

Brusellozun Tanı ve Takibinde Serum Aglütinasyon Testi ve “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” Yönteminin Yeri

Ayhanım Tümtürk¹, M. Arzu Yetkin¹, Necla Tülek¹, Dilek Kılıç²

Özet: Bu çalışmada brusellozun serolojik tanısında kullanılan serum aglütinasyon testi (SAT) ile “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) yöntemiyle *Brucella* özgül IgG ve IgM antikor testlerinin, hastalığın tanısı ve takibinde kullanılabilirliği ve birbirlerine olan üstünlüklerinin araştırılması planlandı. Çalışmaya bruselloz tanısı alarak tedavisi başlanan toplam 86 hasta alındı. Bu 86 hastanın tedavi sonrası değişik zamanlarda kontrole gelen 60’ıyla birlikte toplam 146 serumda, SAT ve ELISA yöntemiyle *Brucella* IgG ve IgM antikor tayini yapıldı. Brusellozun tanı ve izleminde sadece SAT veya ELISA ile IgG ölçümünün bazı vakalarda tek başına yeterli olmayabileceği, IgM testleriyle değerlendirmek gerektiği sonucuna varıldı. Ayrıca tedavi izleminde her iki yöntemin çok daha geniş çalışmalarla değerlendirilmesi ve maliyet analizlerinin yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Bruselloz, serum aglütinasyon testi, ELISA.

Summary: The value of serum agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay IgM and IgG antibodies to *Brucella* in diagnosis and follow-up of brucellosis. In this study the results of serum agglutination test (SAT) were compared with those of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) IgM and IgG antibodies to *Brucella* in 146 serum samples (86 initial and 60 follow-up serums) of 86 patients with brucellosis and tried to detect their values in follow-up period. No single test used separately was found to be sufficiently enough for diagnosis and follow-up period of brucellosis. Further studies are needed to clarify the role of the both tests and their costs for the follow-up period of brucellosis.

Key Words: Brucellosis, serum agglutination test, ELISA.

Giriş

Bruselloz, tüm dünyada yaygın olarak görülen bir zoonozdur. Hastalık genellikle bakteriyemi ile seyreden kronik infeksiyona neden olur. Gerek insanlarda gerek hayvanlarda oluşan hastalık, işgücü kaybı ve ekonomik kayba neden olmaktadır. Hastalığın insanlara geçişi daha çok infekte hayvanlarla temas ve infekte süt ve süt ürünlerinin doğrudan alınmasıyla olmaktadır. İnfeksiyon akut dönemde ateş, gece terlemesi, eklem ağrıları ile karakterize semptomlar verir. Subakut ve kronik dönemde ise çeşitli organ tutulumlarına ait semptomlar, kilo kaybı, düzensiz ateş, depresyon gibi bulgularla birçok hastalığı taklit edebilir. Brusellozun klinik bulgu ve belirtilerinin çok fazla değişken olması, özellikle kronik ve subklinik infeksiyonlarda semptomların özgül olmaması nedeniyle tanıda sorunlar yaşanmaktadır. Tanı, öykü, kültür yöntemleri ve serolojik testlerle konulmaktadır. *Brucella* bakterisi in vitro yavaş ürediği için, primer izolasyonu gecikebilir. Bu nedenle hastalığın erken tanısı için serolojik testlerin sonuçlarından faydalanılır (1,2).

Brusellozun serolojik tanısında yaygın olarak kullanılan test serum aglütinasyon testi (SAT)’dir. Ama bu testin, diğer bazı mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon vermesi, sonuçla-

rın tek başına akut, subakut veya kronik infeksiyonun ayırt edilmesine olanak vermemesi gibi birtakım olumsuzlukları vardır. Bu olumsuzluklar nedeniyle antikor alt gruplarının belirlenmesine olanak sağlayan yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Uygulaması kolay ve duyarlı bir test olan “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) üzerinde en çok çalışılan yöntem olmuştur (3-7).

