

4475

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BRUSÉLLOZUN SEROLOJİK TANISINDA  
UYGULANILAN WRIGHT AGLÜTİNASYON,  
ROSE-BENGAL VE COOMBS TESTLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Müge OĞUZKAYA

Danışman  
Doç.Dr.Hüseyin KILIÇ

KAYSERİ - 1995

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

## TABLO VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo I : Brucella Bakterilerinin Biyokimyasal Özellikleri .....	6
Tablo II : Brusellozda Uygulanan Serolojik Testler.....	10
Tablo III : 2295 Serum Örneğinin WAT Sonuçları .....	22
Tablo IV : Seropozitifliğin WAT Titrelerine Göre Yüzdesi .....	23
Tablo V : WAT ile Seropozitif Bulunan Serum Örneklerinin RBPT ile Karşılaştırılması .....	24
Tablo VI : WAT ile Seropozitif Bulunan 189 Serum Örneğinin Coombs Testiyle Analizi .....	25
Tablo VII : Coombs Testindeki Titre Artışının Dağılımı .....	25
Tablo VIII : WAT ile Seronegatif 200 Serumun Coombs Sonrası Değerlendirilmesi .....	26
Tablo IX : WAT ve Coombs ile Seronegatif 100 Serumun RBPT ile Karşılaştırılması .....	26
Resim 1 : Standart Tüp Aglütinasyon Testi (WAT) .....	19
Resim 2 : Rose-Bengal Testi (RBPT) .....	20

## KISALTMALAR

- ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbent Assay = Enzimle  
işaretili antikor yöntemi
- PCR** : Polymerase Chain Reaction = Polimeraz zincir  
reaksiyonu
- WAT** : Wright Agglutination Test = Wright aglütinasyon  
testi
- RBPT** : Rose-Bengal Plate Test = Rose-Bengal lam aglütinasyon  
testi
- KBD** : Kompleman birleşme deneyi
- IHAT** : İndirekt hemaglütinasyon testi
- IFAT** : İndirekt fluoresan antikor testi
- Ig** : İmmunoglobulin
- LPS** : Lipopolisakkarit
- R** : Rough
- S** : Smooth

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
MATERYAL VE METOD.....	17
BULGULAR .....	22
TARTIŞMA .....	27
SONUÇ .....	31
ÖZET .....	33
SUMMARY .....	35
KAYNAKLAR .....	37

## GİRİŞ VE AMAÇ

Brucella grubu bakteriler; intrasellüler yerleşirler ve dünyada önemli halk sağlığı problemlerinden biri sayılan brusellozun etkenidir. Bu mikroorganizma bir antropozoonoz etkenidir. Brucellalar hayvandan hayvana ve hayvandan insana kontamine olmuş dışkı, idrar, süt, süt ürünleri ve dokular ile temas sonucu bulaşır.

Bruselloz'da genel enfeksiyon belirtileri yanında, makül şeklinde döküntüler, hepatomegali, splenomegali, lenfadenomegali, menenjit, epididimoorşit gibi klinik belirtilerin spesifik olmaması nedeni ile laboratuvar tanı yöntemleri ön plana çıkmıştır. Mikroorganizmanın izolasyonundaki güçlükler nedeniyle, tanıda serolojik yöntemlerden daha fazla yararlanılmaktadır (9,14,46,49, 52,55).

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi klinik ve polikliniklerinden Bruselloz ön tanısı ile Merkez Laboratuvarı'na gönderilen

hasta serumlarında Brucella antikoru yönünden Rose-Bengal, Standart tüp aglütinasyon (Wright) ve Coombs testleri ile incelenmeleri ve bu testlerin bir-biri ile karşılaştırılmaları amaçlandı.



## GENEL BİLGİLER

### Tarihçe

Brucella'lar daha çok sığır, koyun, keçi, domuz, köpek gibi hayvanlarda genital organ, meme bezleri ve plasenta enfeksiyonlarına etken olan bakterilerdir (11).

Brucella grubu mikroorganizmaların ilk üyesi olan B.melitensis 1887 yılında Bruce tarafından Malta Adası'nda "*Malta humması*" adı verilen bir hastalıktan ölen İngiliz askerlerin dalağında izole edilmiş ve aynağının keçilerin süt ve idrarı olduğu belirtilmiştir (1,11,17,18).

Sığırlarda düşüğe sebep olan B.abortus 1897'de, B.suis 1914'te izole edilmişlerdir. Bunlar uzun süre ayrı bakteriler olarak kabul edilmiş, daha sonra morfolojilerine ve kültür özelliklerine dayanarak, David Bruce anısına izafeten *Brucella* cinsi içerisinde, ayrı iki tür olarak toplanmışlardır (18,45).

B.ovis'in, 1953 yılında Avusturalya'da koçlarda epididimit ve orşit, dişilerde yavru atmaya sebep olduğu gösterilmiştir. B.neotoma 1957'de tarla farelerinden ve B. canis köpeklerden izole edilmiştir (17). İnsanlarda B.abortus, B.melitensis, B.suis ve B.canis'in enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir (36).

Türkiye'de ilk brusella izolasyonları 1915 yılında Kuleli Hastanesi'nde bir erde, Hüsamettin Kural ve Mahmut S.Akalın; sığırlarda ise 1931'de Zühtü Berke; koyun ve keçilerde, 1943'te Gölem ve 1944'te Köylüoğlu ve Aktan tarafından bildirilmiştir. Bu tarihlerden sonra yapılan çalışmalar enfeksiyonun hayvanlarda ve insanlarda yaygın olduğunu göstermiştir (5).

Brusellozun yaygınlığı konusunda ülkemizde ve dünyada pek çok yayın bulunmaktadır (7,12,13,16,21,23,25,26,28,30,32,33,37,45,48).

## MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Brucella cinsi bakteriler 0.6-2 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) uzunluğunda 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  eninde hareketsiz, sporsuz, küçük kokobasillerdir. B.melitensis daha çok kokobasil, B.suis ise basil şeklindedir. B.abortus ikisi arasında yer alır. Bununla beraber morfolojilerine dayanarak türlerinin ayırımına karar vermek zordur (1,11,17,36,43,45). Bakteriyolojik boyalarla oldukça iyi boyanırlar. Gram negatiftirler. Bazen bipolar boyanırlar.

Brucella'lar küçük olduklarından moleküler hareket nedeni ile yerlerinde titreşirler. Buna *Braunien hareket* de denir. Organizmadan yeni ayrıldıkları zaman S tipi kolonilerde ince bir kapsüllerinin bulunduğu saptanır. Pasajlarla ve R. koloni şekillerinde bu kapsüller kaybolur (1,11).



## KÜLTÜR KARAKTERLERİ

Brucella cinsi bakteriler ilk kültürlerinde yavaş ürerler (5-10 gün veya daha fazla). Daha sonraki pasajlarda ise koloniler 37 °C'de 48 saat sonra ancak görülebilirler. İlk izolasyonlarında, intrasellüler yaşamaları sebebiyle beslenme ihtiyaçları komplekstir. En iyi üreme et veya karaciğer buyyonlu veya triptozla zenginleştirilmiş besiyerlerinde elde edilir. Bazı suşlar seruma ihtiyaç duyarlar (41,43). 20-40 °C'de ürerler. Optimal üreme ısısı 37 °C ve optimal pH=6.5-7.2'dir. İlk izolasyondan sonra buyyon ve jeloz gibi basit besiyerlerinde üremeye alışır. Buyyonu ince granüler çöküntü halinde yavaş olarak bulandırır. Uzun süreli inkübasyondan sonra buyyon viskoz hale döner. Jelozdaki kolonileri küçük, yuvarlak, saydam, şebnem tanesine benzeyen, konveks, S tipindedir ve ince kapsülleri vardır. Kolonileri pigmentsiz ve hemolizsizdir. Fakat B.melintesis ve B.abortus'un bazı suşları eski kültürlerde kahverengine dönüşür. Eski kültürlerinde R kolonileri oluşur. Ancak B.ovis ve B.canis ilk izolasyonlarında R tipi koloni oluştururlar (11,17,36,43).

## BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Brucella grubu mikroorganizmalar değişik karbonhidratları kullanırlar. Fakat oluşan asit+gaz miktarı çok azdır. Jelatini eritmezler, indol oluşturmazlar. Nitratları nitritlere çevirirler. Üreaz aktivitesi B.suis bakterisinde yüksektir. Brucella'ların her üç tipi de H<sub>2</sub>S oluşturur. Katalaz ve genellikle oksidaz pozitifler (11,36,43,45).

