

Endemik Bölgelerde Bruselloz Tanısında Serolojik Testlerin Kombinasyonu

Combination of the Serological Tests for the Diagnosis of Brucellosis in Endemic Areas

Mehmet Balcı¹, Çiğdem Kader¹, Neziha Yılmaz¹, Mehmet Uyar², Yalçın Erdoğan³

¹Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yozgat, ²Halk Sağlığı Müdürlüğü, Konya,

³İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, İstanbul

ABSTRACT

AIM: The aim of the study is to analyze the efficiency of combination of RBPT, STAT and ELISA tests on patients with brucellosis where the diagnosis is dependent on the compatible clinical and epidemiological findings with negative RBPT and/or STAT test results.

METHODS: The serum samples of 66 patients having clinical and epidemiological findings compatible with brucellosis were analyzed using the combination of RBPT, STAT and ELISA tests. Both positive and negative samples were re-analyzed for seropositivity by using the STAT or ELISA tests together. The results were statistically analyzed with the SPSS 16.0 computer program using the Fisher Exact test. The significance level was defined as $p < 0.05$.

RESULTS: Serum samples tested for brucellosis using the RBPT were found to be seropositive in 45.5% and seronegative in 54.5%. The seropositive group had a 73% seropositivity with the combination of STAT and ELISA tests. The seronegative group also had a 25% seropositivity with the combination of STAT and ELISA tests. Both groups' seropositivity rate significantly increased after the combination of the tests ($p < 0.05$).

CONCLUSION: It seems that the combination of RBPT, STAT and ELISA tests increases the rate of seropositivity in patients with negative RBPT and /or STAT tests, particularly with a pre-diagnosis of brucellosis.

Key words: brucellosis; diagnostic tests; routine; serological tests

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada RBPT ve/veya STAT testleri negatif olan klinik ve epidemiyolojik olarak bruselloz ile uyumlu hastalarda RBPT, STAT ve ELISA kombinasyonunun tanıdaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

YÖNTEM: Klinik ve epidemiyolojik olarak brusellozla uyumlu 66 olgunun serum örneği RBPT, STAT ve ELISA ile test edildi. RBPT pozitif ve

negatif kişilerde STAT ve/veya ELISA test sonuçları seropozitiflik yönünden karşılaştırıldı. Veriler SPSS 16.0 bilgisayar programına girildi. Sonuçların istatistiksel analizi için Fischer Exact testi yapıldı. $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

BULGULAR: Brusella antikorları yönünden RBPT ile test edilen serumların %45,5'i seropozitif, %54,5'ü seronegatif olarak bulundu. İki farklı testin (STAT ve/veya ELISA) pozitifliği birlikte değerlendirildiğinde seropozitiflik oranı RBPT pozitif grupta %73 iken RBPT negatif grupta ise %25 olarak saptandı. Testlerin kombinasyonu her iki grupta da seropozitiflik oranını anlamlı olarak artırdı ($p < 0,05$).

SONUÇ: RBPT, STAT ve ELISA kombinasyonunun özellikle bruselloz ön tanısı ve RBPT ve/veya STAT için negatif testleri olan hastalarda daha fazla test pozitifliğini sağlıyor gibi gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: bruselloz; tanısal testler; rutin; serolojik testler

Giriş

Bruselloz, tüm dünyada görülebilen zoonotik bir hastalık olup ülkemizde endemiktir. Halen önemli bir halk sağlığı problemi olan bruselloz, herhangi bir organı tutabilen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Multisistemik bir hastalık olması ve birçok hastalıkla kolayca karışabilen değişik belirti ve klinik bulgularla seyretmesi nedeniyle enfeksiyonun kesin tanısı, sadece klinik belirti ve bulgulara dayanılarak konulamaz.