Bu çalışmada, brusellozun serolojik tanısında ELISA yönteminin hastalığın tanı ve takibinde kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Çalışmaya, Nisan 1999 ile Ağustos 2001 tarihleri arasında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği’nde yatırılarak izlenen ve bruselloz tanısı alarak tedavisi başlanan toplam 86 hasta alındı. Hastalara bruselloz tanısı, klinik özellikleri olanlarda, *Brucella* aglütininlerinin SAT ile (1/160 titrede saptanması ve/veya kan kültüründe *Brucella* spp. üremesi ile konuldu. Şikayet süresi < 8 hafta olanlar akut, 8-52 hafta arası subakut ve > 52 hafta olanlar kronik olarak değerlendirildi (6). Hastaların başlangıçta ve tedavi sonrası periferik venöz kan örnekleri alındı; serumları ayrılarak çift olarak saklandı. Hastalara tedavi olarak doksisisiklin 2x100 mg/gün oral (altı hafta) ile birlikte streptomisin 1 gr/gün İM (üç hafta) veya rifampisin 600 mg/gün (altı hafta) verildi. Bu 86 hastadan tedavi sonrası kontrole gelen 60 kişinin kan örnekleri alındı ve serumları ayrıldı. Kontrol se-

(1) Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Cebeci-Ankara

(2) Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

Tablo 1. Brusellozlu Hastaların Demografik ve Epidemiyolojik Özellikleri

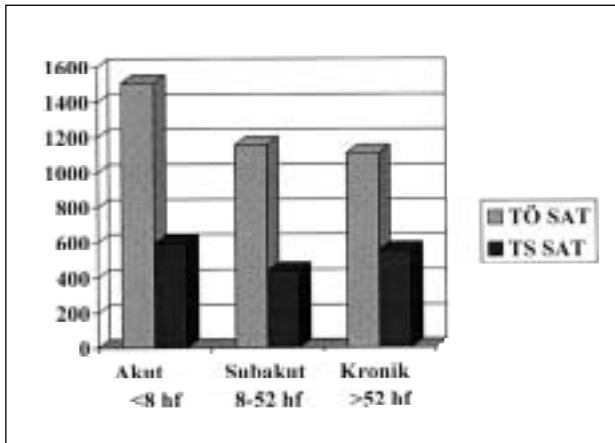
Demografik Özellikler	
Hasta sayısı (kadın/erkek)	86 (38/48)
Yaş dağılımı (yaş ortalaması)	15-78 (42.7) yıl
Olası Bulaşma Öyküsü	
	n (%)
Taze peynir yeme+hayvancılık	36 (41.9)
Taze peynir yeme	26 (30.2)
Hayvancılık	14 (16.3)
Belli olmayan	10 (11.6)

rumları 33/60 (%55) hastada tedaviden altı hafta sonra, 14/60 (%23) hastada üç-altıncı ayında, 13/60 (%21) hastada tedaviden bir yıl veya daha sonra alınabildi. Serum örnekleri çalışılana kadar -70°C'de dondurularak saklandı. Çalışma bitiminde saklanan (tedavi öncesi ve sonrası) serum örneklerine, Pendik Veterinerlik Enstitüsü'nce *Brucella abortus* S99 suşundan hazırlanan antijen ile tekrar tüpte SAT yapıldı. Ayrıca 2-merkaptotanol (2-ME) aglütinasyon testleri çalışıldı. *Brucella* IgG ve IgM antikorları ticari olarak temin edilen ELISA kiti (IBL GmbH, Hamburg) kullanılarak, prospektüsüne uygun olarak çalışıldı. *Brucella* IgG ve IgM antikor titreleri kontrol serumlarla standard eğri çizilerek hesaplandı.

İstatistiksel analizlerde SPSS bilgisayar programı kullanılarak optik dansite değerlerinin ortalama ve standard sapmaları tespit edildi. Her bir parametrenin birbirleriyle önemlilik testleri yapıldı. Bulguların istatistiksel önemi Wilcoxon ve Kruskal-Wallis testleri ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlı olarak alındı.

Sonuçlar

Çalışmaya 48'i (% 55.8) erkek, 38'i (%44.2) kadın olmak üzere 86 hasta alındı. Hastaların demografik ve epidemiyolojik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.



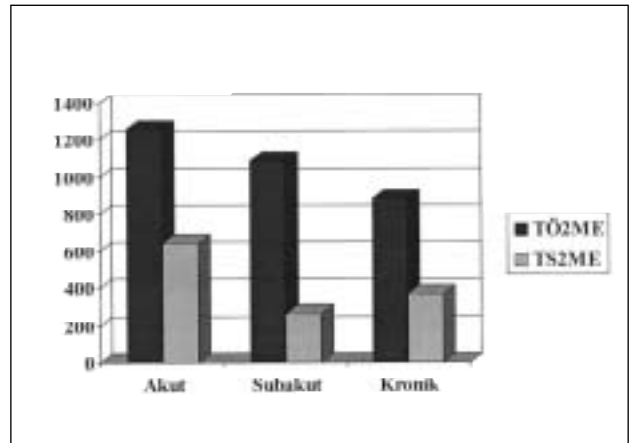
Şekil 1. Brusellozlu hastalarda şikayet sürelerine göre tedavi öncesi ve sonrası ortalama SAT değerleri. TÖ: Tedavi öncesi, TS: Tedavi sonrası, SAT: Serum aglütinasyon testi titresi (titreler 1/200-1/1600 arasındadır).