Brucella bakterilerinin bazı boyalar ile olan ilişkilerinde de ayrılıklar görülür. Besiyerlerine belli konsantrasyonlarda konulan thionin, bazik fuksin, kristal viyole ve pironin gibi maddeler karşısında B.melintesis inhibisyona uğramadan ürer. B.abortus yalnız thionin tarafından inhibe olur ve B.suis bazik fuksin, kristal viyole, pironin tarafından inhibe edildiği halde, thioninden etkilenmeyerek üremesini sürdürür (Tablo I) (17,43).

Rus araştıncılar tarafından izole edilen ve Tbilisi fajı (Tb) olarak isimlendirilen bir faj *B.abortus*'u ve *B.suis*'i standart şartlarda erittiği halde, diğerlerini eritmez. Halen *Brucella*'lara karşı elde edilmiş olan fajlar şunlardır: Tb, Firenze (Fi), Weybrigel (Wb), Berkeley (BK<sub>0</sub>, BK<sub>1</sub>, Bk<sub>2</sub>), RIO ve RIC (45).

*Brucella*'lar ısı ve dezenfektanlara karşı dayanıksızdırlar. Ultraviyole ve X-ışınları normal sterilizasyon şartlarında *Brucella* için öldürücüdür. Etanol, izopropanol, fenol hipoklorit, etilen oksit ve formaldehit *Brucella*'lar için öldürücüdür (17).

Sütte yüksek ısı ve kısa zamanda pastörizasyonla ölmeleri epidemiyolojik bakımdan önemlidir. Çiğ sütte oda sıcaklığında asit oluşumu sebebiyle çabuk ölürler. Taze, asitsiz peynirlerde uzun süre (1-2 ay) canlı kalmalarına rağmen, laktik veya propiyonik asitle fermente edilmiş peynirlerde yaşayamazlar. *Brucella* bakterileri gün ışığı görmedikleri nemli toprakta 2 ay, suda 15 gün, kültürlerde ve soğukta 4 ay kadar canlı kalabilirler. Bu bakterilerin biyokimyasal özellikleri Tablo I'de özetlenmiştir (11,43)

Tablo I. *Brucella* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Türler	Biyotip	CO <sub>2</sub> ihtiyacı	H <sub>2</sub> S düşümü	Üreaz aktivite.	Boya Varlığında Üreme		Erit. (1 mg/L)	Penicilin 50	Aglütinasyon		
					Bazik fuksin	Tiyonin I II			A	M	R
<i>B.melitensis</i>	1	-	-	var	+	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	var	+	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	var	+	+	+	+	+	+	-
<i>B.abortus</i>	1	+	+	1-2 saat	+	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	1-2 saat	-	-	±	-	+	+	*
	3	±	+	1-2 saat	+	-	+	+	+	+	*
	4	±	+	1-2 saat	+	-	-	+	+	*	+
	5	-	-	1-2 saat	+	-	+	+	+	*	+
	6	-	±	1-2 saat	+	-	+	+	+	+	*
Suş 10	7	-	±	1-2 saat	+	-	+	+	+	+	-
	9	±	+	1-2 saat	+	-	+	+	+	*	+
	1	-	+	1-2 saat	+	-	-	-	-	+	-
<i>B.suis</i>	1	-	+	0-30 dk	-	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	0-30 dk	-	-	+	+	-	+	*
	3	-	-	0-30 dk	+	+	+	+	±	+	-
	4	-	-	0-30 dk	+	+	+	+	-	+	+
<i>B.canis</i>	-	-	0-30 dk	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>B.neotomaz</i>	-	+	0-30 dk	-	-	+	+	-	+	-	-
<i>B.ovis</i>	+	-	Negatif	+	+	+	-	-	-	-	+

Brucella bakterilerinin ekzotoksinleri yoktur. Fakat hücre substratları toksiktir ve toksinin hücre duvarının bir komponenti olduğu tesbit edilmiştir (11).

S tipi Brucella'lar *Vibrio cholerae*, *E.coli* serotip 0:57, H:7, *Salmonella* serotip 0:30 ve *Yersinia enterocolitica* serotip 0.9 ile cross reaksiyon verir. S tipi koloni yapanların dışındaki suşlar *Pseudomonas* türleri ile çapraz reaksiyon verirler (43).

## ANTİJEN YAPISI

Aglutinin absorpsiyon ve jel difüzyon tekniği ile yapılan incelemelerde Brucella'larda somatik A ve M antijenleri ile bir yüzeyel L zarf antijeninin bulunduğu ortaya konulmuştur. Daha çok *B.abortus* kökenlerinde bulunmuş olan L antijeni, yeni ayrılan bakterilerde var olup onların immun serumlarla aglütinasyonuna engel olmakta ancak 100 °C'de 30 dakika ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadır. Bu özelliği ile *Salmonella*'lardaki Vi antijenine benzer.

Somatik A ve M antijenleri Brucella bakterilerinde ayrı oranlarda bulunurlar. *B.melitensis*'te daha çok M ve daha az miktarda A antijeni bulunmasına karşın, *B.abortus* ve *B.suis*'te daha az oranında M ve daha fazla A antijeni vardır. Bu suretle aglütinin absorpsiyon testleri kullanarak *B.melitensis*'i diğerlerinden serolojik olarak ayırmak olanağı olduğu halde *B. abortus* ile *B.suis*'i birbirinden ayırmak olanaksızdır (1,10,11,36).

## PATOJENİTE

Brucella bakterilerinin giriş kapısı enfekte besinler, süt ve süt ürünleri ile sindirim kanalı, damlacık enfeksiyonu yolu ile, mukozalar ve enfekte dokulara temas suretiyle deri çatlaklarıdır (5,11,31).

Bakteriler genellikle zedelenmiş deriden vücuda girer ve oradan lenf bezlerine geçerek lenfadenopati oluşturur. Ağız mukozasından girerse boğaz lenf organlarında, barsak mukozasından geçerse mezenter lenf bezlerinde yerleşirler. Burada çoğalan bakteriler daha sonra kan dolaşımına karışırlar, lenf bezleri, karaciğer, dalak, kemik iliği gibi retiküloendotelyal sistem hücrelerinin bulunduğu organlarda lokalize olurlar. Bu bakteriler makrofaj ve mononükleer hücrelerin dahil olduğu fagositik hücrelerde gözlenmiştir. Hücre içerisindeki bakteriler antikor ve antimikrobik ilaçlardan korunurlar (11,34, 36).

*Brucella* bakterilerinin hücre ve makrofaj içerisinde üremelerinin sebebini araştırmak için pek çok çalışma yapılmıştır. Smith ve arkadaşları, *B.abortus*'un fetal sığırdokularına karşı bir eğilimi olduğunu, fetal embriyonlarda % 60-85, koryonda % 25, amniyotik ve allontoik sıvılarda % 2-8 oranında bulunduğunu tesbit etmiştir. Bu araştırmacılar gebe sığırdokularında ayrıca dört karbonlu polihidrik bir alkol olan *Erythritolün* bulunduğunu da göstermişlerdir. Bu alkol *B.abortus* için temel bir besiyerinde karbonhidrat kaynağı görevi görür. Bu sebeple *erythritolün* varlığı ile sığırdokularında organotropizm arasında karşılıklı bir ilişki bulunmaktadır. İnsanlarda böyle doku lokalizasyonlarının olmaması, bu organlarda fazla miktarda *erythritolün* bulunmaması ile ilgilidir (1).

## TANI

Brusellozun diagnozu klinik belirtilerin değişikliği nedeniyle güçtür. Bir kısım olgular klinik belirti göstermezler. Akut ve subakut olgular ateş ve bakteriyemi ile seyrederek kronik olgularda bakteriyemi yoktur ve lokalize bir odak enfeksiyonu ile seyrederek veya odak da göstermezler. Klinik belirtilerle brusellozdan şüphe edilir, tam laboratuvar yöntemleriyle konur. Bakteriler intrasellüler olarak bulduklarından kan kültürü fazla yararlı değildir (23). Etkene yönelik tanıda bakteri izolasyonu ve serolojik testler tek seçenek-

tir (55). Bakterinin izolasyonu ve identifiye edilmesi tanının tam olarak konulması için yeterlidir. Fakat antikorların bulunması yalnız immün cevabın göstergesidir. Mevcut enfeksiyondan ziyade geçirilmiş bir enfeksiyonu gösterir (1,12,42). Brusellozun laboratuvar tanısı için genelde şu yöntemlere başvurulur:

- 1- Kültür ve izolasyon
- 2- Serolojik testler
- 3- Allerjik testler
- 4- Hayvan deneyleri.

