

ORJİNAL YAZI

## Bruselloz Tanı Yöntemlerinin Etkinliğinin Araştırılması

Ufuk DİZER, Can Murat BEKER, Hüseyin ÇİÇEK, Özgür R. GÜNER,  
İsmet ZEREN, Alaaddin PAHSA

GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

### ÖZET

Çalışmamızda, Haziran 2000-Mayıs 2003 tarihleri arasında anamnez ve fizik muayene bulgularıyla bruselloz olduğu düşünülen, Rose Bengal lam aglütinasyon testi (RBT) ve Wright tüp aglütinasyon testi (TAT) pozitif bulunarak tanısı kesinleşen 24'ü erkek, 8'i kadın hastada bruselloz tanı yöntemlerinin etkinliği araştırılmıştır. Olgularımızın %100'ünde RBT ve TAT, 12 (%37.5) hastada *Brucella* IgM pozitif bulundu. ELISA yöntemiyle bakteriyeye karşı oluşan antikorların tespitinin, hastalığın tanı ve tedavisinin takibinde anlamlı olduğu görüldü. Hastalarımızın %18.7'sinde kanda, %28.1'inde kemik iliğinde üreme saptandı. Kültür sonuçlarının düşük kalmasının nedeni, hastalara tanı konmadan önce başka sağlık kuruluşları tarafından verilen çeşitli antibiyotikler olarak düşünüldü. Çalışmamızda, 3 (%9) olguda PCR tekniği ile serumda *Brucella* bakterisi saptandı. Hasta serumunun PCR tekniği için uygun örnek olmadığı düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Bruselloz. Tanı testleri. PCR.

### Investigation Into The Efficacy Of Diagnostic Tests In Brucellosis

#### ABSTRACT

In our study, 24 male and 8 female patients with brucellosis whose diagnosis were confirmed by positive slide agglutination (Rose Bengal) and standard tube agglutination (Wright) tests were enrolled between the dates of June 2000 and May 2003.

Both agglutination tests were positive in all patients. In the serological diagnosis of brucellosis, *Brucella* IgM antibodies detected by using ELISA were positive in 12 (37.5%) patients respectively. Detection of the antibodies by using ELISA method was found to be effective in the diagnosis and follow-up to response to the treatment of Brucella.

Blood and bone marrow cultures were positive in 18.75% and 28.1% of patients, respectively. Non-specific antibiotic use before specific diagnosis and treatment was thought as a cause of low positivity rate in culture results. Because polymerase chain reaction (PCR) assay was positive only in 3 (%9) patients, the serum was considered not to be the appropriate material for the analysis.

**Key Words:** Brucellosis. Diagnostic Tests. PCR.

Bruselloz, geçimini ağırlıklı olarak tarım ve hayvancılık ile sağlayan ülkelerde önemli düzeyde maddi kayıplara, insanlara bulaşması sonucunda da fiziksel yetersizlik ve iş gücü kaybına yol açan bir hastalıktır. Hayvanlardan insanlara bulaşarak edinilen bruselloz, tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, olgu sayısının yılda 500.000 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığın yaygınlığı farklı bölgelerde nüfusun sosyal ve kültürel özelliklerine ve yerel *Brucella* eradikasyon programlarının uygunluğuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir<sup>1</sup>.

Bildirimdeki yetersizlikler, asemptomatik olguların varlığı ve tanılma prosedür yetersizlikleri de gözönüne alınırsa, epidemik verilerin sonucu yansıtmadığı, çok daha büyük bir kitlenin bu hastalık ile birlikte yaşadıkları söylenebilir. Hastalığın klinik tablolarının asemptomatik seyredebilmesi ve özellikle romatolojik hastalıklar ile izdüşen birçok klinik belirtisinin bulunması nedeniyle gereksiz ve vücuda zarar verebilen tedavilerin kullanılması ile sonuçlanmaktadır<sup>2</sup>.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmamız, Haziran 2000-Mayıs 2003 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kliniği ve GATA bünyesinde bulunan kliniklerde yatan toplam 32 hastadan oluşan Çalışma Grubu (ÇG) ve sağlıklı gönüllülerden seçilen 30 kişilik Kontrol Grubu'nda (KG) yapılmıştır. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımları, meslekleri, beslenme alışkanlıkları (taze peynir yeme, çiğ süt

Geliş Tarihi: 25.04.2005

Kabul Tarihi: 18.10.2005

Dr. Ufuk DİZER

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve  
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
ANKARA

içimi vb.), hayvanlarla temasları, seyahat öyküleri, şikayetlerin başladığı mevsim gibi anamnez ve fizik muayene bulguları irdelenerek ön tanı olarak bruselloz düşünülen hastalara nonspesifik testler ile birlikte ön tanı amacıyla RBT yapıldı. RBT pozitif saptanan hastalara TAT, kemik iliği ve kan kültürü, *Brucella* IgG ve IgM, *Brucella* PCR planlandı.