Bruselloz tanısı hastanın öyküsü, klinik belirti ve bulguları, rutin hematolojik ve biyokimyasal laboratuvar testleri, radyolojik tetkikleri ve brusellaya özgü mikrobiyolojik tanı metotları birlikte değerlendirilerek yapılmalıdır. Brusellozun laboratuvar tanısı, bakterinin klinik örneklerden izolasyonu, kan serumunda brusella antikor yanıtının gösterilmesi veya moleküler yöntemlerle mikroorganizmaya özgü nükleik asit tanısının yapılmasından ibarettir.

Yard. Doç. Dr. Mehmet Balcı, Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yozgat, Türkiye,
Tel. 0 354 212 70 60 Email. drmehmet1971@gmail.com
Geliş Tarihi: 22.05.2013 • Kabul Tarihi: 03.12.2013

Bakteri izolasyonu altın standart olarak kabul edilmekle birlikte yavaş üreyen bir bakteri olması nedeni ile brusellanın izolasyon oranı düşüktür. Kültürden bakterinin izolasyon oranı bakterinin tipine, hastalığın evresine, antibiyotik kullanımına, klinik örneğin türüne, miktarına ve kullanılan kültür metoduna bağlı olarak, akut olgularda %80–90 iken, kronik olgularda kültür pozitifliği %30–70 arasında değişir. Özellikle kronik olgularda etken çoğunlukla izole edilemez ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyon gelişme riski nedeniyle, özel biyo–güvenlik koşullarını gerektirir. Bu yüzden günümüzde tanıda en yaygın olarak serolojik testler kullanılır^{1–5}.

İnsan brusellozunun tanısında standart/serum tüp agglutinasyon testi (STAT), Rose Bengal plate testi (RBPT), Coombs testi (CT) ve enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) en fazla kullanılan serolojik testlerdir^{1,6–10}. Günümüzde bruselloz tanısı için kullanılan en yaygın serolojik test RBPT olup, endemik bölgelerde insan brusellozunun tanısında tarama testi olarak kullanılmaktadır^{1,3,8}.

RBPT testinin tanı kapasitesi, daha önceden temas veya hastalık öyküsü olmayan olgularda yüksek iken, tekrarlayan temas varlığında ve geçirilmiş enfeksiyonda düşüktür. Bu nedenle, enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde, reenfeksiyon/rekürrens veya yeni geçirilmiş enfeksiyon öyküsü olan bireylerde tanıda tek başına kullanılması uygun değildir. RBPT özellikle tek başına kullanıldığında yalancı pozitiflik ve negatiflikler görülebilmektedir. Bu yüzden sonuçlar Standart Tüp Agglutinasyon test (STAT) veya ELISA gibi daha özgül testlerle teyit edilmelidir^{6–8}.

RBPT basit, ucuz ve etkili bir test olmasına rağmen, STAT, kompleman fiksasyon testi (CFT) ve ELISA gibi diğer testlerden daha az duyarlı olduğu kabul edilir. RBPT'nin tek başına veya STAT ya da ELISA ile birlikte iyi bir tarama testi olduğu iddia edilmektedir. Ancak, üç testin karşılaştırmalı duyarlılığı ile ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır. Özellikle, RBPT ve STAT testlerindeki yalancı negatifliklere bağlı yanlış tanıların önlenmesi için ELISA gibi diğer testler ile teyit edilmesi gerekir. Bu çalışma, endemik bölgede yaşayan bruselloz ön tanılı hastaların serumunda anti brusella antikorlarının saptanmasında üç serolojik testin (RBPT, STAT ve ELISA) etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapıldı.

Yöntem

Bu çalışma Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kayıtlarının incelenmesi ile

retrospektif olarak yapıldı. Ekim 2012 ile Şubat 2013 tarihleri arasında klinik ve epidemiyolojik bulgularıyla brusella tanısı alan hastaların verileri kullanılarak çalışma tamamlandı. Çalışma sırasında Helsinki Deklarasyonu ölçütlerine uyularak katılımcıların kimlik ve kişilik bilgileri korundu. İlgili bölümden gerekli izinler alındı.

