

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE  
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***BRUCELLA ENFEKSİYONLARININ TANISINDA KULLANILAN  
SEROLOJİK TESTLERİN TANİ DEĞERLERİ***

*TEZ YÖNETİCİSİ*  
*(Prof.Dr. İbrahim BAYDAR)*

Dr. Mesih TÜRKER  
(UZMANLIK TEZİ)  
GAZİANTEP / 1995

<u>KONU</u>	<u>SAYFA</u>
1. İÇİNDEKİLER.....	1
2. TABLO-ŞEKİL LİSTESİ.....	2
3. TEŞEKKÜR.....	3
4. METİN	
a) GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
b) GENEL BİLGİLER.....	5
c) GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
d) BULGULAR.....	31
e) TARTIŞMA.....	44
f) SONUÇ.....	52
5. TÜRKÇE ÖZET.....	54
6. YABANCI DİLDE ÖZET.....	55
7. KAYNAKLAR.....	56

## İÇİNDEKİLER:

GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
GENEL BİLGİLER.....	5
A) BAKTERİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	6
B) EPİDEMİYOLOJİ.....	9
C) PATOJENEZ VE PATOLOJİ.....	10
D) KLİNİK BULGULAR.....	11
E) KONAK İMMUNİTESİ.....	14
F) TANI.....	14
I) BAKTERİYOLOJİK TANI.....	14
II) SEROLOJİK TANI.....	15
Standart Tüp Aglutinasyon Testi (STAT).....	16
Plate Test.....	17
Rose Bengal Plate Test (RBPT).....	18
2-Merkaptoetanol veya Rivanol'ü Aglutinasyon Testleri.....	19
Coombs Serumu ile Yapılan Tüp Aglutinasyon Testi.....	20
Kompleman Birleşmesi Testi.....	21
Spot Test.....	21
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	22
İndirekt Floresan Antikor Testi.....	23
Radio İmmunoassay (RIA).....	24
Sütlerde Antikor Arama Yöntemleri.....	24
III) ALLERJİK TANI.....	24
IV) HAYVAN DENEYLERİ.....	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
A) GEREÇLER.....	26
B) YÖNTEM.....	27
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA.....	44
SONUÇ.....	52
ÖZET.....	54
YABANCI DİLDE ÖZET.....	55
KAYNAKLAR.....	56

## TABLO-ŞEKİL LİSTESİ:

Tablo I: Brucella Bakterilerinin Aralarındaki Ayrılıklar.....	8
Tablo II : Brucella Kan Kültürü Pozitif 21 Hastaya Ait Serolojik Testlerin Sonuçları.....	31
Tablo III: Bruselloz Geçirmemiş 20 Sağlıklı İnsana Ait Serolojik Testlerin Sonuçları.....	32
Tablo IV: ELISA ile Brucella-IgG ve Brucella-IgM Antikorları İncelenen 21 Serumun Absorbans Değerleri.....	34
Tablo V : STAT ve ELISA-IgM Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	35
Tablo VI : STAT ve ELISA-IgG Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	35
Tablo VII : STAT ve Lam Aglutinasyonu (B.abortus) Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	38
Tablo VIII : STAT ve Lam Aglutinasyonu (B.melitensis) Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	38
Tablo IX : Lam Aglutinasyonu (B.abortus) ve ELISA-IgM Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	39
Tablo X : Lam Aglutinasyonu (B.abortus) ve ELISA-IgG Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	39
Tablo XI : Lam Aglutinasyonu (B.melitensis) ve ELISA-IgM Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	40
Tablo XII : Lam Aglutinasyonu (B.melitensis) ve ELISA-IgG Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	40
Tablo XIII : Lam Aglutinasyonu (B.abortus) ve Lam Aglutinasyonu (B.melitensis) Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	41
Tablo XIV : ELISA-IgM ve ELISA-IgG Testlerinin Karşılıklı Sonuçları.....	41
Şekil 1: ELISA ile IgG Değerleri İncelenen 21 Serumun Absorbans ve STAT Titrelelerinin Dağılımı .....	36
Şekil 2: ELISA ile IgM Değerleri İncelenen 21 Serumun Absorbans ve STAT Titrelelerinin Dağılımı .....	37
Şekil 3: STAT Dilüsyonlarına Karşılık Gelen ELISA-IgG Absorbans Değerleri.....	42
Şekil 4: STAT Dilüsyonlarına Karşılık Gelen ELISA-IgM Absorbans Değerleri.....	43

## TEŞEKKÜR

*Uzmanlık öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yetişmemizde büyük fedakarlık gösteren, gayret sarfeden ve tez çalışmalarım da konu seçiminden tezin sonuçlanmasına kadar sabır ve hoşgörü ile yardımını gördüğüm değerli hocam Prof.Dr. İbrahim Baydar'a minnet ve şükranlarımı sunarım.*

*Anabilim dalında çalışma sürem boyunca yetişmemde büyük emeği geçen, olgunluğu ve idareciliği ile bize örnek olan Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Yrd.Doç.Dr. Fatma Sırmatel'e teşekkürü borç ve vazife bilirim.*

*Anabilim dalında çalıştığım süre boyunca samimi ilgilerini, yakınlıklarını ve yardımlarını esirgemeyen öğretim üyesi, araştırma görevlisi, hemşire, laborant ve personel tüm mesai arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.*

**Dr. Mesih TÜRKER**

## GİRİŞ VE AMAÇ:

Bruselloz, günümüzde dünyanın birçok bölümünde özellikle Akdeniz ülkeleri ve Ortadoğu'da ortak bir infeksiyon hastalığı olarak durmaktadır. Bir zoonoz olan bu hastalık, direkt temasla veya hasta hayvanların et, süt ve süt ürünleri ve ayrıca solunum yolundan insanlara geçmektedir. Süt endüstrisinin her geçen gün büyümesinin yanında süt ve süt ürünleri ile infekte gıdaların tüketiminin artması da bu hastalığın güncelliğinin devam etmesine yol açmaktadır.

Hastalığın klinik tablosunun her zaman tipik seyretmemesi ve belirtilerinin non-spesifik olması yanında hekimlerin bu konudaki bilgilerinin çoğu kez yetersizliği nedeniyle teşhisin güçleştiği ve geciktiği bir gerçektir. Bu nedenle gerek veteriner hekimlikte ve gerekse tıp alanında hastalığın özellikle tanı ve tedavisi yetersiz kalmaktadır. Brusellozda sorunlardan bir diğeri de hastalığın akut ya da kronik dönemde olup olmadığı ve ayrıca tedaviye cevap alınıp alınmadığıdır.

Bütün infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi brusellozun da tanınması ve etkili bir tedavinin yapılabilmesi için en güvenilir ve çabuk testlerin seçilmesi ve uygulanması gerekir. Çalışmamız, bruselloz tanısında kullanılan serolojik testlerin yeterliliklerini, duyarlılıklarını, özgüllüklerini ve birbirine olan üstünlüklerini araştırmak amacıyla dayalıdır. Testlerin sensitivitelerini doğru olarak belirleyebilmek için kan kültürleriyle kanıtlanmış bruselloz olguları üzerinde çalıştık. Özellikle rutin olarak kullanılan testler üzerinde durduk ve bu amaçla en sık olarak kullanılanlardan Standart Tüp Aglutinasyon Testi ve Lam Aglutinasyon testlerini, brusellozun tanısına yakın zamanlarda giren ELISA ile kıyasladık. Çalışmalarımızı, Infeksiyon Hastalıkları kliniğimize başvuran ve kan kültürlerinden Brucella bakterisi izole edilen 21 hastadan ve bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı insandan alınan serumlar üzerinde yaptık.

## GENEL BİLGİLER:

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerin etken olduğu, başlıca evcil ve vahşi toynaklılar ile geviş getiren memelilerin hastalığı olup, insanlara direkt veya indirekt temas ile veya bu hayvanların infekte ürünleri ile bulaşan bir infeksiyon hastalığıdır. Akut infeksiyon, insanlarda, dalgalı bir ateş, titreme ve kilo kaybı ile kendini belli eder. Kronik infeksiyon ise ateş, kilo kaybı, anksiyete, depresyon ve çeşitli organlarda apselere yol açmaktadır.(1)

Brusellozun ilk tanımı 1859'da Marston tarafından yapılmıştır. İlk olarak 1887'de David Bruce, Malta adasında Malta Ateşi adı verilen hastalıktan ölmüş kimselerin dalağında *Brucella melitensis*'i izole etmiştir. Sonraları bu bakterinin keçi sütlerinde bulunduğu ve çiğ süt içen insanlara geçtiği saptanmıştır. 1897'de ise M.L.Hughes, hastalığı "Malta humması" ve "Dalgalı humma" olarak adlandırmıştır. 1893'de Danimarka'da Bang ve Stribolt, fetüs'den izole ettikleri ve ineklerde düşüğe sebep olan bakteriye "*Bacillus abortus*" ismini vermişlerdir. Aynı yıllarda Wright ve arkadaşları, *B.melitensis*'e karşı hasta kanında oluşan aglutininlerin varlığını göstermişlerdir. 1904'de Zammit ve ayrıca 1905'de Merrocks, keçilerde brusellozu tesbit etmişlerdir. 1911'de Schröder ve Cotton ve ayrıca 1912'de Smith ve Fabyan inek sütünden *B. abortus*'u ayırmışlardır. 1914'te Traum, domuzdan *B.suis*'i izole etmiştir. 1918'de Evans, *B. abortus*'un da insanda hastalık yapabileceğini ileri sürmüştür. *Brucella* cinsinin tanımı 1920'de Meyer ve Show tarafından yapılmıştır. 1953'de Buddle ve Boyes, koçlarda epididimit yapan *B. ovis*'i tanımlamışlardır. Aynı zamanda Stoenner ve Lademan, çöl ağaç kemelerinde *B. neotomae*'yi bulmuşlardır. 1968'de ise Charmichael ve Bruner tarafından köpeklerde düşük yapan *B. canis* bulunmuştur. Ayrıca Sibiryada geyiklerden *B.rangiferis* türü izole edilmiştir.(2,3,4,5,6)

### A.) BAKTERİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ:

Brucella bakterileri, küçük, hareketsiz, sporsuz, gram negatif, uçları toparlak, 0,5-0,7 $\mu$ m / 0,5-1,5  $\mu$ m büyüklüğünde, kokobasiller veya kısa çomakçıklardır. Çok defa ikişer ikişer uç uca durma alışkanlığında olup bu durumları ile diplokoklara benzerler. Bazen sıvı besiyerlerinde 3-5'li kısa ve düzenli zincirler yapabilir ya da kümeler halinde bulunabilirler. Her ne kadar en çok bilinen üç Brucella türü olan B.melitensis, B.abortus ve B.suis arasında bazı görünüş ayrılıkları kaydedilmiş ise de (örneğin toparlağımsılık B. melitensis'de daha belirgindir) pratik olarak onları bu yönleri ile birbirlerinden ayırt etmek olanaksızdır. Bakteriler küçük olduklarından moleküler hareket nedeni ile yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Kapsülsüzdürler, ancak organizmadan yeni ayrılan kökenlere ait S tipi kolonilerde ince bir kapsül bulunur. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar. Gram negatif olup iyi görünmeleri için sulu füksin ile üç dakika kadar boyanmaları gerekir. Çomakçık şeklinde olanlar bazen düzensiz boyanma özelliği gösterebilirler.(2,3,7,8)

Brucella bakterileri zorunlu aerop olup, katı anaerop şartlarda üreyemezler. Üreme 10-40°C'lik ısı aralığında, en iyi 37°C'de olur ve optimal 6,6-7,4'lük bir pH gereklidir. Adi besiyerinde zor ve yavaş ürerler. Besiyerine kan, asit, serum ve karaciğer özü koyarak yapılan zenginleştirmeler üremeyi hızlandırır. Özellikle serum, gliserin, glikoz konmuş besiyerleri ile yumurtalı besiyerlerinde de ürerler. Çukolatamsı agarda bol ürerler. İlk izolasyondan sonra buyyon ve jelöz gibi basit besiyerlerinde de üremeye alışırırlar. Üremeleri için thiamine, niacin ve biotin'e muhtaçtırlar. B.abortus ve B.ovis parazitlikten saprofitliğe geçerken ortamda % 10 CO<sub>2</sub>'li hava isterler. Calcium panthenate ve mesoerithritol üremeyi uyarır. Katı besiyerinde 2-3 günlük inkübasyondan sonra beliren koloniler, küçük, yarı saydam ve yarı kubbelidir. Koloniler 4 veya 5 gün sonra 2-3 mm.ye erişirler.



Non-hemolitik ve pigment oluşturmeyen kolonilerdir. *B.canis* ve *B.ovis* R, diğerleri ilk üremede S kolonileri oluştururlar. Serumlu buyyonda önce yaygın bulanıklık ve sonra dipte çöküntü yaparlar. *Brucella* bakterileri şekerleri fermente etmezler. Ancak klasik ortamda karbonhidratlar üzerine az fermentatif etki ile başlıca oksidatif metabolizmaları vardır.(3,7,8)

*Brucella* bakterileri katalaz pozitif, oksidaz pozitif (*B.ovis* ve *B.neotomae* hariç), üreaz değişken organizmalar olup nitrat'ı nitrit'e indirgerler. Sitrat ve metil red negatiftirler. Organik kükürtlü bileşikleri parçalama sonucunda *Brucella*'ların her üç türü de H<sub>2</sub>S oluştururlar. Ancak bunlar arasında *Brucella suis* en uzun süre (3-5 gün) ve en fazla miktarda, *Brucella abortus* orta süre (2 gün) ve orta miktarda, *Brucella melitensis* ise en az süre (1 gün kadar) ve en az miktarda kükürtlü hidrojen yaparlar. Acetylmethylcarbinol veya gelatinase üretmezler ve o-nitrophenol-b-D-galactoside'den o-nitrophenol salınımı yapmazlar. *Brucella* bakterilerinin bazı boyalar ile olan ilişkilerinde de ayrılıklar görülür. Besiyelerine belli konsantrasyonlarda konulan thionin, bazik füksin, kristal viyole ve pironin gibi maddeler karşısında *Brucella melitensis* inhibisyona uğramadan ürer. *Brucella abortus* yalnız thionin tarafından inhibe olur ve *Brucella suis* ise thionin dışındakiler tarafından inhibe edildiği halde thionin'den etkilenmeyerek üremesini sürdürür. Ayrıca inozitol, mannoz, ramnoz, ve trehaloz gibi karbonhidratları fermente etme bakımından da türler arasında ayrılıklar görülmektedir. Tür veya biotipin tam idantifikasyonu için oksidatif metabolizma çalışmaları gereklidir.(2,7)

*Brucella* genusunda halen 6 tür ve 15 biotip bulunmaktadır. *B. melitensis*'in 3 biotipi, *B. abortus*'un 7 biotipi ve *B. suis*'in 5 biotipi tanımlanmıştır. *B.canis*, *B.ovis* ve *B.neotomae*'nin biyotipleri ise saptanmamıştır. İnsan için infektif türler ; genellikle domuzları infekte eden *B.suis*, daha çok sığır için patojen olan *B.abortus*, koyun ve

keçilerde saptanan *B.melitensis*, köpeklerde patojen olan *B.canis*'dir. Çöl ağaç kemelerinde görülen *B.neotomae* ve koyun için patojen olan *B.ovis*'in insanda hastalık yapıp yapmadığı bilinmemektedir(7). En çok bilinen üç *Brucella* türünün önemli özellikleri Tablo-I'de görülmektedir.

