

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

**ROSE-BENGAL TESTİ (+), SERUM TÜP
AGLÜTİNASYON TESTİ (-) VE COOMBS TESTİ (-) OLAN
VE KLİNİK OLARAK BRUSELLOZ ŞÜPHELİ
HASTALARIN SERUMUNDA BRUCELLA DNA'NIN REAL
TIME PCR YÖNTEMİYLE ARANMASI**

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Kadri GÜL

Dr. Hakan TEMİZ

Diyarbakır, 2006

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
MATERYAL VE METOD.....	22
BULGULAR.....	29
TARTIŞMA.....	32
ÖZET.....	40
SUMMARY.....	42
KAYNAKLAR	43

GİRİŞ

Dünyada önemli halk sağlığı problemlerinden biri sayılan brusellozun etkeni olan *Brucella* cinsi bakteriler fakültatif hücre içi bakterileridir. Bruselloz; hayvanlarla yakın teması olan insanlarda (veteriner, çiftçi ve kasap gibi) veya süt ve süt ürünlerini taze tüketenlerde daha sık görülmektedir. Neden olduğu hastalığın ciddiyeti ve insanlar için uygun aşının yokluğundan dolayı biyoterörizm ajanı olarak kullanılabilir.

Brusellozda genel infeksiyon belirtilerinin yanında özgül klinik belirtilerinin olmamasından dolayı laboratuvar tanı yöntemleri ön plana çıkmıştır. Mikroorganizmanın izolasyonundaki güçlüklerden dolayı serolojik yöntemlerden daha fazla yararlanılmaktadır. Son 20 yılda bakterilerin moleküler yöntemlerle saptanması mikrobiyolojide büyük bir devrim yaratmıştır. Brusellozun tanısında kültür ve serolojik yöntemlerden daha hızlı ve duyarlı olan bu yöntemler hastalığın tanısında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada; Dicle üniversitesi Tıp Fakültesi klinik ve polikliniklerinden bruselloz ön tanısı ile Merkez Laboratuvarına gönderilen hasta serum örneklerinden, Rose Bengal testi pozitif, Standart Tüp Aglütinasyon testi ve Coombs testi negatif olanlarda, *Brucella* DNA'nın real time PCR yöntemiyle aranması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

TARİHÇE

Milattan sonra 79 yılında volkanik patlama sonucu harap olan eski bir Roma şehrinin kalıntıları arasında bulunan erişkin iskeletlerinde; brusellozun tipik kemik lezyonları bulunmuş olup; gömülü karbonize peynirlerin elektron mikroskopuyla yapılan analizinde *Brucella* spp.'ye morfolojik olarak benzeyen kok benzeri formların varlığı tespit edilmiştir (1).

Bruselloza benzer klinik durumlar; Milattan Önce 450 yıllarında Hipokrat tarafından tarif edilmiştir ve humma olarak tanımlanmıştır. Ancak Brusellozun ilk uygun tarifi 1860 yılında cerrah olan Marston tarafından yapılmıştır (2,3).

İngiliz ordusunda doktor olarak çalışan Sir David Bruce etkeni ilk kez 1887 yılında, Malta'da hastalıktan ölen İngiliz askerin dalak dokusundan izole etmiş ve *Micrococcus melitensis* olarak adlandırmıştır (2). Danimarkalı veteriner Bang, 1895 yılında sığırlardan düşük etkeni olarak *Bacillus abortus*'u izole etmeyi başarmıştır (3). Maltalı doktor olan Zammit, 1905 yılında hastalığın rezervuarının keçiler olduğunu ve hastalığın insanlara bulaşmasında taze keçi sütünün rol aldığını belirtmiştir (3). 1918 yılında Amerikalı bakteriyolog Alice Evans Malta Ateşi ve Bang hastalığının etkenlerinin birbiriyle yüksek derecede benzer olduğunu göstermiştir. Kısa bir süre sonra bu iki türün morfolojik, kültür ve

biyokimyasal özellikleri kıyaslanarak yapılan incelemelerinde bunların aynı cins içinde oldukları belirtilmiş ve Sir David Bruce'un anısına *Brucella* cinsi olarak adlandırılmıştır (4).

1914'de Traum domuz düşük materyalinde *B.suis*'i, 1966'da Carmichael köpeklerden *B.canis*'i izole etmişlerdir (3). *B.ovis* 1953'de koyunlardan, *B.neotomae* 1957'de ratlardan izole edilmiştir ve günümüze kadar bu iki türün insanlarda hastalık yaptığı gösterilememiştir (2). 1994'te *Brucella maris* olarak adlandırılan tür deniz memelilerinden izole edilmiştir (3).

Türkiye'de *B.melitensis* ilk defa 1915 yılında Kuleli hastanesinde bir erde tespit edilmiştir (5). Hastalık ilk olarak Malta adasında saptandığından "Malta Humması" veya "Akdeniz Humması" olarak isimlendirilmiştir. Hastalığa, klinik gidişindeki tipik ateş trasesi nedeni ile "dalgalı humma" denmiştir. Ülkemizde bu hastalık; *B.melitensis*'in koyunlardan insanlara bulaşması nedeniyle "koyun hastalığı", hastalığın hayvanlardan insanlara bulaşması nedeniyle de "mal hastalığı" gibi isimlerle de anılmaktadır (2).

SINIFLANDIRMA

Brucella cinsinde bilinen altı tür vardır. *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis* ve *B.neotomae*. *B.ovis* ve *B.neotomae* dışındakiler insanlar için patojendir. Deniz memelilerinden izole edilen *B.maris* henüz sınıflandırmada yerini almamıştır (6).

Her bir *Brucella* türünün de biyokimyasal ve fizyolojik özellikleriyle birbirlerinden ayrılabilen çeşitli biyotipleri vardır. *B.melitensis*'in 3 biyotipi, *B.abortus*'un 7 biyotipi, *B.suis*'in 5 biyotipi ve diğer türlerin ise birer biyotipleri vardır (6).

Brucella türlerinin biyotip düzeyindeki identifikasyonları için başlıca 4 ana test uygulanmaktadır. Bunlar CO₂ gereksinimi, hidrojen sülfür (H₂S) üretimi, bazik fuksin ve tiyonin boyaları ile inhibisyona duyarlılık ve monospesifik A,M ve R serumları ile aglütinasyondur (7).

Filogenetik olarak *Brucella* cinsi; bakterilerin *Rhizobiaceae* grubuna aittir. Ayrıca *Proteobacteria* sınıfının α -2 alt sınıfında yer almaktadır ve bu sınıf ise *Bartonella*, *Rochalimaea*, *Ochrobacterium* ve *Agrobacterium* ile yakın ilişkilidir (8).

DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları; bilinen 6 *Brucella* türü arasında %90'dan fazla benzerliği ortaya koymaktadır (9).

MORFOLOJİ VE BOYANMA ÖZELLİKLERİ

Brucella cinsi bakteriler; 0.6-1.5 mikrometre (μm) boyunda ve 0.5-0.7 μm eninde kok, kokobasil veya kısa basil şeklindedirler. Çok defa ikişerli uç uca durma alışkanlığında olan bu bakteriler bazen sıvı besiyerinde 3-5'li zincirler yapabilirler. Bakteriyolojik boyalarla oldukça iyi boyanırlar ve Gram negatif özellik gösterirler. Kirpiksiz, sporsuz ve hareketsiz olan bu bakteriler küçük olduklarından moleküler hareket nedeniyle yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Organizmadan yeni ayrıldıklarında S tipi kolonilerde ince bir kapsüllerinin bulunduğu saptanır. Pasajlarda ve R koloni şekillerinde bu kapsüller kaybolur. Basil şeklinde olanlar bazen düzensiz boyanma özelliği gösterirler (10,11).

KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ

Brucella cinsi bakteriler insanlarda hastalığa neden olan diğer bakterilere göre daha uzun bir bölünme zamanına (2.5-3.5 saat) sahiptirler ve klinik örneklerden izolasyon için uzun süre (30 gün veya daha fazla) gerekmektedir (3,12).

Brucella cinsi bakteriler organizmadan yeni ayrıldıklarında; besiyerinde yavaş ürerler ve ilk izolasyondan sonra buyyon ve jeloz gibi basit besiyerinde de üremeye alışırlar (13).

Kökenlerin çoğu üreyebilmek için zengin kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar ve besiyerine kan veya serumun eklenmesi üremeyi olumlu yönde etkiler. Serum dekstroz agar veya diğer saydam besiyerlerinde ekimden 48 saat sonra koloniler oluştururlar (2).

Jelozdaki kolonileri küçük, yuvarlak, konveks, saydam, şebnem tanesine benzeyen kaygan ve S tipindedir ancak B.canis ve B.ovis ilk izolasyonlarında R koloni oluştururlar (6,13).

Pigment yapmazlar. B.melitensis ve bir kısım B.abortus kökenlerinin kolonileri zamanla esmer-kahverengi bir renk alır, hemoliz yapmazlar (4,13).

Zorunlu aerop olup respiratuvar tipte metabolizmaları vardır. Bazı kökenler (B.abortus ve B.suis'in birçok biovarı) üreyebilmek için özellikle primer izolasyonlarında CO₂'ye gereksinme duyarlar. Optimal üreme sıcaklıkları 37 °C (20-40 °C arasında üreyebilirler) ve optimal pH 6.6-7.4 arasındadır (2).

BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Karbonhidratlardan asit veya gaz yapmamakla beraber glikozu az miktarda kullanırlar. Jelatini eritmezler ve indol oluşturmazlar. Katalaz ve çoğu kez oksidaz olumludurlar. Nitratları nitritlere indirgerler. Asetil metil karbinol (Voges Proskauer) oluşturmazlar. Metil kırmızısı testi olumsuzdur. Üreaz aktivitesi değişken olup en yüksek B.suis'te görülmektedir (6,13).

Organik kükürtlü bileşikler parçalama sonucunda Brucella'ların her üç türü de Hidrojen Sülfür (H₂S) oluştururlar. Ancak bunlar arasında B.suis en uzun süre (3-5 gün) ve en fazla miktarda, B.abortus orta süre (2gün) ve az miktarda; B.melitensis ise en az süre (1 gün kadar) ve en az miktarda H₂S yapar (13).