Hastalar şikayet sürelerine göre değerlendirildiğinde, 40 hasta (%46.5) akut, 30'u (%34.9) subakut ve 16'sı (% 18.6) kronik bruselloz ile uyumlu idi. Kontrole gelen hastalardan 22'si akut, 24'ü subakut, 14'ü kronik bruselloz grubundandı.

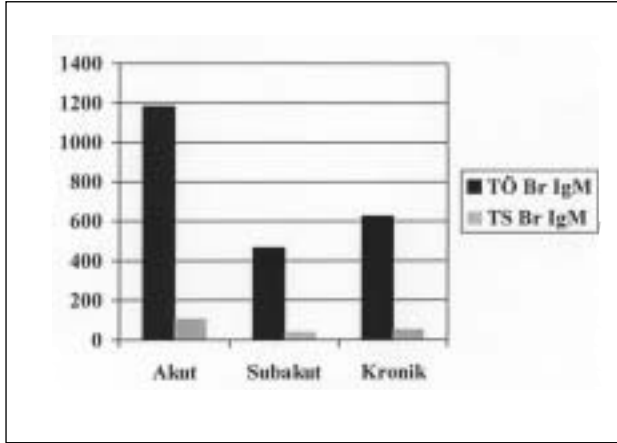
Tedavi öncesi akut, subakut ve kronik hastaların SAT aglütinin titrelerinin ortalamaları sırasıyla 1/1508, 1/1157, 1/1110 olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Kruskal-Wallis testi, $p > 0.05$). Tedavi sonrası grupların SAT titreleri arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tedavi sonrası alınan serumların hiçbirinde SAT titrelerinde negatifleşme tespit edilmemiştir. Şikayet süresine göre akut, subakut, kronik olarak gruplandırılan hastaların tedavi öncesi ve sonrası SAT titreleri karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı düşüş olduğu görülmüştür (Wilcoxon testi, p değerleri sırasıyla, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$). Şekil 1'de brusellozlu hastaların şikayet sürelerine göre tedavi öncesi ve sonrası ortalama SAT titreleri gösterilmektedir.

Hastaların tedavi öncesi 2-ME ile yapılan SAT titreleri arasında önemli bir fark saptanmamıştır. Tedavi sonrası da 2-ME testlerinde gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Şikayet süresine göre tedavi öncesi ve sonrası 2-ME test titreleri değerlendirildiğinde; akut ve subakut grupta yer alan hastaların tedavi öncesi ve sonrası 2-ME titreleri arasında düşüş saptanmış ve bu düşüşün de istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Wilcoxon testi, $p < 0.01$). Kronik grupta yer alan hastaların ise tedavi öncesi ve sonrası 2-ME testi titreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bulgular Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tedavi öncesi *Brucella* IgM değeri 56/86 (%65) hastada, tedavi sonrası ise 10/60 (%17) hastada "cut-off" değerinin üzerinde tespit edilmiştir. Akut grupta yer alan hastaların *Brucella* IgM titre ortalaması 1183 IU/ml iken, subakut grupta 465 IU/ml; kronik grupta 625 IU/ml olarak bulunmuştur. Akut grupta yer alan hastaların *Brucella* IgM değerleri diğer gruplara göre daha yüksek seviyede tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Tedavi sonrası grupların *Brucella* IgM değerleri arasında ise farklılık bulunmamıştır. Her üç grupta tedavi öncesi ve sonra-



Şekil 2. Brusellozlu hastaların tedavi öncesi ve sonrası 2 ME test titreleri ortalamaları. TÖ2ME: tedavi öncesi 2-merkaptotanol testi; TS2ME: tedavi sonrası 2-merkaptotanol testi (titreler, 1/200-1/1400 arasındadır).