Bruselloz ön tanısı ile takip edilen 66 hastadan alınan serum örneği RBPT (Metser lab. TÜRKİYE), STAT (Cromatest Linear Chemicals. S. L. SPAIN) ve ELISA (Vircell ELISA Anti–Brucella IgM ve IgG) testleriyle değerlendirildi. Lam üzerine hasta serumu ve sonra bir damla RBPT antijen kitinden eklendi, elde dört dakika çevrildi ve aglütine olanlar pozitif olarak kabul edildi. ELISA antikorları üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırıldı ve sonuçlar antikor indeksi olarak hesaplandı. Antikor indeksi 11 ve üstü olanlar pozitif, 9–11 arasında olanlar ara değer, 9 ve altında olanlar negatif olarak değerlendirildi. STAT testi içinse serumda 1/160 titre ve üstündeki örnekler STAT pozitif olarak değerlendirildi.

RBPT testi ile pozitif ve negatif sonuç elde edilmesine göre örnekler iki gruba ayrıldı. RBPT pozitif ve negatif olan grupların STAT ve ELISA testleri ile kombinasyonu sonrası toplam pozitiflik oranının değişimi değerlendirildi.

Veriler SPSS 16.0 bilgisayar programına girildi. İstatistik analiz için Fischer Exact testi kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

Bulgular

Brusella antikorları yönünden RBPT ile test edilen serumların %45,5'i seropozitif, %54,5'i seronegatif olarak bulundu. RBPT ile seropozitif 30 örneğin 19'u (%63.3) ELISA IgG, 18'i (%60) STAT ile seropozitif olarak değerlendirildi. RBPT ile seronegatif bulunan örneklerin %13.8'inde ELISA ve %11'inde STAT ile seropozitiflik saptandı. İki farklı testin (STAT ve/veya ELISA) pozitifliği birlikte değerlendirildiğinde RBPT seropozitif grupta 22 (%73); RBPT seronegatif grupta ise 9 (%25) örnekte brusella antikor pozitif bulundu. Toplamda brusella için testlerin kombine edilmesi 66 hastada 39 hastanın pozitif test sonucu vermesine sebep oldu. Testlerin kombinasyonu sonrası elde edilen toplam %59 pozitiflik oranı, RBPT ile test sonucu elde edilen %45.5'lik pozitiflik oranına göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p < 0.05$).

Çalışmada yer alan laboratuvar testlerinin sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Klinik ve epidemiyolojik özellikleri ile brusella ön tanısı alan 66 hastanın antikor sonuçlarının farklı testlere göre pozitiflik oranları

SEROLOJİK TESTLER	RBPT POZİTİF N=30, %45.5	RBPT NEGATİF N=36, %54.5
STAT POZİTİF	18 (%60)	4 (%11.1)
ELISA IgG POZİTİF	19 (%63.3)	5 (%13.8)
STAT ve/veya ELISA POZİTİF	22 (%73)	9 (%25)

RBPT: Rose Bengal plate testi, STAT: Standart/serum tüp agglutinasyon testi, ELISA: Enzim bağlı immunosorbent assay testi

Tartışma

Çalışmamız bulgularıyla bruselloz tanısında kullanılan testlerin kombinasyonunun seropozitiflik oranını artırdığını gösterdik.

Bruselloz tüm dünyada yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır. İnsanlarda ve hayvanlarda hastalık oluşturan bruselloz ülkemizde endemik olup, ekonomik kayıplara yol açan önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bruselloz, herhangi bir organı tutabilen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır. Birçok hastalıkla kolayca karışabilen değişik semptom ve klinik bulgularla seyrettiğinden enfeksiyonun tanısı, sadece klinik belirti ve bulgulara dayanılarak konulamaz. Bu nedenle Bruselloz tanısında hastanın öyküsü, klinik belirti ve bulgular, rutin hematolojik ve biyokimyasal testler, radyolojik tetkikler ve brusellaya özgü mikrobiyolojik tanı metotları birlikte değerlendirilmelidir. Günümüzde epidemiyolojik ve klinik olarak bruselloz ile uyumlu olguların kültür veya serolojik testler ile doğrulanması brusellozda tedaviye başlamak için yeterlidir. Hastadan alınacak detaylı öykü ve bakterinin üretilmesi tanıda halen standart yöntemdir.