Rusya'nın Tbilisi eyaletinde izole edilip Tbilisi (Tb) adı verilen faj son derece stabil olduğundan referans faj olarak tür tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tb fajı rutin test dilusyonunda (RTD) yani tam bir lizisin görüldüğü minimal faj konsantrasyonunda sadece smooth B.abortus kültürlerini lize eder (7).

Brucella bakterilerinin belirli boyalar ile olan ilişkilerinde de bazı farklar görülür bundan dolayı türlerinin ayırımında bu boyaların eklendiği özel besiyerleri (triptikaz soyagar veya triptoz agar) kullanılmaktadır. İnsan infeksiyonlarından en sık izole edilen üç türün; söz konusu olan bu boyalar varlığındaki üreme özellikleri Tablo 1'de verilmiştir (13).

TÜR	Tiyonin (1/50000)	Bazik fuksin (1/25000)	Metil viyole (1/50000)	Pironin (1/100000)
B.melitensis	Ürer	Ürer	Ürer	Ürer
B.abortus	Üremez	Ürer	Ürer	Ürer
B. suis	Ürer	Üremez	Üremez	Üremez

Tablo 1: Brucella türlerinin boya varlığında üreme özellikleri

EPİDEMİYOLOJİ

İnsanlarda hastalık etkeni olan *Brucella* bakterilerinden *B.melitensis* esas olarak koyun ve keçilerde; *B.abortus* daha çok sığır ve mandalarda; *B.suis* domuzlarda bulunur. Köpeklerde bulunan *B.canis*'in insanlarda hastalık yapması çok nadirdir (2).

B.abortus'un oluşturduğu sığır brusellozu çok yaygın form olma özelliğini korumakta ve *B.melitensis*'in oluşturduğu koyun ve keçi brusellozu ise insanlardaki en ciddi klinik tablo oluşturma özelliğini sürdürmektedir (14).

Bruselloz; hastalığın esas kaynağını oluşturan evcil hayvanlarda süt verimini azaltırken hayvanlarda düşüklere neden olarak ekonomik kayba neden olmaktadır. Ergin ve gebe dişi hayvanlar bruselloza daha duyarlıdır. Etken dişilerde uterusu erkeklerde ise testise yerleşme eğilimindedir. Gebe hayvanlarda kotiledonlara yerleşip enfeksiyona neden olan etken yavrunun beslenmesini engelleyerek anne karnında ölüme veya düşüğe neden olmaktadır (2).

Bazı gelişmiş ülkelerde Bruselloz hayvanlar arasında tamamen eradike edilmiş olmasına rağmen ülkemizde hayvanlar arasında yaygın bir hastalıktır. Özellikle Ankara ovası, Konya yöresi, Güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır ve Şanlıurfa'da yaygındır. Kırsal kesimde daha çok *B. melitensis* enfeksiyonu görülürken büyük şehirlerde daha çok *B. abortus* enfeksiyonuna rastlanır. Türkiye'de insanlardan en sık *B.melitensis* biyotip 3 izole edilmiştir ancak *B.suis* enfeksiyonuna ait yayın yapılmamıştır (2,7).

Bruselloz hayvanlarla yakın teması olan insanlarda (veteriner, çiftçi ve kasap gibi) veya süt ve süt ürünlerini taze tüketenlerde daha sık görülmektedir. Ülkemizde hastalık her yaş ve cinsite görülmekle beraber en sık 15-35 yaş grubunda görülür. Yaz aylarında insanların

kırsal kesime seyahat olanaklarının artması, süt ve süt ürünlerinden taze peynir ve krema tarzı yağların taze olarak elde etme olanaklarının bulunması nedeniyle infeksiyon yaz aylarında daha sık olarak görülür (2).

Hastalığın insanlara bulaşmasında üç önemli yol bilinmektedir;

1) Kontamine et, süt ve süt ürünlerinin sindirim yolu ile alınması, ülkemizde en sık karşılaşılan bulaş yoludur. Genellikle pastörize edilmemiş, çiğ sütten yapılmış peynirlerin yeterince bekletilmeden yenmesi ile bulaş gerçekleşmektedir. Kaşar peyniri ve yoğurt gibi ısıtılarak veya fermentasyon ile hazırlanan besinlerle ise bulaştırılmazlar. Ülkemizde en sık bulaş çiğ sütten yapılan peynir, krema ve yağlarla olmaktadır.

2) İnfekte hayvanın genital salgı, düşük materyali veya idrarının btnliğ bozulmuş deri veya konjunktivaya direkt teması.

3) İnfeksiyöz aerosollerin inhalasyonu ile bulaş olabileceği dşnlmekte ve 10-100 bakterinin alınması bile hastalığa neden olmaktadır (2, 8).

İnsandan insana bulaşma son derece nadirdir ve insan spermelerinden elde edilmiş olsalar bile cinsel yolla geçiş tartışmalıdır (6). Bruselloz laboratuvarından kazanılmış en sık etkenlerden biridir ve bruselloz vakalarının %2 sinin laboratuvar kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Bulaşma genelde örneklerin korunmasız olarak tutulması, besiyerlerinin koklanması, ağızla pipetleme veya infekte aerosollerin göz, burun veya ağıza temasıyla olmaktadır (8,11).

Neden olduğu hastalığın ciddiyeti ve insanlar için uygun aşının yokluğundan dolayı biyoterörizm ajanı olarak kullanılabilmektedir. Bazı brucella suşlarının B kategorisi biyoterörizm ajanı olarak dikkate alınmasından dolayı; hastalığın saptanmasında hızlı ve uygun tanı araçları üzerinde yoğun ilgi vardır (15).

DİRENÇ ÖZELLİKLERİ

Brucella cinsi bakteriler ısı, asit ve dezenfektanlara karşı dirençli değildir. İyonize radyasyon ve sık kullanılan dezenfektanlar bakterileri öldürmede yeterlidir. Pastörizasyon esnasında ölmelerinin epidemiyolojik değeri vardır (2,5,13).

60°C’da 10 dakikada, %0.1 fenolde 15 dakikada tahrip olurlar. Normal mide asidi bakteriyi öldürmede yeterlidir. Hayvanların barındığı ahır tozlarında 6 hafta, suda ise 10 hafta canlılığını sürdürebilir. Düşük yapmış hayvan fetusunda 75 gün, infekte çiğ süttten yapılmış dondurmada 30 gün, çiğ süttten yapılmış tuzsuz krema yağında buzdolabında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirinde 45 gün, %17 tuz içeren peynirde ise 1 ay, toprakta on hafta, keçi sütünden yapılmış peynirde soğukta 6 aya kadar ve çiğ sütte 17 gün canlı kalabilirler (2,5,14).

Bu bakteriler; streptomisin, tetrasiklin, rifampisin, 3.kuşak sefalosporinler ve trimetoprim/sülfametoksazol’e (TMP/SMZ) duyarlı, penisilinlere dirençlidir (2).

ANTİJEN YAPISI

Aglütinin absorpsiyon ve jel difüzyon tekniği ile yapılan incelemelerde Brucella’larda somatik A ve M antijenleriyle (Ag) bir yüzeyel L zarf antijeni bulunduğu gösterilmiştir. Daha çok B.abortus kökenlerinde bulunmuş olan L antijeni; organizmadan yeni ayrılan bakterilerde var olup onların immun serumlarla aglütinasyonuna engel olmakta ancak 100⁰ C’de 30 dakika ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadırlar. Bu özelliği ile Salmonella’lardaki Vi Ag’ye benzemektedir (3,13).

Somatik A ve M Ag brucella bakterilerinde farklı oranlarda bulunmaktadır. B.melitensiste daha çok M Ag ve daha az miktarda A Ag bulunmasına karşın; B abortus ve B.suis te daha az oranda M Ag ve daha fazla A Ag vardır. Bundan dolayı aglütinin absorpsiyon testleri kullanılarak B.melitensisi diğerlerinden serolojik olarak ayırmak olanaklı iken B.abortus ve B.suis'i birbirinden ayırt etmek olanaksızdır (13).

PATOJENİTE

Bakterinin kuluçka süresi ortalama 2-3 haftadır. Bu süre alınan bakteri sayısı ve vücuda giriş yoluna göre değişebilir. Bakterinin oral yoldan alımında mide asidinin yetersizliği bakterinin geçişini kolaylaştırır (6,2).

Etken alındıktan sonra bölgesel lenf bezlerinde ürer ve çoğalan bakteriler hematojen yolla Retikülo Endotelyal Sistem (RES) organlarına yayılır. Yerleştiği başlıca organlar karaciğer (KC), dalak, kemik iliği (Kİ), böbrek, santral sinir sistemi, endokard, testis ve overlerdir. Özellikle KC, dalak, Kİ'nde epitelooid hücreler plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerle çevrili granülomlar brusellozda karakteristik histopatolojik görünüme neden olmaktadır (2,6).

Fakültatif hücre içi bakteri olan Brucella konağın fagositik hücrelerinde canlı olarak kalabilir hatta üreyebilirler. Bakterilerin, fagositik hücrelerinde canlı olarak kalabilmeleri nötrofillerde miyeloperoksidaz sistemini baskılayan, makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunu engelleyen ve oksidatif hasara karşı koruyan bazı maddeler ve enzimler sentez etmelerine bağlıdır (6).

İnsan plasentası eritritol içermemesi nedeniyle insanlarda bruselloza bağlı düşük riski diğer bakteriyel enfeksiyonların seyrinde görülebilecek düşük riskinden fazla değildir (2).

KORUNMA

Bruselloz esas olarak vahşi ve evcil hayvanların hastalığıdır ve insanlar hastalığı bu hayvanlardan veya ürünlerinden almaktadırlar. Bu nedenle hastalıktan korunmada asıl önemli olan, hayvanlardan insanlara bulaşmayı önlemektir. Süt ve süt ürünlerinin pastörize edilmesi, hayvanların aşılınması, brusellozdan korunmada en önemli faktörlerdir. Laboratuvar çalışmaları sırasında olabilecek bulaşmaların önlenmesi için Seviye 3 Biyogüvenlik kurallarına uyulmalıdır.