TABLO-I : BRUCELLA BAKTERİLERİNİN ARALARINDAKİ AYRILIKLAR

	<b>B.melitensis</b>	<b>B.abortus</b>	<b>B.suis</b>
Tiyonin	üzer	üremez	üzer
B.füksin	üzer	üzer	üremez
Metil viyole	üzer	üzer	üremez
Pironin	üzer	üzer	üremez
İnozitol	-	+	-
Maltoz	-	-	+
Mannoz	-	+	+
Ramnoz	-	+	-
Trehaloz	-	-	+
CO <sub>2</sub> 'ye ihtiyaç	yok	var	yok
H <sub>2</sub> S teşkili	1 gün	2 gün	3-5 gün
üreyi hidroliz	-,+	-,+	++

*Brucella* bakterileri 60 °C' de on dakikada, %1 fenolde onbeş dakikada ölürlür. Yaş toprakta 5-10 hafta, steril çeşme suyunda 6 hafta, deniz suyunda 25 gün, sütte 10 °C' de 10-17 gün, dondurmada 1 ay ve peynirde 2 ay canlı kalabilmektedir. Gün ışığında ise bir kaç saatte ölürlür. Bazik füksin, tiyonin, safranin o, metil moru ve pironin'in *Brucella* bakterilerinin üremesi üzerine etkileri ayrı ayrıdır.(3)

*Brucella* bakterilerinin *Franciella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *E.coli* (serotip O157:H7), *Salmonella* (serotip O:30 ), ve *Yersinia enterocolitica* (serotip O:9) ile serolojik çapraz reaksiyonlar verdiği

bilinmektedir. Brucella bakterilerinin R şekilleri ile de bazı Pseudomonas türleri serolojik çapraz reaksiyon vermektedir. Brucella bakterilerinin S şekillerinde lipopolisakkarit-protein kompleksinde M ve A diye adlandırılan iki yüzey antijen vardır. Bu antijenler aglutinasyondan sorumludurlar. B.melitensis'de M antijeni A antijenine göre yirmi kat daha fazla iken, B.abortus ve B.suis'de ise A antijeni daha fazladır. B.melitensis ve B.abortus'un farklı absorpsiyonları ile hazırlanan monospesifik antiserumlar lipopolisakkarit M veya A' dan baskın olanını belirlemede kullanılabilir. Brucella bakterilerinde ayrıca bir yüzeyel antijen (L zarf antijeni) saptanmıştır. Daha çok B.abortus'un yeni ayrılan kökenlerinde bulunmuştur. Bu antijen immun serumlarla aglutinasyona engel olmaktadır. Ancak 100 °C'de yarım saat ısıtılınca bu özellik ortadan kalkmaktadır. Bu bakterilerin R şekilleri S antikorları ile daha zayıf aglutinasyon verirler veya hiç aglutine olmazlar. R şekilleri ancak iki saat kaynatılmakla suda kendiliğinden aglutine olurlar.(3,7,8,9)

## **B.) EPİDEMİYOLOJİ:**

Bruselloz hemen hemen Dünya'nın her yerinde görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Orta Avrupa, Güney Afrika, Meksika, Kanada ve Japonya B.abortus'un en yaygın olduğu bölgelerdir. B.melitensis ise keçi yetiştiriciliğinin yaygın olduğu ülkelerde görülmektedir. İnfeksiyon Güney Avrupa ve özellikle Akdeniz sahillerinde endemiktir.(10)

Brucella türleri konak spektrumu geniş olan bakterilerdir. B.melitensis başta keçi ve koyun olmak üzere, daha seyrek olarak sığır ve domuzlarda; B.abortus en çok sığır, sonra domuz, keçi ve koyunlarda; B.suis en çok domuz, daha sonra sığır ve atta; B.canis ise köpek ve Ren geyiklerinde hastalık yapmaktadır. Ülkemizde koyun, keçi, inek ve manda bulaşmada rol oynayan en önemli hayvanlardır.

Yukarıda bahsedilen dört Brucella cinsi insanda hastalık yapmakta ise de yurdumuzda B.melitensis ve B.abortus infeksiyonları görülmektedir.(3,10)

Bulaşmalar infekte hayvanların dokuları, kan, idrar, dışkı, vagina salgıları, sütleri, düşen fetüsleri, plasentaları... ile olmaktadır. Vücuda giriş, ciltteki sıyrıklardan ve yaralardan veya süt ve süt ürünleri ile sindirim sistemindedir. Ayrıca solunum sisteminden bulaşmalar (laboratuvar infeksiyonları) görülmektedir. Gerek hayvanlarda ve gerekse insanlarda bruselloz yaz aylarında kış aylarına göre ortalama dört kat daha fazla görülmektedir. Bruselloz mesleklerle ilişki göstermektedir. Mezbaha işçilerinde, hayvan kesicilerinde, etle çalışanlarda ve veteriner hekimlerde diğer meslek gruplarına göre daha sık rastlanmaktadır. Bulaşmalar hayvandan hayvana veya hayvandan insana olmaktadır.(3,10)

Bruselloza karşı genel olarak insanların doğal direnci çok kuvvetlidir. Genellikle 20-40 yaş arasında sık görülmektedir. Bruselloz bağışıklık oluşturmamasına rağmen infeksiyon ikinci kez de geçirilebilir. (3,6,10)

### **C.) PATOJENEZ VE PATOLOJİ:**

Deri, orofarinks, ve konjunktivada ufak yara ve çiziklerden giren bakteriler lenf yolları vasıtasıyla bölgesel lenf düğümlerine gelirler. Fagositler tarafından fagosite edilmelerine rağmen burada üremelerini devam ettirerek Ductus thoracicus yoluyla kana karışırlar. Genel yayılma sonucu karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlara ulaşırlar. Bu organlardaki üreme sürecinden sonra ikinci bir yayılma yapar ve bu sefer organları tek tek tutarak leptomenenjit, araknoidit, ensefalit, miyelit, radikülit, nörit, endokardit, tromboflebit, lenfadenit, hepatit, kolesistit, anjiokolit, bronşit, pnömoni, osteomyelit, periostit, artrit,

spondilit, orşit, endometrit, abortus, menstürasyon bozuklukları, nevrasteni...gibi infeksiyon ve rahatsızlıklara sebep olurlar.(3,10)

Brusellozda doku reaksiyonu primer olarak granülomatöz özellik gösterir. Lezyonlarda lokal iltihap, epiteloid hücreler, dev hücreleri, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan bir infiltrasyon vardır. Lezyonların görünümü sarkoidozdaki gibidir. Bazen fokal lezyon nekrotik olabilir ve tüberküloza benzer kazeifikasyon görülebilir. Bu duruma özellikle B. suis'in neden olduğu süpüre lezyonlarda rastlanır.(6)

#### **D.) KLİNİK BULGULAR:**

Hastalığın inkübasyon süresi çok değişken olmakla beraber genellikle 2 ila 3 hafta kadardır. Ancak bu süre 3 gün kadar kısa olabileceği gibi bazen aylar ile de ölçülebilir(11). Klinik bulgular çok değişkendir. Genellikle kronik bir infeksiyondur. Hastalığın başlangıcında genel olarak yorgunluk, kilo kaybı, terleme, üşüme, titreme, iştahsızlık, mide bulantısı, konstipasyon gibi non-spesifik bulgular görülür. Bunlara ilaveten hastaların yaklaşık yarısında yaygın kas ağrıları, baş ağrısı ve sırt ağrısı görülebilir. En sık görülen bulgu ateştir(%89). Daha sonra sırasıyla halsizlik, kırgınlık(%69), vücutta yaygın adele ve eklem ağrıları(%61), baş ağrısı(%51), kilo kaybı(%41), iştahsızlık(%39) gelmektedir. Daha az sıklıklarda mental depresyon ve psikiyatrik bozukluklara da rastlanabilir. Hastalığın başlangıcı bu bulguların pek çoğunu içeren bir şekilde ve hızlı olabileceği gibi sinsi de olabilir. Ateş, kendine özgü ve hastalığa ismini veren belirli bir semptomdur. Yavaş yavaş yükselen ateş, 5-6 günde maksimum seviyesine eriştikten sonra tekrar yavaş yavaş düşer, ateşsiz süren bir dönemden sonra periyodik yükselme ve inmelerle dalgalı bir seyir izler. Bu nedenle hasta tabelasında ateşli ve ateşsiz dönemlerin yumuşak ondülasyonları göze çarpar. Ateşsiz dönemlerde hasta kendini iyi

hisseder. Hastaların bazılarında lenfadenopati, splenomegali, hepatomegali, lobar pnömoni ve deri döküntüleri bulunabilir.(2,3,8,11)

Brusellozun kan tablosunda karakteristik bulgu yoktur. Lökosit sayısı çoğunlukla normal veya hafif azalmıştır. Lenfositlerde nisbi artış ve anemi oldukça sık rastlanan bulgulardandır. Eritrosit sedimentasyon hızı normal veya artmış olabilir(3). Crosby ve arkadaşları(12) 38 brusellozlu hastadaki hematolojik değişiklikleri incelediklerinde; hastaların % 74' ünde anemi, % 45' inde lökopeni, %21' inde nötropeni, % 63' ünde lenfopeni ve % 40' ında trombositopeni saptamışlardır. Aynı zamanda bu hastaların % 26' sında pıhtılaşma bozuklukları ile birlikte kanama komplikasyonlarına rastlanmıştır.

Brusellozda çeşitli klinik şekiller tarif edilmiştir. Bunlar akut, kronik ve gizli olmak üzere üç grupta incelenebilir. Akut bruselloz, ateş, terleme, yaygın vücut ağrıları ve zayıflama gibi belirtilerle kendini gösterir ve tanımı kolaydır. Bir yıldan uzun süren vakalar ise kronik bruselloz olarak değerlendirilir. Akut hastalığı takip eden relapsların olması, lokalize infeksiyon varlığı ve tedaviye cevap vermeme, kronik bruselloza işaret eder. Çoğu vakada semptomlar çok az ve non-spesifiktir. Hastalık genelde ateşsiz seyreder. Bunun yanında halsizlik, baş ağrısı, terleme, iştahsızlık, uykusuzluk ve sinirlilik... gibi belirtiler verir. Brucella'ların hücre içi yerleşimlerine bağlı olarak tekrarlayan vakalar da görülebilir. Bu tip vakalar genellikle bir viral hastalığı veya travmayı takip ederek 2-3 ay içinde ortaya çıkarlar. Sanıldığından daha fazla olan gizli brusellozda ise belirtiler bulunmadığı gibi tanımı ancak serolojik deneyler ile olmaktadır. Asemptomatik olarak seyreden böyle vakalar sıklıkla meslek hastalığı olarak görülür.(3,13)

Hastalık her organa lokalize olabilir. Kemik, santral sinir sistemi, akciğer, kalp, dalak, karaciğer, safra kesesi, testis ve prostat'a

yerleşebilir. Lokalize hastalıkların % 20'si kemik ve eklemlerde görülmekte olup en sık *Brucella melitensis* ile oluşmaktadır. Genellikle disk boşluğunda infeksiyon ve vertebral osteomyelit yapabilir. Vakaların % 60'ı lumbo-sakral bölgeye yerleşir. Radyolojik olarak vertebral osteoporoz, ön vertebral plakta erezyon ve osteofitler saptanabilir. Ayırıcı tanı olarak pyojenik osteomyelit, tüberküloz ve malignite önemlidir.(13)

Sinir sistemi komplikasyonlarının en sık görüleni meningoensefalitlerdir. Ayrıca menenjit, ansefalit, miyelit, radikülit ve nevrit de görülebilir(14). Santral sinir sistemi brusellozisinde lomber ponksiyonla alınan beyin-omurilik sıvısında yüksek basınç, bulutlu görünüm, çoğunlukla mononükleer hücre artımı ve % 100 mg.'ın üzerinde protein saptanır. Beyin-omurilik sıvısından yapılan kültür çalışmaları % 45 başarılıdır. Bu tip vakalarda parapleji, hemipleji, çeşitli felçler, psikozlar, geçici parkinsonizm, generalize rijidite ve nonparkinsoniyen tremorlar görülebilir.(15)

Kalp tutulumu olarak endokardit, miyokardit ve perikardit yapabilir. Kalp tutulumu olan hastaların % 45'ini valvül hastaları oluşturur. Konjestif kalp yetmezliği gelişen vakalarda mortalite % 85 civarındadır. Brusellozdan ölen hastaların % 80' inde otopside endokardit saptanmıştır.(16,17)

Genito-üriner sistemde en sık testis, daha sonra prostat tutulur. Böbrekte apse, diffüz interstisyel tutulum ve renal kalsifikasyon görülebilir. Hastalarının % 10-25' i hastalıkları esnasında etkeni idrarları ile dışarı atarlar. Pulmoner sistem yerleşimleri vakaların % 10-15' inde görülmektedir. Akciğer komplikasyonları olarak bronşit, pnömoni, plörezi, akciğer apsesi ve ampiyem gelişebilir. Bu saydıklarımızdan başka deri ve yumuşak doku tutulumları,

hepatobiliyer sisteme ait tutulumlar, dalakta ve gözde lokal tutulumlar da görülebilir.(13)