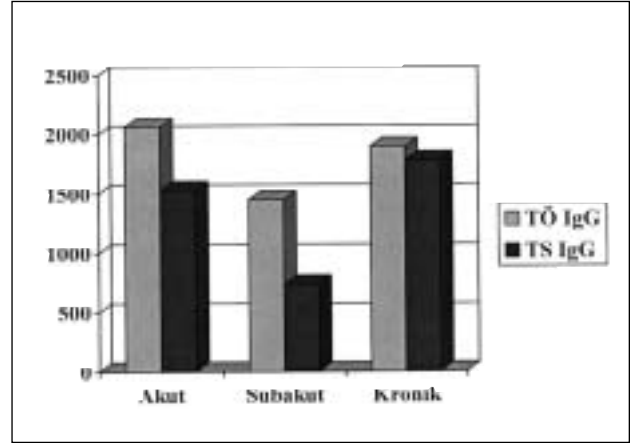
Şekil 3. Brusellozlu hastaların tedavi öncesi ve sonrası *Brucella* IgM antikor düzeyleri ortalaması. TÖ: Tedavi öncesi, TS: Tedavi sonrası, Br: *Brucella*.

sı IgM titreleri arasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (Wilcoxon testi, p değerleri akut, subakut ve kronik grupta sırasıyla; $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). Hastaların, hastalık sürelerine göre tedavi öncesi ve sonrası *Brucella* IgM değerleri Şekil 3'te gösterilmiştir.

Tedavi öncesi *Brucella* IgG titresi 80/86 (%93) hastada "cut-off" değerinin üzerinde iken, tedavi sonrası 53/60 (%88) hastada "cut-off" değerinin üzerinde bulunmuştur. Tedavi öncesi IgG titresi negatif olan 6 hastanın üç tanesi akut, üç tanesi subakut bruselloz ile uyumlu bulundu. Tedavi öncesi *Brucella* IgG değerlerine göre gruplar farklılık bulunmamıştır. Benzer şekilde tedavi sonrası gruplar arasında da fark saptanmamıştır. Çalışmamızda, akut ve subakut grupta yer alan hastaların tedavi öncesi ve sonrası IgG titreleri arasındaki düşüş anlamlı bulunurken ($p < 0.05$ ve $p < 0.01$), kronik grupta yer alan hastalardaki düşüş anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4). Çalışmamızda altı hastanın IgG düzeyi tedavi sonrasında artış gösterdi. Bu hastaların tedavi sonrası IgM düzeyleri ise negatif bulundu. Bu altı hastanın bir tanesi akut, iki tanesi subakut, üç tanesi kronik bruselloz idi. Bu hastalardan üç tanesinde fokal infeksiyon veya komplikasyon vardı. Bu üç hastanın bir tanesi akut, iki tanesi subakut bruselloz ile uyumlu idi. 11 hastada ise IgG değerinin tedavi öncesi ve sonrasında aynı kaldığı görüldü. Yine bu hastaların hepsinde tedavi sonrası IgM değerinin düştüğü görüldü. Bu hastaların hiçbirinde de relaps gelişmedi.

Çalışmamızda SAT ile ELISA sonuçlarının birbirleri ile korelasyonuna bakıldığında, tedavi öncesi SAT ile *Brucella* IgM değerleri arasında korelasyon olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.001$), IgG arasında ise korelasyon bulunmadığı saptanmıştır. Tedavi sonrası SAT ile *Brucella* IgM ve IgG titreleri arasında korelasyon bulunduğu ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). 2-ME test sonuçları ile *Brucella* IgG değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır.

Çalışmaya alınıp tedavisi verilen 86 hastadan 60 tanesinin tedavi sonrası kontrol serumları alınabildi. Bu hastalar tedavi sonrası serumlarının alınma zamanına göre üç gruba ayrıldı. Serumları tedavi sonrası ilk altı haftada ayrılan 33 hasta birin-

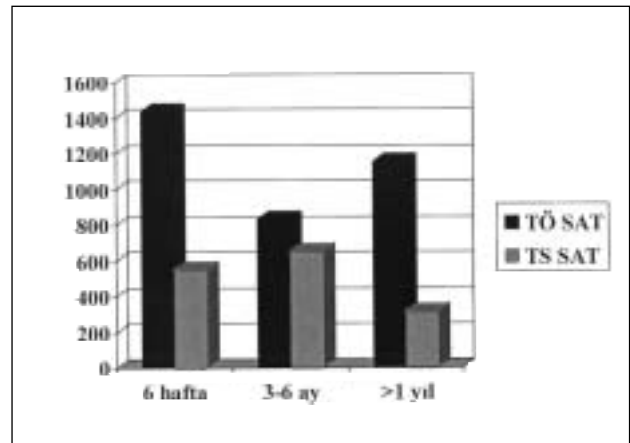


Şekil 4. Brusellozlu hastalarda tedavi öncesi ve sonrası *Brucella* IgG değerleri (IU/ml). TÖ: tedavi öncesi, TS: tedavi sonrası.

ci grup, tedavi sonrası üç-altı ay sonra ayrılan 14 hasta ikinci grup, bir yıl ve üzerinde alınabilen 13 hasta üçüncü grupta yer aldı. Her üç grupta da tedavi öncesi ve sonrası SAT titreleri arasındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Wilcoxon testi, p değerleri sırasıyla, $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.01$). Bir yıl sonra alınan örneklerde, diğerlerine göre daha düşük değerler elde edilmekle birlikte SAT ve IgG değerleri diğerlerine göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Şekil 5'te hastaların tedavi sonrası kontrol serumlarının alınma zamanına göre tedavi öncesi ve sonrası SAT titreleri ortalamaları gösterilmiştir.