KLİNİK BULGU VE BELİRTİLER

Brucella infeksiyonlarının kendine özgü, diğer infeksiyonlardan ayırt edici belirtileri yoktur ve olguların yaklaşık yarısı 2-8 haftalık kuluçka dönemini izleyen akut, sistemik bir başlangıçla karşımıza çıkmaktadır (3,5,6).

Bruselloz; klasik olarak titreme ile yükselen ateş, aşırı terleme, baş ağrısı kırıklık, halsizlik, kilo kaybı, bel ve yaygın vücut ağrılarıyla ortaya çıkar. Olgularda en sık rastlanan bulgular ateş, splenomegali, hepatomegali, lenfadenomegali ve artrittir. Klinik olarak subklinik, akut, subakut ve kronik seyir gösterebilir. Bazen çeşitli sistemleri tutan bulgularla ortaya çıkabilir. En sık eklem ağrıları görülür. Tedavi sonrası ortaya çıkan infeksiyonlar rölaps veya reinfeksiyona bağlıdır. Klinik olarak; semptomların süresi ve ciddiyeti göz önüne alınarak akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılabilir (3.6).

BRUSELLOZ’UN KOMPLİKASYONLARI

Brusella infeksiyonları akut sistemik belirtilerin yanı sıra veya bunlar olmadan özgül organ tutulumuyla da ortaya çıkabilir. Lokalize (fokal) bruselloz yada komplikasyon olarak adlandırılır.

Bakterilerin Santral Sinir Sistemini (SSS) direkt olarak invazyonu olguların %5’inden azında görülür ve genellikle akut veya kronik menenjit şeklindedir. Bu olgularda Gram boyama genelde negatiftir ve kültür pozitifliği %25’ten azdır. Bununla beraber tanı Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) spesifik antikorların bulunmasıyla konulur. Bruselloza bağlı eklem efüzyonlarından elde edilen sinovyal sıvıların incelenmesinde mononükleer hücre hakimiyeti görülmekle beraber olguların yaklaşık yarısından brucella izole edilmiştir (3).

TANI

Hastalığın belirti ve bulguları özgün olmadığı için hastadan kapsamlı bir öykünün alınması önem taşımaktadır. Hastalığın erken ve uygun tanısı tedaviye erken başlanmasında önemlidir (8).

ÖRNEK TOPLAMA, SAKLAMA VE TRANSPORTU

İnsan brusellozun tanısında en uygun örnekler; kültür için kan ve Kİ; serolojik testler için ise serumdur. Brucella ayrıca dalak, KC ve apse örneklerinden de izole edilebilir. En uygun sonucu almak için ateşli dönemlerde birden fazla kan kültürü ve mümkünse antibiyotik kullanımından önce alınmalıdır.

Alındıktan sonra 1 saat içinde işlenmeyecek örnekler buzdolabında saklanmalıdır. Akut faz serum örnekleri semptomların başlangıcından hemen sonra; konvelesan faz serum örnekleri ise 14-21 gün sonra alınmalıdır. Serum örneklerinin saklanması durumunda dondurulmalıdır. Eğer dondurma işlemi mümkün değilse serumun her ml'sine %1 lik 10 µl merthiolat eklenir (4).

ÖRNEKLERİN DİREKT İNCELENMESİ

Kan ve KI'nin direkt olarak mikroskopla incelenmesi tanıda yeterli derecede duyarlı değildir. Direkt Floresan Antikor Testi için uygun laboratuvar protokolü yoktur (4).

I. DİREKT ETYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

Hastalık etkeninin kültürden izolasyonu veya nükleer materyallerin moleküler tanı teknikleriyle gösterilmesi temeline dayanan yöntemlerdir.

A. KÜLTÜR YÖNTEMLERİYLE ETKENİN İZOLASYONU

Fakültatif hücre içi paraziti olan etkenlerin kültürden izolasyonu 5-7 gün arası bir zamanı gerektirmektedir. Rutin kültürler bir hafta boyunca takip edilerek süre sonunda üreme saptanamaması durumunda negatif sonuçlar bildirilir. Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan örneklerin kültürünün kontamine flora bakterilerinin üremesini engellemek için seçici besiyerlerine yapılması uygun olmaktadır. Etkenler et ekstresi, triptoz, glikoz ve tuz içeren ortamlarda birçok türünün izole edilebilmesine karşın birçoğu da tiamin, niasin, nikotinik asit, biotin ve serum gibi maddelerin varlığında üreyebilmektedir. Brucella'ların üretiminde %5

koyun kanlı agar, triptoz agar, triptikaz soy agar, serumlu dekstroz agar, gliserol dekstroz agar ve kan kültür şişeleri kullanılan besiyerlerinden bazılarıdır. Tüm temel ortamlar *Brucella* dışındaki organizmaların üremesini engellemek için antibiyotik eklenerek seçici hale getirilebilir. Bu amaçla belirli oranlarda Polimiksin B, basitrasin, sikloheksimid, nalidiksik asit, nistatin, vankomisin içeren antimikrobik komplekslerin kullanılması uygun olmaktadır. Etkenin direkt izolasyonu için genelde katı besiyerleri tercih edilmektedir. Bu besiyerlerinin en önemli avantajlarından birisi gelişen bakteri kolonilerinin morfolojilerinin incelenmesiyle tanıya katkı sağlamasıdır (16).

Etüv içindeki nem; uzamış inkübasyon süresi içinde besiyerinin yüzeyinin kurumasını engelleyecek derecede yeterli olmalıdır (8).

Kan kültürleri sadece sıvı ortamlarda ve bifazik ortamlarda yapılabilir. Castaneda besiyeri olarak bilinen nonselektif bifazik besiyeri; kan ve diğer vücut sıvıları ya da süttten *Brucella* izolasyonunda tercih edilen besiyeridir. Tekrarlayan pasajlarla kontaminasyondan kaçınmak için Castaneda tarafından geliştirilmiş katı ve sıvı besiyerlerinin aynı şişede olduğu kültür ortamlarıdır. Castaneda yönteminde kan örneği ekildikten sonra katı ortam üzerine sıvı besiyerinin geçmesini sağlayacak şekilde şişe eğdirilerek kanın besiyerine yayılması sağlanır. Şişe dik pozisyonda etüvde inkübe edilir ve üç gün boyunca her gün incelenir. Katı kısımda koloni oluşumu halinde alt kültürler yapılır ve identifikasyona gidilir. Eğer koloni oluşmamışsa yine 3 gün boyunca inkübasyonda tutularak incelenir. Bu yöntemle kültür genelde 1 hafta içinde sonuç verir. 15 günden sonra pozitif sonuç almak nadirdir. Ancak olumsuz sonuçlar 35 günlük inkübasyondan sonra rapor edilir (12,16).

Bakterilerin izolasyon süresini kısaltmak amacıyla lizis konsantrasyon yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde hücre içi bakterilerin açığa çıkması sağlanır. Santrifügasyonla yoğunlaştırılan bakteri süspansiyonu agar içeren besiyerine ekilir (12).

İzolasyonda kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla ticari otomatik kan kültür sistemlerinden de yararlanılabilir. Brusellozlu hastaların kan kültürlerinden bakteriyi izole etme oranı % 53.4-90 arasında değişmektedir ve kronik hastalarda duyarlılık oldukça düşüktür (12,17).

Kİ kültürlerinden pozitif sonuç alma süresi kan kültürüne oranla daha kısa olmaktadır. Bakterilerin kültürden izolasyonunu sınırlayan en önemli faktörlerin başında antibiyotik kullanımı gelmekte ve antibiyotik kullananlarda kan kültürlerinden önemli ölçüde hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Antibiyotik kullananlardan Kİ kültürlerinin yapılması durumunda daha olumlu sonuçlar alınmaktadır.

B. MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BRUCELLA DNA'SININ ARANMASI

Brusellozun tanısında 1990 yılından itibaren kullanılmakta olan PCR; duyarlılığının yüksek olması, hızlı olması, herhangi bir vücut dokusunda uygulanabilmesi ve bulaştan 10 gün sonra bile pozitif sonuç vermesi açısından önemli bir gelişme olmuştur. Değişik hedef genler, primer çiftleri, PCR teknikleri ve ekstraksiyon yöntemleri hem hayvan hem de insan Brucella infeksiyonlarının tespitinde de kullanılmaktadır (10,18,19).

Bruselloz tanısında real time PCR kullanımıyla ilgili ilk çalışma Redkar ve ark. tarafından yapılmıştır (20).

rt PCR testinin çalışması için; hedef DNA, iki primer, dört nükleotid trifosfat (dNTP), polimeraz enzimi, tampon çözelti içinde magnezyum iyonları gereklidir. Reaksiyon ısı döngüleriyle yapılmakta; çift zincirli hedef DNA'nın ayrılması (Denaturasyon) için ısı yükseltilir ve sonra primerlerin tek zincirli DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlamak (annealing) için ısı düşürülür. Daha sonra polimeraz enzimi yardımıyla tek zincir DNA kalıplarına bağlanan primerler 5' - 3' yönünde uzatılır (Extension) (19,21).

rt PCR’da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünlerin varlığının saptanması; çift zincirli DNA arasına giren bir floresan boya veya floresan ile işaretli probler aracılığıyla yapılabilmekte bu amaç için Syber Green (SYBR Gren) veya floresan probler (TaqMan probu, Moleküler boncuk yöntemi, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) hibridizasyon probu) kullanılmaktadır (22,23,24). PCR ile bruselloz tanısında Taqman probu; jel elektroforeze göre daha özgül bulunmuştur (25).

Ayrıca Brucella spp tanısında multiplex rt PCR ve PCR-ELISA ile ilgili çalışmalarda yapılmıştır (26,27).

II. İNDİREKT TANI YÖNTEMLERİ

Tanıda kullanılan serolojik testlerin birçoğu diğer bakterilerle çapraz reaksiyon veren antilipopolisakkarit antikorların tespitine dayanmaktadır (20).

A. TÜP AGLÜTİNASYON TESTLERİ

a.) Standart Tüp Aglütinasyon Testi (STA)

İlk kez Wright tarafından 1897 yılında uygulanan bu test çok ekonomik olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testte; Brucella bakterileri hızla antijen yapılarını değiştirdikleri için standart aglütinasyon veren S kökenlerinin ısı ile öldürülmüş fenollü süspansiyonları kullanılır (16,28). Test titresinin 1/160 ve üstü olması aktif infeksiyon için önemli bir kanıt olarak düşünülmektedir (29).

