

Brusellozda laboratuvar tanı yöntemleri

Spesifik tanı yöntemleri:

1. Direk (kültür ve bakterinin gösterilmesi)
2. Antikorların gösterilmesi

- 1. Standart tüp aglütinasyonu
- 2. Rose Bengal lam testi
- 3. Coombs testi
- 4. Spot ve dipstick testi
- 5. IFA testi
- 6. ELISA
- 7. PCR
-

Brusellozun antijenik yapısı zayıftır

- Hastalığın süresine göre oluşan aglütininler farklıdır
- IgM : 1 hafta- 3 ay (akut enfeksiyon)
- IgG: 3. hafta- 12. ay, bazen ömür boyu (Akut ve kronik enfeksiyonda)
- IgA: 3 aydan sonra (Kronik ve relaps olgularında)
- IgG+IgA: Relaps olgularında

PCR>ELISA>IFA>Combs>STA Immuncapture: Coombs ve STA kombinasyonu

- PCR %100 sensitivite, %98.3 spesifite
- ELISA ve PCR da cross reaksiyon görülmez
- Testler pahalı ve zaman alıcı

Tanı : Aglütinasyonlar

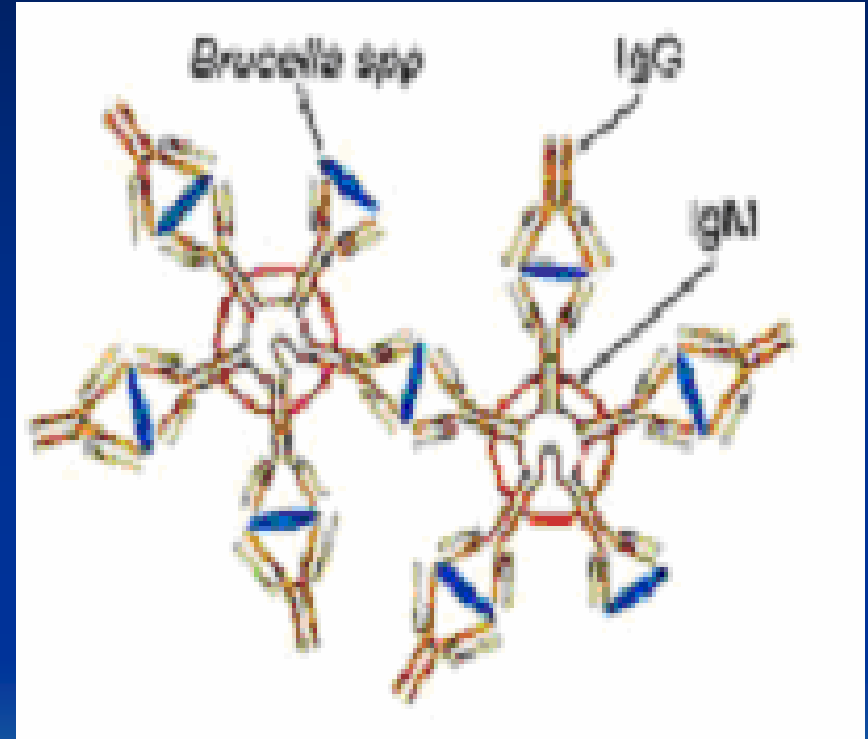
Rose-Bengal: Hasta serumu
+ boyalı brucella antijeni