İrdeleme

Bruselloz, tanısı, öykü, klinik bulgular, bakteriyolojik ve serolojik testlere dayanılarak konulan bir hastalıktır. Bununla beraber lokalize, akut veya kronik infeksiyon şeklinde kendini göstermesi, tipik bulgularının olmayışı, her sistemi tutabilmesi



Şekil 5. Brusellozlu hastaların tedavi sonrası kontrol serumlarının alınma zamanına göre tedavi öncesi ve sonrası SAT titreleri ortalamaları. TÖ: Tedavi öncesi, TS: Tedavi sonrası.

ve her türlü bulguyla karşımıza çıkabilmesi nedeniyle zaman zaman tanıda sorunlar yaşanabilmektedir. Ayrıca sıklıkla bulguların silik seyretmesi, kontrolsüz ve uygun olmayan antibiyotik kullanımına bağlı semptomların baskılanması da tanıyı zorlaştırmaktadır. Brusellozun kesin tanısı bakteriyolojik olmakla birlikte in vitro olarak yavaş üremesi sebebiyle primer izolasyonu gecikebilir veya her zaman kültür pozitifliği olmayabilir. Bu nedenle tanıda serolojik testler önem kazanmıştır. Bruselloz tanısında serolojik testler tüm dünyada en çok kullanılan yöntem olmasına rağmen kronik enfeksiyonda, geçirilmiş enfeksiyonda ve/veya mesleki maruz kalmaya bağlı brusellozdaki antikor konsantrasyonlarındaki değişiklikler hakkında bilgiler yetersizdir (8). Bu çalışmada, SAT ve ELISA ile *Brucella* IgG ve IgM antikorlarının saptanmasının, brusellozun serolojik tanısı ve tedavi takibindeki yerleri araştırılmıştır.

Brusellozun kronik bir hastalık olmasından dolayı olguları akut, subakut, kronik olarak sınıflandırmak aslında çok da doğru bir yaklaşım olmamakla beraber, halen birçok çalışmada yaklaşım kolaylığı açısından kullanılmaktadır. Tohme ve arkadaşları (9), 63 hastada yaptıkları bir çalışmada, vakaların %65'ini akut, %33'ünü subakut ve %2'sini kronik bruselloz ile uyumlu bulmuşlardır. Özer ve arkadaşları (10) da vakaların % 63.6'sını akut, %21.2'sini subakut, %15.2'sini kronik bruselloz ile uyumlu bulmuştur. Bizim çalışmamızda ise hastalardan 40 (%46.5) tanesi akut, 30'u (%34.9) subakut ve 16'sı (%18.6) kronik bruselloz ile uyumlu bulundu. Akut vaka oranımız diğer çalışmalara oranla daha az bulunmuştur.

Brucella türlerine karşı özgül antikorların tespitinde kullanılan serolojik testlerin duyarlılığı %65-95 arasındadır. Ancak özgüllüğü, brusellozun endemik olduğu bölgelerde sağlıklı popülasyonda da antikor prevalansının yüksek olarak saptanabilmesinden dolayı düşüktür (5). SAT bu testlerden en çok kullanılandır. Ucuz olması, özel aletlere ihtiyaç göstermemesi gibi avantajlarının yanında, iki gün sürede sonuç vermesi, tek başına akut, subakut ve kronik enfeksiyonu ayırt edememesi, blokan antikorlara bağlı yanlış negatif sonuç alınması ve bazı mikroorganizmalara (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Legionella pneumophila* ve *Francisella tularensis* gibi) karşı çapraz reaksiyon göstermesi gibi olumsuzlukları da vardır (3-7).