Bu testte yalancı negatiflik sonuçları; prozon fenomeni, hastalığın erken döneminde olması ve blokan antikor varlığında gözlenebilir. Prozon’da; aglütinasyon, serumun düşük

dilüsyonunda ve özellikle serumun yüksek titrede antikor içerdiği durumlarda maskelenebilir. Sıklıkla 1/20 dilüsyonda görülür; 1/80 ve üstü dilüsyonlarda nadirdir (10,28).

Yalancı pozitif sonuçlar ise Francisella tularensis, Escherichia coli O116 ve O157, Salmonella urbana, Yersinia enterocolitica O:9, Vibrio cholerae, Xanthomonas maltophilia ve Afipia chevelandensis'e karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyona bağlıdır (10).

Yalancı pozitif ve negatif sonuçlar sulandırımının 1/320 den daha fazla yapılmasıyla önlenir (3).

Bu testin en büyük dezavantajı hastalıktan sonra titrenin uzun süre yüksek kalmasından dolayı hasta takibinde kullanılamamasıdır. Diğer bir dezavantajı ise bu testin B.canis enfeksiyonu tanısında kullanılmamasıdır (10).

b.) 2-Merkaptoetanol ve Rivanol (Diamino 6,9 Etoxy acridin) Testi

Bu testler; immunglobulin (Ig) M pentamerinin disülfid bağlarının indirgenmesini temel alır ve serumun bu maddeler ile muamelesi sonucu Ig M aglütinasyon yeteneğini kaybederken Ig G etkilenmeden kalır. STA aglütinasyon yapan antikorların (Ig G ve Ig M) total miktarını belirlerken bu testler Ig G miktarını tespit için kullanılır (16). Bu maddelerle işlem görmüş serumlarla yapılan aglütinasyon deneylerinin yine olumlu bulunması Ig G antikorlarına bağlı olup hastalığın kronikleştiği anlamını taşır (30). STA ile bu testin birlikte kullanımı akut olguların ayırt edilmesinde ve takibinde önemlidir (31).

c.) COOMBS testi (CT):

Çok nadiren blokan antikorların varlığında negatif sonuç alınır ve bu durum Coombs testiyle saptanır (3). STA’da aglutinasyon vermeyen, Ig G sınıfından olan blokan antikorları tespit etmek için kullanılır (5,16).

B. KOMPLEMAN BİRLEŞTİRME TESTİ

Hastalığın ileri evrelerinde veya kronik hastalarda predominant olan IgG antikorlarının tanısında; 1/64 ve üzerindeki titreler önemlidir (29).

Antikomplementer aktivitenin ortaya çıkması, kompleman gibi kararsız reaktiflerin kullanılması, hastalığın başlangıç dönemlerinde kompleman fiksasyonuna yanıtın tespit edilmesindeki yetersizlik ve teknik gereksinimler gibi dezavantajlara sahiptir (16,32).

C. HIZLI AGLÜTİNASYON TESTLERİ

Hızlı aglutinasyon testleri; Lam aglutinasyon testi ve Kart test yöntemidir. Bu testlerde alınan pozitif sonuçların STA ile doğrulanması gerekmektedir. Bu makroskopik aglutinasyon testlerinde boyalı bakteri süspansiyonları kullanılmaktadır. Boyalı brucella antijenleri kullanılarak tüpte aglutinasyon da (mikroaglutinasyon) araştırılabilir. Bu uygulamayla STA’a göre daha az antijen, daha az tüp dilusyonu ve daha kısa inkübasyon süresi avantajı sağlanır (16).

Diğer bir hızlı test olan Rose Bengal testi (RB); STA ile oldukça uyumlu sonuçların alındığı tamponlanmış reaktifler ile düşük pH’ta (pH:3.65) aglutinasyon temeline dayanan

tarama testidir. Ticari olarak kullanılan kitlerde B. abortus antijeni kullanılmaktadır ve bu testin duyarlılığı %96 ile %100 arasında değişmektedir (3,16,29).

Spot test özel yöntemlerle boyanmış antijenler ile tam kanda tanıda kullanılır (28).

D. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TESTİ:

Son zamanlarda özgül lipopolisakkarit antijenlerin kullanılması esasına dayanan ELISA yöntemlerinde; antijen olarak Brucella'ların tüm hücreleri, lipopolisakkaritleri, tuzla ekstrakte edilen proteinleri, nativ hapten polisakkariti ve dış membran proteinleri kullanılabilir (16,33).

Hastalığın başlangıcında özgül Ig M, üçüncü haftadan sonra ise özgül Ig G antikorları serumda saptanabilir. ELISA yöntemi akut ve kronik bruselloz tanısında Ig sınıflarının profilini veren, hızlı, duyarlı, özgül ve güvenilir bir yöntemdir ve geniş kitlelerin taranmasında uygundur (16,34).

Hastalığın seyri sırasında Ig G, Ig M, Ig A antikor titrelerindeki değişiklikler ELISA yöntemiyle klasik serolojik testlerden daha iyi tespit edilir ve bu test kronik bruselloz tanısında iyi bir seçenektir (33,35).

E. DERİ TESTLERİ

Geç tip aşırı duyarlılık testleri bruselloz tanısında yardımcı olmakta, özellikle geviş getiren hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlarda da kullanılan bu testlerde; antijen olarak öldürülmüş Brucella bakterileri, saflaştırılmış bakterilerin 21 günlük kültür süzüntüleri ve ticari olarak hazırlanmış saflaştırılmış rekombinant bakteri proteinleri kullanılmaktadır. Testte kullanılan antijenlerin lipopolisakkarit içermemesi gerekmektedir.

Aksi halde diğer Gram negatif bakteri infeksiyonlarda çapraz reaksiyonlar alınması nedeniyle testin tanısal değeri olmaz. Brusellin allerjik deri testleri; tarama testi veya tamamlayıcı test olarak yardımcı olmaktadır. Brusellozun allerjik tanısında en sık kullanılan test “Brucellergen” deri testidir. Brucellergen bir nükleoprotein kompleksi olup deri içine şırınga edildikten sonra 24 saat içinde injeksiyon yerinde kızarıklık, ödem ve sertlik meydana gelmesi durumunda kişinin Brucella bakterilerine karşı aşırı duyarlı olduğuna karar verilir (16).

F. RIA

Testte kullanılan anti-human antikorlar ¹²⁵Iodine ile işaretlenir ve Brucella’ya karşı oluşan antikorlar saptanır. Bu testin duyarlılığının yüksek olmasına rağmen kompleks olması ve radyoaktif madde kullanılması nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır (18,29).

G. DİPSTİCK TEST

İnsan serum örneklerinde Brucella spesifik Ig M antikorlarının tespiti için basit dipstick testi geliştirilmiştir. Dipstick ısıya dirençli antijeni; B.abortus 1119-2 nin sıvı kültürünün yıkanmış hücrelerinin 95⁰ C’de ısıtılmasını takiben hücre kalıntılarının santrifügasyon ile kaldırılmasıyla hazırlanır. Hazırlanan bu preparat nitroselüloz banda belli bir çizgi olarak uygulanmıştır. Bir internal kontrol için antihuman Ig M antikoruna ayrı bir çizgi olarak nitroselülozu kaplayarak uygulanmıştır. Testin sensitivitesi hastalığın ilk 2 ayında %89.0 ve hastalığın 2-4 aylarında %83.1 olarak bulunmuştur. Testin hesaplanan spesifitesi ise %98.6 olarak bulunmuştur. Testin uygulanmasının kolay oluşu, özel araç ve çok fazla

deneyimli personel gerektirmemesinden dolayı saha kullanımı için uygun olduğu belirlenmiştir (36).

H. BRUCELLACAPT TESTİ:

Total anti-brucella antikorlarının immunocapture-aglütinasyonu tekniğı temelinde bruselloz tanısı için yeni bir testtir. Tanısal etkinliğı Coombs testine eşittir (37).

MATERYAL VE METOD

Serum örnekleri; Dicle üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarına değişik klinik ve polikliniklerden bruselloz ön tanısı ile gönderilen kan örneklerinden alındı. Çalışmaya alınan toplam serum örneklerinin 28 tanesi (%31) yatan hastalardan ve 62 tanesi (%69) ise poliklinik hastalarından alınmıştır. Venöz yoldan alınan kanlar 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de (devir/dakika) 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Kullanılacak serumun hemolizli ve lipemik olmamasına dikkat edildi. Serum örnekleri temiz serolojik tüplere alınıp Rose Bengal testi, Standart Brusella Tüp Aglütinasyon Testi ve Coombs Testi çalışıldı. Ayrılan bir kısım serum ise eppendorf tüplerine konularak real time PCR (rt PCR) çalışması için -20⁰C'ta saklandı.

Rose Bengal Testi (RBT)

Rose Bengal Lam Testi Antijeni: B.abortus S99 suşundan hazırlanmış, standart Brusella antiserumu ile standardize edilmiş ve Rose-Bengal ile boyanmış olan antijen; Seromed Biyolojik Ürünler San. Tic. Ltd. Şti.'nden (İstanbul) temin edildi.

Ön hazırlık;

1. Antijen; kullanıma başlamadan önce 15 dakika oda ısısında tutuldu ve iyice çalkalandı.
2. Temiz plastik plaklar ve kürdan temin edildi.

Testin uygulanışı;

1. Temiz plak üzerine 0.05 ml hasta serumu damlatıldı.
2. Bunun üzerine 0.05ml Rose Bengal Lam Testi Antijeni eklendi.

3. Antijen ve serum kürdan ile karıştırılarak 1.5 cm çaplı alana yayıldı.
4. Plak; elde çevirmeli hareketler yapılarak 4 dakika çevrildi.
5. Sonuçta iri tanecikli kümeleşme oluşumu pozitif, homojen görünüm ise negatif aglütinasyon olarak değerlendirildi.