STA: Dilüsyone edilmiş
hasta serumu + brucella
antijeni

Dipstick testi: Hasta serumu
+ brucella antijeni

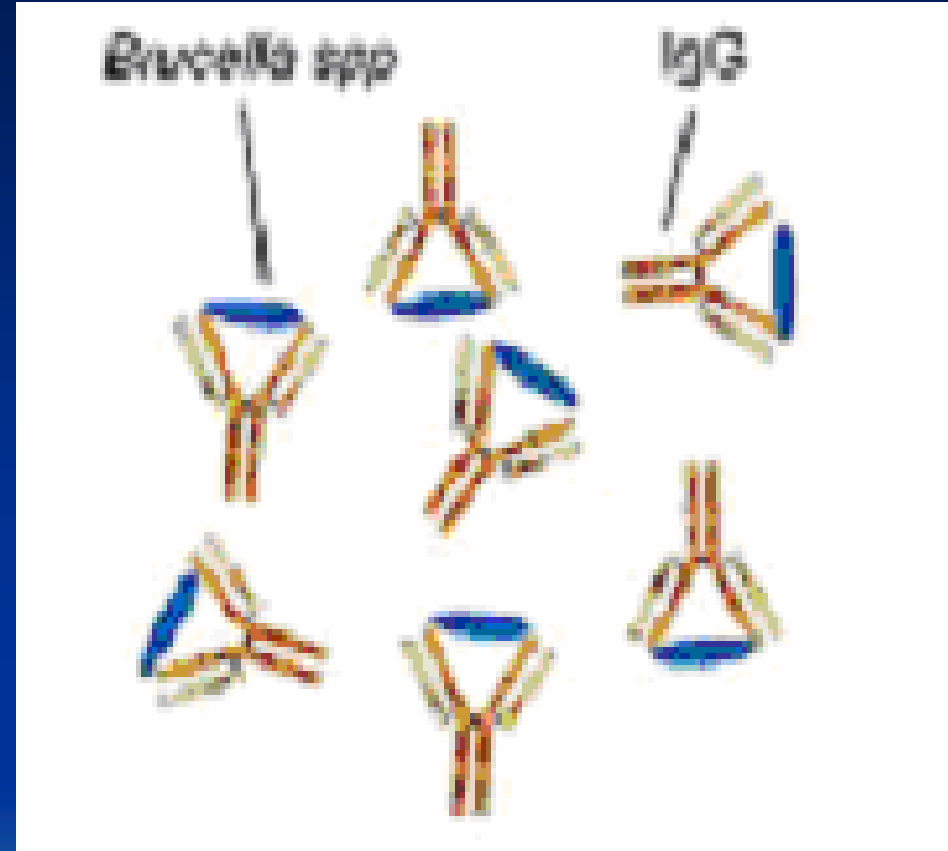
Spot test: Tam kan +
brucella antijeni

HIZLI, UCUZ, AKUT
infeksiyonda spesifitesi
yüksek



AGLUTİNAN ANTİKORLAR
(IgG+IgA+IgM)
Akut Hastalarda

- Kronik infeksiyonlarda, tekrarlamalarda ve endemik bölgelerde, brusellaya karşı oluşan antikor seviyesi artar. Bu vakalarda, artan antikorların çoğu aglütinasyon göstermeyen IgG antikorlarıdır (**blokan antikorlar,inkomplet antikorlar**)



NON AGLUTİNAN ANTİKORLAR

(IgG+IgA)

Kronik Hastalarda

Direk tanı yöntemi:

Kan kültürü
Doku kültürü



API 20NE testi

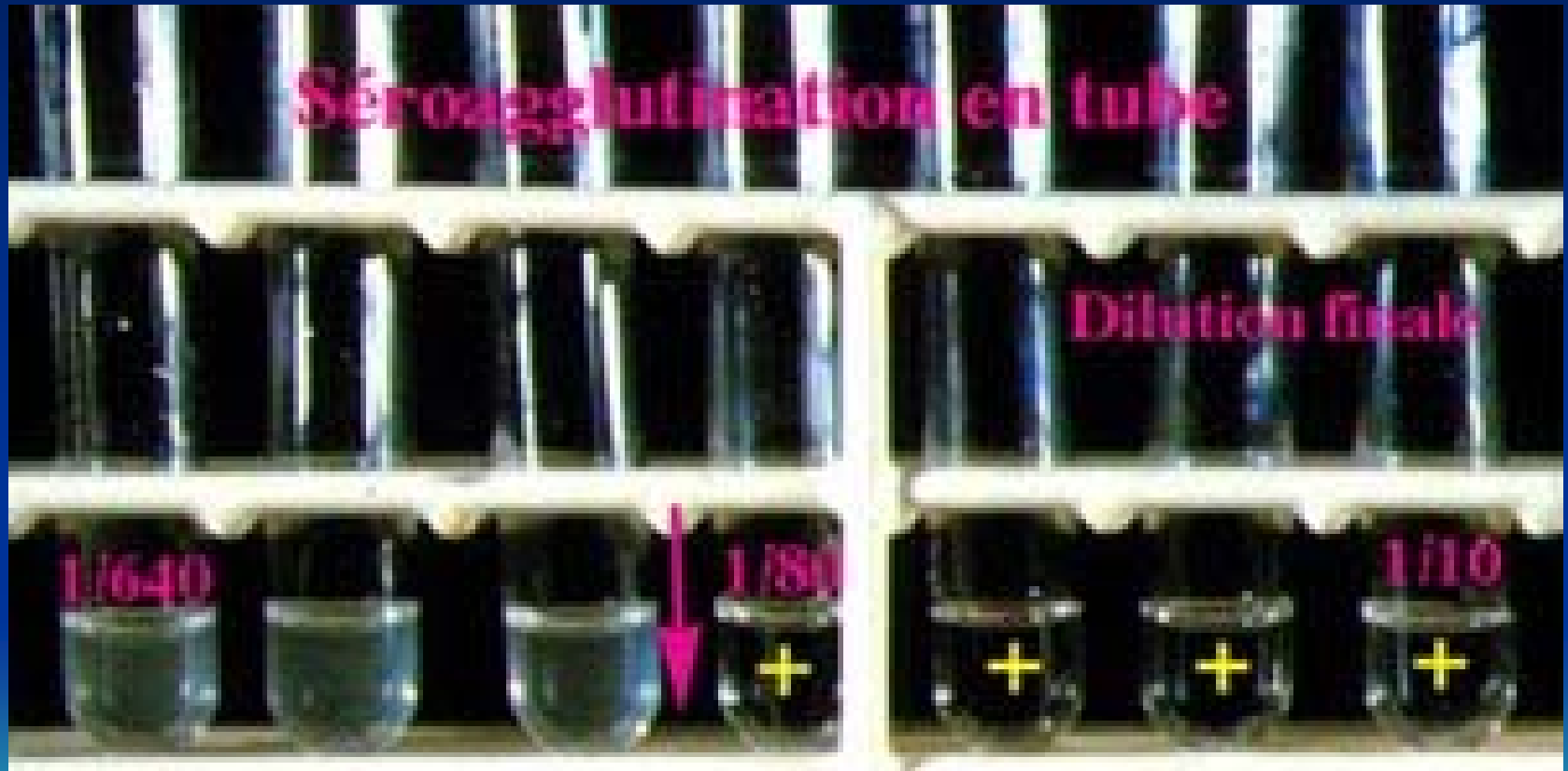
İzole edilen bakterinin tanımlanması



STA

1. Bir spora 10 tüp dizin
2. Birinci tüpe 0.9 ml serum fizyolojik
3. Diğer tüm tüplere 0.5 ml serum fizyolojik
4. Birinci tüpe 0.1 ml hasta serumu
5. Karışımdan alınan 0.5 ml diğer tüplere geometrik dilüsyonla aktarılır.
6. Son tüpe bu karışım konulmaz
7. Tüm tüplere 0.5 ml brusella antijeni konulur
8. Bir gece 37 °C de beklet
9. Aglütinasyon olan tüp (+) titrasyonu verir.

