir, ancak kronik ve iyileşmiş olgularda daha duyarlıdır. IgM sonuçları IgG düzeyleri yüksek olduğunda yanlış negatif ve romatoid faktör varlığında yanlış pozitif olabilir. IgM ve IgG sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ELISA'nın duyarlılığını artırabilir (18). ELISA testlerinin performansı farklı çalışmalarda değişmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, hastalığın süresine göre IgG'nin arttığı ve brusellozun akut, subakut ve kronik dönemlerinde IgG pozitifliğinin sırasıyla % 76, % 90 ve % 100 oranlarında olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda IgM sonuçları brusellozun klinik tipleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gösterdiği ve IgM'in akut bruselloz tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir (19). ELISA IgM ve IgG'nin duyarlılıklarını Sirmatel ve ark. (20) sırasıyla %61.9 ve %

49.5, Özdemir ve ark. (17) % 73.7 ve % 72.2 olarak tespit etmişlerdir. Ancak ELISA IgG testini duyarlılığını (% 97.1) IgM'den (%71.4) daha yüksek saptandığı çalışmalar da bulunmaktadır (21).

Brusellozun serolojik tanısında standart yöntem olan Coombs'lu STA ile Brucella Coombs Gel testini karşılaştırdığımız bu çalışmada, 74 hastanın 56'sında (%75.7) Coombs'lu STA testi 53'ünde (%71.6) Brucella Coombs Gel testi pozitif bulunmuştur. Coombs'lu STA testi ile pozitif olarak saptanan 3 örnek (ikisi 1/320 titrede, biri 1/160 titrede) Brucella Coombs Gel testi ile negatif (1/80) olarak belirlenmiştir. 18 hasta her iki testte de negatif olarak tespit edilmiştir. Coombs'lu STA testi ile karşılaştırıldığında Brucella Coombs Gel Testi'nin duyarlılığı %94.6, özgüllüğü %100, PPD %100 ve NPD %85.7 olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada Coombs'lu STA testi ile pozitif ($\geq 1/160$) bulunan 31 ve düşük titre/negatif (0-1/80) bulunan 69 örnek diğer testlerle karşılaştırılmıştır. 31 örnek her iki test ile de pozitif iken, Brucella Coombs Gel Testi pozitif (1/160) bir örnekte Coombs'lu STA testi düşük titre/negatif (1/80) saptanmıştır. Testler arasındaki uyum analizinde kappa değeri, Coombs'lu STA testi ile Brucella Coombs Gel Testi için 0.977 olarak hesaplanmış ve mükemmel uyum olarak değerlendirilmiştir (22).

Sonuç olarak bu çalışmada, Brucella Coombs Gel testinin brusellozun serolojik tanısında altın standart olan Coombs'lu STA testi ile karşılaştırıldığında benzer performansla sahip olduğu görülmüştür. Brucella Coombs Gel testi endemik bölgelerde brusellozun tanısı için iyi bir seçim olabilir.

Kaynaklar

1. EJ Y. Brucella species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 2005: 2669-72.
2. Hussein MZ, Abou-Elnoeman SA, Al-Fikky AA, El-Samadouny EI, Shaaban AAM. Evaluation of Rose Bengal Test, Standard Tube Agglutination Test and Nested PCR for the diagnosis of Human Brucellosis. Egypt J Med Microbiol 2006;15:249-56.
3. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet Microbiol 2010;140:392-8.
4. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents 2010;36:12-7.
5. Aliskan H. The value of culture and serological methods in the diagnosis of human brucellosis. Mikrobiyol Bul 2008;42:185-95.
6. Vrioni G, Pappas G, Priavali E, Gartzonika C, Levdiotiou S. An eternal microbe: Brucella DNA load persists for years after clinical cure. Clin Infect Dis 2008;46:e131-6.

7. Maas KS, Mendez M, Zavaleta M, et al. Evaluation of brucellosis by PCR and persistence after treatment in patients returning to the hospital for follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:698-702.
8. Gomez MC, Nieto JA, Rosa C, et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1031-3.
9. Asaad AM, Alqahtani JM. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *J Infect Public Health* 2012;5:189-94.
10. Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. Diagnosis of brucellosis. *Open Vet Sci J* 2010;4:46-60.
11. Patra KP, Saito M, Atluri VL, et al. A protein-conjugate approach to develop a monoclonal antibody-based antigen detection test for the diagnosis of human brucellosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2926.
12. Bayram Y, Korkoca H, Aypak C, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates from various clinical specimens. *Int J Med Sci* 2011; 8:198-202.
13. Ulu Kiliç A, Metan G, Alp E. Clinical Presentations and Diagnosis of Brucellosis. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013;8:34-41.
14. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Pri-lozi* 2010; 31:65-89.
15. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech* 2013;32:177-88.
16. Mantur BG, Amarnath SK, Parande AM, et al. Comparison of a novel immunocapture assay with standard serological methods in the diagnosis of brucellosis. *Clin Lab* 2011;57:333-41.
17. Ozdemir M, Feyzioglu B, Kurtoglu MG, Dogan M, Dagi HT, Yuksekkaya S, et al. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis. *Int J Med Sci* 2011;8:428-32.
18. Fadeel MA, Hoffmaster AR, Shi J, Pimentel G, Stoddard RA. Comparison of four commercial IgM and IgG ELISA kits for diagnosing brucellosis. *J Med Microbiol* 2011;60:1767-73.
19. Pabuccuoglu O, Ecemis T, El S, Coskun A, Akcali S, Sanli-dag T. Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:272-6.