Standart Brusella Tüp Aglütinasyon Testi (STA)

Standart Brusella Tüp Aglütinasyon Antijeni: B.abortus S99 suşu ile hazırlanmış; standart Brusella antiserumu ile standardize edilmiş; B.abortus, B.melitensis ve B.suis teşhisinde kullanılan antijen; Seromed Biyolojik Ürünler San. Tic. Ltd. Şti.'nden (İstanbul) temin edildi.

Ön hazırlık;

1. Standart Brusella Antijeni kullanılmaya başlamadan 15 dakika önce oda ısısına getirildi ve iyice çalkalandı.
2. Serum sulandırımı için 6 adet temiz tüp ve 1 adet kontrol tüpü (140X100mm) hazırlandı.
3. 1ml ve 5ml'lik steril cam pipetler hazırlandı.
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 0.9ml, diğerlerine 0.5ml fizyolojik tuzlu su konuldu.
- 3.) İlk tüpe 0.1 ml hasta serumu eklendi ve karıştırıldı. Birinci tüpten 0.5ml ikinci tüpe ve 2. tüpten 0.5 ml 3. tüpe aktarıldı. 6. tüpe kadar işleme devam edildi ve 6.tüpten 0.5 ml dışarı atıldı. Kontrol tüpüne serum bırakılmadı.
- 4.) Tüplerde serum dilusyonları 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 oldu.

- 5.) Tüm tüplere 7.kontrol tüpü de dahil olmak üzere 0.5ml Standart Brusella Tüp Aglütinasyon Antijeni eklendi. Böylece son serum sulandırılmaları 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 oldu.
- 6.) Tüpler karıştırıldı ve 37⁰C’de 24 saat inkübe edildi.
- 7.) İnkübasyonu takiben tüpteki sıvının berraklaşması, aglütinasyonun tüpün dibinde yaygın bir şekilde görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.
- 8.) En son aglütinasyon görülen tüpün titresi pozitif değer olarak kabul edildi. Pozitif olan en son tüp ise üst dilusyonlar çalışıldı.

COOMBS TESTİ (CT)

Coombs (anti-human globulin) Serumu; Tulip Diagnostics (P) Ltd. (India) tarafından hazırlanmış ve yerli aracı firmalar tarafından temin edilmiştir.

Ön hazırlık;

1. STA testi sonucunda teste tabi tutulacak tüpler ayrıldı.
2. Coombs serumu kullanımdan 15 dakika önce oda ısısına alındı.
3. Coombs serumu 1/10 oranında sulandırıldı.

Testin uygulanışı;

1. Ayrılan tüp dizisinde aglütinasyon pozitif görülen tüpler not edilerek işlemden çıkarıldı.
2. Diğer tüpler 2000rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Üst sıvı kısmı atılıp yeniden fizyolojik tuzlu su eklenip santrifüj edilerek üst sıvı kısmı atıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
3. Her tüpe 0.45ml fizyolojik tuzlu su eklenerek süspanse edildi.
4. Her tüpe 0.05ml, 1/10 oranında sulandırılmış Coombs serumu eklendi.
5. Tüpler karıştırıldı ve 37⁰C’de 24 saat inkübe edildi.

6. En son aglütinasyon görülen tüpün titresi pozitif değer olarak kabul edildi.

REAL TIME PCR (rt PCR)

Ön hazırlık olarak; -20° C’de saklanan ve RBPT pozitif, STA ve Coombs Testi negatif olan 90 adet serumun; çalışma günü çıkartılıp oda sıcaklığında erimesi sağlandı.

Serum örneklerinden DNA izolasyonu;

Serum örneklerinden DNA’nın izolasyonu; NucleoSpin Blood Kiti (Macherey-Nagel, Almanya) ile yapıldı. Bu metot; değişik örneklerden yüksek saflıkta genomik DNA’nın hızlı şekilde izolasyonunu sağlamaktadır. Bu işlemin amacı alınan örnekleri lize ederek genomik DNA’nın filtrelelere yapışmasını sağlamaktır.

NucleoSpin Blood Kiti İçeriği;

- Buffer B1
- Reagent B2
- Buffer B5
- Buffer BW
- Buffer BE
- Proteinase K(Lyophilized)
- Proteinase Buffer
- NucleoSpin Blood Kolonları
- Toplama tüpleri

Bu işlem için üretici firmanın talimatları doğrultusunda;

- 1-Daha önceden -20⁰C'ta saklanan serum örnekleri oda ısısına getirildi.
- 2-Kullanılacak tüm kitler oda ısısına getirildi.
- 3-Lyophilized Proteinase K ile belirtilen miktarda Proteinase Buffer karıştırıldı.
- 4-Buffer B5'e belirtilen miktarda %96'lık etanol eklenerek karıştırıldı ve ağzı kapalı olarak tutuldu.
- 5-Buffer B1; Reagent B2'ye tamamen eklendi ve iyice karıştırılarak lizis buffer B3 oluşturuldu.
- 6-Kan örneklerinin lizisi için: 25 µl Proteinase K, 200µl serum örneği ve 200µl lysis buffer B3 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konulduktan sonra etkin şekilde 20 saniye vortekslendi. Daha sonra bu tüpler 70⁰C'ta 15 dakika bekletildi.
- 7-DNA'nın bağlanmasını ayarlamak için 210 µl %96'lık etanol eklendi ve tekrar vortekslendi.
- 8-DNA'nın bağlanması için; tüplerin tüm içeriği NucleoSpin Blood Kolonlu tüplere aktarıldı ve 11000 Xg 'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 9-Yıkama işlemi için; kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildikten sonra üzerlerine 500 µl Buffer BW eklenerek 11000 Xg 'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar tekrardan yeni toplama tüplerine yerleştirildikten sonra üzerlerine 600 µl Buffer B5 eklenerek 11000 Xg 'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 10-Membranın kuruması ve artık etanolün uzaklaştırılması için; kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildikten sonra 11000 Xg 'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 11-Yüksek saflıkta DNA'nın eldesi için; kolonlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak üzerlerine 70⁰C'de ısıtılmış 100 µl Buffer BE eklendi. Oda ısısında 1 dakika beklendikten sonra 11000 Xg 'de 1 dakika santrifüj edildi.

PCR reaksiyon miksinin hazırlanması;

PCR reaksiyon miksi hazırlamak için; TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, California, ABD) kullanıldı. Bu kit Taqman reaksiyonları için hazırlanmış olup; AmpliTaq Gold DNA Polimeraz, dNTP, pasif referans boya ve uygun tampon bileşikleri içermektedir. 2-8 °C'ta saklanan master miksin kullanılmadan önce çözülmesi ve iyice karışması sağlandı.

Spesifik primer ve problar;

Amplifikasyon için bakterinin 16S rRNA bölgesini kodlayan gene spesifik primerler; Forward Primer (5'-TCCAGCCATGCCGCGTGAGTGA-3') ve Reverse Primer (5'GCAGCCGCGGTAATACGAAGGG-3') kullanıldı. Prob olarak ise 5'- (6FAM) GTGAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTT-TAMRA) (PH)- 3' kullanıldı. Pozitif kontrol olarak High Copy plasmid DNA ve negatif kontrol içinse steril su kullanıldı.

Tablo 2'de belirtildiği şekilde; her bir reaksiyon tüpünde toplam hacim 50 µL olacak kadar, rt PCR için reaksiyon miksi hazırlandı.

PCR Reaksiyon Miks İçeriği	Hacim
TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)	25 µL
Forward primer	5 µL
Reverse primer	5 µL
TaqMan Prob (2.5 µM)	5 µL
Serum örneği	5 µL
Distile Su	5 µL
Toplam	50 µL

Tablo 2: rt PCR için hazırlanan reaksiyon miski içeriği

rt PCR işlemi; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, California, ABD) cihazında üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı. 95⁰ C'de 10 dakika (Hold); 95⁰ C'de 15 saniye (denaturasyon) ve 60⁰C'de 1 dakika (bağlanma ve uzama) tutularak 40 döngü işlemi gerçekleştirildi.

Birbirine bağlı cihaz ve bilgisayardan oluşan bu sistemde; test edilen kuyucuklara lazer kaynağından gönderilen lazer ışınlar kuyucuklarda bulunan floresanların uyarılmasını sağlamakta ve fiber optik kablolar kuyucuklardan yayılan floresanı toplayarak lens, filtre ve aynalardan oluşan sistem yardımıyla spectograph'a iletmektedir. Spectograph ise; gelen ışığı dalga boyuna göre ayırarak CCD (charge-coupled device) kameraya aktarır. Cihaz ise kameradan aldığı floresan sinyallerine veri analiz algoritmalarını uygulayarak sonuç vermektedir.

BULGULAR

Dicle üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarına değişik klinik ve polikliniklerden bruselloz ön tanısı ile gönderilen serum örneklerinden RBT pozitif, STA titresi 1/160'tan düşük ve CT'İ negatif olan 90 tane serum örneğın Brucella DNA varlığı yönünden rt PCR yöntemiyle incelendi.

Çalışmaya alınan RBT pozitif olan toplam 90 serum örneğının 21 tanesi (%23.3) 1/20 titrede, 41 tanesi (%45.5) 1/40 titrede ve 28 tanesi de (%31.1) 1/80 titrede pozitif bulunmuştur. Serumların STA titrelerine göre yüzdeleri Tablo 3'te verilmiştir.

STA titresi	Sayı	%
1/20	21	23.3
1/40	41	45.5
1/80	28	31.1
Toplam	90	100

Tablo 3: Serumların STA titrelerine göre yüzdeleri

STA ile titresi 1/160'tan düşük bulunan serum örneklerinde blokan antikorları belirlemek için CT ile incelendi. STA ile 1/20 titrede seropozitif bulunan 21 serum örneği CT ile incelendiğinde; 13 örnekte titre artışı saptanmazken, 8 örnekte bir kat artış saptandı. STA ile 1/40 titrede seropozitif bulunan 41 serum örneği CT ile incelendiğinde; 32 örnekte titre artışı saptanmazken, 9 örnekte bir kat artış saptandı. STA ile 1/80 titrede seropozitif bulunan 28 serum örneği CT ile incelendiğinde; 27 örnekte titre artışı saptanmazken, 1 örnekte bir kat artış saptandı. Sonuçlar Tablo 4'te özetlendi.