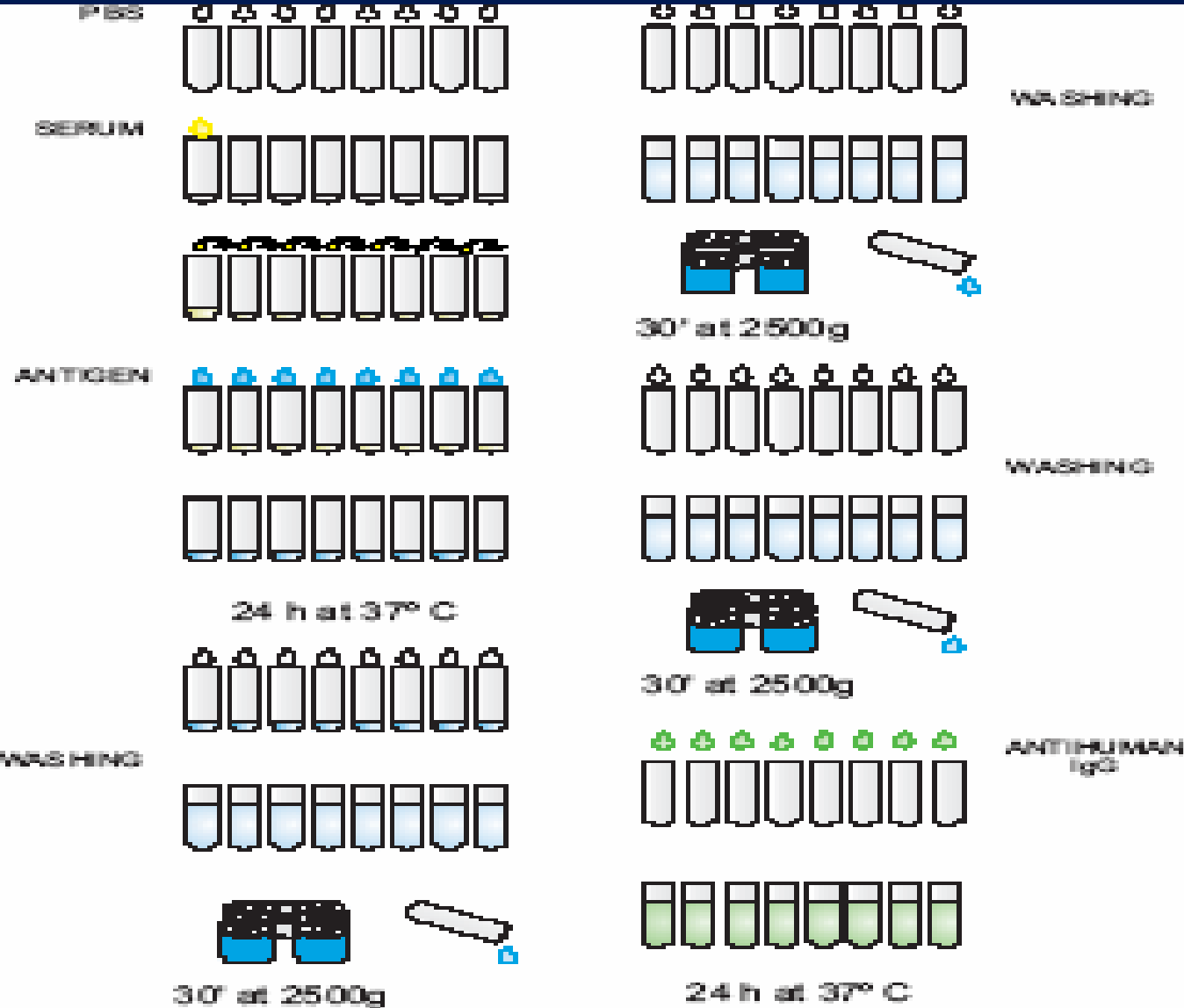
STA



Blokan antikorlar (inkomplet antikorlar)

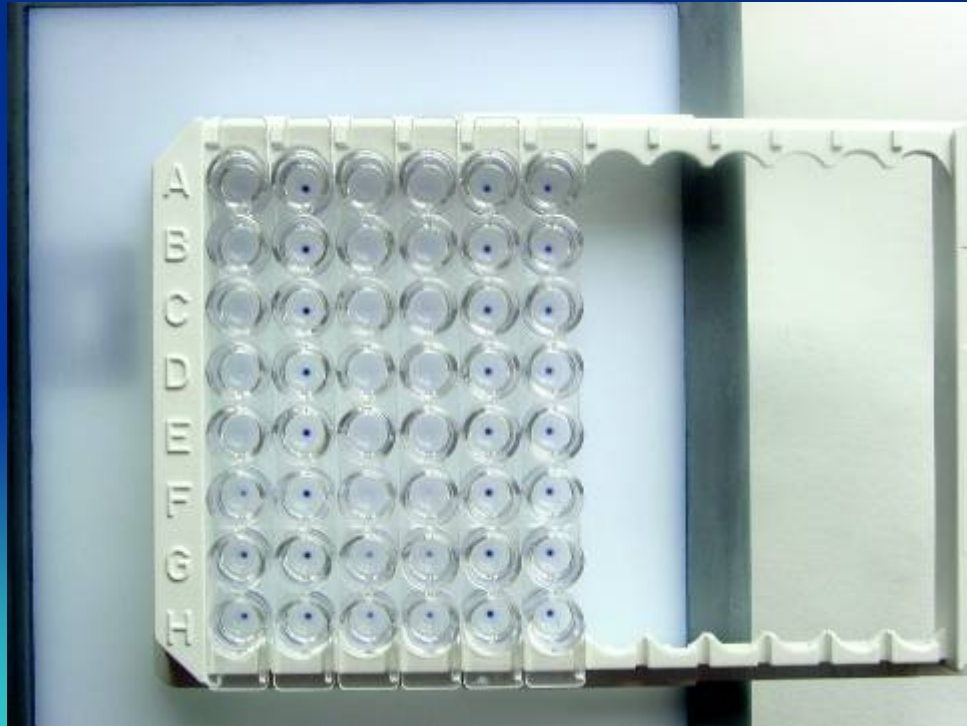
Coombs testi veya Enzim immunoassay ile belirlenirler. **Rose Bengal testi bu olgularda negatif olarak sonuç verebilir. Tüp aglutinasyon testinde blokan antikorlar nedeniyle ya düşük titrede pozitiflik ya da negatif sonuç alınır.**