### 1- Kültür ve İzolasyon

Kan, BOS veya doku parçaları tripticase'lı soya buyyonu veya thionin tripticose agarına, aynı terkibi taşıyan çift fazlı (sıvı-katı) Castenada ortamlarına çift olarak ekilir. Vasatlardan biri normal, diğeri % 5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama konur. 2-3 günde bir sıvı ortamlardan katı ortamlara pasajlar yapılır. Üreme olup olmadığı izlenir. Üç haftalık süre ile üremeyenler negatif kabul edilir. Brucella'ya benzer mikroorganizmalar ürerse; biyoşimik özellikleri incelenir. Absorbe serumlarla aglütinasyona tabi tutularak tip tayinine gidilir (11,23,36, 43,53).

### 2- Serolojik Testler

Brusellozda bakteriyi üretmek için uzun süre inkübe etmek gerektiğinden ve bu süre içerisinde hasta kanında antikorlar oluştuğundan, serolojik reaksiyonlarla hastalığın tanısı konulabilir. Hastalığın serolojik tanısında en çok aglütinasyon testi kullanılmaktadır (1,8,44,56).

Brusellozun serodiyagnozunda en çok aglütinasyon testi uygulanırsa da, gerek hastalığa tanı koyma ve gerekse prevalans ve insidans tesbitinde diğ

testlerden yararlanılmaktadır. Hastalığın serodiyagnozunda uygulanan serolojik testlerin avantaj ve dezavantajları Tablo II'de özetlenmektedir.

**Tablo II. Brusellozda Uygulanan Serolojik Testler (42)**

Testin Adı	Avantajları	Dezavantajları
Standart tüp aglütinasyon	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uygulanması ve değerlendirilmesi kolaydır</li> <li>- Standart antijen kullanılır</li> <li>- Hastalığın erken safhalarını belirler</li> <li>- IgM, IgG'leri tayin eder</li> </ul>	Yalancı negatiflikler görülebilir
2 Merkaptoetanol aglütinasyonu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IgG'leri tayin eder</li> <li>- Tanıda son derece önemlidir</li> </ul>	Yalancı negatiflikler görülebilir
Coombs (antihuman globulin)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Özellikle IgG ve IgA; blokan antikorların varlığını belirler</li> </ul>	Uzun zaman gerektirir
Kompleman birleşmesi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kronik bruselloz tanısında kullanılır</li> <li>- IgG'leri tayin eder</li> </ul>	Genellikle hastalığın erken safhalarında negatiftir
Radioimmün assay (RIA) testi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IgG, IgM ve IgA'ları tayin eder</li> <li>- IgM'lere aglütinasyon testinden çok daha hassastır</li> </ul>	Radyoaktif madde gerektirir
Rose-Bengal Plate aglütinasyon testi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laboratuvar şartlarının bulunmadığı ortamlarda kullanılabilir</li> <li>- İyi bir tarama testidir</li> </ul>	Az duyarlıdır
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Özgül IgG ve IgM antikorları tayin eder</li> </ul>	

Akut brusellozlu hastaların çoğunda hastalığın ilk günlerinden itibaren IgM yapısında antikorlar oluşur. Daha sonra IgM'i hızla IgG ve IgA yapısında antikorlar takip eder. Hastalığın 3. veya 4. haftasında antikor titresi en üst seviyeye ulaşır ve hastalık geçtikten sonra bile kanda saptanabilir. Brucella sp'ye karşı IgE antikorları da bazı brusellozlu hastalarda gözlenebilir, fakat bunların klinik önemi belirsizdir (7,8,26,42,43).

## 2.a) Standart Tüp Aglütinasyon Testi

Antijen olarak standart ısı ile öldürülmüş fenollü bakteri süspansiyonu kullanılır. Brucella bakterileri hızlı antijenik yapı değişikliği gösterdiklerinden, antijenler iyi aglütine olan kökenlerin S kolonilerinden hazırlanmalıdır (1,12,42,50,55).

Aglütinasyon testinde olası bir prozon olayını gözden kaçırmamak için, hasta serumu bir dizi tüpte en az 1/640 oranında sulandırılıp üzerine eşit miktarda standart Brucella antijeni ilave edilir. İnkübasyonu takiben tüpteki sıvının berraklaşması, aglütinasyonun tüpün dibinde yaygın bir şekilde görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Resim 1). 1/40 ve yukarı sulandırmalardaki aglütinasyon tanı açısından önemlidir. 1/160 ve yukarı sulandırmalar ise kesin bruselloz göstergesidir (1,18).

Tüp aglütinasyon deneyi tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat saptanan antikorların hangi sınıftan olduklarının belirlenememesi, düşük titrede alınan pozitifliklerin yorumundaki güçlükler ve titrelerin zaman içinde süratle azalması tüp aglütinasyonunun olumsuz özellikleridir (42).

## 2.b) 2-Merkapto Etanol veya Rivanolle Aglütinasyon Testi

Klasik tüp aglütinasyon testinde Ig'lerin hangi sınıftan oldukları saptanamaz, ancak deney öncesinde hasta serumu 2 merkapto etanolle veya rivanolle muamele edilirse, IgM sınıfı antikor moleküllerinin polipeptid zincirleri kırılarak bu moleküllerin yıkıma uğratılması mümkün olur. Bu işlem sonucunda oluşacak olan pozitiflik IgG'ye bağlıdır. Kronik dönemde IgM gittikçe azalarak ortadan kalkarken IgG'nin yapımı sürer. Bu test kronik dönemdeki olguların incelenmesi için uygundur. Bu testin olumlu bulunması aglütinasyonun IgG antikorlarına bağlı olduğunu, yani hastalığın kronikleştiği anlamını taşır. Önce olumlu iken bu işlem sonunda olumsuz aglütinasyon görülmesi, ilk aglütinasyonun IgM antikorlarına bağlı olduğu anlamını taşır (4,12,36,56).

### 2.c) Coombs (anti-human globulin) Tüp Aglütinasyon Testi

Bazı serumlar spesifik antikorlar içermelerine rağmen, aglütinasyon meydana gelmez. Aglütinasyon vermeyen serolojik tüplerdeki antijen-antikor karışımı 3 kez tuzlu su ile yıkanıp, yeniden süspansiyon yapılır. Süspansiyon üzerine her tüpe birer damla Coombs serumu (1/10'luk) damlatılır. Eğer reaksiyon blokan antikorların varlığı nedeniyle meydana gelmedi ise, bu uygulama ile aglütinasyon görülür. Brusellozda oluşan antikorların önemli bir kısmı bu niteliktedir. Blokan antikorlar hastalığın subakut döneminde görülebilir. Hastalık aktivitesinden ayrı olarak uzun yıllar serumda kalabilirler (1,5,12,13,21,23).

Bloke edici blokan antikorlar olarak da tanımlanan Ig'lerin varlığında antijen-antikor birleşmesi gerçekleşmekte fakat aglütinasyon meydana gelmemektedir. Ortama ilave edilen Coombs reaktifi antikorlar arası köprüler kurarak gerçek seropozitifliğin ortaya çıkmasını sağlar (12,42,43).

### 2.d). Rose-Fengal Plate Testi (RBPT)

B.abortus S.99 kökeninden hazırlanan ve özel teknikle boyanan tamponlu tuzlu sudaki yoğun Brucella antijeni kullanılarak yapılan bir deneydir (Resim 2). Kullanılan tamponun pH'sı 3.6-3.7'ye ayarlı olduğundan, serumdaki IgM'lerin aktivitesi önlenmiş olur. Sonuçta bu test ile saptanan antikorların büyük bir bölümü IgG yapısındadır.

Direkt kan ile yapılan aglütinasyona *Spot Test* adı verilir (11,12,15).

### 2.e) Kompleman Birleşmesi Deneyi

KBD, bruselloz tanısında güvenilir bir testtir. Tanıda özellikle IgG'ler, daha az miktarda IgM'ler rol oynar. Antijen olarak Brucella bakteri ekstraktı



kullanılır. Mikro ya da makro teknikle yapılabilir. IgG yapısındaki eksik anti-korlarda reaksiyona katıldıklarından Coombs testi ile aynı değerde sonuçlar alınabilir. Tüp aglütinasyon testi ile sonuç alınamayan kronik brusellozun tanısı için uygundur (1,11,12).

## 2.f) İndirekt Hemaglütinasyon Testi

Bakterinin Lipopolisakkarit (LPS) kısmı ile kaplı tannik asitle muamele edilmiş koyun eritrositlerinin kullanıldığı bu testte, çözünmüş antijenlerden de yararlanılabilir. Çok duyarlı olan bu testle nanogram düzeyindeki Ig'leri saptamak mümkündür (1).