### **E.) KONAK İMMUNİTESİ:**

Brusellozda antikor cevabı, infekte kişilerin % 95'inden fazlasında oluşmaktadır. Akut brusellozda IgM tipindeki antikorlar ilk hafta içinde yükselmeye başlamakta ve üçüncü ayda ise pik yapmaktadır. Akut hastalığın başlangıcından 2 ila 3 hafta sonra IgG tipi antikorlar yükselmekte, 6-8 hafta yüksek kalmakta ve tedavi edilmeyen vakalarda ise en az bir yıl yüksek seviyede devam etmektedir. IgA tipi antikorlar IgG tipi antikorlardan hemen sonra yükselmektedir. Sıvısal immunité çalışmalarında, normal insan veya hayvan aglutininlerinin, kompleman varlığında bakterisidal olduğu gösterilmiştir. Ancak buna rağmen serumdaki antikorlar koruyucu immunitede yetersiz kalmaktadır. Hücresel immunitenin Brucella infeksiyonlarına karşı önemli derecede rolü vardır. Hücresel immun yanıtı bozuk olan lenfomalı hastalarda bruselloz oranının yüksek olabileceği bildirilmiştir.(13,18)

### **F.) TANI:**

#### **1) BAKTERİYOLOJİK TANI:**

Hastalığın özellikle akut dönemindeki tanımında kültür çalışmaları önemlidir. Kan, kemik iliği, eklem sıvısı, lenf bezi, karaciğer ve dalak ponksiyon sıvıları, idrar, beyin-omurilik sıvısı, düşük vak'alarında üretim organları ve salgılarından alınan materyalden etken organizmayı üretebilmek mümkündür. Fakat kültür çalışmaları her zaman iyi sonuç vermemektedir.(3)

Kan ve diğer vücut sıvılarının kültüründe Castaneda tekniği tavsiye edilmektedir. Bu teknik, aynı şişede sıvı ve katı olmak üzere



bifazik ortamda gerçekleşir. Katı faz hazırlanırken ortama trypticase soy agar, tryptose agar veya nihai konsantrasyonu % 2,5 olacak şekilde Brucella agar ilave edilir. Sıvı faz ise aynı bazal ortamdaki agarsız olarak hazırlanır ve daha sonra aseptik şartlarda eklenir. Castaneda şişesi kullanılan bu işlem Alton ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Ekimler çift yapılmalıdır. Biri normal atmosferde diğeri %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosferde enkübe edilmelidir. CO<sub>2</sub>'li ortamın sağlanması önemlidir ve kültür şişesi bu ortamı içine alabilmelidir. Kan kültürleri 35-37 °C'de 30 gün süreyle inkübe edilirler. Bununla birlikte her 4-5 günde bir besiyerinin sıvı kısmından pasaj yapılmalıdır. Castaneda şişesinin bulunmadığı durumlarda ticari bifazik kan kültürü şişeleri Brucella kültürü için kullanılabilir. Şayet alınan materyel abse, fibröz pıhtı, eksuda vs. içeriyorsa, aseptik ortamda, %5 koyun kanlı agar, %5 serum içeren Brucella agar veya serum dextroz agara inoküle edilirler. Kontaminasyon ihtimali çoksa bazal ortama selektif bir ortam eklenmelidir. Plaklar 35-37 °C'de, % 5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 10 gün inkübe edilirler. Yeterli bir idantifikasyon için önemli kriterler ; H<sub>2</sub>S üretimi, CO<sub>2</sub>'ye olan gereksinim, monospesifik antiserumlarla olan aglutinasyon, üreaz üretimi ve katı ortamda bazik füksin ve tionin varlığında üreme durumlarıdır.(7)

## II) SEROLOJİK TANI:

Brucella infeksiyonlarının tanısında serolojik reaksiyonlardan yararlanmak pratik bir yöntemdir. Antikorlar IgG, IgM ve IgA yapısında olup hastalığın ikinci haftasından itibaren ortaya çıkarlar. İnsanda akut infeksiyonda önce IgM artar; ilk haftalarda kanda bulunabilen ilk antikordur. Yaklaşık üç ay sonra IgM seviyesi düşmeye başlar. IgG ise hastalığın ikinci haftasında yükselmeye başlar ve tedavi edilmeyen hastalarda en az bir yıl yüksek kalır. İyi tedavi olmuş hastalarda ise altı ayda çok düşük düzeylere ulaşır veya kaybolur. IgG'nin yüksek seviyelerde kalması infeksiyonun retiküloendotelial sistem veya diğer

infeksiyon odaklarında devam ettiğini gösterebilir. Bu konu üzerinde çalışmalar devam etmektedir. IgA antikorları IgG'den sonra yükselmektedir fakat tanı açısından değeri yoktur. Relapslarda IgM antikorunun yükselmesi çelişkilidir ve son zamanlarda yapılan çalışmalarda IgM değil IgG'nin yükseldiği bulunmuştur. Kronik infeksiyon sırasında bazen aglutininler ortaya konamaz; hatta aglutininlerin ortaya çıkmadığı vak'alar vardır.(3,13,19)

Brucella infeksiyonlarının tanısında uygulanabilecek serolojik testleri şöylece özetleyebiliriz:

### **1) Standart Tüp Aglutinasyon Testi (STAT):**

Bruselloz tanısında aglutinasyon ile hasta kanında antikor araştırmak önemli bir yer tutar. Tüp aglutinasyon testi, Brucella infeksiyonu sırasında gelişen serum aglutininlerinin yarı kantitatif olarak tanınmasını sağlar. Aynı zamanda infeksiyonun çeşitli safhalarında serum antikor seviyesindeki değişimleri ortaya çıkarmak açısından yararlı bir testtir. Ucuz olması, kolay okunması gibi avantajları yanında, saptanan antikorların sınıflarının belirlenememesi, düşük titredeki pozitifliğin yorumlanmasındaki güçlükler ve blokan antikorlarda cevapsız kalması gibi dezavantajları vardır.(20,21)

Antijen hazırlamak için antijenik stabilitesi bulunan özel Brucella kökenleri kullanılmaktadır. Bu amaçla iyi aglutinasyon veren kökenlerin S kolonilerinden üretilmiş, ısı ile öldürülmüş, fenollü bakteri suspansiyonları kullanılır. Günümüzde en çok kullanılan standart kökenler Brucella abortus S 99 ve Brucella abortus 1119 kökenleridir. Brucella antijenlerinin hazırlanmasının zorluğu nedeniyle bunları standart olarak hazırlayan merkezlerden elde ederek çalışmak önerilir.(21)

Deney için hasta serumunun fizyolojik tuzlu su (% 0,85 NaCl) içindeki sulandırılmaları hazırlanır. Olası bir prozon olayını gözden kaçırmamak için en az 1:640 sulandırmaya kadar hazırlamak gerekir. Bu amaçla bir tüp taşıyıcısına en az 10 adet tüp sıralanır. Bunlardan birincisine 0,9 ml. diğerlerine 0,5'er ml. fizyolojik tuzlu su dağıtılır. Birinci tüpe hasta serumundan 0,1 ml. konur. Yeni bir pipet ile bir kaç kez emilip bırakılarak karıştırıldıktan sonra bu tüpten 0,5 ml. ikinci tüpe aktarılır. Bu şekilde sondan bir önceki tüpe kadar tüpten tüpe 0,5' er ml. aktarılır. Bu tüpten 0,5 ml. dışarı atılır. Son tüpe serum konmaz (antijen kontrol tüpü). Bu şekilde serumun çift sulandırılmaları (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560) elde edilir. Antijen suspansiyonu iyice karıştırıldıktan sonra 0,5'er ml. tüm tüplere dağıtılır. Bu işlemle tüplerdeki serum sulandırılmaları birer kat artmış olur. Tüpler çalkalanarak karıştırılır ve 37°C'de 48 saat bekletilir.(21)

Sonuçların okunmasından önce kontrol tüpünde aglutinasyon olmadığının saptanması gerekir. Aglutinasyon sonuçları okunurken tüpler çalkalanmaz. Üstteki sıvının berraklığı ve oluşan çöküntü derecesine göre 4+, 3+, 2+, 1+, ve (-) olarak değerlendirilir ve titreleri ile birlikte kaydedilir. Bu şekilde okunan sonuçlar serumun sulandırım derecesine göre her tüp için yazılır. Örneğin (1:80 4+), (1:160 2+)...gibi. Serumun aglutinasyon titresini, en az iki pozitif sonuç veren serumun sulandırımıdır.(21)

Bruselloz tanısı için titrenin 1:100' den fazla olması veya 10-15 gün sonra titrenin belirgin yükselmesi (semptomların başlangıcını takiben en az 4 kat artması) değer taşır.(21)

## **2) Plate Test:**

Çok kısa sürede sonuç alınması bakımından kitle taramalarında bir ön deney olarak kullanılabilir. Bu amaçla standardize edilmiş ölü bakteri suspansiyonları hasta serumu ile lam üzerinde karıştırılarak gözle görünen bir aglutinasyonun varlığı veya yokluğu araştırılır. Sonuçlar pozitif veya negatif olarak yorumlanır.(22) Kronik brusellozda cevapsız kalması, bazı bakteri infeksiyonlarında çapraz reaksiyon nedeni ile yalancı pozitif sonuçlar vermesi ve prozon olayında yalancı negatif sonuçlar alınması dezavantajları arasında sayılabilir.(23)

### **3) Rose Bengal Plate Test (RBPT):**

Rose Bengal testi, insan ve hayvan serumlarındaki Brucella antikorlarını saptamada kullanılan bir lam testidir. Hem IgG hem de IgM ile reaksiyon vermektedir. Dolayısıyla hastalığın akut ve kronik dönemlerinin her ikisinde de kullanılabilir.(24)

Antijen olarak Rose-Bengal boyası ile özel teknik ile boyanan Brucella abortus bakterilerinin tamponlu tuzlu sudaki standart suspansiyonları kullanılır. Çok temiz ve üzerinde yaklaşık 1,5 cm çapında yayvan çukurlar bulunan plastik plaklar ya da çok temiz bir beyaz fayans üzerine hasta serumundan bir küçük damla damlatılır (yaklaşık 0,03 ml). Üzerine bir küçük damla Rose-Bengal antijeni damlatılır ve iyice karıştırılarak 1,5 cm. çaplı bir alana yaydırılır. Elde ya da bir rotatorda çalkalanarak dört dakika sonunda gözle görünür bir aglutinasyonun olup olmadığı gözlenerek değerlendirilir.(21)

Rose-Bengal testi iyi bir tarama testidir. Domuz brusellozu hariç Rose-Bengal testini en iyi sonuç veren test olarak kabul edenler vardır. Fakat hastalığın çok erken ve çok geç devrelerinde yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir.(25,26)

#### 4) 2-Merkaptoetanol veya Rivanol'ü Aglutinasyon Testleri:

Antikorların sınıfını belirlemede kullanılan testlerdir. 2-Merkaptoetanol testi ilk defa 1964 yılında Anderson ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Daha sonraki araştırmalarda bu deneyin Wright reaksiyonuna kıyasla aktif bir infeksiyonu daha iyi gösterdiği sonucuna varılmıştır. 1982' de Sippel ve arkadaşları immunoglobulinlerin ayırımında bu deneyin kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Deneyin Wright deneyi ile birlikte yapıldığında aktif infeksiyonu belirlemede kullanılabileceği bildirilmektedir.(27,28)

Brusellozun kronik döneminde IgG antikorlarının yapımı devam etmektedir. Ancak bu dönemde bir çok olguda IgM antikorları da, düşük titrelerde ve bazen anlamlı titrelerde varlıklarını sürdürebilirler. Böyle vakalarda olumlu bulunan bir aglutinasyon sonucunun IgM tipi antikorlardan mı, yoksa hastalığın kronik olarak devam etmesinden mi olduğunun ayırt edilmesi gerekir. Önemli olan, hastalığın aktif olarak sürdüğünü belirleyen IgG tipi antikorların varlığını saptamaktır. Bunun için hasta serumundaki IgM' in tahrip edilerek aglutinasyon deneylerinin yapılması yöntemleri uygulanır. Bu şekilde yapılan aglutinasyon deneylerinin yine olumlu bulunması hastalığın kronikleştiği anlamını taşır. Önce olumlu iken bu işlemlerden sonra olumsuz aglutinasyon elde edilmesi ise ilk aglutinasyonun, IgM tipi antikorlara bağlı olduğu anlamını taşır.(21)

Deneyin esası, serumdaki IgM'lerin disülfid bağlarının 2-mercaptoethanol ile parçalanması ilkesine dayanır. Bu deneyde 1:80(++)'lik bir değer aktif infeksiyonu belirlerken, 1:40 ve daha düşük titrasyondaki değerler şüpheli reaksiyonlar olarak kabul edilir. Bu testin serum sulandırılmaları ve okumaları standart tüp aglutinasyon testi ile aynıdır. Deney aynen Wright deneyi gibi yapılır, ancak fenollü tuzlu

su yerine fosfat tamponu ile sulandırılmış 0,1 M 2-mercaptoetanol kullanılır.(20)

Rivanol (Diamino 6,9 Etoxy acridin) ile yapılan deneylerde de, rivanol'ün albumin ve yüksek molekül ağırlıklı globulinleri çöktürdüğü ve böylece 2-mercaptoethanol ile benzer sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Bir tüp içersine 3 kısım (0,9 ml) rivanol çözeltisi ve üzerine 1 kısım (0,3 ml) hasta serumu konur. Oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra 2000 rpm.de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki duru sıvı alınarak aglutinasyon deneyleri bununla yapılır. Rivanollü serumun birinci tüpte 1:5, ikincisinde 1:10 olmak üzere çift kat sulandırımı yapılır. Sonraki işlemler tüp aglutinasyon yöntemindeki gibi yürütülür. Ancak bu deneyde IgM'lerin çöktürülmesi sırasında bir miktar IgG'de çökebilmektedir. Serumun rivanol ile muamelesi, santrifüjü ve üstteki sıvı ile çalışılması ve ayrıca her defasında rivanolün günlük hazırlanması gibi zahmetler sözkonusudur.(21,29)

##### **5) Coombs Serumu ile Yapılan Tüp Aglutinasyon Testi:**

Brusellozda sık olarak blokan antikorlar oluşur. Klinik olarak bruselloz belirtileri belirgin olduğu halde aglutinasyon sonuçlarının olumsuz olması, brusellozda sık rastlanılan bir durumdur. Olay, antikorların antijenlere bağlandıkları halde aglutinasyon reaksiyonu oluşturmasını engelleyen mekanizmanın bulunmasından doğmaktadır. Aglutinasyon blokajının ortaya çıkarılmasında kullanılan en iyi deney Coombs deneyidir. Bunun için aglutinasyon vermeyen tüm tüpler 2000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenerek bakteriler çöktürülür. Üstteki sıvı dökülür. Her tüpe yeniden bir miktar tuzlu su konur. Ayrı pipetlerle çekip bırakmak suretiyle karıştırılır. Yeniden santrifüjlenir. Aynı işlem üç kez yinelenerek bakteriler yıkanır. Sonra her tüpe 0,45 ml.tuzlu su eklenir. Çalkalanarak yeniden suspanse edilir. Daha sonra insan anti-globulin (coombs) serumu, üzerinde yazılı sulandırım titresinden