STA titresi	CT ile aynı titre	CT ile bir kat artış
1/20	13	8
1/40	32	9
1/80	27	1

Tablo 4: Serum örneklerinin CT ile Analizi

rt PCR ile 90 serum örneğinde yapılan çalışmada 3 hastada (%3.3) Brucella DNA pozitif bulundu. Bu hastaların STA ve CT sonuçları Tablo 5’te gösterilmiştir.

Serum No	Gönderen klinik	STA	CT	Rt PCR
1	Poliklinik	1/20	Negatif	Pozitif
2	Endokrinoloji	1/20	1/40	Pozitif
3	Poliklinik	1/40	Negatif	Pozitif

Tablo 5: Real time PCR ile Brucella DNA pozitif bulunan serumlar

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre; tüm dünyada yıllık yarım milyon yeni bruselloz olgusu saptanmakta olup bu sayının yanlış tanı konması ve bildirimlerin tam olmaması nedeniyle daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (35). Güney Amerika, Ortadoğu ülkeleri, İspanya, Yunanistan ve Türkiye gibi Avrupa ülkeleri hiperendemik alanlar olup yılda ortalama 4000 yeni vaka görülmektedir (3,5). 1990 yılında ülkemiz genelinde yapılan, STA titresinin 1/40'ın üzerinde pozitif sayıldığı sürveyans çalışmasında 70000 serum örneği test edilmiş olup %1.8 oranında seroprevalans saptanmıştır. En yüksek seroprevalans %3.6 oranında Diyarbakır'da belirlenmiştir (38). 2004 yılında yapılan çalışmada ise Diyarbakır'da seropozitiflik %2.2 olarak bulunmuştur (39).

Brucella infeksiyonlarının kendine özgü, diğer infeksiyonlardan ayırt edici belirtileri yoktur ve farklı klinik tablolarla ortaya çıkmaktadır (5,6). Bundan dolayı tanıda; hastadan kapsamlı öykü alınması, bakterinin izolasyonu ve serumda özgül antikorların aranması gerekmektedir fakat bu testlerin zaman alıcı ve duyarlılığının az olması yüzünden son yıllarda tanıda moleküler yöntemlerden faydalanılmaya başlanmıştır. Bilimin birçok alanında kullanılmakta olan moleküler teknikler; sonuçların hızlı alınması, geleneksel yöntemlerle tanı konulamayan mikroorganizmaların saptanabilmesi, maliyet uygunluğu, kullanım kolaylığı ve testin duyarlılığının yüksek olmasından dolayı mikrobiyolojide de yaygın olarak tercih edilmektedir (22,24,40).

DNA'nın ilk olarak 1870 yılında tanımlanmasından çok sonra Kary Mullis ve arkadaşları tarafından 80'li yılların ortalarında geliştirilen ve Kary Mullis'in 1993 yılında

Kimya alanında Nobel Ödülü almasını sağlayan PCR tekniği; değişik mikroorganizmaların DNA'sının tespitinde kullanılmaktadır. Değişik hedef genler, primer çiftleri, PCR teknikleri ve ekstraksiyon yöntemleri hem hayvan hem de insan Brucella infeksiyonlarının tespitinde de kullanılmaktadır (18,19,40,41,42).

Brusellozun tanısı için; ilk olarak Brucella spp. kan vücut sıvıları ve doku örneklerinden izole edilmeli veya ikinci olarak klinikle uyumlu önemli titrelerde spesifik antikor veya serokonversiyon gösterilmelidir. Önemli titreler; STA'nın 1/160 ve üstünde olması ve CT'in 1/320 ve üstünde olmasıdır. 2 hafta arayla alınan serum örneklerinde 4 kat antikor titre artışı da tanıda önemlidir (18,43). Serolojik testler kolay ve hızlı olmasına rağmen; rölaps ve kronik bruselloz hastalarında duyarlılığı az olduğundan ve diğer gram negatif bakterilerle çapraz reaksiyon verdiğinden dolayı yanlış pozitiflik görülebilmektedir. Serolojik testlerde endemik bölgelerde yaşayan sağlıklı kişilerde de pozitiflik görülebilmekte ve ayrıca 1/20 ve 1/160 arasındaki titreleri yorumlamak güç olmaktadır (17,18,44).

Yaptığımız çalışmada; RBPT pozitif olan toplam 90 serum örneğinin 21 tanesi (%23.3) 1/20 titrede, 41 tanesi (%45.5) 1/40 titrede ve 28 tanesi de (%31.1) 1/80 titrede pozitif bulunmuştur.

Diyarbakır gibi endemik olan bölgelerde sık olarak gözlenen, spesifik olmayan infeksiyon varlığında; RBT pozitif sonuç vermekte ve STA titresi de 1/160'ın altında gözlenmektedir. 1/320 ve üzeri CT titreleri aktif infeksiyonu düşündürmektedir (45).

Çalışmamızda; STA ile titresi 1/160'tan düşük bulunan serum örneklerinde, blokan antikorları belirlemek için CT ile incelendi. STA ile 1/20 titrede seropozitif bulunan 21 serum örneği CT ile incelendiğinde; 13 örnekte titre artışı saptanmazken, 8 örnekte bir kat artış saptandı. STA ile 1/40 titrede seropozitif bulunan 41 serum örneği CT ile incelendiğinde; 32 örnekte titre artışı saptanmazken, 9 örnekte bir kat artış saptandı. STA ile 1/80 titrede seropozitif bulunan 28 serum örneği CT ile incelendiğinde; 27 örnekte titre artışı

saptanmazken, 1 örnekte bir kat artış saptandı. Hiçbir örnekte CT’te anlamlı derecede titre artışına (1/320 ve üstü titre) rastlanmadı.

rt PCR ile 90 serum örneğinde Brucella DNA’nın tespiti için yaptığımız çalışmada; 3 hastada (%3.3) Brucella DNA pozitif bulundu.

Bulaştan on gün sonra Brucella spp. tesbit edilebilen PCR’a dayalı testler; geleneksel yöntemlerden daha hızlı ve daha fazla duyarlıdır. Bununla beraber Brucella için PCR’ın özgüllük ve duyarlılığı yapılan çalışmalarda farklı olup; örneğin hazırlanması, hedef genlerin tespiti ve tespit yöntemleri hakkında standardizasyon geliştirilmemiştir (18,29).

Brucella DNA’sı PCR ile; doku örnekleri, idrar, BOS, kan, apse, balgam ve diğer vücut sıvılarında (asit ve plevral sıvı) tespit edilebilmektedir (46). Tanıda sıklıkla tam kan ve serum örnekleri tercih edilmektedir. Zerva ve ark. (47) tarafından, tam kan ve serum örneklerinin test için uygunluğunun karşılaştırıldığı çalışmada; serum örneğinde tanısal duyarlılık %94, tam kanda ise %61 olarak bulunmuştur. Tam kan ve serum örneklerinin özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. Serum örneklerinde PCR için inhibitör madde olan antikoagulan madde, hemoglobin bulunmamasından dolayı; brusellozun PCR ile tanısında tam kan yerine serumun tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada inhibitör maddelerin serumda azlığı ve serumdan DNA eldesinin tam kana göre daha kolay olmasından dolayı serumun tercih edilmesi gerektiği gösterilmiştir (48). Brusellozlu hastaların %20-40’ında santral sinir sisteminin de etkilendiği fokal komplikasyonlar görülmektedir. Colmenero ve ark. (43) yaptığı çalışmada 6 tane nörobrusellozlu hastanın 2 hastanın BOS kültüründe B.melitensis izole edilmiş ve 4 hastanın BOS’unda STA ile antikorlar saptanmıştır. Hastaların tümünde rtPCR pozitif sonuç vermiş olup nörobrusellozun hızlı tanısında rtPCR’ın kullanılabileceği belirtilmiştir. Yapılan ayrı bir çalışmada; nörobrusellozlu hastanın serumunda PCR ile negatif sonuç alınmasına karşın BOS’ta PCR ile pozitif sonuç alınmıştır (49).

Örneklerden DNA'nın ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalarda örneklerden DNA'nın izolasyonu için ticari kitlerin kullanılması bu konuda belirli standartların sağlanacağını göstermektedir (44,47,50,51).

PCR'da; hedef DNA araştırılan mikroorganizmaya özgül olmalı ve türün tüm izolatlarının tespiti için; hedef DNA polimorfik olmamalı ve değişkenlik göstermemelidir. Brusellozun tanısında PCR'a dayalı tanısal test ilk olarak 1990 yılında yapılmıştır ve bu çalışmada *B. abortus* suş 19'un 43-kDa'luk dış membran proteinini kodlayan gen amplifiye edilmiştir (52). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda; 16S rRNA geni, 31-kDa'luk *B. abortus* proteinini (BCSP31) kodlayan gen, *B. abortus* dış membran proteini olan omp-2'yi kodlayan gen araştırılmıştır (41,53,54). Herman ve ark. (53) yaptığı çalışmada; *Brucella* spesifik primerler; 17 farklı bakteri ile denenmiş *Ochrobactrum anthropi* dışında PCR pozitifliği saptanmamıştır. *Brusella* spesifik primerlerle yapılan diğer çalışmalarda da, farklı bakterilerden sadece *O. anthropi* amplifikasyonu saptanmıştır (55,56,57). *Ochrobactrum* spp. *Brusella* cinsi bakterilerle yakın ilişkilidir ve PCR'da görülen bu sonuç şaşırtıcı değildir. *Ochrobactrum* spp. genelde immunsuprese hastalardan olmak üzere birçok klinik örneklerden, su ve topraktan izole edilmiştir (53,58).

PCR'da kullanılan primer çifti PCR'ın özgüllüğü ve duyarlılığını belirlemektedir.

Çalışmamızda; amplifikasyon için bakterinin 16S rRNA bölgesini kodlayan gene özgül primerler kullandı ve bakterinin cins düzeyinde tespiti sağlandı. Çeşitli primerlerin kıyaslandığı çalışmalarda; 16S rRNA genini hedef alan primer çiftinin diğerlerine göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır (50,59,60,61,62). *Brusella*'nın tür düzeyinde tespiti; epidemiyolojik olarak hastalığın kaynağının belirlenmesi için gerekli olmakla beraber; insan brusellozu tanısında ve tedavisinde cins düzeyinde tespit yeterli olduğu belirtilmektedir (18).