Brusellaya özgü tanı metotları bakterinin izolasyonu, serolojik olarak Brusellaya özgü antikor yanıtının ya da antijenlerinin gösterilmesi ve moleküler yöntemlerle mikroorganizmaya özgü nükleik asit tayininden ibarettir. Bakteri izolasyonu altın standart olarak kabul edilmekle birlikte yavaş üreyen bir bakteri olması nedeniyle izolasyon oranı düşüktür. Kültürden bakterinin izolasyon oranı bakterinin tipine, hastalığın evresine, antibiyotik kullanımına, klinik örneğin türüne, miktarına ve kullanılan kültür metoduna bağlı olarak değişiklik gösterir. Özellikle kronik olgularda etken çoğunlukla izole edilemez ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyon gelişme riski nedeniyle, özel biyogüvenlik koşulları gerektirir. Bu

yüzden, serolojik testler günümüzde tanıda yaygın olarak kullanılır¹⁻⁵.

Bruselloz tanısı için kullanılan en yaygın serolojik test Rose Bengal plate testi (RBPT) olup, endemik bölgelerde insan brusellozunun tanısında tarama testi olarak kullanılmaktadır. RBPT'nin tanı değeri, daha önceden temas veya hastalık öyküsü olmayan olgularda yüksek iken tekrarlayan temasların varlığında ve geçirilmiş enfeksiyonda düşüktür^{6,7}. Bu nedenle, brusella endemik bölgelerde, reenfeksiyon/rekürrens veya yeni geçirilmiş enfeksiyon öyküsü olan bireylerde tanıda tek başına kullanılması uygun değildir^{1,3,4,8,9}.

Aktif brusellozu olan olgularda RBPT'nin duyarlılığı ve özgüllüğü %75-100 iken, kronik ve komplike olgularda yalancı negatiflik nedeniyle testin duyarlılığı %33-50 arasında değişir^{1,7,10}. Bu yüzden RBPT gibi hızlı aglütinasyon testleriyle alınan sonuçların STAT ve ELISA gibi daha özgül yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir^{1,7,8,10}.

Bu çalışmada, brusellozla uyumlu semptomları uzun süre devam eden ve epidemiyolojik olarak brusellozla ilişkili hastalarda RBPT ile seropozitiflik oranı %45,5 olarak bulundu. RBPT ile seropozitif bulunan örnekler STAT ve ELISA ile test edildiğinde ise seropozitiflik oranı sırasıyla %60 ve %63,3 olarak tespit edilirken, STAT ve ELISA birlikte değerlendirildiğinde ise seropozitiflik oranı %73 olarak bulundu. RBPT ile seronegatif bulunan örnekler ELISA ve STAT ile değerlendirildiğinde seropozitiflik oranı sırasıyla %13,8 ve %11,1 olarak bulunurken, STAT ve ELISA birlikte değerlendirildiğinde seropozitiflik oranı %25 olarak tespit edildi ($p < 0.001$).

RBPT basit, ucuz ve etkili bir test olmasına rağmen, standart tüp aglütinasyon testi (STAT), kompleman fiksasyon testi (CFT) ve enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) gibi diğer testlerden daha az duyarlıdır⁸⁻¹⁰. Özellikle, tek başına kullanıldığında rastlanılan

yalancı negatifliklerin önlenmesi için daha duyarlı ve özgül yöntemler kullanılmalı veya farklı çalışma prensibi olan testler birlikte değerlendirilmelidir.

ELISA yöntemi, blokan antikorlardan etkilenmediği için, kronik olguların tanımlanmasında ELISA-IgG daha duyarlı bir yöntem olarak görülmektedir^{7,11}.