10 kat daha yoğun olarak tuzlu su ile sulandırılır. Bu sulandırmadan her tüpe 0,05 ml. eklenip karıştırılır. Otuzyedide derecede 24 saat bekletildikten sonra aglutinasyon okunur.(21)

### **6) Kompleman Birleşmesi Testi:**

Bu test özellikle aglutinasyon testlerinde olumsuz sonuçlar alınan kronik vakalarda çalışılabilir. Prezon olayından etkilenmediği bildirilmiştir. Kompleman birleştirici antikorlar aglutininlerden daha geç oluşmakta, ancak serumda daha uzun süre kalmaktadırlar. Bu antikorlar IgG ve daha az olarak da IgM yapısındadır.(13,30)

Bu test kronik brusellozun araştırılmasında çok kullanışlıdır. IgG'yi belirler, ancak IgM'i belirlemez. Hastalığın erken evresinde sıklıkla negatif sonuçlar verir(20). Antijen olarak Brucella bakterisi suspansiyonu kullanılır. Koyun ve keçi bruselloz'unda kompleman birleşmesi testi en hassas test olarak kullanılmaktadır.(31)

### **7) Spot Test:**

Tam kan kullanılarak yapılan bir lam aglutinasyon testidir. Kitle taramalarında bir ön deney olarak kullanılır. Antijen, özel yöntemle boyanmış Brucella bakterilerinden hazırlanmıştır. Temiz bir fayans ya da çukurlu plak üzerine 4 mm.lik öze ile bir öze dolusu antijen bırakılır. Hastanın parmak ucu delinir. İlk damla kan silinir. İkinci damladan 3 mm.lik öze ile alınan bir öze dolusu kan, antijenin üzerine bırakılır. Aynı öze ile 1,5 cm.lik bir alana yayılarak karıştırılır. Parmak ucu kanı yerine sitratla alınmış damar kanı da kullanılabilir. Dört dakika süre ile eğip doğrultmak suretiyle izlenir. Olumlu sonuçlarda aglutine olan parçalar kenarlarda mavi bir halka şeklinde toplanırlar. Orta kısımda kırmızı-yeşil bir renk oluşur.(21)

### 8) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Brucella infeksiyonlarının tanısı üzerine ELISA yöntemiyle ilk çalışma 1976 yılında Carlsson ve arkadaşları(3) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ELISA'nın tüp aglutinasyonuna göre on ila yüz kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. 1980 yılında ise Magee, bruselloz tanısında ELISA'nın tek başına yeterli olabileceğini açıklamıştır. ELISA ile yapılan bruselloz çalışmaları daha sonraki yıllarda hız kazanmış ve pek çok detaylı bilgiler elde edilmiştir.

Bruselloz tanısında ELISA, çok duyarlı ve özgül bir metoddur. Tüp aglutinasyonuna göre daha kısa sürede sonuçlar elde edilebilir. Hastalığın akut ve kronik safhalarını kolaylıkla belirler. Ayrıca en önemli avantajı olarak tüp aglutinasyonu ile belirlenemeyen blokan antikoları da tesbit etmesi ve coombs testine gereksinim göstermemesi sayılabilir. ( 20, 28, 31, 32, 33, 34, 35)

Brucella IgM'in akut vakaların tamamında, kronik infeksiyonların ise %32'sinde yüksek seviyelerde bulunduğu bildirilen bir çalışmada, Brucella-IgG'nin her iki tür infeksiyonda da yüksek bulunduğu tesbit edilmiş olup, ayrıca IgG'nin alt grupları üzerinde de çalışılmış, akut brusellozda IgG<sub>1</sub>'in (%79), kronik brusellozda da IgG<sub>4</sub>'ün (%73) daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir.(36)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, brusellozda relaps esnasında IgG titresinde artış görüldüğü, ancak IgM titresinde artış görülmediği bildirilmektedir.(19,32,37) Bu çalışmalardan birinde akut dönemde hastaların IgG seviyelerinin başlangıçta bir pik yapıp sonra sürekli bir düşüş gösterdiği, buna karşılık, relapslı veya kronik formda yer alan hastalarda ise IgG seviyelerine ait piklerin birden fazla sayıda olduğu tesbit edilmiştir. Hastalığın seyrini takipte IgM seviyelerinin faydalı olmadığı, ancak IgG'ye göre daha erken



maksimum seviyeye ulaştıkları için hastalığın erken evrede tanısında faydalı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca düşük antikor konsantrasyonlarında bile kesinlik arzettiği için bu testin epidemiyolojik ölçümler için de değerli olduğu bildirilmiştir.(32)

Bütün bunlara rağmen Brucella-ELISA'nın bazı dezavantajları da sözkonusudur. Bunlar arasında, çeşitli bakterilerle çapraz reaksiyon vermesi (2,23,32,33), yüksek romatoid faktörden kaynaklanan yalancı IgM pozitifliğinin olması (35) ve sonuçların değerlendirilmesinde bir standardizasyonun olmaması sayılabilir.

Brusellozun serolojik olarak saptanmasında genellikle indirekt ELISA tekniği tercih edilmiştir (Antikor aranan yöntemlerden olan bu tekniğin özelliği, oluşan rengin optik dansitesinin hasta serumundaki antikor yoğunluğu ile doğru orantılı olmasıdır). Brucella-ELISA'da antijeni kaplamak için katı yüzey olarak genellikle 96 çukurlu polistiren mikrotitrasyon plaklarından yararlanılmıştır.(28,34,38,39,40)

Antijen olarak, Brucella'ların tam hücreleri (28,34,38), lipopolisakkaritleri (40,41,42) ve dış membran proteinleri (40,43) denenmiştir. ELISA testlerinde genellikle peroksidaz(38), alkalin fosfataz (28,34,39) ve beta galaktozidaz enzimleriyle işaretli anti-insan gama globulinleri kullanılmıştır. En sık kullanılan substratlar da, orto-fenilen diamin (28,38), para-nitrofenilfosfat (34,39) ve 5-aminosalisilik asittir(40).

### **9) İndirekt Floresan Antikor Testi:**

Bu test için önce özel bir lam üzerine Brucella antijeni tesbit edilmekte ve sonra bunun üzerine şüpheli hasta serumu eklenmektedir. Daha sonra inkübasyon ve yıkama işlemleri uygulanmaktadır. Lam üzerindeki antijen-antikor birleşmesini

göstermek için floresan madde ile işaretlenmiş insan anti-globulin'i kullanılmaktadır. Bir hayli duyarlı ve özgül bir metod olup başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir.(11,43)

### **10) Radio İmmunoassay (RIA):**

İmmunoglobulin gruplarını ayrı ayrı saptayabilmesi sayesinde akut ve kronik olguların birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün olmaktadır. Çok duyarlı bir testtir.(11,13,42,43,44)

### **11) Sütlerde Antikor Arama Yöntemleri:**

Hayvan brusellozu olgularında epidemiyolojik tarama amacıyla tam süt kullanılarak süt halka testi ve süt lam testi kullanılmaktadır. Ayrıca süt serumu ile de süt serumu aglutinasyon testi, süt serumu anti-globulin testi ve süt serumu rose-bengal testi uygulanmaktadır.(30)

### **III) ALLERJİK TANI:**

Allerjik tanı amacıyla bakterilerden saflaştırılarak elde edilen ve bir nükleoprotein kompleksinden oluşan "brusellergen" kullanılır. Brusellergen'in intradermal enjeksiyonunu takiben 24 saat içinde kızarıklık, ödem ve sertlik oluşan reaksiyonlar olumlu kabul edilir. Bu test her ne kadar hastaların çoğunda olumlu sonuç verse de, testin olumsuz olması bruselloz tanısından uzaklaştırmaz.(2,11)

### **IV) HAYVAN DENEYLERİ:**

Bruselloz tanısında hayvan deneyleri diğer testlere göre daha seyrek kullanılır. Brucella bakterilerine karşı kobaylar az duyarlı olup 2 ila 4 hafta sonra hastalık belirtileri verirler. Bu iş için hasta kanı kobay peritonu içine enjekte edilir ve 2 ila 4 hafta sonra ateş ve sepsis

belirtileri veren hamile kobayların düşük yaptığı görülür. Bu hayvanların kan, dalak ve lenf ganglionlarından yapılan kültürlerde Brucella bakterilerini üretmek mümkündür. Ölmeyen hayvanlarda ise mellitin ile yapılan deri içi testlerinde pozitifleşme ve serumlarında ise Brucella aglutinin titrelerinde yükselme saptanabilir.(2,11)

## GEREÇ VE YÖNTEMLER:

### A.) GEREÇLER:

#### **Serumlar:**

Serumlar, Gaziantep yöresinde GZP. Ü. Tıp Fakültesi Şahinbey Hastanesi'ne başvuran ve kan kültürlerinden Brucella bakterisi izole edilen 21 hastadan ve bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı insandan alındı. Toplanan serumlar çalışılincaya kadar derin dondurucuda dondurularak saklandı.

#### **Besiyerleri:**

Kan kültürü için ticari bifazik kan kültürü şişeleri (Oxoid) kullanıldı. Burada üreyen bakterilerin pasajı için %5 koyun kanlı agar ihtiva eden plaklar kullanıldı.

**Standart Tüp Aglutinasyon Testi Antijeni:** Tüp Aglutinasyon Testi için Cromatest firmasından temin edilen Brucella abortus S99 suşundan hazırlanmış antijen kullanıldı.

**Lam Aglutinasyon Testi Antijeni:** Lam aglutinasyon testi için ticari firmaların (Cromatest, Botafarma) standardize edilmiş boyalı ölü bakteri suspansiyonları kullanıldı. Brucella abortus ve Brucella melitensis suşlarından hazırlanmış ayrı ayrı antijenler kullanıldı.

**Brucella-ELISA Sistemi:** Brucella-spesifik IgG ve IgM çalışmasında kullanılmak üzere "Schriapparelli Diagnostici Ismunit" firmasının Brucella-ELISA kitleri kullanıldı. Bu sistemde kullanılan reagenler:

- a.)Spesifik antijenle kaplı her biri 8 kuyu içeren 12 adet strip
- b.)Pozitif ve negatif kontrol serumları
- c.)Washing buffer (PBS-tween tampon, pH:7,2)

d.)Sera dilüent ( pH:7,2; PBS-tween tampon'da dilüe edilmiş keçi kaynaklı serum)

e.)Konjugat dilüent (PBS-tween tampon, pH:7,2)

f.) Anti-human IgM veya Anti-human IgG enzim konjugatı: Keçi kaynaklı anti-human IgM veya Anti-human IgG antikorları ihtiva etmektedir. Peroksidaz ile konjuge edilmiştir.

g.)Kromojen: Ortofenildiamin.2HCl

h.)Kromojen dilüenti: % 0,03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ihtiva eden sitrat-fosfat buffer(pH:5)

ı.) Stopping solüsyon: 2,5 M. sülfirik asit.

**Spektrofotometre** ( Pasteur LP 400 ) : ELISA çalışması esnasında 492 ve 620 nm. dalga boyundaki filtresiyle mikrotitrasyon plaklarının okunmasında kullanıldı.

**Otomatik Yıkayıcı** ( Pasteur LP 35 ) : Mikrotitrasyon plaklarının yıkanmasında kullanıldı.

## **B.) YÖNTEM :**

### **Brucella Kültür Yöntemi:**

Kan ve diğer vücut sıvılarının kültüründe ticari bifazik kan kültürü şişeleri kullanıldı. Hastalığın özellikle ateşli dönemlerinde kan kültürleri alındı. Ekimler çift yapılmak suretiyle biri normal atmosfer ortamına, diğeri %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama alındı. Kan kültürleri 35-37°C'de 30 gün süreyle inkübe edildiler. Aynı zamanda her 4-5 günde bir besiyerinin sıvı kısmından pasaj yapıldı. Bu amaçla alınan materyal aseptik ortamda %5 koyun kanlı agara inoküle edildi. Plaklar 35-37°C'de, %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 10 gün süreyle inkübe edildiler. Oluşan kolonilerin idantifikasyonu için mikrobiyolojik özellikler ve

monospesifik antiserumlarla yapılan aglutinasyon testlerinden yararlanıldı.

### **Tüp Aglutinasyon Yöntemi:**

Bütün reaktifler ve serum örnekleri oda ısısına getirildi. Serum fizyolojik (% 0.85 NaCl) ile bütün serumların 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 ve 1:1280 sulandırılmaları (0,5 ml) hazırlandı ve bütün tüplere standart antijenden (Cromatest) 0,5 ml. eklenerek 37 C'de 24 saat inkübe edildi. Pozitif ve negatif aglutinin kontroller (Cromatest) de çalışmada yer aldı. Parlak ışık altında sonuçlar değerlendirildi. Aglutinasyon görülmeyen tüpten bir önceki tüpün antikor titresini yansıttığı kabul edildi.

### **Lam Aglutinasyon Yöntemi:**

Bütün reaktifler ve serum örnekleri oda ısısına getirildi. Serum örneklerinden temiz bir lam üzerine 20 ml konularak çalışıldı. Üzerlerine birer damla boyalı lam aglutinasyon antijeni (Cromatest) damlatıldı. İyice karıştırılıp rotator veya elde sallanarak bir dakika sonunda aglutinasyon gözlemlendi. Brucella abortus ve Brucella melitensis suşlarından hazırlanmış antijenler kullanılarak her bir serum örneği için ayrı ayrı test yapıldı. Gözle görülebilir aglutinasyonlar pozitif olarak değerlendirildi. Çalışmada pozitif ve negatif kontroller kullanıldı.