Yapılan birçok çalışmada PCR'ın duyarlılığının kültür ve diğer serolojik yöntemlerden daha iyi olduğu gösterilmiştir (17,50,63,64,65).

Matar ve ark. (17) yaptığı çalışmada; aglütinasyon titreleri 1/160'tan büyük olan 20 hastadan (17 hasta akut brusellozlu, 3 hasta kronik relaps eden brusellozlu) alınan tam kan örneklerinin hepsinde Brucella DNA tespit etmişlerdir ve testin sensitivitesinin %100 olduğu bildirilmiştir.

Queipo-Ortuno ve ark. (63) yaptığı çalışmada; 47 hastadan toplam 50 kan örneği alınmış olup 50 örneğin hepsinde PCR pozitif bulunmuştur. Testin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. 60 kişilik kontrol grubunun 59'unda PCR negatif bulunmuştur. Bundan dolayı testin özgüllüğü %98.3 olarak bildirilmiştir. Buna karşın PCR sonuçları pozitif çıkan hastaların; %30'unun kan kültürleri ve %16'sının seroloji sonuçları negatif bulundu. Testin yüksek derecede sensitif olması testin yaklaşık 2 bakteri hücresine denk gelen 10 fg'a kadar bakteri DNA'sını tespit edebilmesine bağlı olduğu belirtilmiştir.

Navarro ve ark. (65) bruselloz tanısı konan hastalarda yaptıkları çalışmada; PCR'ın duyarlılığını %50 ve özgüllüğünü %60 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar yalancı negatifliğin; kanda bulunan polimeraz inhibitörleri varlığı, tespit limitinin altında bakteri sayısı veya örneklerdeki hedef DNA'nın azalmasına bağlı olabileceğini ve sağlıklı kişilerde bulunan yalancı pozitifliğin ise; kan kültürü ve serolojik yöntemlerle tespit edilemeyen asemptomatik enfeksiyona veya başka bakterilerin DNA'sıyla olan çapraz reaksiyona bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Nimri (50) tarafından, 165 seropozitif hastada PCR ile yapılan çalışmada; 120 hastada PCR pozitif bulunmuş olup testin duyarlılığı %72.7 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.

Elfaki ve ark. (42) yaptığı çalışmada; klinik olarak bruselloz tanısı konan, RBT pozitif, STA titresi 1/80 olan ve kan kültüründe etken saptanamayan 4 hastanın 3'ünde PCR pozitifliği bulmuştur. Ayrıca bu çalışmada tedavi sonrası PCR sonuçlarının negatifleştiği belirtilmiştir.

Brusellozlu hastaların büyük bir kısmı tedaviden sonra spesifik olmayan semptomlar bildirirler ve hastalığın tamamen iyileştiğine ait iyi tanımlanmış ölçütler olmadığından hastaların gerçekten tedavi edildiğini anlamak güçtür (66). Brusellozda tedavi sonrası rölaps gelişimine eğilim vardır ve bu durum bakterinin hücre içi yerleşiminden dolayı, immun sistem ve tedaviden korunmasına bağlıdır. Rölapslar genelde ilk infeksiyondan 6 ay sonra ortaya çıkmakta ve hastaların tedaviden sonra 1 yıl boyunca izlenmesini gerektirmektedir. Bundan dolayı PCR'ın hastalığın başlangıcında, fokal komplikasyonlar varlığında ve tedavinin takibinde başarıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (50).

Morata ve ark. (66) brusellozlu hastaların tedavi sonrası ve relaps dönemlerinde PCR'ın yararlılığı hakkında yaptıkları çalışmada; başlangıçta 30 hastanın 29'unda (%96.6) PCR pozitif bulunmuş olup tedavi sonrası PCR pozitif 29 hastanın 28'inde (%96.5) PCR negatifleşmiştir. PCR pozitif olan asemptomatik hastada 1 ay sonra PCR negatifleşmiştir. Tedavi sonrası hastadaki PCR pozitifliği; hasta kanında bulunan ölü bakteri DNA'sına veya mononükleer hücreler içindeki DNA artıklarına bağlı olabileceği belirtilmiştir. Bununla beraber; *Borrelia burgdorferi* ve *Mycobacterium tuberculosis* bakterilerinin neden olduğu infeksiyonlarda tedavi sonrasında PCR pozitifliğinin devam ettiği belirtilmiştir (18).

Çalışmamızda saptadığımız pozitif PCR sonuçlarının; bölgemizde sık rastladığımız kronik veya tam tedavi görmemiş hastalara ait serumlar olduğunu düşünmekteyiz.

Orijinal PCR metodunda; başlangıçta bulunan hedef DNA molekülleri miktarından bağımsız olarak sonuçta aynı miktarda ürün artışı gözlenmekteydi ve bu durum 1992 yılında Higuchi ve ark. tarafından rt PCR'ın geliştirilmesiyle çözülmüştür (19,22). rt PCR klinik mikrobiyolojide patojenlerinin tanısında devrim yaratmıştır ve mikrobiyal ajanların tanısında rt PCR'ın faydasını gösteren artan sayıda yayınlanmış klinik çalışmalar bulunmaktadır (23). Çalışmamızda; rt PCR işlemi; ABI PRISM 7700 SDS cihazında yapıldı.

rt PCR; hızlı, dinamik, kapalı sistemlerde gerçekleştirildiğinden kontaminasyon riskinin az olduğu, kullanılan PCR volümünün azaltıldığı, nükleik asit amplifikasyonu eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç veren nicel PCR yöntemidir ve DNA tespitinde en duyarlı yöntemdir (24,61,67).

Debeaumont ve ark. (51) tarafından yapılan çalışmada kültürü pozitif 17 brusellozlu hastanın 11'inde rt PCR sonucu pozitif bulunmuş ve 60 kontrol serumlarının tümünde amplifikasyon saptanmamış ve rtPCR'in duyarlılığı % 64.7 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Duyarlılıkta düşüklüğün; birçok serum örneğinin 3 aydan uzun süre -20⁰ C'ta saklanmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir ve *O. anthropi* DNA'sı yalancı pozitif sonuca neden olmamıştır.

PCR'in yüksek duyarlılığına rağmen; negatif sonuç hastalığın var olmadığı anlamına gelmemektedir (18,64,66). Kanda bakteriyemi geçici olarak oluşabilir ve örnek alındığı sırada diğer vücut sıvılarında yeterli derecede bakteri bulunmamasından dolayı; PCR negatifliği saptanabilir. Buna karşın PCR ile tespit edilen DNA sekansları aktif hastalığı göstermemektedir çünkü PCR canlı ve ölü mikroorganizma DNA'larını ayırt edememektedir **(18)**. Bununla beraber pozitif PCR sonuçlarının aktif hastalıkla ilişkili olduğu ve tedavi sonrası sonuçların negatifleştiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (66). Tedavide başarısızlık ve yetersizlik; PCR pozitifliğinin sürmesiyle kendini göstermektedir. PCR ile pozitif sonuç alınan ve yakın zamanda uygun antibiyotik tedavisi alan hastalarda ek tedaviye gereksinim olmamakla beraber PCR ile pozitif sonuç alınan ve bruselloz için tedavi almamış kişilerde tedaviye başlanması gerekmektedir (18).

Sonuç olarak; brusellozun tanısında tüm infeksiyon hastalıklarda olduğu gibi etkenin izolasyonu altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat bu yöntemin duyarlılığının az ve uzun sürede sonuç vermesinden dolayı hızlı tanı gerektiren durumlarda kullanımı yeterince uygun olmamaktadır. Tanıda geleneksel olarak kullanılan serolojik yöntemler; yeterli antikor

cevabının oluşmadığı hastalığın başlangıç dönemlerinde, kronik ve rölaps olgularında, tedaviye cevabın izlenmesinde ve bölgemiz gibi endemik olan alanlarda yeterli ve anlamlı sonuçlar vermemektedir. Bruselloz tanısında serumda rt PCR ile etken DNA'sının tespiti; testin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü olması, kısa sürede sonuç vermesi, laboratuvarında personele bulaş riskinin diğer yöntemlere göre az olmasından dolayı, yöntemin çalışmasında tam bir standardizasyon sağlandıktan sonra rutin laboratuvar tanısında kullanılması önemli bir gelişme olarak kabul edilmektedir.

ÖZET

Brucella cinsi bakterilerin etkeni olduğu bruselloz; dünyada önemli halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Hastalığın ciddiyeti ve insanlar için uygun aşının yokluğundan dolayı biyoterörizm ajanı olarak kullanılabilir.

Brusellozda genel infeksiyon belirtilerinin yanında özgül klinik belirtilerinin olmamasından dolayı laboratuvar tanı yöntemleri ön plana çıkmıştır. Bruselloz tanısında; mikroorganizmanın izolasyonundaki güçlüklerden dolayı serolojik yöntemlerden daha fazla yararlanılmaktadır. Serolojik testlerde endemik bölgelerde yaşayan sağlıklı kişilerde de pozitiflik görülebilmekte ve ayrıca 1/20 ve 1/160 arasındaki titreleri yorumlamak güç olmaktadır. Ancak son yıllarda moleküler yöntemler hastalığın tanısında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada; Dicle üniversitesi Tıp Fakültesi klinik ve polikliniklerden bruselloz ön tanısı ile Merkez Laboratuvarına gönderilen hasta serum örneklerinden, Rose Bengal testi pozitif, Standart Tüp Aglütinasyon testi titresi 1/160'tan düşük ve Coombs testi negatif olanlarda, Brucella DNA'nın real time PCR yöntemiyle aranması amaçlandı.

Çalışmaya alınan RBT pozitif olan toplam 90 serum örneğinin 21 tanesi (%23.3) 1/20 titrede, 41 tanesi (%45.5) 1/40 titrede ve 28 tanesi de (%31.1) 1/80 titrede pozitif bulunmuştur. real time PCR ile 90 serum örneğinde yapılan çalışmada ise 3 hastada (%3.3) Brucella DNA pozitif bulundu. Çalışmamızda saptadığımız pozitif PCR sonuçlarının; bölgemizde sık rastladığımız kronik veya tam tedavi görmemiş hastalara ait serumlar olduğunu düşünmekteyiz.