TAT'da 1/100 ve üstündeki sonuçlar pozitif olarak kabul edildi ve ÇG'ye dahil edildi. Kemik iliği ve/veya kan kültüründe üreme saptanan hastalara diğer testler yapılmakla birlikte test sonuçları beklenmeden tedaviye başlandı. Eş zamanlı olarak hastaların tümüne *Brucella* IgG ve IgM çalışıldı. *Brucella* spesifik testlerinin pozitifliği, beyaz küre (BK) sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), C-reaktif protein (CRP) ve rutin kan biyokimyası tetkikleri ile tanı desteklenmeye çalışıldı.

*Brucella* IgG ve IgM antikorları izlendiğinde; hastalığın ilk günlerinde IgM yapısındaki antikorlar serumda oluşmakta, ilerleyen dönemde IgG yapısındaki antikorlar ortaya çıkmaktadır. Hastalığın ilerlemesi ile IgG serumda kantitatif olarak dominant hale geçmektedir. Çalışmamızda, düz tüpe alınan kan örnekleri 2000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilip serum kısmı ayrıldı. *Brucella* IgG-IgM ELISA (Immunolab GmbH, GERMANY) marka kit kullanılarak serumda oluşan renk değişikliği 450 nm. dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek antikor titresi tayin edildi. IgG ve IgM için 10'un üzeri değerler pozitif olarak değerlendirildi.

Kan ve kemik iliği kültürü; BACTEC 9240 ve Bact/ALERT kültür şişelerinde gönderilen kan ve kemik iliği kültür örnekleri otomatik kültür sistemlerine konuldu. *Brucella* bakterisi geç ürediği için kültür şişeleri 4 hafta süre ile bekletildi. Üreme olan şişelerden örnekler alınarak kanlı agar, Eosin-Methylene-Blue (EMB) ve çikolatamsı agar besi yerlerine ekimler yapıldı. Çikolatamsı agar besiyeri %5 CO<sub>2</sub> ortamında 37°C'de 24 saat süre ile bekletilirken, kanlı agar ve EMB besiyerleri ise aynı sıcaklık ve süre ile normal oksijenli ortamda bekletildi. Üreme saptanmadığı veya çok hafif üreme görüldüğü durumlarda bekletme süresi 48 saate tamamlandı. Üreme saptanan besiyerlerinden örnekler alınarak Gram boyama ve biyokimyasal testleri ile bakterinin identifikasyonuna gidildi.

*Brucella* PCR; *Brucella* DNA'sı aşağıda açıklanan ekstraksiyon modülü çalışma protokolüne göre elde edildikten sonra amplifikasyon protokolüne göre karıştırılıp thermal cycler'a alındı. Daha sonraki aşamada jel dökülerek cihazdan alınan örnekler yüklenip elektroforezde yürütüldü.

Heliosis® DNA Ekstraksiyon Modülü Çalışma Protokolü; örneklerin kapakları açılmadan önce spin santrifüj edildi. 400 µl DNA Lyziz Binding solüsyonuna 100 µl Serum/Plazma eklendi ve vortekslenildi. Karışım 65 °C'de 10 dk, +4 °C'de 2 dk bekletildi. Spin

santrifüj edildikten sonra üzerine 500 µl DNA presipitasyon solüsyonu eklendi ve vortekslenildi. 15 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım, çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındı. 500 µl DNA yıkama solüsyonu eklendi, vortekslenildi. 5 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım pipetle tamamen alındı. 10 dk oda sıcaklığında kurutuldu. 20 µl DNA sample diluter eklendi. Vortekslenip spin santrifüj edildi.

**Tablo I.** *Brucella* PCR primerleri

<b>Br1:</b> 5' GTATCGTTCTTGAAGCCTAC 3'
<b>Br3:</b> 5' GTGCATTTCAATAGGCTAGAG 3'
<b>Br2:</b> 5' CCTGGTGATGTTATAGATG 3'

**İstatistiksel Analizler:** İstatistiksel analizlerde SPSS 9.05 for Windows istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarına ait değişkenlerin analizinde aşağıdaki test yöntemleri uygulanmıştır:

- Sürekli değişkenlerin normallik analizlerinde Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır.
- Çalışma ve kontrol grupları arasında normal dağılım gösteren sürekli değişkenler için Student-t testi, normal dağılıma uymayanlar değişkenler için Mann-Whitney U testi, kategorik değişkenler için ise Ki-kare ve Fisher'in kesin Ki-kare testi kullanılmıştır.
- İstatistiksel önemlilik düzeyi için p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