## 2.g) İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)

Veterinerlik alanında fetal membranlarda ve düşük materyalinde antijen aramak için geliştirilmiş olan IFAT yöntemi, spesifik antikorların araştırılmasında kullanılır (3).

## 2.h) Opsonositofajik Test

Hasta serumundaki fagositozu kolaylaştıran ve *opsonin* adı verilen anti-korların ortaya çıkarılması için uygulanan bir testtir. Tanı hasta serumu, lökosit ve bakteri süspansiyonunun birbiri ile karıştırılmasından sonra 15 dakika 37°'de inkübe edilmesi ve buradan hazırlanarak, Giemsa ile boyanan preparatın incelenmesi ile konur. Bir lökosit tarafından fagosit edilen ortalama bakteri sayısı fagositik endeksi verir. Bu sayı 6-10 veya daha fazla ise test pozitifdir (1).

## 2.1) ELISA

Akut ya da kronik devrenin tanımlanmasında son derece duyarlı bir testtir. ELISA uygulamalarında tüp aglütinasyon için hazırlanmış LPS ekstraları veya çeşitli protein fraksiyonlarından yararlanılır. ELISA, özgül immünoglobulinleri tayin eder (6,10,12,13,26,27,38,39,51).

## 3- Allerjik Testler

Allerjik tanı için bakterilerden elde edilmiş ve saflaştırılmış nükleoprotein kompleksinden oluşan *Brucellergen* deri içine şırınga edilir. 25 saat içinde kızartı, ödem ve sertlik şeklinde reaksiyon görülürse test pozitifdir. Pozitif test kişilerin *Brucella*'lara karşı aşırı duyarlı olduklarını gösterir. Bu testin olumlu ya da olumsuz olması bruselloz tanısını uzaklaştırmaz. Deri testi antijeninin uygulanması aglütininlerin artmasına sebep olacağından, serolojik çalışmaların deri testinden önce yapılması gerekir (1,11,35).

## 4- Hayvan Deneyleri

Kobaylar *Brucella*'ya karşı duyarlı olup 2-4 hafta sonra hastalık belirtisi verirler. İncelenecek materyal kobayın periton, kas veya konjunktivasına inoküle edilir. Deneyde iki kobay kullanılıp bunlardan birisi inokülasyondan 3 hafta, diğeri 6 hafta sonra öldürülür. Erkek kobaylarda orşit, gebe dişi kobaylarda ise abortus görülür (1).

## BAĞIŞIKLIK

*Brucella* bakterilerinin oluşturduğu enfeksiyona konağın immun cevabı hem hücresel hem de humoraldir. Hücresel immün cevap hastalığın gidişini ve sonucunu belirtir. Antikorlar genellikle IgM, IgG ve IgA sınıflarındandır. Enfeksiyonun ilk birkaç gününde oluşan IgM daha sonra kantitatif olarak ka-

lır ve IgG predominant hale geçer (35). İnsan brusellozunda IgM antikoru ağıltınasyon, IgG antikoru kompleman fiksasyonundan sorumludur. Enfeksiyonu geçirenlerde ağıltıninler, opsoninler, bakterisidal antikoru ve hipersensitivite gelişir. Hücresel bağışıklıkta duyarlı T-lenfosit hücresi bir yandan mikrop öldürücü etkilerinin yanısıra saldıkları T-lenfokinlerle aktive ettikleri makrofaj ve lökositlerin yardımı ile hücresel bağışıklığın temel ögesidir. Brusellozda kazanılan bağışıklık tam değıldir. Relapslar sık görölür ve bağışıklık kanda antikoru bulunmasıyla sağılanamaz (1,5,11,36,42,47).

## EPİDEMİYOLOJİ

İnsanlar için bruselloz'un başlıca kaynağı koyun, sığır, keçi ve domuz olmak üzere çeşitli evcil hayvanlardır. Hastalık hemen tüm hayvan türlerini etkilediğinden diğeri evcil ve yabani hayvanlardan da insanlara bulaşma söz konusu olabilir. Bruselloz'un insandan insana bulaşması nadir görölün bir durumdur (1,5,11,31).

Hayvanlardan insanlara bulaşma sıklık sırasına göre başlıca üç yolla olur:

- 1) Sindirim kanalından
- 2) Deriden ve konjonktivadan
- 3) Solunum yolundan

Hasta hayvanların düşük materyali veya vajinal akıntı ve idrar gibi diğeri çıkartıları ile temas sonucu hastalığın bulaşma ihtimali çok yüksektir. Enfekte materyalin zedelenmiş deriye teması bulaşma şansını daha da artırır (36).

Enfekte süt ve süt ürünleri enfeksiyon kaynağıdır. Pişmemiş ya da pastörize edilmemiş halde alınan bu ürünler, enfeksiyona sebep olurlar. Brucella

etkenlerinin, dış ortamda uzun süre canlı kalabilmeleri nedeni ile, indirekt yollarla da insanlara bulaşma söz konusudur. Yapılan araştırmalar, Brucella etkeninin çeşme suyunda 37 gün, donma derecesinde 2.5 yıl, peynirde 2 ay ve 0 °C'daki dondurmada 1 ay süreyle canlı kalabileceğini göstermiştir. Ahır ve laboratuvarlarda inhalasyon yoluyla bulaşma olabilmektedir. Ayrıca konjonktiva veya deriye kaza sonucu inokülasyonla da bulaşma olabilmektedir. İnsandan insana bulaşma nadir olmakla birlikte, bu bulaşmada seksüel ilişkinin önemli bir yeri vardır. Brusellozun coğrafik dağılımı ise rezervuar olan hayvanların dağılımına göre değişmektedir. Bruselloz tüm dünyada yaygındır. Ülkemizde, B. melitensis ve B. abortus fazla oranda görülmesine rağmen, B. suis'e rastlanılmamaktadır (5,31,40).

## KORUNMA

Brucellozdan korunmada sütlerin pastörizasyonu veya kaynatılması şarttır. Çünkü ülkemizde iyi kaynatılmamış süttten hazırlanmış taze peynirler önemli bir enfeksiyon kaynağıdır. Etler iyi pişirilmelidir. Hayvan ve hayvansal ürünlerle uğraşanlar eldiven kullanmalıdır. Bruselloz'dan korunmada; B.abortus, B.melitensis Rev.I, B.suis-Z gibi suşlardan hazırlanan canlı attenüe aşılar, H38 gibi ölü Bruselloz aşıları kullanılmaktadır. Bu aşılar genellikle veterinerlik alanında uygulanmaktadır (31,35,54).

## MATERYAL VE METOD

Serum örnekleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Merkez Laboratuvarına, değişik klinik ve polikliniklerden bruselloz ön tanısı ile gönderilen 2295 kan örneklerinden alındı.

### a) Serumlar

Kan örnekleri 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serum örnekleri temiz serolojik tüplere alınıp çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Toplanan serum örnekleri WAT, indirekt Coombs ve RBPT ile incelendi.

## **b) Antijenler**

### **b.1) Standart Brucella Tüp Aglütinasyon Antijeni**

İnternasyonal Standart Anti-Brucella abortus serumu ile standardize edilmiş, B.abortus ve B.melitensis'in teşhisinde kullanılan antijen Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

### **b.2) Rose-Bengal Lam Testi Antijeni**

Aglütinasyon yeteneği standart serumla, standardize edilmiş, B.abortus S.99 suşunun ölü ve boyalı bir süspansiyonudur. Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

### **b.3) Coombs (anti-human globulin) Serumu**

Lorne Laboratuvar Ltd'de hazırlanmış, yerli aracı firmalar tarafından temin edildi.

## **YÖNTEMLER**

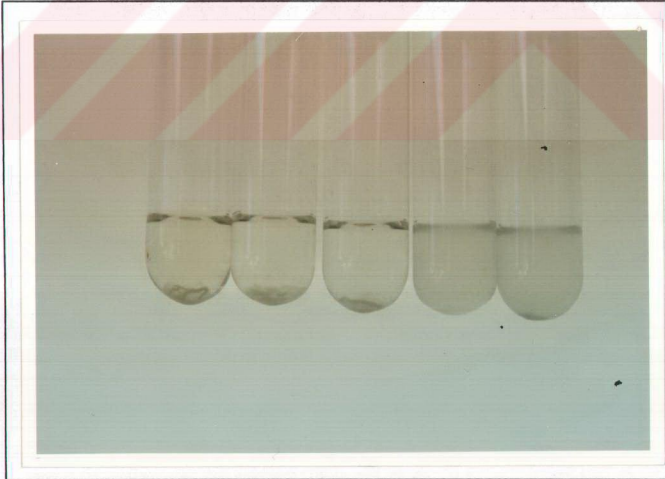
### **I- Standart Tüp Aglütinasyon Testi (Wright Aglütinasyon Testi=WAT)**

#### **Ön hazırlık;**

1. Standart Brucella Antijeni kullanmaya başlamadan, 15 dakika önce oda ısısına getirildi.
2. Serum dilüsyonu için 6 adet temiz tüp ve 1 adet kontrol tüpü (14x100 mm) hazırlandı.
3. 1 ml ve 5 ml'lik cam pipetler.
4. Fizyolojik tuzlu su (% 0.9).