### **Brucella-ELISA Yöntemi:**

Çalışmamızda ticari firmalardan (Schriapparelli) temin edilen Brucella-ELISA sistemi kullanıldığı için plaklar antijenle kaplanmış şekilde kullanıma hazır idi. Brucella IgG ve IgM için ayrı ayrı çalışmalar yapıldı. Önce test prosedürüne uygun olarak konsantre

haldeki washing buffer'in (PBS-tween tampon, pH:7,2) bidistile su ile dilüsyonu yapıldı. Hazırlanan solüsyon hem yıkama işleminde hem de sera dilüent'in dilüsyon işleminde kullanıldı. Testin ilk adımı olarak mikrotitrasyon plağının solid faz yıkaması gerçekleştirildi. Bunun için kuyular yıkama solüsyonu ile tam doldurularak 3 kez yıkandı. Testin ikinci basamağında ise serumların inkübasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla önce test prosedürüne uygun olarak sera dilüent'in dilüsyon işlemi yapıldı. Sonra sera dilüent kullanılarak çalışılacak olan serumların 1:300 'lük test dilüsyonları hazırlandı. Pozitif ve negatif kontrol serumları kit içersinde kullanıma hazır olarak sunulduğundan bunlara ayrıca dilüsyon uygulanmadı. Kontrol serumlarından her birisi için iki spesifik antijen kuyusu kullanıldı. Dilüe haldeki serumlardan her bir kuyuya 100 µl. konulmasından sonra 37 C'de 60 dk. süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyular yıkama solüsyonu ile tam doldurularak 3 kez yıkandı. Testin üçüncü basamağı olan konjugat inkübasyonu için anti-human IgG veya anti-human IgM enzim konjugatlarının önce dilüsyonları yapıldı. Bunun için kullanıma hazır haldeki konjugat dilüenti (PBS-tween tampon, pH:7,2) kullanıldı. Dilüsyon için paket üzerinde yazılı olan optimum konjugat dilüsyonu değerleri kullanıldı. Dilüe haldeki konjugattan her bir kuyuya 100 µl. koymak suretiyle 37 C'de 30 dk. inkübe edildi. Süre sonunda kuyular yıkama solüsyonu ile tam doldurularak 3 kez yıkandı. Testin son adımını enzim reaksiyonu oluşturdu. Bunun için sitrat-fosfat buffer'in 3 ml'si içersine bir OPD (Ortofenildiamin.2HCl) tablet atılarak kromojen substrat solüsyonu hazırlandı ve hazırlanan solüsyondan her bir kuyuya 100 µl kondu. 37 C'de 10 dk. inkübasyondan sonra her bir kuyuya 100 µl stopping solüsyon (2,5 M. sülfirik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu ve hemen plaklar Micro-ELISA okuyucusuna (Pasteur LP 400) alınarak çift dalga boyunda (492-620 nm) absorbands değerleri okutuldu.

Cutoff değerinin hesaplanması için önce pozitif kontrol serumunun ortalama absorbans değeri ile negatif kontrol serumunun ortalama absorbans değeri toplandı. Bu değer paket üzerinde gösterilen K değeri ile çarpılarak deneyin Cutoff değeri bulundu. Bu değerin altında absorbans değeri veren serumlar için sonuç negatif olarak kabul edildi.



**BULGULAR:**

Çalışmalarımızı, Brucella kan kültürü pozitif olan 21 hastadan ve bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı insandan alınan serumlar üzerinde yaptık. Serolojik deneyler aynı şartlarda karşılaştırmalı olarak yapıldı. Brucella kan kültürü pozitif olan 21 hastaya ait serolojik testlerin sonuçları Tablo-II de toplu halde görülmektedir. Bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı insana ait serolojik testlerin sonuçları ise Tablo-III de verilmiştir.

**TABLO II : BRUCELLA KAN KÜLTÜRÜ POZİTİF 21 HASTAYA AİT SEROLOJİK TESTLERİN SONUÇLARI.**

no	Hasta Adı	IgM	IgG	STAT	Iam ag. (ab.)	Iam ag. (mel.)
1	V.B.	+	+	1/640	+	+
2	B.Ç	+	-	1/640	+	+
3	M.S.	+	+	1/1280	-	+
4	H.B.	+	+	1/1280	+	+
5	R.Ö.	-	+	1/160	+	+
6	E.Ö.	+	+	1/1280	+	+
7	A.K.	-	+	1/640	-	+
8	S.T.	+	+	1/320	+	+
9	H.K.	+	+	1/1280	+	+
10	Ş.K.	+	-	1/320	+	+
11	M.A.	-	+	1/320	+	+
12	V.G.	-	+	1/160	+	+
13	Ş.K.	-	+	1/160	-	+
14	S.Ö.	-	+	1/160	+	+
15	A.E.	-	+	1/320	-	+
16	N.K.	+	+	1/640	+	+
17	H.A.	+	+	1/640	+	+
18	O.A.	+	-	1/640	+	+
19	D.A.	+	+	1/1280	-	+
20	S.Ç.	+	+	1/1280	-	+
21	Ş.Ş.	+	+	1/640	-	-

TABLO-III : BRUSELLOZ GEÇİRMEMİŞ 20 SAĞLIKLI İNSANA AIT SEROLOJİK TESTLERİN SONUÇLARI.

no	Hasta Adı	IgM	IgG	STAT	Iam ag. (ab.)	Iam ag. (mel.)
1	P.Y.	-	-	-	-	-
2	Z.Ç.	-	-	-	-	-
3	F.E.	-	-	-	-	-
4	F.D.	-	-	1/20	+	+
5	P.K.	-	-	-	-	-
6	S.K.	-	-	1/40	+	+
7	Ş.D.	-	-	-	-	-
8	A.A.	-	-	-	-	-
9	G.D.	-	-	-	-	-
10	E.A.	-	-	-	-	+
11	G.T.	-	-	1/20	+	+
12	M.A.	-	-	-	-	-
13	S.V.	-	-	-	-	-
14	N.T.	-	-	-	-	-
15	Z.K.	-	-	-	+	+
16	T.Ö.	-	-	-	-	-
17	S.P.	-	-	-	-	-
18	K.Ş.	-	-	-	-	-
19	G.G.	-	-	1/20	+	+
20	S.H.	-	-	-	-	-

**Standart Tüp Aglutinasyon Testi (STAT) Sonuçları:**

Araştırmamızda bu test ile 1/160 ve üzerindeki titreler pozitif kabul edilmiştir. Brucella kan kültürü pozitif 21 hastanın serumlarının bu test ile incelenmesi sonucunda 21 serum ( % 100) pozitif bulunurken bu test ile negatif bulunan hiç bir serum yoktu. Bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı insanın serumlarının bu test ile incelenmesiyle ise ortaya çıkan sonuçların tamamı negatif olup hiç bir pozitif sonuca rastlanmadı.

**Lam Aglutinasyon Testlerinin Sonuçları:** Bu çalışmada Brucella kan kültürü pozitif 21 hastanın serumları ile daha önceden bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı kişinin serumları, B. melitensis ve B. abortus lam aglutinasyon antijenleri kullanılarak test edildiler. Brucella kan kültürü pozitif olan 21 hastanın serumları ile B. abortus lam aglutinasyon antijeni kullanılarak yapılan inceleme sonucunda 14 serum ( % 66,6) pozitif ve 7 serum ( % 33,3) negatif bulundu. Aynı serumlarda B. melitensis lam aglutinasyon antijeni kullanılarak yapılan inceleme sonucunda ise 20 serum (% 95,2) pozitif ve 1 serum (% 4,76) negatif bulundu. Daha önceden bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı kişiye ait serumlarda ise; B. abortus lam aglutinasyonu ile yapılan inceleme sonucunda 5 serum (%25) pozitif ve 15 serum (%75) negatif bulunurken, B. melitensis lam aglutinasyonu ile yapılan inceleme sonucunda da 6 serum (%30) pozitif ve 14 serum (%70) negatif bulundu.

**Brucella-ELISA Sonuçları:** IgG değerlerinin ölçümü için yapılan Brucella-ELISA-IgG çalışmasında, Brucella kan kültürü pozitif 21 insan serumunun 18 ( % 85,7) tanesi pozitif, 3 ( % 14,2) tanesi ise negatif olarak saptandı. IgM değerlerinin ölçümü için yapılan Brucella-ELISA-IgM çalışmasında ise, Brucella kan kültürü pozitif 21 insan serumunun 14 ( % 66,6) tanesi pozitif, 7 ( % 33,3) tanesi ise negatif olarak saptandı. Bruselloz geçirmemiş 20 sağlıklı kişiye ait serumların ELISA ile değerlendirilmesinde ise her hangi bir pozitif Brucella-IgG veya her hangi bir pozitif Brucella-IgM değerine rastlanmadı. ELISA ile Brucella-IgG ve Brucella-IgM antikoları incelenen 21 hasta serumunun absorbans değerleri tablo-IV de toplu olarak verilmiştir.

TABLO IV : ELISA İLE BRUCELLA-IGG VE BRUCELLA-IGM ANTİKORLARI İNCELENEN 21 HASTA SERUMUNUN ABSORBANS DEĞERLERİ.

no	IgG cutoff:0,295	IgM cutoff:0,315
1	0,892	1,768
2	0,264	0,775
3	1,330	1,676
4	0,775	1,176
5	0,577	0,070
6	0,391	0,650
7	0,490	0,184
8	0,491	0,521
9	0,515	1,770
10	0,022	0,425
11	0,327	0,214
12	0,312	0,117
13	0,381	0,231
14	0,323	0,172
15	0,921	0,068
16	0,493	0,534
17	0,596	0,340
18	0,206	1,587
19	2,002	1,599
20	1,041	1,529
21	1,177	1,051

**İstatistiksel Değerlendirme:** Araştırmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde " bağımlı grupta kıkare testi " kullanılmıştır.(45)

TABLO V : STAT VE ELISA-IGM TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

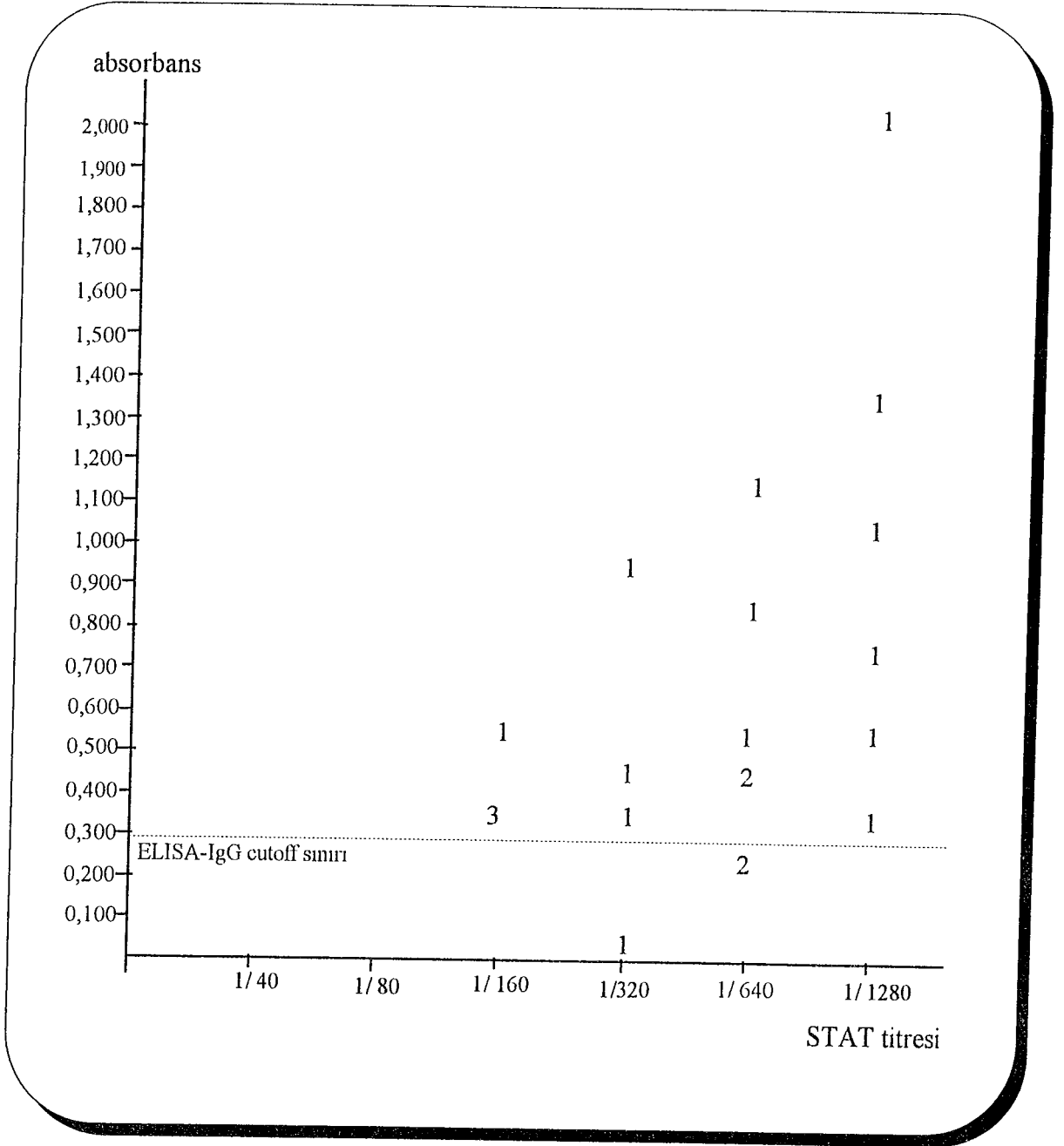
STAT	ELISA-IgM		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	14	7	21
Negatif	0	0	0
Toplam	14	7	21

21 serum üzerinde uygulanan STAT ve ELISA-IgM testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (  $\chi^2 = 7$  ;  $p < 0,01$  )