## Bulgular

Çalışmamıza, Haziran 2000-Mayıs 2003 tarihleri arasında GATA İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine müracaat eden veya GATA'nın çeşitli kliniklerinde yatarken bruselloz tanısı alan 32 hasta ÇG olarak alınmıştır. Hastalara ait demografik veriler Tablo II'de verilmiştir. Hastaların 19'u (%59) kırsal alanda oturuyordu. Hastaların alınan anamnezi sonucunda 12'sinde (%37,5) hastalık gelişimi açısından bir risk saptandı. ÇG hastalarının 3'ünde (%9) aynı zamanda ailesinde de akut bruselloz tanısı almış hasta mevcuttu. ÇG'de yer alan 32 hastanın klinik tablolarının mevsimlere göre dağılımı 12 kişi (%37,5) yaz, 14 kişi (%43) ilkbahar, 6 kişi (%18,5) sonbahar aylarında müracaat etmiş olup, kış döneminde bruselloz tanısı konulmuş akut bruselloz tablosu saptanmadı.

**Tablo II.** ÇG ve KG'ye ait yaş ve cinsiyet bilgileri

	KADIN			ERKEK		
	(n)	%	Yaş ortalaması ± SS	(n)	%	Yaş ortalaması ± SS
H.G.	8	25	30,1±6,7	24	75	26,6±7,4
K.G.	6	20	31,0±5,1	24	80	27,3±6,0

## Bruselloz Tanı Yöntemlerinin Etkinliğinin Araştırılması

Hastalardan elde edilen anamnez sonucunda ÇG'ye alınan hastaların 27'sinde (%84) ateş, 21'inde (%65) titreme, 18'inde (%56) halsizlik, 30'unda (%93) gece terlemesi, 13'ünde (%40) bel ağrısı, 7'sinde (%21) diz ve ayak bileğinde ağrı, 7'sinde (%21) iştahsızlık, 7'sinde (%21) bulantı-kusma, 3'ünde (%9) kilo kaybı, 3'ünde (%9) baş ağrısı, 4'ünde (%12,5) ishal, 2'sinde (%6) kabızlık, 1'inde (%3) görmede bulanıklık, 1'inde (%3) testislerde ağrı, 1'inde (%3) çarpıntı mevcuttu.

ÇG'ye alınan hastaların yapılan fizik muayenelerinde, 27'sinde (%84) 38°C'nin üstünde ateş, 15'inde (%46) hepatomegali, 12'sinde (%37,5) splenomegali, 7'sinde (%21) lenfadenopati, 6'sında (%18) sakroileit nedeniyle Laseque pozitifliği, 3'ünde (%9) diz eklemine şişlik, 2'sinde (%6) ayak bileğinde şişlik, 1'inde (%3) el bileğinde hareket kısıtlılığı, 3'ünde (%9) herpes labialis, 1'inde (%3) skrotumda şişlik ve

kızarıklık saptandı. Ateş şikayeti ile polikliniğe müracaat eden hastalardan alınan anamnez sonrası ateş etiyolojisini ortaya koymak amacıyla birinci basamak testler planlandı. Bruselloz ön tanısı ihtimali yüksek olan hastalardan, bu nonspesifik testlerin yanı sıra RBT istendi. Hastalara ait nonspesifik test sonuçları Tablo III'te verilmiştir.

Çalışma ve kontrol grupları arasında BK ortalamaları yönünde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamazken ( $p>0,05$ ) ESH, CRP, ALP, AST ve ALT değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,05$ ).

ÇG'deki hastalarımızdan 9'unda (%28.1) kemik iliği, 6'sında (%18.7) kan kültüründe etken üretildi. İki tanı yöntemi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. *Brucella* IgG ve IgM seviyelerinde KG'ye göre anlamlı fark bulundu. ÇG'ye alınan 32 hastadan 31'inde TAT'da titre 1/100 ve üzerinde