STAT'ındaki en önemli yalancı negatiflik durumu komplike ve kronik olgularda görülmektedir. Bu durumda KBT, 2-ME testi, ELISA veya Coombs' testi çalışmalıdır^{8,12-17}.

İndirekt ELISA, brusellozis taramasında tek başına veya RBPT'e ek olarak kullanılabilir iyi bir test olabilir¹⁸⁻²¹. Serolojik testlerin karşılaştırıldığı diğer çalışmalarda ELISA'nın duyarlılık ve özgüllüğü STAT'a eşit veya daha yüksek bulunmuştur^{5,8,19,21,22}.

Mantur ve arkadaşları ELISA'nın STAT'a göre daha yüksek duyarlılıkta olduğunu (akutta %28, kronikte ise %55 daha fazla duyarlılık) göstermişlerdir¹⁷. ELISA, özellikle kronik ve nörobruselloz gibi komplike bruselloz olgularında STAT'dan daha duyarlı bulunmuştur^{7,11}. Kültür, tanı için altın standart olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür. Özellikle kronik olgularda etken çoğunlukla izole edilemez. Kültür laboratuvar kaynaklı enfeksiyon gelişme riski nedeniyle, özel biyogüvenlik koşullarını gerektirdiğinden serolojik testlerden ELISA, STAT ve RBPT'ye ek olarak kullanılabilir iyi bir tanı testi olabilir.

Sonuç olarak çalışmamız bulgularına göre; RBPT, STAT ve ELISA kombinasyonunun özellikle bruselloz ön tanısı ve RBPT ve/veya STAT için negatif testleri olan hastalarda daha fazla test pozitifliğini sağlıyor gibi gözükmektedir.

Kaynaklar

1. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:12-7.
2. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis a review of the literature. Part I. Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 2003;49:487-505.
3. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis a review of the literature. Part II. serological tests for brucellosis. *Clin Lab* 2003;49:577-89.
4. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM, et al. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:221-5.
5. Diaz R, Moriyon I. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: Young EJ, Corbel MJ, eds. *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989.
6. Gomez MC, Nieto JA, Rosa C, et al. Evaluation of Seven Tests for Diagnosis of Human Brucellosis in an Area Where the Disease Is Endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1031-3.
7. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, et al. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg (Lond)* 1986;97:457-69.
8. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 2002;90:447-59.
9. Hajia M, Fallah F, Angoti G, et al. Comparison of Methods for Diagnosing Brucellosis. *Lab Medicine* 2013;44:29-33.
10. Díaz R, Casanova A, Ariza J, et al. The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the Diagnosis of a Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:1-7.
11. Araj GF. Enzyme-linked immunosorbent assay, not agglutination, is the test of choice for the diagnosis of neurobrucellosis. *Clin Infect Dis* 1997;25:942.
12. White RG. Immunoglobulin profiles of the chronic antibody response: discussion in relation to brucellosis infections. *Post Grad Med J* 1978;54:595-602.
13. Memish Z, Mah MW, Al Mahmoud S, et al. *Brucella* bacteremia: clinical and laboratory observations in 160 patients. *J Infect* 2000;40:59-63.
14. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z, et al. Diagnostic value of *Brucella* ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. *J Chemother* 2001;13:54-9.
15. Memish ZA, Almuneef M, Mah MW, et al. Comparison of the *Brucella* Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with *Brucella* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:129-32.
16. Casao MA, Navarro E, Solerab J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect* 2004;49:102-8.
17. Mantur B, Parande A, Amarnath S, et al. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:314-8.
18. Mert A, Ozaras R, Tabak F, et al. The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2003;46:241-3.
19. Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, et al. Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:688-94.
20. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, et al. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992;14:131-40.
21. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi* 2010;31:65-89.
22. Asaad AM, Alqahtani JM. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, South western Saudi Arabia. *J Infect Public Health* 2012;5:189-94.