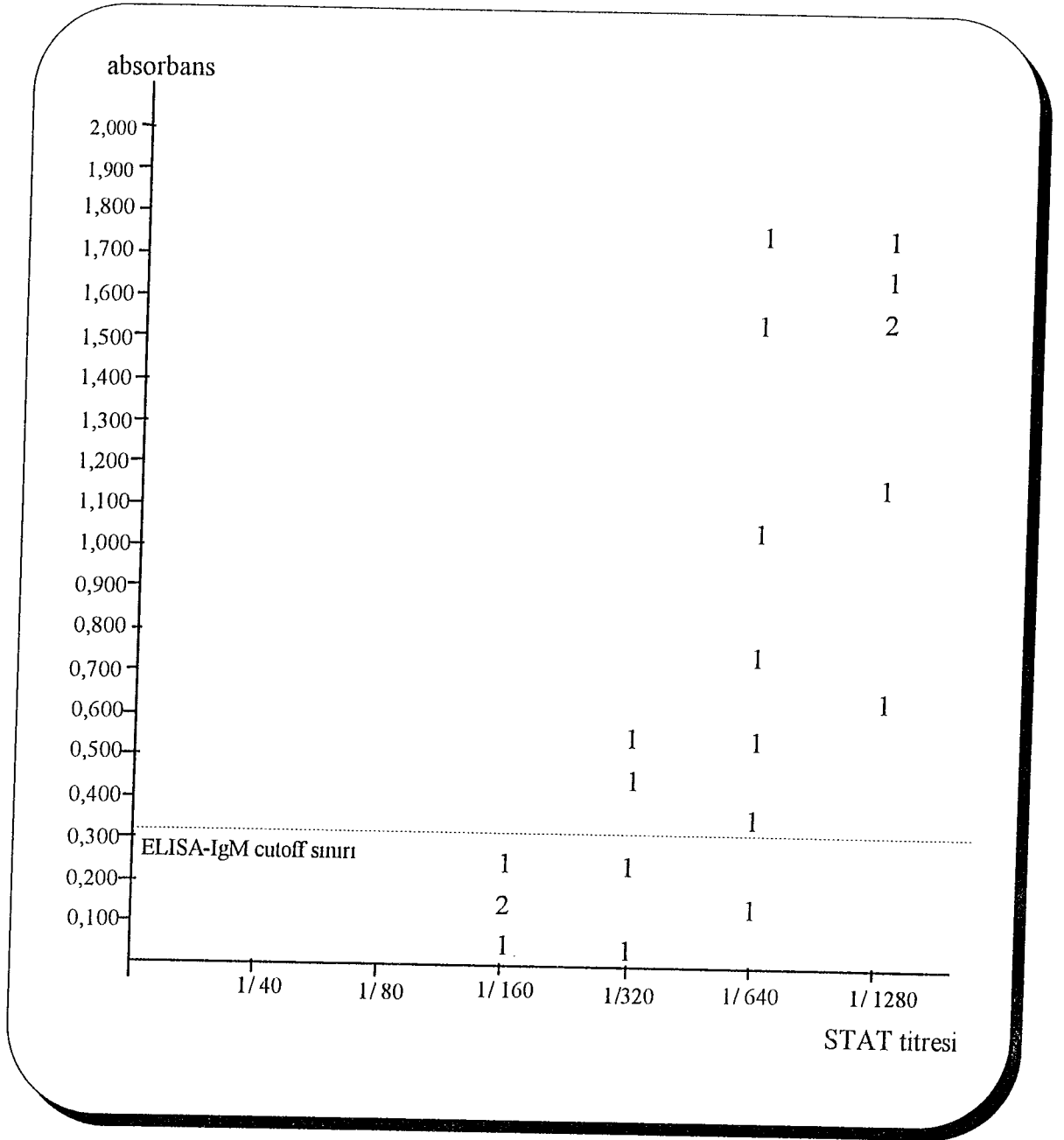
TABLO VI : STAT VE ELISA-IGG TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

STAT	ELISA-IgG		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	18	3	21
Negatif	0	0	0
Toplam	18	3	21

21 serum üzerinde uygulanan STAT ve ELISA-IgG testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (  $\chi^2 = 3$  ;  $p > 0,05$  )



**Şekil 1: ELISA ile IgG Değerleri İncelenen 21 Serumun Absorbans ve STAT Titrelerinin Dağılımı.**



**Şekil 2: ELISA ile IgM Değerleri İncelenen 21 Serumun Absorbans ve STAT Titrelerinin Dağılımı.**

TABLO VII : STAT VE LAM AGLUTINASYONU (B.ABORTUS) TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

STAT	Lam agl.(Ab.)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	14	7	21
Negatif	0	0	0
Toplam	14	7	21

21 serum üzerinde uygulanan STAT ve Lam agl.(Ab.) testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $\chi^2 = 7$  ;  $p < 0,01$  )

TABLO VIII : STAT VE LAM AGLUTINASYONU (B.MELITENSIS) TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

STAT	Lam agl.(mel.)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	20	1	21
Negatif	0	0	0
Toplam	20	1	21

21 serum üzerinde uygulanan STAT ve Lam agl.(mel.) testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $\chi^2 = 1$  ;  $p > 0,05$ )



TABLO IX : LAM AGLUTINASYONU (B.ABORTUS) VE ELISA-IGM TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

Lam agl.(Ab.)	ELISA-IgM		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	10	4	14
Negatif	4	3	7
Toplam	14	7	21

21 serum üzerinde uygulanan Lam agl. (Ab.) ve ELISA-IgM testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $\chi^2 = 0$  ;  $p > 0,05$ )

TABLO X : LAM AGLUTINASYONU (B.ABORTUS) VE ELISA-IGG TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

Lam agl.(Ab.)	ELISA-IgG		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	11	3	14
Negatif	7	0	7
Toplam	18	3	21

21 serum üzerinde uygulanan Lam agl. (Ab.) ve ELISA-IgG testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $\chi^2 = 1,6$  ;  $p > 0,05$ )

TABLO XI : LAM AGLUTINASYONU (B.MELITENSIS) VE ELISA-IGM TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

Lam agl.(mel.)	ELISA-IgM		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	13	7	20
Negatif	1	0	1
Toplam	14	7	21

21 serum üzerinde uygulanan Lam agl.(mel.) ve ELISA-IgM testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (  $\chi^2 = 4,5$  ;  $p < 0,05$  )

TABLO XII : LAM AGLUTINASYONU (B.MELITENSIS) VE ELISA-IGG TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

Lam agl.(mel.)	ELISA-IgG		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	17	3	20
Negatif	1	0	1
Toplam	18	3	21

21 serum üzerinde uygulanan Lam agl.(mel.) ve ELISA-IgG testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (  $\chi^2 = 1$  ;  $p > 0,05$  )

TABLO XIII : LAM AGLUTINASYONU (B.ABORTUS) VE LAM AGLUTINASYONU (B.MELITENSIS) TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

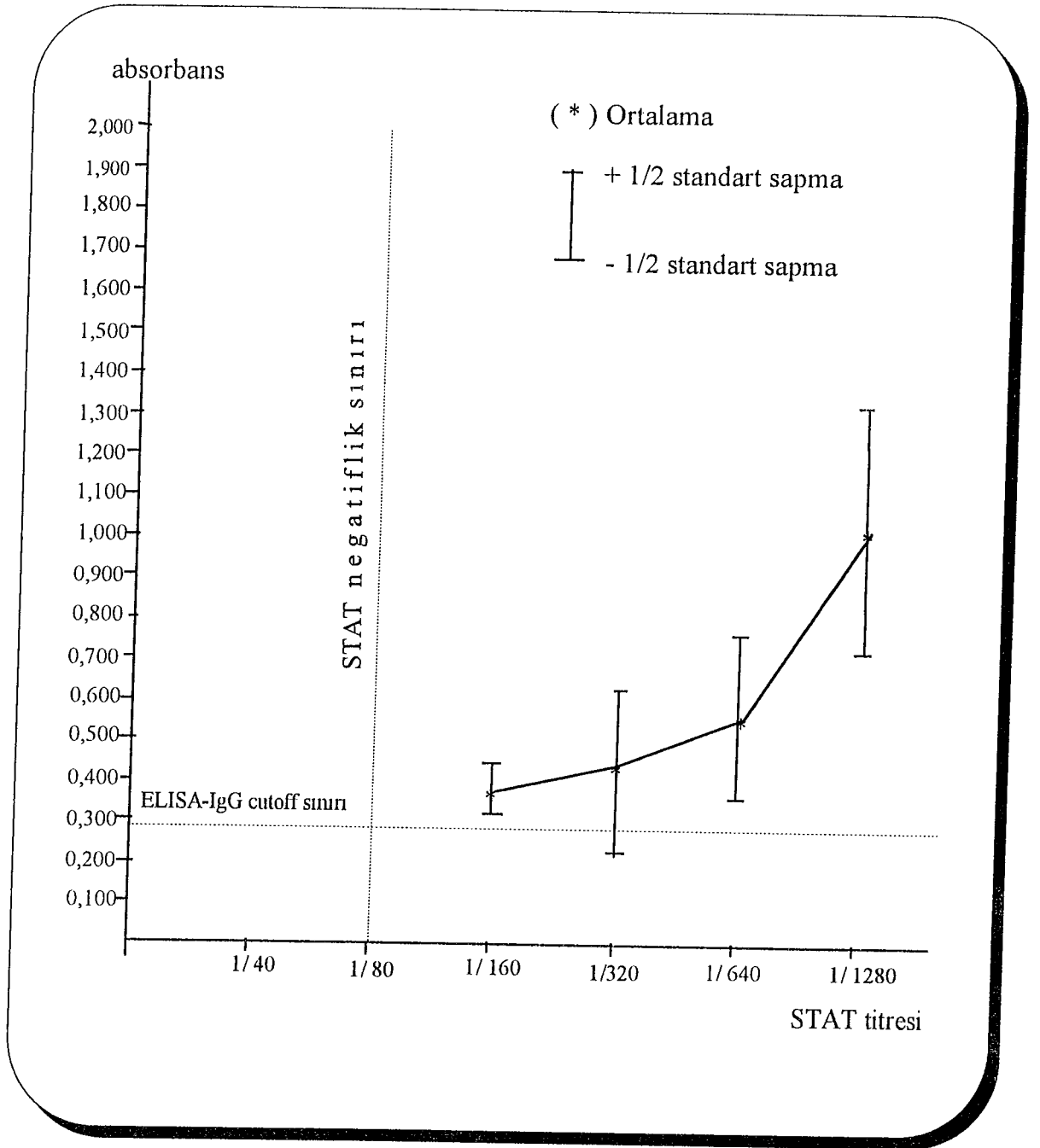
Lam agl.(Ab.)	Lam agl.(mel.)		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	14	0	14
Negatif	6	1	7
Toplam	20	1	21

21 serum üzerinde uygulanan Lam agl. (Ab.) ve Lam agl.(mel.) testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $\chi^2 = 6$  ;  $p < 0,05$  )

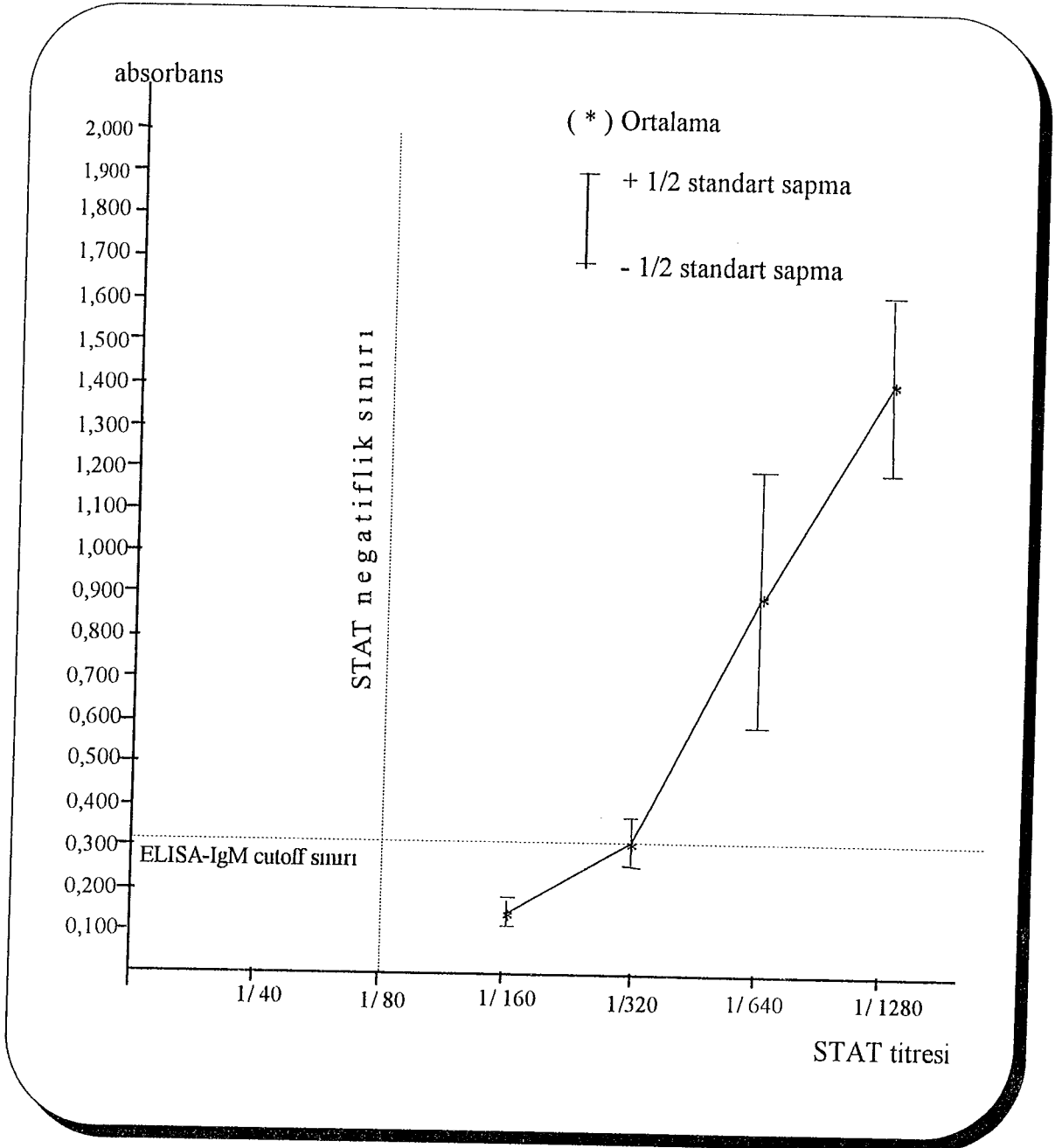
TABLO XIV : ELISA-IGM VE ELISA-IGG TESTLERİNİN KARŞILIKLI SONUÇLARI:

ELISA-IgM	ELISA-IgG		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	11	3	14
Negatif	7	0	7
Toplam	18	3	21

21 serum üzerinde uygulanan ELISA-IgM ve ELISA-IgG testlerinin saptayabildiği pozitif serumlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $\chi^2 = 1,6$  ;  $p > 0,05$  )



**Şekil 3 : STAT Dilüsyonlarına Karşılık Gelen ELISA-IgG Absorbans Değerleri.**



**Şekil 4: STAT Dilüsyonlarına Karşılık Gelen ELISA-IgM Absorbans Değerleri.**

## TARTIŞMA :

Çalışmamız, bruselloz tanısında kullanılan serolojik testlerin yeterliliklerini, duyarlılıklarını, özgüllüklerini ve birbirine olan üstünlüklerini araştırmak amacıyla dayalıdır. Bu amaçla en sık olarak kullanılan serolojik testlerden Standart Tüp Aglutinasyon Testi ve Lam Aglutinasyon Testlerini, brusellozun tanısına yakın zamanlarda giren ELISA ile kıyasladık. Testlerin sensitivitelerini doğru olarak belirleyebilmek için, çalışmamızı kan kültürlerinden Brucella bakterisi izole edilen yani kesin brusellozlu 21 hastanın serumu üzerinde yaptık.