### Testin Uygulanışı;

1. Her serum için 6 adet serolojik tüp ve 1 adet kontrol tüpü ile çalışıldı.
  2. İlk tüpe 0.8 ml, diğerlerine 0.5 ml fizyolojik tuzlu su kondu.
  3. İlk tüpe 0.2 ml hasta serumu eklendi. Karıştırıldı. Birinci tüpten 0.5 ml ikinci tüpe ve 2. tüpten 0.5 ml 3. tüpe aktarıldı. Altıncı tüpe kadar işleme devam edildi, 6. tüpten 0.5 ml dışarı atıldı.
  4. Tüplerde serum dilüsyonları; 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 oldu.
  5. Tüm tüplere 7. kontrol tüpü dahil, 0.5 ml standart brucella antijeni ilave edildi. Nihayi serum sulandırılmaları 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 ve 1/320 oldu.
  6. Tüpler iki el arasında karıştırıldı, 37 °C'de 18-20 saat inkübe edildi.
- En son aglütinasyon görülen tüpün titresi pozitif değer olarak kabul edildi. Pozitiflik en son tüpte ise üst dilüsyonlar çalışıldı (Resim 1).



Resim 1. Standart Tüp Aglütinasyon Testi (Wright aglütinasyon testi)

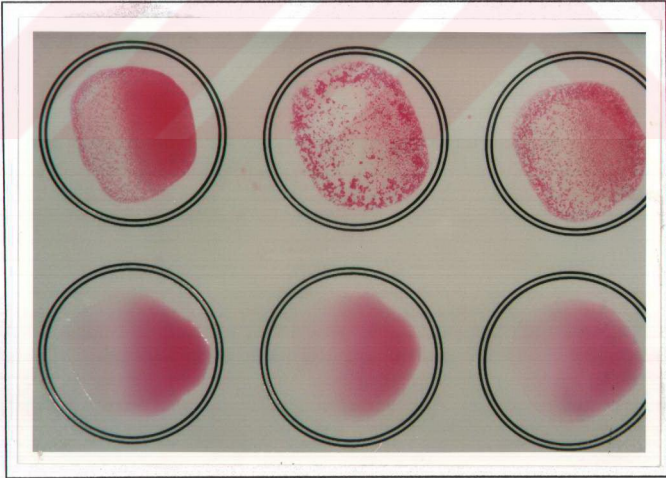
## II- Rose-Bengal Lam Testi (RBPT)

### *Ön Hazırlık;*

1. Antijen kullanıma başlamadan önce oda ısısında (20-25 °C) 10-15 dk tutuldu.
2. Temiz ve üzerinde 1.5 cm çapında çukurlar bulunan plastik plaklar temin edildi.

### *Testin Uygulanışı;*

1. Temiz plak üzerindeki 0.03 ml hasta serumu damlatıldı.
2. Üzerine 0.03 ml Rose-Bengal antijeni eklendi.
3. Kürdan ile karıştırıldı, karıştırıcıda 4 dk tutuldu.
4. Sonuçta iri tanecikli aglütinasyon oluşumu pozitif, homojen görünüm negatif aglütinasyon olarak değerlendirildi (Resim 2).



**Resim 2.** Rose-Bengal Testi (RBPT)



### III- Coombs Testi

#### *Ön Hazırlık;*

1. Standart tüp aglütinasyon testi sonucunda, teste tabi tutulacak tüpler ayrıldı.
2. Coombs serumu kullanımdan 10-15 dk önce oda ısısına alındı.
3. Coombs 1/10 sulandırıldı.

#### *Testin Uygulanışı;*

1. Ayrılan tüp dizisinde aglütinasyon pozitif görülen tüpler not edilerek işlemden çıkarıldı.
2. Diğer tüpler 20 dk 2000 rpm'de (dv/ dk) santrifüj edildi. Üst sıvı kısmı atılıp, yeniden fizyolojik tuzlu su eklenip, santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
3. Her tüpe 0.45 ml fizyolojik tuzlu su eklenerek süspanse edildi.
4. 0.05 ml 1/10'luk Coombs serumu, her tüpe eklendi.
5. 37 °C etüvde 18-24 saat inkübe edildi, aglütinasyon değerlendirildi.

#### *Sonuçlar;*

1. Tüplerde aglütinasyon olup olmadığı gözlemlendi.
2. En son aglütinasyon görülen tüpün titresi pozitif titre olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Kayseri ve yöresinde 11 Ağustos 1994-10 Şubat 1995 tarihleri arasında bruselloz ön tanılı toplam 2295 serum örneği serolojik yöntemler ile Brucella aglütinini yönünden incelendi.

WAT ile değerlendirilen 2295 serum örneğinin 255 (% 11.1)'inde antikor saptanırken, 2040 (% 88.9) serum örneğinde antikor bulunmadı (Tablo III).

Tablo III. 2295 Serum Örneğinin WAT Sonuçları

Serum Sayısı	Wright Aglütinasyon Testi (WAT)			
	Pozitif (+)		Negatif (-)	
	Sayı	%	Sayı	%
2295	255	11.1	2040	88.9

Brucella WAT'de serum sulandırılmaları 1/10-1/2560 titrelerde çalışıldı. Klinik açıdan önemli olan >1/160 titrelerde 66 (% 26) olguda seropozitiflik tesbit edildi. 1/10-1/160 sulandırılmalarda ise 189 (% 74) serumda seropozitiflik elde edildi (Tablo IV).

Tablo IV. Seropozitifliğin WAT Titrelerine Göre Yüzdesi

WAT Titrelemi	Sayı	%	Toplam
1/10	8	3.1	
1/20	46	18.0	189
1/40	34	13.3	(% 74)
1/80	62	24.3	
1/160	39	15.2	
1/320	48	18.8	
1/640	14	5.4	66
1/1280	3	1.6	(% 26)
1/2560	1	0.3	
1/5120	-	0.0	
<b>TOPLAM</b>	<b>255</b>	<b>100.0</b>	<b>255</b> (% 100)

Çalışması WAT'a göre daha basit ve pratik olup, özel ekipman gerektirmeyen, tek olgu çalışmalarında kullanılabilen RBPT'nin sensitivitesi ile kullanılabilirlik oranını belirlemek için WAT ile seropozitif bulunan 255 serum örneği RBPT ile çalışıldı.

WAT ile Brucella antikorları pozitif bulunan 255 örnekten 208 (% 81.6)'i RBPT ile pozitif bulunurken, 47 (% 18.4) serum örneği RBPT ile negatif bulundu (Tablo V).

**Tablo V. WAT ile Seropozitif Bulunan Serum Örneklerinin RBPT ile Karşılaştırılması**

		Wright Aglütinasyon Testi (WAT)										
Serolojik Yöntem		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	Toplam
Rose-Bengal Testi	(+) Olgu Sayı	-	22	23	58	39	48	14	3	1	-	208
	%	0	48	67	93	100	100	100	100	100	0	81.6
												255
												%100
	(-) Olgu Sayı	8	24	11	4	-	-	-	-	-	-	47
	%	100	52	33	7	0	0	0	0	0	0	18.4

WAT ile 1/10-1/160 titrelerde seropozitif bulunan toplam 189 serum örneğinde blokan antikörleri belirlemek için Coombs testi ile incelendi. Sonuçlar Tablo VI'da özetlendi.

WAT ile 1/10 titrede seropozitif bulunan 8 serum örneği Coombs testine tabi tutulduğunda 5 örnekte titre artışı saptanmazken, 3 serum örneğinde bir kat artış gözlemlendi.

WAT ile 1/20 titrede seropozitif bulunan 46 örnekten Coombs testinde 31 örnek aynı titrede yer alırken, 14'ünde bir kat ve 1 tanesinde iki kat artış tesbit edildi.

WAT ile 1/40 titrede seropozitif bulunan 34 serum örneği Coombs testine tabi tutulduğunda 28 serum örneğinde titre artışı gözlenmezken, 4 örnekte bir kat ve iki örnekte iki kat titre artışı gözlemlendi.

WAT ile 1/80 titrede pozitif bulunan 62 serum örneği Coombs testinde 55'i aynı titre ve 7'sinde bir kat artış tesbit edildi.