Brusellozda humoral cevap olarak IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar oluşur; enfeksiyonun ilk haftasında IgM antikorunu sentezlenmeye başlar, bunu ikinci haftadan sonra IgG sentezi takip eder. Zamanla IgM titresini düşer ve tedavi ile IgG antikorunda da iyileşme ile uyumlu olarak düşme meydana gelir. Bu düşme süresi tam belli değildir. IgG titresinde düşme olmaması veya tekrar yükselmesi nöks veya kronik enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (1,2,12). Bazı vakalarda ise enfeksiyon bulgusu olmadan düşük IgM seviyesi aylar veya yıllar boyunca serumda tespit edilmektedir (2). IgA antikorları ise hastalığın erken safhalarında yükselir. Hastalığın ilerleyen aylarında önemli ölçüde azalır. Ama IgG antikor düzeyinden daha az miktarda olarak devamlı olarak kalır (11).

Bruselloz tanısında endemik bölgelerde SAT ile 1/320 ve üzeri, endemik olmayan bölgelerde 1/160 ve üzeri titre pozitif kabul edilmesine rağmen, hiçbir titre tek başına tanı koydurucu değildir. 2-4 hafta sonra serolojik titrelerin tekrarlanması önerilmektedir. Bununla beraber klinik olarak aktif enfeksiyonu

olan birçok olguda serum aglütinasyon testi 1/160'ın üzerindedir (1-3).

Çalışmaya dahil edilen hastaların tedavi öncesi serum SAT değerleri karşılaştırıldığında akut olgularda daha yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında bir fark saptanmamıştır. Brusellozda tek başına SAT titreleri hastalığın evresi hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Tüm hastaların tedavi öncesi ve sonrası SAT titreleri arasındaki düşme istatistiksel olarak anlamlı saptanmış, ama tedavi sonrası alınan serumların hiçbirinde SAT titrelerinde negatifleşme tespit edilmemiştir. Gazapo ve arkadaşları (13), yaptığı çalışmada bruselloz tedavisi alan hastaların, tedavi bitiminden bir yıl sonrasına kadar SAT titrelerinde pozitifliğin devam edebileceğini belirtmişler ve relaps olan vakaların %25'inde tüp aglütinasyon titresinde yükselme saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da tedavi sonrası kontrol serumu bir yıl sonra alınan örneklerde bile pozitifliğin devam ettiği görülmüştür. Ancak serum titrelerinde yükselme olmadığı ve klinik bulguları da olmadığı için olgularımızda relaps düşünülmemiştir.

2-merkaptoetanol (2-ME) aglütinasyon testi immünoglobülin sınıflarını ayırmak için SAT ile birlikte kullanılan basit bir yöntemdir. Bu yöntem IgM pentamerinin disülfid bağlarının indirgenmesine dayanır (2,14,15). Böylece 2-ME ile tespit edilen IgG antikorlarıdır. Çalışmamızda tedavi ile akut, subakut, kronik tüm gruplarda 2-ME titresinin düştüğünü gördük. Akut ve subakut gruptaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p > 0.01$), kronik grupta ise tedavi sonrası düşme anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). 2-ME testinin, IgG titreleri ile korele gitmediği görülmüştür. SAT ve *Brucella* ELISA testinde ölçülen antikorların farklı olmasıyla açıklanabilir. 2-ME testinin tanıda çok daha önemli olduğu, özellikle kronik olgularda tedavi takibinde özel bir yarar sağlamadığı söylenebilir.

Bruselloz tanısında ve izleminde SAT'ın tek başına yeterli olamaması nedeniyle antikor alt gruplarının belirlenmesine olanak sağlayan ve hastalığın izleminde kullanılabilecek yeni tanı yöntemleri araştırılmıştır. ELISA ile antikor subgruplarının çalışılması bu yöntemlerden biridir. ELISA yönteminin, fazla sayıda örneğin çok kısa sürede değerlendirilebilmesi ve antijen modifikasyonları ile çapraz reaksiyon riskinin en aza indirilmesi gibi avantajları da vardır. Bruselloz tanısında ELISA testinin hızlı, duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir. Akut ve kronik brusellozda immünoglobülin profilini göstermede yardımcıdır. Kitle taramalarında ve brusellozun serolojik tanısında seçilebilecek bir yöntem olarak pek çok çalışmada önerilmektedir (16,17-20).