Çalışmada yer alan kesin brusellozlu hastalara ait 21 insan serumunda, Standart Tüp Aglutinasyon Testi ile 21 (%100), B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testi ile 20 (% 95,2), ELISA-IgG ile 18 (% 85,7), ELISA-IgM ile 14 (% 66,6), B. abortus antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testi ile 14 (% 66,6) tane pozitif serum saptadık. (Tablo-II)

Yapılan istatistiksel çalışmada testlerin bir kısmının duyarlılıkları arasında anlamlı farklılıklar olduğu anlaşılmıştır (Tablo-V...Tablo-XIV). Bu da bizlere en duyarlılarının Standart Tüp Aglutinasyon Testi, ELISA-IgG ve B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan Lam Aglutinasyon Testi olduğunu; ELISA-IgM ve B. abortus antijeni kullanılarak yapılan Lam Aglutinasyon Testlerinin ise daha az duyarlı olduklarını göstermiştir. Standart Tüp Aglutinasyon Testi, B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan Lam Aglutinasyon Testi ve ELISA-IgG testleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Bilindiği gibi, Brucella'ya özgü IgM, IgG ve IgA tipi antikorların birbirlerinden ayrı olarak saptanabilmeleri ancak immunofluorescence antibody assay (IFA), radioimmunoassay (RIA) ve ELISA ile sağlanabilmektedir. IFA tekniğindeki sonuçların yorumlanmasındaki

subjektiflik ve RIA tekniğindeki radyoaktivite tehlikesi gibi sorunlar ELISA'da görülmez. Ayrıca ELISA tekniğinde kullanılan konjugatlar, IFA ve RIA'da kullanılan reaktanlara göre daha dayanıklıdır. ELISA ile çok sayıda serum örneğinin otomatik ve hızlı bir şekilde taranabilmesi de bu tekniğin avantajları arasındadır.(34)

Bu araştırmada 21 kesin brusellozlu hastanın serumunu kullandık. Bu hastaların 18 tanesinde IgG seviyesini yüksek bulurken, 14 tanesinde ise IgM seviyesinin yüksek olduğunu tesbit ettik. Hastalarımızın semptomlarının başlamasından bize müracaat ettikleri zamana kadar geçen süreleri incelediğimizde toplam 14 hastanın ilk 3 aylık sürede müracaat ettiklerini, geri kalan 7 hastanın ise daha geç müracaat ettiklerini öğrendik. İlk üç aylık sürede müracaat eden 14 hastanın tamamında da IgM seviyelerinin yüksek olduğunu, geri kalan 7 hastada ise ELISA-IgM sonuçlarının negatif olduğunu gördük. Dolayısıyla akut dönemde müracaat eden 14 hastanın tamamında IgM seviyelerini yüksek olarak saptadık.

Bilindiği gibi akut brusellozda kanda önce IgM, ikinci haftadan sonra IgG yükselmeye başlar. IgM normal şartlarda üçüncü aydan sonra düşmeye başlarken, IgG tedavisiz vakalarda en az bir yıl, tedavi edilenlerde ise altı ay kadar serum seviyesini korur.(13)

Araj ve arkadaşları(34) 281 kişinin serumları üzerinde yaptıkları araştırmada, akut ve kronik bruselloz tanısında immunglobulin sınıflarının belirlenmesinde ELISA kullanmışlar ve her bir immunglobulin sınıfı için farklı derecede duyarlılık ve özgüllük saptamışlardır. Akut veya kronik brusellozlu hastalarda 1600'den yüksek titredeki IgG için %98 oranında duyarlılık ve özgüllük saptarlarken, akut brusellozlu hastalarda 400'den yüksek titredeki IgM için %98 oranında duyarlılık ve özgüllük saptamışlardır. Bununla birlikte kronik brusellozlu hastalarda brucella-IgM değerlerinin çok düşük olduğunu da vurgulamışlardır.

Bizim çalışmamızda ise akut ve kronik brusellozlu hastalarda yüksek IgG değerleri için % 85,7 oranında bir duyarlılık saptanırken, akut brusellozlu hastalarda yüksek IgM değerleri için %100 oranında bir duyarlılık saptadık. Aynı şekilde kronik brusellozlu hastalarda Brucella-IgM değerlerinin çok düşük olduğunu da saptadık. Bu yönüyle bizim çalışmamız, Araj ve arkadaşlarının bu çalışmasına paralellik göstermektedir.

1985'de E. De Klerk ve R.Anderson (35), akut brusellozlu hastalarda ELISA ile Brucella-spesifik IgM ölçümünün en duyarlı serodiagnostik test olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise akut vakalar için ELISA-IgM testinin duyarlılığının %100 olduğu ve bu yönüyle E. De Klerk ve R.Anderson'un bu çalışmasına paralel olduğu izlenmiştir. (Bizim istatistik çalışmamızda akut ve kronik tüm vakalar yer aldığı için ELISA-IgM testinin diğer bazı testlere göre duyarlılığı düşük olarak izlenmektedir)

Çalışmamızda, ELISA-IgM değerleri pozitif ancak ELISA-IgG değerleri negatif olan 3 serum örneği başlangıç safhasındaki akut brusellozu düşündürmektedir(Tablo-XIV). Çünkü akut vakalarda IgM tipi antikorlar IgG tipi antikorlardan önce yükselmekte, kronik vakalarda ise daha erken düşmektedir.(34,35)

1988'de T.Pellicer ve arkadaşları (19), Brusellozda relaps esnasında IgG titresinde artış olduğunu, ancak IgM titresinde artış görülmediğini bildirmişlerdir.

1989'da Elena Gazapo ve arkadaşları(32) 52 kültür pozitif bruselloz vakasını incelemişler ve başlıca iki model görmüşlerdir. Bazı hastaların IgG seviyelerinin başlangıçta bir pik yapıp sonra sürekli bir düşüş gösterdiği, buna karşılık, relapslı veya kronik formda yer alan



hastalarda ise IgG seviyelerine ait piklerin birden fazla sayıda olduğu tesbit edilmiştir. Hastalığın seyrini takipte IgM seviyelerinin faydalı olmadığı, ancak IgG'ye göre daha erken maksimum seviyeye ulaştıkları için hastalığın erken evrede tanısında faydalı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca düşük antikor konsantrasyonlarında bile kesinlik arzettiği için bu testin epidemiyolojik ölçümler için de değerli olduğu bildirilmiştir.

1990 yılında J.Ariza ve arkadaşları (37), ELISA IgG ve IgA'nın ikinci kez pik yapmasının relaps için iyi bir marker olduğunu, ancak yalnız başına IgG yüksekliğinin devam etmesinin kronik infeksiyon için iyi bir belirleyici olmadığını bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi son zamanlarda yapılan çalışmalarda, brusellozda relaps esnasında IgG titresinde artış görüldüğü, ancak IgM titresinde artış görülmediği bildirilmektedir.(19,32,37)

Semptomlarının başlamasından bize müracaat ettikleri zamana kadar geçen sürelerinin 6 ay ila 1 yıl'dan daha uzun bir süreyi kapsadığını veya daha önce de bu infeksiyona ait belirtilerinin olduğunu öğrendiğimiz toplam 7 hastamızın serum örneklerini incelediğimizde, ELISA-IgG değerlerinin pozitif ancak ELISA-IgM değerlerinin negatif olduğunu gördük (Tablo-II). Bu yönüyle bizim sonuçlarımız adı geçen çalışmalara paralellik göstermektedir.

Sippel ve arkadaşları (28), 409 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada kan kültürü, Standart Tüp Aglutinasyon Testi ve ELISA kullanmışlardır. ELISA çalışmasında, antijen olarak B. melitensis tam hücrelerini kullanarak IgG, IgM ve total (IgG,IgM,IgA) antikorları araştıran Sippel ve arkadaşları, kan kültürlerinin haftalarca sonra alınabildiğini ve sıklıkla başarısız sonuçlar verdiğini, Standart Tüp Aglutinasyon Testinin de zahmetli, zaman alıcı ve blokan antikorlara bağlı yalancı negatif sonuçlar verebildiğini, buna karşılık ELISA'nın

Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nden daha duyarlı olduğunu, blokan antikorlardan etkilenmediğini, hastalığın akut veya kronik olarak tanımlanmasında kusursuz bir yöntem olduğunu açıklamışlardır.

Saz ve arkadaşları(38) 208 brusellozlu hasta serumu üzerinde çalışmışlar ve Rose-Bengal Plate Test, Standart Tüp Aglutinasyon Testi ve Coombs testlerini ELISA ile kıyaslamışlardır. Bunun sonucunda ELISA'yı duyarlılık (% 97) ve özgüllük (%96) bakımından diğer testlerden üstün bulmuşlardır.

Hunter ve arkadaşları(43), bruselloz şüpheli 101 insan serumunda yaptıkları çalışmada, antijen olarak B. melitensis majör dış membranlarını kullanmışlardır. ELISA ile IgG ve IgM değerlerini ölçerek bu sonuçları 2-merkaptotanol'lü ve 2-merkaptotanol'süz tüp aglutinasyon testi sonuçları ile karşılaştırmışlar ve ELISA'nın bu yöntemlerin ikisinden de daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bütün bu çalışmalarda ELISA' nın Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise Standart Tüp Aglutinasyon Testi %100 oranında bir duyarlılık göstermiş olup ELISA-IgG ile duyarlılık yönünden aralarında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. ELISA-IgM'in ise Standart Tüp Aglutinasyon Testi'ne göre daha az duyarlı olduğu görülmüş, ancak bu testin akut vakalar için %100'lük bir duyarlılık gösterdiği izlenmiştir. Bizim sonuçlarımız, ELISA ile Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nin duyarlılık yönünden aynı olduğunu belirtmesi bakımından adı geçen çalışmalara tam bir paralellik göstermemektedir.

Çalışmamızda, ELISA-IgG ile Standart Tüp Aglutinasyon Testi arasında duyarlılık yönünden fark görülmediği saptanmıştır. Ancak ELISA-IgG negatif ve Standart Tüp Aglutinasyon Testi pozitif olan 3 serum bulunmaktadır(Tablo-II). Bu serumlar incelendiğinde bunların

üçünün de ELISA-IgM testlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. Bu serumların Standart Tüp Aglutinasyon Testi sonuçlarının pozitif çıkması IgM tipi antikorlara bağlanabilir. Aynı şekilde, IgM negatif fakat Standart Tüp Aglutinasyon Testi pozitif olan 7 serumun incelenmesinde ise bu serumların yedisinin de ELISA-IgG değerlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. Bu serumların Standart Tüp Aglutinasyon Testi sonuçlarının pozitif çıkmasında ise IgG rol oynamaktadır. Çünkü Standart Tüp Aglutinasyon Testi, IgM tipi antikorlarla birlikte IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> ve IgA tipi antikorlarla da reaksiyon vermektedir.(46)

ELISA'nın aglutinasyon testlerine en önemli üstünlüğü blokan antikorları da belirlemesidir(28). Bizim çalışmamızda, kullandığımız ELISA tekniğinde bize önerilen prosedüre bağlı kalarak sadece 1:300'lük bir serum dilüsyonu gibi tek bir dilüsyonda çalışmış olmamızın yanında ayrıca tüp aglutinasyonu ile çalıştığımız hastalarda en düşük titrenin 1:160 çıkmış olması nedeniyle de bu konuya bir örnek gösteremiyoruz. Ancak bizim çalışmamızda, Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nde blokan antikorlar nedeni ile oluşmuş herhangi bir hatalı negatif sonuç da sözkonusu değildir.

De Klerk ve arkadaşları (35), Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nden bahsederlerken yüksek derecede özgüllük ve anlamlı bir duyarlılığa sahip olması nedeniyle yararlı ve tanımlayıcı bir test olduğunu ifade etmektedirler.

Standart Tüp Aglutinasyon Testi'ni çalışırken standardize edilmemiş antijen kullanmak, 5,5 ila 8 arasındaki pH dışında bir pH'da çalışmak, % 0,5'den küçük tuz yoğunlukları ile çalışmak aglutinasyonu etkiler(47). Ayrıca blokan antikorların varlığında bu test yetersiz kalmaktadır. Aglutinasyon testlerinin yetersiz kalışında, prezon olayı, antikor tipleri, kullanılan antijen ve testin tipi gibi sebeplerin rol oynadığı çeşitli araştırmacılar tarafından açıklanmıştır.

1991'de Edward J. Young (48), 214 vakalık çalışmasında aglutinasyon testlerini incelemiş ve aktif brusellozlu hastaların çoğunun 1:160 ve üzerinde aglutinasyon titrelerine sahip olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte tek bir titrenin her zaman diagnostik olamayacağını da ifade etmiştir. Takip serumları da test edildiği takdirde, aglutinasyon reaksiyonlarının, aktif hastalığı inaktif hastalıktan ayırt etmede yeterli bilgi vereceğini savunmuştur. Bizim çalışmamızda, aktif brusellozlu olduğu kan kültürleri ile doğrulanan hastaların yer aldığını göz önüne alırsak, Standart Tüp Aglutinasyon Testi sonuçlarının tamamının 1:160 ve üzerinde aglutinasyon titrelerine sahip olması yönünden Edward J. Young'un bu çalışmasına paralellik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Russel ve arkadaşları(26) lam aglutinasyon sonuçlarının yüksek sayıda yanlış pozitif sonuçlar verdiğini savunmuşlardır. Dolayısıyla tanı için lam aglutinasyon sonuçlarının kabul edilmemesini, sonuçların doğrulanması için Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nin yapılması gerektiğini belirtmektedirler.

Nelson ve arkadaşları (22), lam aglutinasyon testi ile hatalı pozitif sonuç alınabileceğini ileri sürmektedirler.

Araj ve arkadaşları (34), Lam aglutinasyon testinin duyarlılığının çok düşük, buna karşılık Standart Tüp Aglutinasyon Testi ve Rose Bengal Testlerinin duyarlılıklarını ise yüksek bulduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca kullanılan antijen tipi, prozon olayı ve antikor cinsi gibi fizyolojik olaylarda aglutinasyon testlerinin hatalı negatif sonuçlar verebileceğine dikkat çekmektedirler.

Bizim çalışmamızda, B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testi ile % 95,2; B. abortus antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testi ile de % 66,6 oranında bir duyarlılık saptanmıştır. Bu

iki sonuç birbirleri ile kıyaslandığında aradaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür. Burada, Lam aglutinasyon testinin duyarlılığının düşük olduğunu belirtmesi bakımından, bizim çalışmamızda yer alan B. abortus antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testinin duyarlılığının düşük çıkması, Araj ve arkadaşlarının çalışmasına benzemekte olup, B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testinin duyarlılığının yüksek çıkması ise buna benzememektedir.