Klinik açıdan önemli olan ve WAT ile 1/160 titrede seropozitif 39 serum örneğinin Coombs testinde 37'sinde aynı titre fakat 2 serum örneğinde bir kat artış gözlemlendi (Tablo VI).

Tablo VI. WAT ile Seropozitif Bulunan 189 Serumun Örneği Coombs Testi ile Analizi

Coombs	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	Toplam
WAT									
1/10	5	3	-	-	-	-	-	-	8
1/20	-	31	14	1	-	-	-	-	46
1/40	-	-	28	4	2	-	-	-	34
1/80	-	-	-	55	7	-	-	-	62
1/160	-	-	-	-	37	2	-	-	39
TOPLAM	5	34	42	60	46	2	-	-	189

WAT ile 1/10-1/160 titreler arasında seropozitif bulunan 189 (% 100) serum örneğinin Coombs testinde; 156 (% 82.5)'sı aynı titrede kalırken, 30 (% 15.85)'unda bir kat, 2 (% 1.05)'sinde iki kat ve 1 (% 0.6)'sinde de dört kat titre artışı tesbit edildi (Tablo VII).

Tablo VII. Coombs Testindeki Titre Artışının Dağılımı

Serum Titreleri	Aynı Titre		Bir Kat Artış		İki Kat Artış		Dört Kat Artış		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
1/10	5	62.5	3	37.5	-	0	-	0	8
1/20	31	67.5	14	30.4	1	2.1	-	0	46
1/40	28	82.5	4	11.7	1	2.9	1	2.9	34
1/80	55	88.8	7	11.2	-	0	-	0	62
1/160	37	94.9	2	5.1	-	0	-	0	39
TOPLAM	156	82.5	30	15.85	2	1.05	1	0.6	189

WAT'ın özgüllük ve duyarlılığını ölçmek amacıyla bu testten daha duyarlı olan Coombs testiyle, WAT'da seronegatif bulunan 200 örnek teste tabi tutuldu. Testin sonucuna göre 192 (% 96) serum örneğinde antikor tesbit edilmemesine karşın 8 (% 4) serum örneğinde 1/10 titrede antikor tesbit edildi (Tablo VIII).

Tablo VIII. WAT ile Seronegatif 200 Serumun Coombs Sonrası Değerlendirilmesi

WAT ile Seronegatif (=n)	COOMBS					
	Titre Artışı Görülmeyen (-)		Bir Kat Titre Artışı (1/10)		İki Kat Titre Artışı (1/20)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
200	192	96	8	4	-	0

Kalitatif bir tarama testi olan RBPT'nin spesifiklik, sersitivite ve kullanılabilirlik oranının araştırılması amacıyla WAT ve Coombs ile seronegatif bulunan 100 serum örneği RBPT ile değerlendirildi. Bu test ile 100 serum örneğinden 97'sinde aglütinasyon tesbit edilmemesine karşın, 3 serum örneğinde kalitatif pozitiflik elde edildi. Böylece WAT ve Coombs standart testler olarak kabul edildiğinde RBPT'nin spesifikliği % 97, sadece WAT standart kabul edildiğinde RBPT'nin sensitivitesi % 81.6 ve kullanılabilirlik oranı % 87.8 olarak gözlenmiştir (Tablo IX).

Tablo IX. WAT ve Coombs ile Seronegatif 100 Serumun RBPT ile Karşılaştırılması

WAT + Coombs Negatif		RBPT Negatif		RBPT Pozitif	
Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
100	100	97	97	3	3

## TARTIŞMA

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterinin etken olduğu koyun, keçi, manda gibi hayvanların et, süt ve süt ürünleriyle geçen, titremeye yükselen ateş, terleme, halsizlik, kas ve eklem ağrıları gibi değişik klinik tablolarla seyreden bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünyanın birçok yerinde olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen önemli bir toplum sağlığı sorunudur.

Brusellozun kesin tanısında kan kültürü yönteminin gösterdiği güçlükler sonuçların uzun süre sonra alınabilmesi ve sıklıkla başarısız sonuçlar vermesi nedeniyle serolojik yöntemler ön plana çıkmıştır (55).

WAT serolojik tanıda yaygın olarak kullanılan bir testtir. Uygulama ve değerlendirme kolaylığı, hastalığın erken safhalarını belirleyebilmesi tercih sebebidir (42). Bruselloz tanısında WAT ile yapılmış pek çok çalışmalar bulunmaktadır (2,15,16,19,20).

Durmaz (22) Malatya'daki kasaplarda bruselloz sıklığını toplam 104 serum örneğinde, WAT ile % 2.9 oranında  $\geq 1/40$  titrelerde seropozitif belirlendiğini bildirmiştir.

Yılmaz (57) bruselloz ön tanılı 1108 serum örneğinin % 22'sinde; Çelebi ve ark. (19) çeşitli meslek gruplarından, toplam 340 serum örneğinde % 2-12, WAT ile seropozitiflik saptamışlardır.

Göktaş (28,30) 1988-1990 yılları arasında bruselloz öntanısı ile gönderilen 3242 serum örneğinde % 11.2 oranında WAT ile pozitif sonuç alındığını bildirmiştir. WAT pozitif bulunan 365 serumun 56 (% 15.4)'sında  $\geq 1/40$  titre; 24 (% 7)'ünde  $1/80$ ; 285 (% 66.6)  $\geq 1/160$  titrelerde antikor tesbit etmiştir. Bir diğer çalışmasında bruselloz öntanısı ile gönderilen 2700 hasta serumundan (% 15.4) seropozitif saptadığını bildirmiştir.

Fazlı ve ark. (24) 1982-1986 yılları arasında Kayseri yöresinde bruselloz öntanılı 6586 serum örneğinde WAT ile 649 (% 9.9)'unda Brucella antikorları saptamışlardır.

Çalışmamızda Brucella öntanılı 2295 hastanın serum örneğinin 255 (% 11.1)'i WAT ile seropozitif bulundu (Tablo III). Bu oran Fazla ve ark. (24), Göktaş (28,30)'ın sonuçları ile uyum göstermektedir. Seropozitif bulduğumuz örneklerin titre dağılımı  $\geq 1/40$  % 34.4;  $1/80$  % 41.3;  $\geq 1/160$  % 41.3'dir (Tablo IV).

Bu oranlar Göktaş (28)'in çalışmasındaki titre dağılımıyla  $\geq 1/160$  paralellik gösterirken, düşük titrelerde farklılıklar vardır. Bu da muhtemelen bölgesel farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarının amacı, sonuçların çabuk ve doğru olarak belirlenmesi ve klinisyenlerin tanısını biran önce koymalarına yardımcı ol-



maktır. Bu nedenle çabuk sonuç veren, güvenilir, özgül, duyarlı, ucuz laboratuvar yöntemlerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır. WAT, RBPT gibi serolojik testler bu amacı temin etmektedirler. WAT'in en büyük dezavantajı sonuçların 1-2 günlük inkübasyondan sonra alınması, ayrıca blokan antikörlerin varlığında yalancı negatif sonuçlar vermesidir. RBPT ve WAT'lerinin kullanılabilirliği ve güvenilirliği birçok araştırmacı tarafından karşılaştırılarak gösterilmiştir.

Göktaş ve ark. (29) çalışmalarında 1200 serum örneğinde, hem WAT hem de RBPT ile Brucella'ya karşı antikör aramışlar, WAT ile pozitif sonuç alınan 98 olgunun tümünde RBPT'de pozitif sonuç vermiştir. WAT yönünden iki test arasındaki uyumu % 100 olarak belirlemişlerdir. Ancak RBPT ile zayıf pozitif sonuç alınan 5 olguda WAT'i negatif kalmıştır. Bununla beraber, her RBPT'nin WAT'e göre daha çabuk sonuç veren, kolay ve güvenilir bir test olduğunu bildirmişlerdir. Günhan ve ark. (33) 128 serum örneği ile yaptıkları bir çalışmada RBPT, WAT ve Coombs testlerini uygulamışlar ve RBPT ile % 5.12, WAT-Coombs testi ile % 8,96 oranında seropozitiflik tespit etmişlerdir. WAT-Coombs testlerinin uyumluluğu yanısıra bu iki testin RBPT'den daha duyarlı olduğunu saptamışlardır.