Coombs çalışması



1. STA dan sonra Aglutinasyon Olmayan tüpler Sentrifujlenip 3 kez yıkanır
2. Üzerine sulandırılmış Anti-IgG (coombs) Serumu konur.
3. Üst sıvısı atılarak dip kısmı kullanılır

ELISA : Antijenle kaplanmış
plaklara serum konularak spesifik
IgG, IgM ve IgA antikorlarına
bakılır.



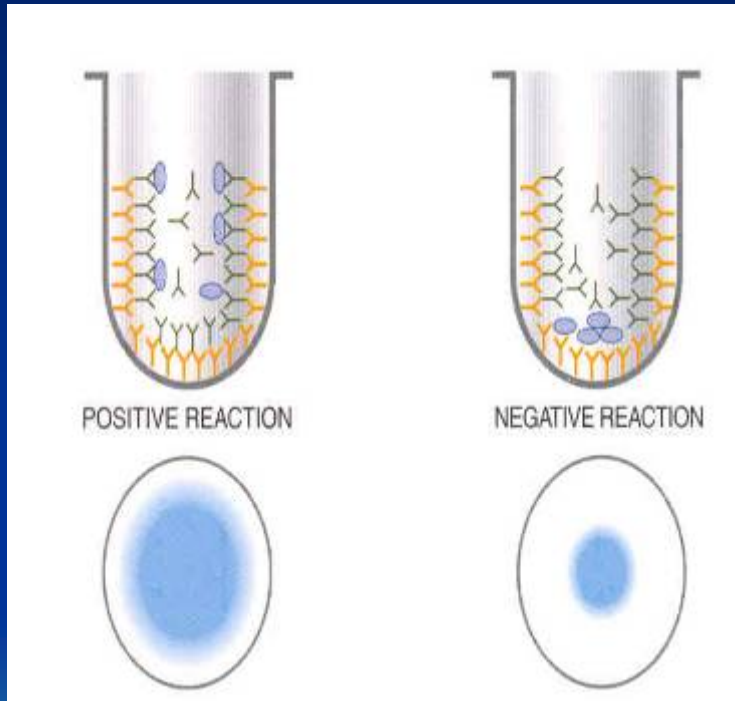
Coombs + STA olan test:

Brucellacapt kit içeriği:

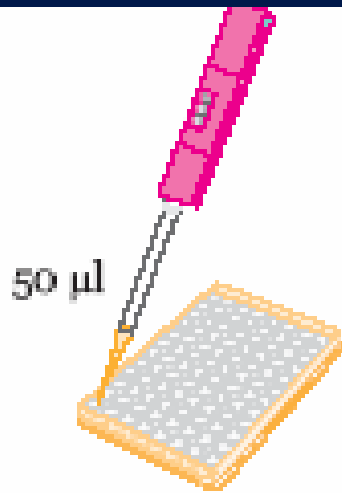
- * 2 tane 96 kuyucuklu pleyt
- * Pozitif kontrol
- * Negatif kontrol
- * Dilüent
- * Brucella antijeni



Brucellacapt testini irdeleyelim..

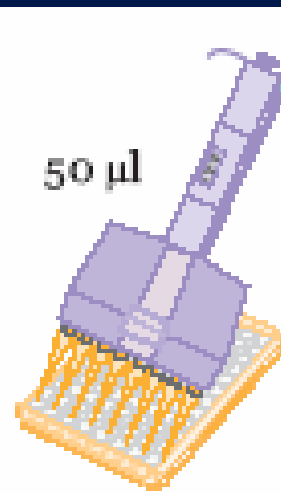


- Bu yöntemde, kuyucuklar insan kaynaklı IgG,IgM,IgA antikorlarına karşı antikorlarla (Coombs antikorları) kaplıdır.
- Brusellaya karşı oluşan üç antikor da tespit eder