PCR testinin; duyarlılığının yüksek olması, hızlı olması, herhangi bir vücut dokusunda uygulanabilmesi, bulaştan 10 gün sonra bile pozitif sonuç vermesi, laboratuvar da personele bulaş riskinin diğer yöntemlere göre az olmasından dolayı, yöntemin çalışmasında tam bir standardizasyon sağlandıktan sonra rutin laboratuvar tanısında kullanılması önemli bir gelişme olarak kabul edilmektedir.

SUMMARY

Brucellosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Brucella* and an important public health problem in many parts of the world. There is still no effective vaccine for humans and these bacteria can be used as bioterrorism agent.

Brucellosis has a great variety of clinical manifestations, making it difficult to diagnose clinically. Therefore; isolation or detection of specific antibodies is essential for confirmation of the diagnosis. Serologic tests play a major role in cases when the disease cannot be detected by culture. However; the interpretation of these tests is often difficult; particularly in patients with chronic brucellosis and in areas of endemicity, where a high portion of the population have antibodies against brucellosis. In last decades; PCR-based assays have been applied for diagnosis of brucellosis.

In this study, a total of 90 serum samples were obtained from patients with brucellosis suspicion at Dicle University Medical Faculty Hospital Central Laboratory. The serum samples were Rose Bengal test positive, Standart Tube Agglutination titer below 1/160 and Coombs test were negative. We aimed to detect *Brucella* DNA in these sera.

The STA titer is 1/20 in 21 (%23.3) patients, 1/40 in 41 (%45.5) and 1/80 in 28 (%31.1) patients. We detected *Brucella* DNA in 3 (%3.3) serum samples of patients. We concluded that these positive results belongs to chronic or incomplete treated patients.

In conclusion; the PCR-based assay has several advantages including speed, safety, high sensitivity and specifity; therefore it can be considered a routine diagnostic method for the diagnosis of brucellosis after standardization.

KAYNAKLAR

1. Capasso L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. 2002. J Infect. 45; 122-127.
2. Sözen TH. Bruselloz. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Cilt 1, Sistemlere göre infeksiyonlar,2002. s: 636-642. Nobel tıp kitapevleri.
3. Young EJ. Brucella species. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000. 5th. Edition. vol 2, p: 2386-2391. Churchill, Livingstone, Philadelphia.
4. Chu MC, Weyant RS: Francisella and Brucella. Eds: Murray Patrick R. Manual of clinical microbiology. 2003. 8th edition. p: 789-808. ASM pres.Washington DC.
5. Mamıkoğlu L. Bruselloz, Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları.2005. Ed: Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. sf :327-342 Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara.
6. Sümerkan B. Brucella Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Cilt 2, Etkenlere göre infeksiyonlar, 2002. s: 1647-1652. Nobel tıp kitapevleri.
7. Erdenliğ S. Türkiye’de Brucella kökenleri. 2003. 11. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı. s: 214-216.
8. Al Dahouk S, Tamaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-A Review of literature .Part 1: Techniques for direct detection and identification of Brucella spp. 2003. Clin Lab. 49: 487-505.
9. Altoparlak Ü. Brusellozun etiyolojisi. 2003. Ankem Derg 17 (3): 330-332.

10. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. 2005. N Engl J Med 352, p: 2325-2336.
11. Yakupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. 2005. Emerg Infect Dis. Vol 11,No:8. p: 1180-1185.
12. Yakupsky P. Minireview: Detection of brucellae in blood cultures. 1999. J Clin Microbiol. 37, p: 3437-3442.
13. Bilgehan H. Brucella. 2000.Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları 10.baskı. s: 199-214. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir.
14. Çelebi S. Brusellozun epidemiyolojisi. 2003. Ankem Derg 17 (No:3): 340-343.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Summary of notifiable diseases. 2003. Morb Mortal Wkly Rep 50: 1-108.
16. Aktaş O. Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. 2003.Ankem Derg 17 (No.3): s: 336-339.
17. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. 1996. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton Brucella antigen DNA. J Clin Microbiol. 34:477-478.
18. Navarro E, Casao MA, Solera J. 2004. Diagnosis of human brucellosis using PCR. Expert Rev Mol Diagn. 4(1). p: 115-123.
19. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. 2006. Molecular Aspects of Medicine 27;95-125.
20. Redkar R, Rosa S, Bricker B, DelVecchio V. 2001. Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis. Mol Cell Probes 15: 43-52.
21. Fatih Köksal. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Ed: Prof. Dr. Rıza Durmaz. 2001. s: 15-34. Nobel Tıp Kitapevleri.

22. Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. 2006. *Infection, genetics and evolution* 6; 2-12.
23. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev*, Jan. p: 165–256.
24. Işık N, Ağa fıdan A. 2004. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında “real-time” polimeraz zincir reaksiyonu kullanımı. *İnfeksiyon derg* 18(1):125-130.
25. Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5’ Nuclease PCR Assay for Rapid Identification of the Genus *Brucella*. 2004. *J Clin Microbiol*. Vol: 42, No: 5, p: 2261–2263.
26. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. 2004. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 42(3): 1290–1293.
27. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordenez MA, Cardenas A, Colmenero JD. 2003. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 41(1): 144–148.
28. Yaylı G. Brusellozun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. 2003.11. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı*. s: 211-213.
29. Al Dahouk S, Tamaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-A Review of literature .Part 2: Serological Tests for brucellosis. 2003. *Clin Lab*. 49: 577-589.
30. Bilgehan H. Bruselloz tanısında aglütinasyon. 2002. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 3.baskı. s: 223-227, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir.

31. Tümtürk A, Yetkin MA, Tülek N, Kılıç D. Brusellozun tanı ve takibinde serum aglütinasyon testi ve “enzyme-linked immunosorbent assay” yönteminin yeri. 2004. Klimik derg. cilt 17, sayı 2, s: 107-112.
32. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marin C, Albert D. 2005. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. Small Ruminant Research 62; 63-70.
33. 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. 1989. J Clin Microbiol 27, p:1909-1912.
34. Sippel JE, El-Marsy NA, Farid Z. Diagnosis of human brucellosis with ELISA. 1982. Lancet. 3; 2(8288):19-21.
35. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. 1992. Clin Infect Dis. 14(1): p: 131-140.
36. Smits HL, Basahi MA, Diaz R, Marrodan T, Douglas JT, Rocha A, Veerman J, Zheludkov MM, Witte OWM, deJong J, Gussenhoven GC, Goris MGA, van der Hoorn MAWG. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. 1999. J Clin Microbiol. Vol 37,No:12 p:4179-4182.
37. Orduna A, Almaraz A, Prodo A, Gutierrez MP, Pascual AG, Duenas A, Cuervo M, Abad R. Hernandez B, Lorenzo B, Bratos MA, Torres AR. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. . 2000. J Clin Microbiol. Vol 38,No:11. p: 4000-4005.
38. Kose S, Smits HL, Abdoel TH, Ozbel Y. 2005. Prevalence of *Brucella* antibodies in rural and suburban communities in three provinces of Turkey:Need for improved diagnosis and prevention. J Infect (In pres).

39. Atmaca S, Özekinci T, Akpolat N, Elçi S, Suay A, Arıkan E. 2004. Brucellosis Seroprevalence in Southeast Turkey. *Turk J Med Sci*; 34:251-255.
40. Rıza Durmaz. Polimeraz Zincir Reaksiyon Yönteminin Bakteriyolojide Kullanımı. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Ed: Prof. Dr. Rıza Durmaz. 2001. s: 75-82. Nobel Tıp Kitapevleri.
41. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* ; 95(4):271-275.
42. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM, Al-Rabiah FA .2005. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. *Med Sci Monit*. 11(11):MT69-74.
43. Colmenero JD, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P. 2005. Real-time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 76: 1025-1027.
44. Vrioni, G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. 2004. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23, 194–199.
45. Serra J, Vinas M. 2004. Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. *Int Microbiol*. 7; p: 53-58.
46. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzales JJ, Colmenero JD. 2001. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol* 39: 3743–3746.
47. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. 2001. Serum is the preferred clinical specimen for the diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol*. 39(4): 1661–1664.

48. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. 2005. Comparison between LightCycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 40: 260–264.
49. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. 2005. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 53(1):1-7.
50. Nimri LF. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. 2003. *BMC Infect Dis*; 3:5.
51. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M. 2005. Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 842–845.
52. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*; 69(2): 216-227.
53. Herman L, De Ridder H. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the Polymerase Chain Reaction. *Appl environ microbiol* 58(6): 2099-2101.
54. Leal-Klevezas DS, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. 1995. Molecular detection of *Brucella* spp. : rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. *Arch Med Res* 26(3):263-267.
55. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 33(3), 615–617.
56. Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M, Dubray G. 1996. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J Appl Bacteriol*. 81(3): 267-275.

57. Casanas MC, Queipo-Ortuno MI, Rodriguez-Torres A, Orduna A, Colmenero JD, Morata P. 2001. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 20:127–131.
58. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. 2002. *Vet Microbiol*; 90: 435–446.
59. Navarro E, Escribano J, Fernandez JA, Solera J. 2002. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 34(2). p: 147-151.
60. Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. 2004. *Clin Microbiol Rev*. Vol.17, No.4, p: 840–862.
61. Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, Schoske R, Crawford R. DNA Assays for Detection, Identification, and Individualization of Select Agent Microorganisms. 2005. *Croat Med J*; 46(4):522-529.
62. Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. Use of 16S rRNA Gene sequencing for rapid confirmatory identification of *brucella* isolates. 2004. *J Clin Microbiol*. Vol:42, No:8. p: 3649-3654.
63. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 35(11), p: 2927–2930.
64. Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N. 2000. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. *Ann Saudi Med* 20, 224-228.

65. Navarro E, Fernandez JA, Escribano J, Solera J. 1999. PCR Assay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol.37(5), p: 1654-1655.
66. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordenez MA, Pichardo C, Colmenero JD. 1999.Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR Assay. J Clin Microbiol 37(12). p: 4163-4166.
67. Rıza Durmaz. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun tipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Ed: Prof. Dr. Rıza Durmaz. 2001. s: 35-43. Nobel Tıp Kitapevleri.