Çalışmamızda, 20 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubumuzda B.abortus antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testinde 5, B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testinde ise 6 pozitif sonuç saptadık. Dolayısıyla bu çalışmada, B.abortus antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testinin % 75 oranında bir özgüllüğe, B. melitensis antijeni kullanılarak yapılan lam aglutinasyon testinin ise % 70 oranında bir özgüllüğe sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu veriler lam aglutinasyon testinin yanlış pozitif sonuçlar verebileceğini, bu nedenle alınabilecek pozitif sonuçların Standart Tüp Aglutinasyon Testi ile doğrulanması gerektiğini göstermekte olup, ancak bu koşulla lam aglutinasyon testinin tarama testi olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

## SONUÇ:

Çalışmamızda yer alan kesin brusellozlu 21 hastanın serumu; ELISA-IgG, ELISA-IgM, Standart Tüp Aglutinasyon Testi (STAT), B.abortus antijeni kullanılarak yapılan Lam Aglutinasyon Testi ve B.melitensis antijeni kullanılarak yapılan Lam Aglutinasyon Testleri ile değerlendirildi. Çalışmamızın sonucunda Standart Tüp Aglutinasyon Testi'nin %100 oranında bir duyarlılığı olduğu ortaya kondu. Brucella-ELISA-IgM testinin akut brusellozlu hastalarda %100 oranında bir duyarlılığa sahip olduğu saptanırken, Brucella-ELISA-IgG testinin akut ve kronik brusellozlu hastaların tamamında % 85,7 oranında bir duyarlılığa sahip olduğu saptandı. Yapılan istatistiksel çalışmada ise duyarlılık yönünden Brucella-ELISA'nın, Standart Tüp Aglutinasyon Testi'ne bir üstünlüğü olmadığı görüldü. Lam Aglutinasyonlarında ise kullanılan antijen çeşidine göre değişik oranlarda duyarlılıklar ortaya konmasına karşılık, bu testlerin özgüllüklerinin ELISA ve Standart Tüp Aglutinasyon Testlerine göre daha düşük olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmamızda, zannedildiğinin aksine, Brucella-ELISA' nın bruselloz tanısında en hassas test olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Brucella-ELISA yine de, daha kısa zamanda sonuç vermesi, blokan antikordardan etkilenmemesi ve ayrıca IgG ve IgM tipi antikorları ayrı ayrı saptayabilmesi sayesinde hastanın klinik durumu hakkında daha iyi bilgi vermesi yönünden Standart Tüp Aglutinasyon Testi'ne göre bazı avantajlar sağlamaktadır. Buna karşılık bu testin çalışılması için daha fazla araç gerece ve eğitimli personele ihtiyaç vardır. Ayrıca Brucella-ELISA'nın ticari firmalardan temin edilerek uygulanmasının maliyeti oldukça yüksektir ve laboratuvar koşullarında hazırlanarak ucuza maledilmesi mümkün ise de her tür laboratuvar koşullarında rahatlıkla hazırlanabileceği söylenemez.

Bütün bu yönleri dikkate alındığında, rutin uygulama için güvenilir ve maliyetinin düşük olması nedeniyle Standart Tüp Aglutinasyon Testi'ni en ideal test olarak öneriyoruz. Bununla birlikte, hastalığın akut ya da kronik dönemde olup olmadığının anlaşılması veya kronik bir brusellozun alevlenmesinin belirlenebilmesi için Brucella-ELISA'yı tavsiye ediyoruz. Yukarıdaki testlerin yapılamadığı durumlarda ise özgüllüğünün düşük olmasına rağmen lam aglutinasyon testleri önerilebilir.

**ÖZET :**

Bu çalışmada, bruselloz'un serolojik tanısında kullanılan Standart Tüp Aglutinasyon Testi (STAT), Lam Aglutinasyon Testi ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay'ın (ELISA) duyarlılık ve özgüllük açısından birbirlerine olan üstünlükleri araştırıldı.

Bakterinin izole ve idantifiye edilerek tanı konulduğu brusellozlu 21 hastanın serumu, ELISA-IgG, ELISA-IgM, Standart Tüp Aglutinasyon Testi (STAT), B.abortus ve B.melitensis antijenleri ile yapılan Lam Aglutinasyon Testleri ile değerlendirildi. Standart Tüp Aglutinasyon Testi ile 21 (%100), B. melitensis antijeni ile yapılan Lam Aglutinasyon Testi ile 20 (% 95,2), ELISA-IgG ile 18 (% 85,7), ELISA-IgM ile 14 (% 66,6), B. abortus antijeni ile yapılan Lam Aglutinasyon Testi ile 14 (% 66,6) tane pozitif serum saptandı. Brucella-ELISA-IgM testinin akut brusellozlu hastalarda %100 oranında bir duyarlılığa sahip olduğu saptanırken, Brucella-ELISA-IgG testinin akut ve kronik brusellozlu hastaların tamamında % 85,7 oranında bir duyarlılığa sahip olduğu saptandı. Buna ilaveten, Brucella-ELISA-IgM testi kronik brusellozlu hastaların tümünde negatif sonuç verdi.

Sonuç olarak, rutin uygulama için güvenilir ve maliyetinin düşük olması nedeniyle Standart Tüp Aglutinasyon Testi'ni en ideal test olarak öneriyoruz. Bununla birlikte, hastalığın akut ya da kronik dönemde olup olmadığının anlaşılması veya kronik bir brusellozun alevlenmesinin belirlenebilmesi için Brucella-ELISA'yı tavsiye ediyoruz. Yukarıdaki testlerin yapılamadığı durumlarda ise özgüllüğünün düşük olmasına rağmen lam aglutinasyon testleri önerilebilir.



### SUMMARY:

In this study, Standard Tube Agglutination Test (STAT), Slide Agglutination Test and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), which were used in the serologic diagnosis of brucellosis, were investigated from the points of sensitivity and specificity.

The sera of 21 patients having brucellosis, diagnosed by the isolation and identification of the bacterium, were evaluated by ELISA-IgG, ELISA-IgM, Standard Tube Agglutination Test (STAT) and Slide Agglutination Tests using *B.abortus* and *B. melitensis* antigens. Seropositivity detected in 21 sera was 21 (100%), 20 (95,2 %), 18 (85,7 %), 14 (66,6 %) and 14 (66,6 %) using Standard Tube Agglutination Test, Slide Agglutination Test using *B.melitensis* antigen, ELISA-IgG , ELISA-IgM and Slide Agglutination Test using *B.abortus* antigen, respectively. It was established that Brucella-ELISA-IgM test had a sensitivity of 100 % in the patients having acute brucellosis. It was also established that Brucella-ELISA-IgG test had an overall sensitivity of 85,7 % in all the acute and chronic brucellosis patients. However, the Brucella-ELISA-IgM test gave negative results in all chronic brucellosis patients.

As a conclusion, Standard Tube Agglutination Test is recommended as the ideal test for routine usage because of its reliability and low cost. However, Brucella-ELISA is recommended in order to determine whether illness is at the acute or chronic stage. In cases where the above-mentioned tests are not available, the Slide Agglutination Tests, which have low specificity, may be advised for use.

**KAYNAKLAR:**

1. Hall WH, Khan MY: Brucellosis In Infectious Diseases. Ed.By Hoeprich PD, Jordan MC. J.B.Lippincott Company. Fourth Edition. 1989, 1282-1288.
2. Bilgehan H : Brucella, Klinik Mikrobiyoloji - Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları, İzmir. 1990, 155-166.
3. UNAT E.K. : Brucella bakterileri, Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi. Dergah Yayınları, İstanbul. İkinci Baskı.1986, 680-695.
4. Arda M : Türkiye'de hayvan brusellozunun durumu ve bruselloz mücadele projesi. I.Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, İzmir. 1980, 166-177.
5. Spink W.W., A.B., M.D., D.Sc. : Brucella In Infectious Disease and Medical Microbiology. Ed.By Braude A.I., et al. 1986, 320-323.
6. Spink W.W., M.D. : Brucellosis In Infectious Disease and Medical Microbiology. Ed.By Braude A.I., et al. 1986, 1217-1219.
7. Moyer N.P., Holcomb L.A. and Hausler W.J., JR : Brucella In Manual of Clinical Microbiology. Ed.By Albert Balows. 1991, 457-461.
8. Freeman, B.A. : (Burrows) Textbook of Microbiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 22.baskı. 1985, 505-512.
9. Corbel, M.J. : Recent Advances in the Study of Brucella Antigens and their Serological Cross-Reactions. Veterinary Bulletin. (55): 927, December-1985.

10. Altan, N. : Bruselloz epidemiyolojisi. I.Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı. İzmir. 1980, 179 -185.
11. Wolfgang KJ, Willet PH, Amos DB : Brucella In Zinsser Microbiology. Appleton-Century-Crofts Norwalk, Connecticut USA. 18'th Ed. 1984, 665-671.
12. Crosby E, Liosa L, Quesada MM : Hematologic changes in brucellosis. J. Infect. Dis. 150: 3: 419-424, Sept.1984.
13. Mikolich J.D., Boyce J.M. : Brucella species In Principles and practice of Infectious Dis. Ed.By Mandell G.L., Douglas R.G., Bennette J.E. Churchill Livingstone Inc. 1990, 1735 -1741.
14. Bashir R, Al-Kawi MZ, Order EJ : Nervous system brucellosis, Diagnosis and Treatment. Neurology. 35: 1576-1581, 1985.
15. Mousa AM, Koshy TS, Araj GF : Brucella Meningitis; Presentation, diagnosis and treatment, a prospective study of ten cases. Querterly Journal of Medicine. New series. 60: 233: 873-885, Sept.1986.
16. Al-Kasab S, Al-Fagih MR, Al-Yousef S : Brucella Infective Endocarditis. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 95: 862-867, 1988.
17. Huelgas RG, De Mora M, Porras JJ : Brucella and acute pericarditis: fortuitous or causal association. J. Infect. Dis. 154: 3: 544, Sept.1986.
18. Hall W.H. : Brucellosis In Bacterial Infections of Humans. Ed.By Evans A.S. and Brachman P.S. Plenum Medical book company, New York. Second edition. 1991, 133-145.

19. Pellicer T, Ariza J, Foz A : Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *The J.of Inf.Dis.* 157: no.5, 918-24, 1988.
20. Meyer M.E. : Immune Response to Brucella. In *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Ed.By N.R. Rose. H.Friedman and J.L. Fahey. American Society for Microbiology.Washington. 1986, 385-387.
21. Bilgehan H. : Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları 1.Baskı. 1992, 203-207.
22. Moyer NP, Evins GM, Pigott NE, Hudson JD, Forshy CE, Feeley JC, and William J, Hausler JR. : Comparison of Serologic Screening Tests for Brucellosis. *J.of Clin.Microbiol.* vol.25, no.10, 1969-72, Oct.1987.
23. Kocabeyođlu Ömer : Brucella abortus, Brucella melitensis, Yersinia enterocolitica serotip O:3 ve O:9 arasındaki antijenik ilişkinin araştırılması. *Mikrobiyol Bült.* 24: 218-225,1990.
24. Caces E, De l'auture H, Vol S, Tichel J, Boulard P : *Comp Immun Microbiol. Infect. Dis.* 1: 107-114, 1978.
25. Badur Selim: Brusellozda Serolojik Tanı ve Seroepidemioloji. *Klinik Dergisi.* 3(1):17-20, 1990.
26. Rusell AO, Patton CM, Kaufmann AF : *J.Clin. Microbiol.* 7 : 454-464, 1978.
27. Reddin JL, Anderson RK, Jenness R, Spink WW : Significance of 7S and macroglobulin brucella agglutinins in human brucellosis. *The New Eng.J.Med.* vol.272, no.24, 1263-67, 1965.

36. Araj G.F. : Profiles of Brucella specific immunoglobulin G subclasses in sera of patients with acute and chronic Brucellosis. *Disease*. 2: 401-410, 1988.
37. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, and Gudiol F : Specific Antibody Profile in Human Brucellosis. *Clinical Inf.Dis*. 14:131-40, 1992.
38. Saz JV, Beltran M, Diaz A, Agulla A, Merino FJ, Villasante PA, Velasco AC : Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis. *Eur-J-Clin-Microbiol*. vol.6, no.1, 71-74, 1987.
39. Araj GF, Lulu AR, Saadah MA, Mousa AM, Strannegard I-L, and Shakir RA : Rapid Diagnosis of Central Nervous System Brucellosis by ELISA. *J.of Neuroimmunology*.12:173-182, 1986.
40. Riezu Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Marin CM, and Diaz R : Comparison of Lipopolisaccharide and Outer Membrane Protein-lipopolisaccharide Extracts in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Brucella ovis Infection. *J.of Clin.Microbiol*. vol.23, no.5, 938-942, 1986.
41. Afzal M, Tengerdy RP, Squire PG, Ellis RP : Characterization of Brucella ovis Lipopolisaccharide and its Use for Diagnosis of Ram Epididymitis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. of Clin. Microbiol*. 20:1159-64, Dec 1984.
42. Luis Fernandez-Lago, Ramon Diaz. Demonstration of Antibodies against Brucella melitensis 16M Lipopolisaccharide and Native Hapten in Human Sera by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J.of Clin.Microbiol*. vol.24, no.1, p.76-80, July1986.

43. Hunter SB, Bibb WF, Shih CN, Kaufmann AF, Mitchell JR, and McKinney RM : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Major Outer Membrane Proteins of *Brucella melitensis* to Measure Immune Response to *Brucella* Species. *J.of Clin. Microbiol.* vol.24, no.4, 566-572,1986.
44. Hewitt WG and Payne DJH : Estimation of IgG and IgM brucella antibodies in infected and non-infected persons by a radioimmune technique. *J.Clin.Pathol.* 37: 692-696, 1984.
45. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: Bağımlı Gruplarda Kikare Testi, *Biyoistatistik.* 4.Baskı, Ankara,1993;174-78.
46. Anon Joint FAO/WHO : Expert Committee on Brucellosis, WHO/Technical Report, 6'th Ed., Genova 1986; Series no:740.
47. Jerry B.G., Reuben D.V., Robert P.W. : Microagglutination procedures for febrile agglutination tests. *Applied. Microbiol.* (10):635-40, 1971.
48. Young Edward J. : Serologic Diagnosis of Human Brucellosis; Analysis of 214 Cases by Agglutination Tests and Review of the Literature. *Reviews of Inf. Dis.* 13: 359-72, 1991.