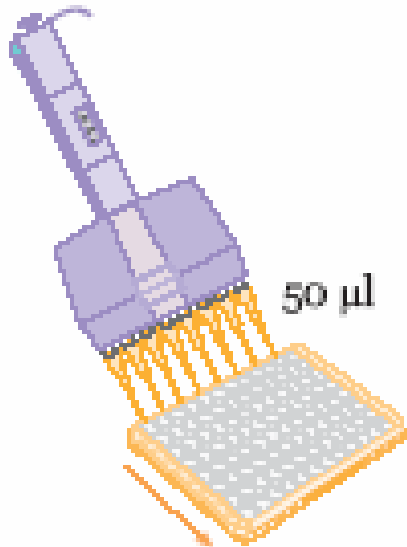


50 µl

Add
diluent

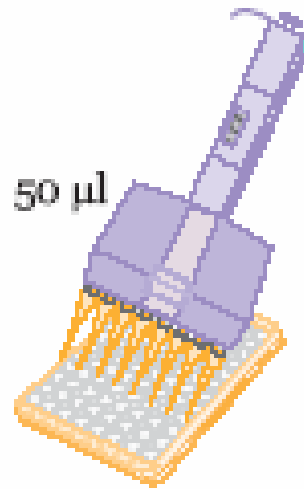


50 µl



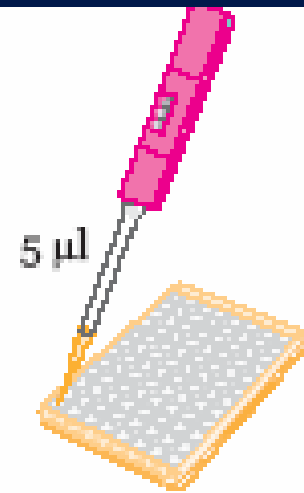
50 µl

Double
dilution



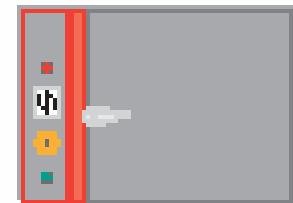
50 µl

Add
antigen



5 µl

Add
serum

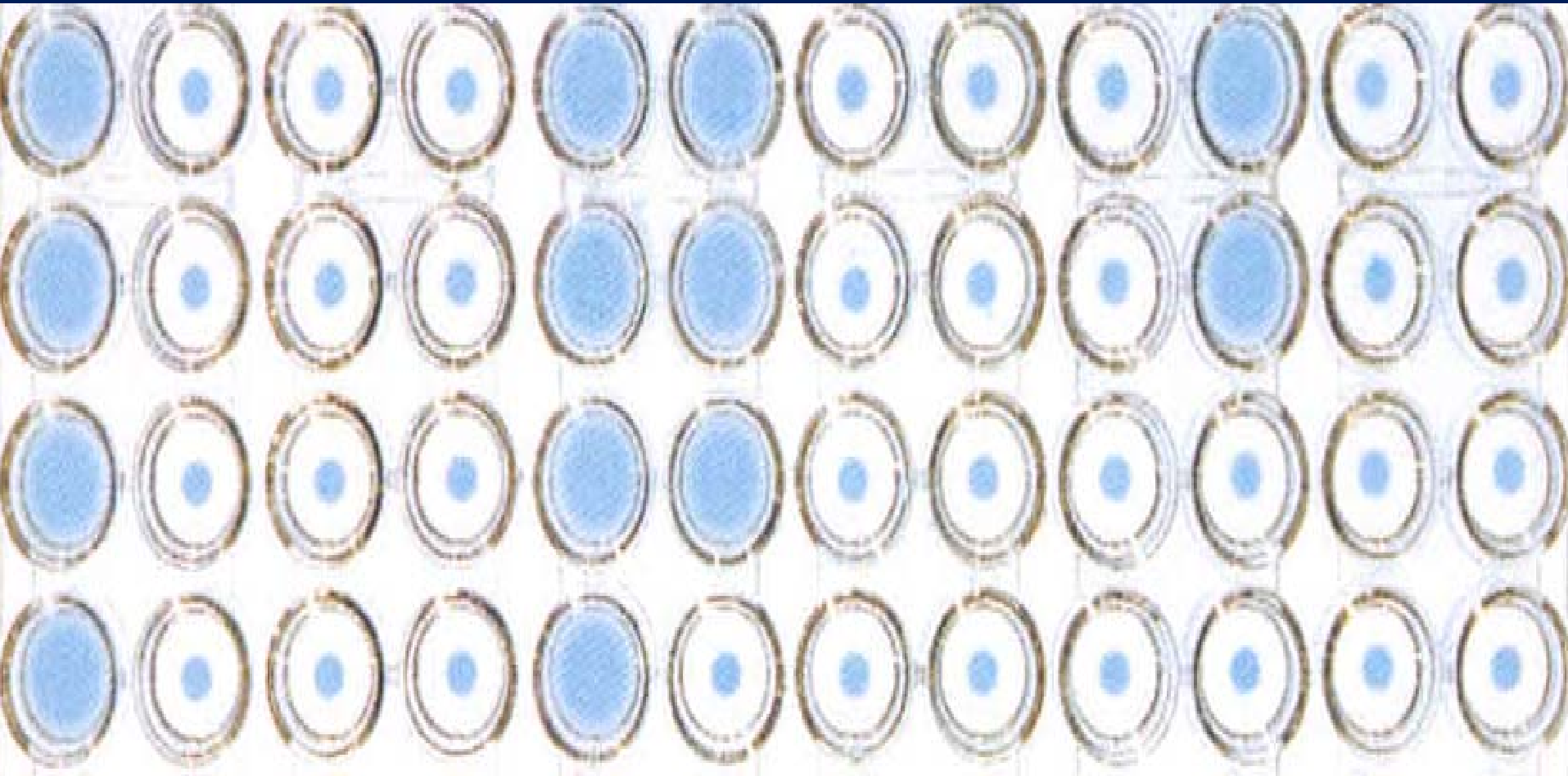


37°C

Incubate for
24 hours

Titrasyondan sonra üstü kapatılır

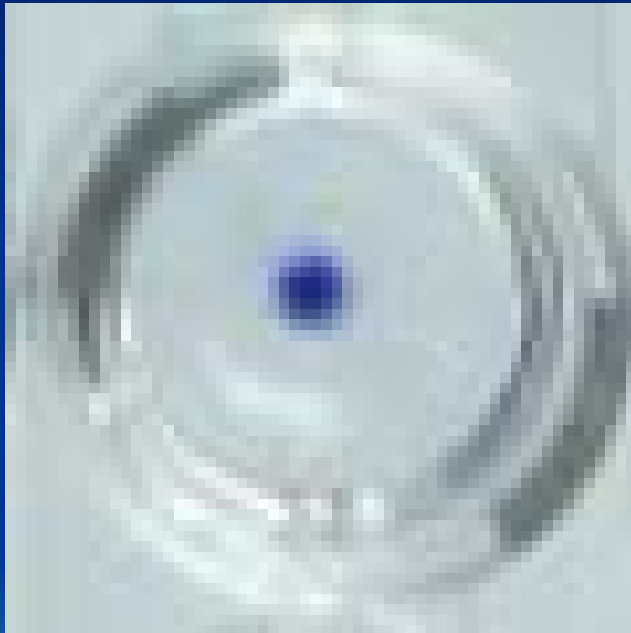




Positif Immunecapture



Negatif immuncapture



- Brucellacapt, kuyucuklarda gerekleŖen bir Coombs'lu brusella aglütinasyon testidir.
- Tüp aglütinasyon testi ile benzer alıŖmaya sahiptir.
- Gece boyu inkübasyonu vardır.
- Sonular gözle deęerlendirilir.

- İncelenen serumda brusella antikorları yoksa antijenler duvara bağlanmadan dibe çöker ve mavi nokta şeklinde görülür.
- Serumda brusella antikorları varsa antijenler duvardaki antikolar tarafından tutulur ve homojen bir mavilik gözlenir.

- Tarama testi olarak her hasta için 2 kuyu kullanılması önerilmektedir. Bir kutu, 96 hasta için tarama amacıyla kullanılabilir. İlk kuyu için 1/160 , ikinci kuyu için 1/320 dilüsyon kullanılır .
- Her iki kuyuda da negatif çıkan serum örnekleri negatif olarak kabul edilir.
- Her iki kuyuda da pozitif çıkan serum örnekleri için daha yüksek dilüsyonlar yapılabilir. 1/160 pozitif, 1/320 negatif olarak çıkan serum örnekleri şüpheli olarak kabul edilir ve 4-7 gün sonra hastadan yeni serum örneği alınarak test tekrar edilir.