Sippel ve arkadaşları (12), kan kültürü, SAT ve ELISA testlerini karşılaştırmıştır. Kan kültürü sonuçlarının haftalar sonra alınabildiği ve negatif sonuç da olabileceği, SAT'ın zaman alıcı ve zahmetli olduğu ve blokan antikorlara bağlı yanlış sonuçlar verebileceği, buna karşın ELISA testlerinin SAT'tan daha duyarlı olduğu, blokan antikorlardan etkilenmediği, geniş kitlelerin taranmasında ve hastalığın tanımlanmasında kusursuz bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Araj ve Kaufmann (17) ise kronik bruselloz tanısında ELISA'nın seçilecek en iyi yöntem olduğu ileri sürmüşlerdir. Ariza ve arkadaşları (11) da hastalığın seyri sırasındaki IgG, IgM ve IgA antikor titresindeki değişikliklerin, ELISA yöntemi ile 2-ME ve SAT'tan daha iyi ve daha özgül olarak tespit edilebileceğini vurgulamışlardır.

ELISA testinde antijen olarak *Brucella*'ların tüm hücreleri, lipopolisakaridleri (LPS), tuzla ekstrakte edilen proteinleri, nativ haptan polisakaridi ve dış membran proteinleri kullanılabilir (17). Çalışmamızda tüm hücre antijenleri ile kaplı ELISA kiti kullanılmıştır. Bugüne kadar tüm hücre kullanılarak çeşitli ELISA testleri yapılmıştır (12,19,21,22). Granfors ve arkadaşları (23) da tüm hücre kullanılarak yapılan ELISA testinde çapraz reaksiyon riskinin, LPS kullanılarak yapılan ELISA'ya göre daha az olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda akut, subakut, kronik tüm gruplardaki hastaların tedavi öncesi IgM ve tedavi sonrası IgM titreleri arasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Tedavi öncesi IgM değeri 56/86 (%65) hastada "cut-off"un üzerinde iken, tedavi sonrası IgM ise 10/60 (%17) hastada "cut-off"un üzerinde bulundu. Şikayet süresine göre akut grupta yer alan hastaların IgM titreleri diğer gruplara göre daha yüksek seviyede bulundu ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı idi. Bu sonuç da bize hastalığın akut evresinin tanısında IgM titresinin bakımının önemli bir belirleyici olacağını göstermektedir. Yüksek IgM seviyesi akut bruselloz lehine bir bulgu olarak değerlendirilmelidir. Hastalığın yüksek endemik olduğu bölgelerde popülasyonun büyük bir kısmında persistan spesifik IgG antikorları vardır. Böyle durumların göstergesinde hastalığın erken fazında spesifik IgM antikorlarının tespiti laboratuvar tanısında daha önemlidir. Spesifik IgM antikorları SAT ve 2-ME ile birlikte dolaylı veya ELISA yöntemi ile doğrudan tespit edilebilir (24). De Klerk ve Anderson (21), ELISA testi ile *Brucella* antikorlarının farklı tiplerinin gösterilebilmesiyle akut ve kronik infeksiyon ayırımının mümkün olabileceğini vurgulamışlardır. *B. abortus* IgM'in ELISA ile saptanmasının, erken evre infeksiyonun saptanması ve mesleki maruz kalmaya bağlı aktif ve subklinik vakaları ayırmada yardımcı olacağı belirtilmiştir.

Çalışmamızda, akut ve subakut grupta yer alan hastaların tedavi öncesi ve sonrası IgG titreleri arasındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, kronik grupta yer alan hastalardaki düşüş anlamlı bulunmadı. Bu da bize özellikle kronik brusellozlu hastaların tedavi sonrası takiplerinin sadece IgG ile yapılmasının yanıltıcı olabileceğini göstermektedir. Tedavi öncesi IgG değeri 80/86 (%93) hastada "cut-off"un üzerinde idi. Tedavi öncesi IgG titresi negatif olan 6 hastanın üç tanesi akut, üç tanesi subakut bruselloz ile uyumlu bulundu. Tedavi sonrası IgG ise hastaların büyük çoğunluğunda (%88) "cut-off" değerinin üzerinde saptandı. Bu hastaların hiçbirinde klinik olarak relaps yoktu.

Bu sonuçlar bize, brusellozun tanı ve tedavi sonrası izleminde, IgG ile birlikte IgM'in de kullanılmasının daha doğru sonuç vereceğini düşündürmektedir. Gazapo ve arkadaşları (13) da brusellozun herhangi bir döneminde ELISA ile IgG ve IgM'nin birlikte çalışılmasının daha doğru sonuç vereceğini bildirmiştir.

Çalışmamızda altı hastanın IgG düzeyi tedavi sonrasında artış gösterirken, 11 hastanın ise IgG düzeyi tedavi öncesi ve sonrasında değişmedi. Bu hastaların hiçbirinde relaps gelişmedi. Ama bununla birlikte literatürde, Ariza ve arkadaşları (11), IgG'nin ilk başvuruda ve daha sonra da devamlı olarak yüksek seyretmesinin fokal infeksiyon lehine bir bulgu olduğunu bildirmişlerdir. Altı hastanın üçünde fokal komplikasyon olması bu bilgi ile uyumlu değerlendirilmiştir.