Bilgin ve ark. (13) bruselloz öntanlı 441 serum örneğinde RBPT, WAT ve ELISA ile Brucella antikörleri araştırıp, RBPT ile 98 (% 22), WAT ile 130 (% 29.4), ELISA ile 151 (% 34.2)'inde seropozitiflik tespit ederek, ELISA'nın WAT ve RBPT'den, WAT'ın RBPT'den daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

Çolak ve ark. (21) 1988'de 828 hastanın serum örneğini, WAT ve Coombs ile karşılaştırmalı çalışmalar ve şu oranları bildirmişlerdir: Serumların 130 (% 15.7)'unda, 149 (% 17.6)'unda seropozitiflik bildirmişlerdir. RBPT ile seropozitif olan 130 örneğin 28 (% 21.5)'inde WAT titresini  $\geq 1/80$ , 102 (% 78.5)'inde  $\geq 1/160$  saptamışlardır. RBPT negatif ve WAT titresini  $1/10-1/80$  arasında olan 28 serumun 10 (% 35)'unda indirekt Coombs test sonuçları bir ve iki kat artış

göstererek 1/160 ve üzerinde, titreye ulaşmıştır. RBPT negatif ve WAT titresi de 1/10-1/80 arasında olan 138 serum örneğinin 21 (% 15.2)'inde indirekt Coombs testi  $\geq 1/160$  olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre RBPT pozitif ve negatif serumların WAT ve indirekt Coombs testi sonuçlarına göre RBPT'nin duyarlılığı ve özgüllüğü % 86.45 ve % 96.9 olarak bulunmuşlardır. RBPT ile WAT arasındaki korelasyonu % 98.94 olarak tesbit etmişlerdir.

Çalışmamızda WAT ile seropozitif tesbit edilen 255 serum örneğinin 208 (% 81.6)'i RBPT pozitif bulunurken, 47 (% 18.4)'si negatif idi (Tablo V). Böylece RBPT'nin duyarlılığı % 81.6 olarak saptandı. Duyarlılık oranımız Çolak'ın (20) çalışmasıyla uyumludur.

Çalışmamızda WAT ve Coombs ile seronegatif saptanan 100 serum örneği RBPT'ye tabi tutuldu, 97'si RBPT ile negatif bulundu. RBPT'nin spesifikliği % 97 oranında belirlendi. Çolak'ın (20) çalışmasındaki RBPT'nin % 96.9 spesifite oranı bizim çalışmamızla uyumludur (Tablo IX).

Çalışmamızda WAT ile 1/10-1/160 titreler arasında pozitif bulunan 189 serum örneği Coombs testine tabi tutulduğunda % 17.5 oranında titre artışı gözlemlendi (Tablo VI ve VII). Bu titre artış oranı Çolak'ın (20) % 15.2 oranındaki titre artışı çalışması ile iyi bir korelasyon göstermektedir.

Brusellozur serodiyagnozuunda, RBPT'i pratik oluşu, çabuk sonuç vermesi ile özellikle bir tarama testi olarak önemlidir. WAT'i, titre artışlarını belirlemesi nedeniyle daha çok kullanılan bir testtir. Brusellozda sık görülen blokan antikorların belirlenmesi için WAT ve Coombs testlerinin birlikte uygulanması daha iyi sonuç vermektedir.

## SONUÇ

Brucelloz ön tanılı 2295 hasta serumu WAT ile 255 (% 11.1)'inde 1/10-1/2560 titrelerde Brucella antikoru saptandı. WAT ile seropozitif 255 (% 100) serum RBPT'ne tabi tutuldu. Bu serum örneklerinden 208 (% 81.5)'i RBPT ile pozitif bulundu. Buna göre;

1. 1/160 ve daha yüksek titreli serumların acil durumlarda çabuk sonuç veren RBPT testi ile incelenebileceği,
2. Düşük titreli serumlar ve bruselloz şüpheli olgulara Coombs testinin WAT ile birlikte uygulanabilirliği,
3. Tarama maksadı ve özellikle laboratuvar şartları uygun olmayan yerlerde RBPT'nin yalnız uygulanmasının yeterli olduğu,

4. WAT'ın bruselloz serodiyagnozunda ELISA dışında en duyarlı reaksiyon olduğu,

5. Blokan antikor ve aglütinasyonu önleyen komponentlerin serumdan uzaklaştırabilmek için özel diluentlerle serum dilusyonlarının yapılması gerektiği sonucuna varıldı.



## ÖZET

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Merkez Laboratuvarı Seroloji Ünitesi'nde 11.08.1994-10.02.1995 tarihleri arasında 2295 serumda Wright aglütinasyon testi (WAT) ile Brucella aglutininleri araştırıldı. Serum örneklerinin 255 (% 11.1)'inde antikor bulundu. Seropozitif saptanan 255 serumun 208 (% 81.6)'i Rose-Bengal lam aglütinasyonu ile pozitif bulundu. 1/10-1/160 titreler arasında WAT ile seropozitif 189 serum Coombs testi ile karşılaştırılmasında 156 (% 82.5) serum aynı titrede kaldı, 30 (% 15.85)'unda bir kat, 2 (% 1.05)'sinde iki kat ve 1 (% 0.06) serumda da dört kat titre artışı belirlendi.

WAT ile seronegatif bulunan 200 serum Coombs testi ile muamele edildiğinde 8 (% 4)'inde 1/10 titrede Brucella antikorunu pozitif bulundu.

WAT ve Coombs ile Brucella antikorunu yönünden seronegatif saptanan 100 serum örneği RB tarama testi ile çalışıldı. Üç serumda RB testi pozitif bulundu.

Coombs ve WAT standart düşünöldüğünde RB testinin özgülüğü % 97, duyarlılığı % 81.6, kullanılabilirlik oranı % 87.8 olarak belirlendi.



## **SUMMARY**

### **Comparison of WAT, RBPT and Coombs test in serodiagnosis of Brucellosis**

Between 11.08.1994 and 10.02.1995 at Erciyes University Medical Faculty Gevher Nesibe Hospital's Center Laboratory of Serology Unit, a total of 2295 patients suspected of brucellosis sera were examined by Wright agglutination test for Brucella antibodies.

In 255 (11.1 %) of 2295 patients sera were determined Brucella antibodies with WAT. 208 (81.6 %) of 255 seropositive sera samples were found positive by RBPT. 189 sera were found seropositive by WAT in titers ranging 1/10-1/160 were examined by Coombs test. And so 156 (82.5 %) sera remained at the same titer, 30 (15.85 %) sera samples gave one titer pick, 2 (1.05 %) sera samples gave two titers pick and 1 (0.06 %) sera sample gave 4 titers pick.

When we examined with Coombs test, 200 sera found seronegative by WAT, 1/10 titer was found in 8 (4 %) sera samples.

100 sera samples found seronegative by WAT and Coombs test were examined by RBPT screening test. In 3 sera samples, RBPT were found positive.

When we compare Coombs and WAT as standard tests RBPT's specificity, sensitivity and usefulness were found 97 %, 81.6 % and 87.8 % respectively.





## KAYNAKLAR

1. Akan E: Brucella'lar, Tıbbî Mikrobiyoloji, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 147-155, 1993.
2. Abbasoğlu U, Mevsim G, Günay Y: Ankara'nın kırsal bir semtinde Brucella antikor taraması, Türk Mikrobiyol Cem Derg 20(3):189-192, 1990.
3. Acar NS, Soydiñç J, Erbaş O: Brusellozun serolojik tanısında tüp aglütinasyon ve indirekt fluoresan antikor testlerinin değerlendirilmesi, Mikrobiyol Bült 28:199-203,1994.
4. Aksu HSZ, Erken E, Albayrak A, Aksaray N, Akoğlu T: ELISA ile Brucella spesifik IgG antikorlarının romatizmal sendromlu hastalarda gösterilmesi. İnfeksiyon Dergisi 2(1):13-18, 1988.
5. Altan N: Brusella epidemiyolojisi. I.Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İzmir, Bilgehan Basımevi 179-185, 1987.

6. Araj G, Kaufman A: Determination by ELISA of IgG, IgM and IgA to *B.melitensis* major outer membran proteins and whole cell-heat killed antigens in sera of patients with brucellosis. *J Clin Microbiol* 27(8):1909-1912, 1989.
7. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F: Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 14:131-140,1992.
8. Badur S: Brusellozda serolojik tanı ve seroepidemiyoloji. *Klinik Dergisi* 3(1):17-20,1990.
9. Bağdatlı Y Emre S, Bursalı E: *Brucella* meninjitleri ve seronegatif bir olgu. *İnfeksiyon Dergisi* 2(2): 181-185,1988.
10. Bastuji BG, Bowden AR, Dubray G. Limet JN: Sodium doducyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharite heterogenity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* 2169-2174, 1990.
11. Bilgehan H: *Brucella*, Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, Bornova-İzmir, 155-166, 1990.
12. Bilgehan H: Bruselloz tanısında aglütinasyon. Klinik Mikrobiyolojik tanı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, Bornova-İzmir, 2.Basım, 226-229,1995.
13. Gün H: Brusellozun serolojik tanısında ELISA, STAT ve RBPT'nin karşılaştırılması, *İnfeksiyon Dergisi* 5(3):171-173,1991.
14. Bouza E, Garcia de la Torre M, Parras F, Guerrero A, Creixems MR, Gubernado J: *Brucellar meningitis*, *Rev Infect Dis* 9(4):810-822,1987.