- Tüp aglütinasyon testi ve Coombs testi için pozitiflik sınırı 1/160 ve üstü , Brucellacapt için 1/320 ve üstü olarak alınmıştır.
- Baçlangıç serumlarında, her üç çalışmada benzer sonuçlar alınmasına rağmen ,uzun dönem tekrarlamalarda tüp aglütinasyon testinin performansında düşme görülmektedir .

- Coombs testi ve Brucellacapt uyumlu sonuç vermektedir.
- Coombs testi ile sadece IgG antikoları ,Brucellacapt ile total antikolar tespit edildiği için Brucellacapt titrasyonları Coombs testine göre yüksek çıkmaktadır.

Brucellacapt Test Prosedürü

Tarama yöntemi

- 1- Tarama amacıyla 1/160 ve 1/320 dilüsyonlar önerilir.
- 2- Eğer pozitif ise 1/320 den başlayarak titrasyon sürdürülür.
- 3- Bütün reaktifleri kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin (18-25°C).

- 4- Kullanacağınız sayıda stripi folyodan çıkarın. Her hasta için iki kuyu kullanılacak şekilde striplerinizi ayarlayın.
- 5- Hasta serumunu bir tüpte, dilüent ile 1/40 oranında sulandırın (200 μ l dilüent,5 μ l serum).
- 6- Stripte ayırdığınız birinci kuyuya ve ikinci kuyuya 50 μ l diluent koyun .Tüpte dilüe ettiğiniz serum örneğinden birinci kuyuya 50 μ l ilave edin , karıştırın ve birinci kuyudan 50 μ l alarak ikinci kuyuya transfer edin.İkinci kuyuda karıştırın 50 μ l karışımı dışarı atın.

- 7- Birinci ve ikinci kuyudaki karışımların üzerine 50 μ l Brucella antijen reaktifinden ekleyin (Brucella antijenini kullanmadan önce iyice karıştırın).
- 8- Birinci kuyudaki son karışım 1/160, ikinci kuyudaki son karışım 1/320 olacaktır.
- 9- Kuyucukların üzerini kutuda bulunan koruyucu bant ile kapatın ve plağı dikkatlice çalkalayın. Kuyucuklarda bulunan sıvının kurumaması ve gerekli reaksiyonun gerçekleşmesi için plağı nemli ortamda 24 saat 37°C'de inkübe edin (Örnek: Kapağı iyi kapanan ve plağı alabilecek bir kabın dibine ıslak pamuk koyup kapağını kapatarak uygun ortam sağlanabilir

Titrasyon Yöntemi

- 1- Çalışılacak sayıda stripi folyodan çıkarın.
- 2- A kuyusuna 100 μ l, diğer kuyulara 50 μ l dilüent koyun.
- 3- A kuyusuna 5 μ l serum pipetleyin ve karıştırın. Bu kuyudan 50 μ l karışımı alın ve B kuyusuna pipetleyin karıştırın .B'den 50 μ l alın C'ye pipetleyin...En son kuyudan 50 μ l dışarı atın.Bu şekilde istenen titrede dilüsyon gerçekleşir.

- 4- Bütün kuyulara 50 μ l Brucella antijeni ilave edin.
- 5- Kuyucukların kuyusu 1/40, B kuyusu 1/80,C kuyusu 1/160...H kuyusu 1/5120 olacaktır.üzerini kutuda bulunan koruyucu bant ile kapatın ve plağı dikkatlice çalkalayın. Kuyucuklarda bulunan sıvının kurumaması ve gerekli reaksiyonun gerçekleşmesi için plağı nemli ortamda 24 saat 37°C'de inkübe edin.Son titrasyon A kuyusu 1/40, B kuyusu 1/80,C kuyusu 1/160...H kuyusu 1/5120 olacaktır.

- Klinisyen için, Akut Bruselloz tanısı biraz sıkıntı yaratır .

Fakat **Kronik Bruselloz** ayrı bir sorundur.

- Bruselloz vakaları toplumda umulandan daha fazladır ve kronikleşme oranı yüksektir.
- Brusellozlu hastaların yaklaşık % 30'unda ciddi organ tutulumları ve komplikasyonlar gelişmektedir.

PCR

- Tam kan, serum ve dokuda çalışılır.
- Kandan:
- DNA izolasyonu
- Amplifikasyon
- Purifikasyon ve sekanslama
- Dot-blot anali

31 kDA membran protein tüm brusella türlerinde ortaktır. PCR bunu ortaya koyar

Ortuno MI J Clin Mic 1994; 35(11): 2927