Brusellozda SAT hem IgG hem de IgM antikorlarını ölçen bir testtir. Bu nedenle bruselloz tanısında ilk başta kullanılacak test olarak görünmektedir. Tedavi sonrası uzun süre yüksek titrelerde kalabilmesi nedeniyle, tek başına akut veya kronikliğin anlaşılmasında, tedavinin değerlendirilmesi ve relapsların ve fokal infeksiyonların tespit edilmesinde yetersiz kalabilmektedir. SAT ile 2-ME testinin birlikte kullanımı, akut olguların ayırt edilmesinde ve tedavi takibinde önem kazanmaktadır. Bununla birlikte kronik olguların takibinde özel bir yarar sağlamadığı düşünülmektedir.

Brusellozun tanı ve takibinde sadece ELISA IgG titrerinin ölçümü de tek başına yeterli görünmemektedir. Ülkemiz gibi brusellozun endemik olarak görüldüğü bölgelerde popülasyonun serumlarında zaten varolabilecek persistan spesifik IgG antikorlarının varlığı serolojik tanıda karışıklıklara yol açabilir. Hastalığın tanı ve takibinde IgM değerlerinin ölçümünü sağlayacak yöntemlerin kullanılmasına gereksinim duyulmaktadır. Titre verebilecek ELISA yöntemlerinin rutin kullanımdaki yeri için maliyet analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Young EJ. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000: 2386-93
2. Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 359-72
3. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(2): 213-21
4. Reisner BS, Woods GL. *Brucella*. In: Henry JB, ed. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 20th ed. Philadelphia: Saunders, 2001: 1114
5. Lago LF, Vallejo FJ, Treujillano I, Vizcaino N. Fluorescent whole-cell hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify *Brucella* spp. by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2768-71
6. Gotuzzo E, Carrillo C. *Brucella*. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious Diseases*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1998: 1837-45
7. Bundle DR, Gidney MAJ, Perry MB, Duncan JR, Cherwonogrodzky JW. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1984; 46: 389-93
8. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3245-8
9. Tohme A, Hammoud A, el Rassi B, Haddad-Germanos M, Ghayad E. Human brucellosis. Retrospective studies of 63 cases in Lebanon. *Presse Med* 2001; 30(27): 1339-43
10. Özer S, Oltan N, Genç S. Bruselloz: 33 olgunun değerlendirilmesi. *Klimik Derg* 1998; 11(3): 82-4
11. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 131-40
12. Sippel JE, El-Marsy NA, Farid Z. Diagnosis of human brucellosis with ELISA. *Lancet* 1982; 2: 19-21
13. Gazapo E, Lahoz JG, Subiza JL. Changes in IgM and IgG antibody concentration in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow-up. *J Infect Dis* 1989; 159: 219-25
14. Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn CW. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997: 431-6
15. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İkinci baskı. İzmir: Barış Yayınları, 1995: 224-9
16. Al-Eissa Y, Al-Zamil F, Al-Mugeiren M, Al-Rasheed S, Al-Sanie A, Al-Mazyad A. Childhood brucellosis: a deceptive infectious

- disease. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 129-33
17. Araj GF, Kaufmann AF. Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (Ig G), Ig M and Ig A to *Brucella melitensis* major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1909-12
 18. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg* 1986; 97(3): 457-69
 19. Devi SJN, Polt SS, Boctor FN, Peter JB. Serological evaluation of brucellosis: importance of species in antigen preparation. *J Infect Dis* 1987; 156: 658-61
 20. Mongini C, Fernandez T, Turovetsky A, Hajos SE. Comparative study of cell-immunoenzymatic methods for the estimation of Ig G and Ig M anti-brucella antibodies in the diagnosis of human brucellosis. *J Appl Bacteriol* 1990; 69(1): 86-91
 21. De Klerk E, Anderson R. Comparative evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. *J Clin Microbiol* 1985; 21(3): 381-6
 22. Saz JV, Beltran M, Diaz A, Agulla A, Merino FJ, Villasante PA, Velasco AC. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis. *Eur Clin Microbiol* 1987; 6:71-4
 23. Granfors K, Viljanen MK, Toivanen A. Measurement of immunoglobulin M, immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of lipopolysaccharide and whole bacterium as antigen. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 6-14
 24. Smits HL, Basahi MA, Diaz R, *et al.* Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4179-82