15. Canbolat A, Karakartal G: Malign lenfoproliferatif hastalıklarda Brucella bakteri antijenine karşı oluşan antikör, *İnfeksiyon Dergisi* 1(1): 43-48,1987.
16. Cengiz AT, Altıntaş K, Cengiz L: Obstetrik'te Toksoplazmoz ve Brusellozun önemi. *İnfeksiyon Dergisi* 1 (1):29-41,1987.
17. Corbel MJ: Brucella, Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity 8th Edition, Vol 2, Systemic Bacteriology, pp 340-351,1990.
18. Corbel MJ, Brinley WJ: Brucella infections in man and animals, contagious equine metritis. Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity 8th Edition, Vol 3, pp 548-572,1990.
19. Çelebi S, Babacan M, Tuncel E, Ayyıldız A: Erzurum yöresinde inaporan bruselloz prevalansı, *İnfeksiyon Dergisi* 5(3): 175-176,1991.
20. Çolak H, Usluer G, Özgüneş İ, Karagüven B, Berlas Ş: Kronik bruselloz tanısında Wright, Indirect Coombs ve ELISA IgG yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült* 26(1): 56-60,1992.
21. Çolak H, Usluer G, Karagüven B, Köse S, Özgüneş İ: Kırsal alanda seroepidemiolojik bruselloz araştırması. *İnfeksiyon Dergisi* 5(2): 83-86,1991.
22. Durmaz R: Malatya'daki kasaplarda inaporan bruselloz sıklığı, *İnfeksiyon Dergisi* 4(2): 231-234,1990.
23. Fazlı ŞA: Brusellozda diagnoz. 24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, Kayseri 73-77, 1990.

24. Fazlı ŞA, Özbal Y, Dalkılıç E, Kılıç H, Sümer İ: Kayseri ve yöresinde son beş yılda bruselloz kuşkusu ile incelenen hastaların serolojik bulguları, *İnfeksiyon Dergisi* 3(2): 157-160, 1989.
25. Fincancı M, Özyürek S: Bir olgu nedeniyle *Brucella* meninjitisi. *İnfeksiyon Dergisi* 4(3): 467-470,1990.
26. Gazapo E, Lahoz JG, Subiza JL, Baquero M, Gil J, G de la Concha E: Changes in IgM and IgG antibody concentrations brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow up. *J Infect Dis* 159(2):219-225,1989.
27. Goldbaum A, Rubbi PC, Wallach JC, Miguel ES, Balti PC, Fossati CA: Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immun response. *J Clin Mikrobiol* 30(3): 604-607,1992.
28. Göktaş P: Brusellozda serolojik yanıtın seyri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 20 (3-4):199-203,1991.
29. Göktaş P, Sümer S, Oktay G, Göktaş S: Bruselloz tanısında iki testin karşılaştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 21(2): 199-203,1991.
30. Göktaş P: Erzincan bölgesinde bruselloz olgularında artış. *İnfeksiyon Dergisi* 4(3):475-481,1990.
31. Günay O: Brusellozisin epidemiyolojisi ve korunma yolları, 24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, Kayseri 83-88, 1990.
32. Günhan C, Karakartal G, Büke M, Serter D, Yüce K, Tanyalçın D, Ertem E: İzmir Bornova Kayadibi köyünde Bruselloz olguları, *İnfeksiyon Dergisi* 4(3):493-497,1990.

33. Günhan C, Ertem E, Şerifian E, Karakartal G, Yüce K, Serter D, Büke M: Sığır yetiştiricilerinde bruselloz sıklığı, *İnfeksiyon Dergisi* 2(2): 177-180, 1988.
34. Günhan C: Brusellozda değişik klinik tablolar ve sağaltım. I. Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İzmir, İzmir Bilgehan Basımevi, 158-160, 1987.
35. Hadjichristodoulou C, Voulgaris P, Toulieres L, Babalis T, Manetas S, Goutzina G, Kastritis I, Tselentis I: Tolerance of the human brucellosis vaccine and the intradermal reaction test of Brucellosis. *Eur J Clin Microbiol* 13(2):129-134, 1994.
36. Helvacı S: Brucella, Klinik Mikrobiyoloji Ed. Kaya Kılıçturgay, Onur Yayıncılık, Bursa, 89-93, 1993.
37. İnci R: Göçerler ve bruselloz. *İnfeksiyon Dergisi* 40(3): 493-497, 1990.
38. Kılıçturgay K, Gökırmak F, Töre D, Helvacı S, Göral G: Uludağ Üniversitesi İnfeksiyon Hastalıkları Kliniğinde izlenen bruselloz olgularının klinik ve serolojik analiz sonuçları. *İnfeksiyon Dergisi* 1(4): 257-262, 1987.
39. Klerk ED, Anderson R: Comparative evaluation of the ELISA in the laboratory diagnosis of brucellosis. *J Clin Microbiol* 21:381, 1985.
40. Mazuelos ME, Nogales MC, Florez C, Gomez-Mateos JM, Lozano-Sanchez A: Outbreak of *B. melitensis* among laboratory workers. *J Clin Microbiol* 32(8): 2035-2036, 1994.
41. Mangles J, Douglas B: Comparison of four commercial *Brucella* agar media for growth of anaerobic organisms. *J Clin Microbiol* 27(10): 2268-2271, 1989.

42. Meyer M: Immun response to Brucella, manial of clinical laboratory immunology 3th Edition, Ed: Rose RN, Friedman H, Fahey J, American society for microbiology, Washington DC, 385-387,1986.
43. Moyer NP, Molcom B, Hausler JR: Brucella, manuel of clinical microbiology. Ed: Ballows A, Hausler W, Herrmen K, Isenberg H, Shatomy J, American society for microbiology, Washington DC, 457-461,1991.
44. Nichols S, Nakamura M, Agglutination, aglutination inhibition assays. Manuel of clinical laboratory immunology 3th Edition, Rose RN, Friedman H, Fahey J, American Society for Microbiology, Washington DC, 49-56,1986.
45. Özsan K: Brusellozisin tarihçe ve etiyojisi. 24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, Kayseri, 57-67, 1990.
46. Öztürk R, Soysal F, Altaş K: Sperm kültüründe B.melitensis üretilen bir epididimo-orşitli bruselloz olgusu. Türk Mikrobiyol Cem Derg 23 (3): 148-150,1993.
47. Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallares R, Gudiol F: Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. J Infect Dis 157(5): 918-924,1988.
48. Poyraz Ö, Saygı G: Bruselloz ve listeriyozun düşük ölü doğum olgularındaki rollerinin serolojik yöntemlerle araştırılması. İnfeksiyon Dergisi 5(3): 167-170,1990.
49. Potasman I, Even L, Banai M, Cohen E, Angel D, Jafee M: Brucellosis: An anausal diagnosis for a seronegative patient with abcessess, osteomyelitis and ulcerative colitis. Rev Infect Dis 13:1030-1042,1991.

50. Sarvamangala JN, Polt SS, Bactor FN, Peter JB: Serological evaluation of brucellosis: Importance of species in antigen preparation. *J Infect Dis* 156(4): 658-661, 1987.
51. Sippel E, Masry E, Farid Z: Diagnosis of human brucellosis with ELISA. *Lancet* 3, 19-21, 1982.
52. Sırmatel F, Özgöztaşı O, Baydar İ: Cilt döküntüsü ile seyreden bir bruselloz olgusu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 23:12-14,1993.
53. Solomon M, Jackson D: Rapid diagnosis of *B.melitensis* in blood: Some operational characteristics of Bact-Alert. *J Clin Microbiol* 30(1):222-224,1992.
54. Stevens M, Hennager SG, Olsen SC, Cheville NF: Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *B.abortus* 19 or RB51. *J Clin Microbiol* 32(4):1065-1066,1994.
55. Töre O: Bruselloz tanısına ilişkin sorunlar. I.Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, İzmir, Bilgehan Basımevi, 162-165,1987.
56. Young EJ: Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and reviews of the literature. *Rev Infect Dis* 13:359-372,1991.
57. Yılmaz S: 1970-1985 yılları kapsayan sürede insan ve hayvanlarda tesbit edilen bruselloz olguları. *Etlik Vet Mikrobiol Enst Dergisi* 5:51,1986.