**Tablo III.** Brusellozlu olgularda nonspesifik test sonuçları

S.NO	BK (/mm <sup>3</sup> )		ESH (mm/h)		CRP(ng/ml)		ALP (U/L)		AST (U/L)		ALT (U/L)	
	ÇG	KG	ÇG	KG	ÇG	KG	ÇG	KG	ÇG	KG	ÇG	KG
1	10200	7410	26	5	18	<6	115	63	34	9	46	13
2	12800	6290	31	3	27	<6	92	92	15	23	26	19
3	6800	9300	29	11	31	<6	89	43	23	26	21	22
4	7890	4920	53	4	49	<6	116	79	37	19	48	29
5	4610	6840	8	9	<6	<6	164	108	39	11	55	17
6	9360	8730	17	3	<6	<6	106	116	13	31	16	28
7	4420	10260	34	14	11	8	93	57	21	16	30	23
8	5600	5940	42	4	54	<6	121	101	19	22	26	26
9	8740	6310	13	5	51	<6	163	83	43	29	49	25
10	4050	9980	27	2	23	<6	78	46	31	14	29	19
11	13900	7400	19	3	34	<6	140	83	28	17	32	11
12	6280	7120	40	7	63	11	113	48	18	29	17	29
13	7490	5300	9	9	<6	<6	128	116	11	21	20	25
14	3920	8060	36	13	61	<6	261	77	51	9	56	13
15	8030	4900	22	5	36	9	183	63	33	31	45	27
16	4940	4630	6	5	<6	<6	81	142	29	13	24	21
17	5690	10700	43	2	31	<6	134	59	13	17	19	12
18	14930	6200	12	6	<6	<6	146	74	25	9	23	15
19	6710	8370	11	12	<6	<6	159	71	40	24	44	28
20	3840	5900	38	4	27	13	208	84	62	19	81	20
21	9160	7340	7	8	<6	<6	104	123	27	30	22	43
22	5070	7920	15	7	24	<6	173	61	44	12	49	17
23	3700	6300	9	3	<6	9	136	104	48	18	62	12
24	6200	6820	12	6	<6	<6	78	72	13	22	9	27
25	7420	4840	48	10	72	<6	139	57	50	13	48	19
26	3100	5210	14	8	29	16	99	124	43	14	51	12
27	8400	8700	6	19	<6	13	87	92	24	29	27	23
28	8230	11400	29	11	43	<6	103	78	31	15	39	10
29	6400	5600	58	3	42	<6	127	136	55	11	48	13
30	5100	7640	15	7	<6	<6	62	85	18	22	21	17
31	9300		23		17		81		15		11	
32	3920		77		58		117		47		49	
Ort. ±SS	7068± 2959	7211± 1844	25,9± 17,3	6,93± 4,0	26,1± 21,7	4,5± 4,0	124,8± 42,4	84,5± 26,9	31,2± 14,0	24,3± 8,6	35,7± 16,0	26,9± 9,7
p	0,822		0,001		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001	

saptandı. Fizik muayene bulguları ve nonspesifik testler ışığında, ön tanı olarak bruselloz düşünülen hastalara aşağıdaki spesifik testler yapılmış ve sonuçlar Tablo IV'te verilmiştir.

leridir. TAT ile RBT'nin birbiri ile uyumluluk oranlarını araştıran çalışmalarda iki test arasındaki uyum %100 bulunmuştur<sup>3,4</sup>. Çalışmamızda; anamnez ve fizik muayene ile ön tanıda bruselloz düşündüğümüz

**Tablo IV.** ÇG ve KG'ye alınan hastalara yapılan spesifik test sonuçları

S.NO	KÜLTÜR		SEROLOJİ								PCR
	K.İ	Kan	RBT		TAT		Bc IgG		Bc IgM		
	ÇG	ÇG	ÇG	KG	ÇG	KG	ÇG	KG	ÇG	KG	
1	-	-	+	-	1/400	1/50	- (4,2)	- (2,8)	- (3,0)	- (6,0)	-
2	-	-	+	-	1/200	1/50	- (3,8)	- (9,0)	- (3,3)	- (7,9)	-
3	+	+	+	-	1/800	1/50	- (6,1)	- (5,3)	- (1,9)	- (8,1)	-
4	-	-	+	-	1/400	1/50	+ (13,8)	- (1,6)	+ (12,6)	- (3,8)	-
5	-	-	+	-	1/1600	1/50	+ (14,0)	- (4,1)	- (9,6)	- (2,0)	+
6	-	-	+	-	1/100	1/50	- (3,9)	+ (11,7)	- (4,0)	- (8,8)	-
7	-	-	+	-	1/800	1/50	- (3,4)	- (9,4)	- (1,8)	+ (10,6)	-
8	+	-	+	-	1/400	1/50	- (9,2)	- (2,7)	+ (10,6)	- (4,1)	-
9	-	-	+	-	1/400	1/50	+ (11,6)	- (6,7)	- (8,1)	- (7,7)	-
10	-	-	+	-	1/200	1/50	- (5,7)	- (8,6)	- (4,3)	- (5,3)	-
11	+	+	+	-	1/800	1/50	+ (10,4)	- (2,3)	- (7,4)	- (8,6)	-
12	-	-	+	-	1/400	1/50	- (2,9)	- (1,0)	- (3,5)	- (2,9)	-
13	-	-	+	-	1/200	1/50	- (1,7)	- (6,4)	- (2,6)	- (4,6)	-
14	+	+	+	-	1/200	1/50	- (7,3)	- (9,2)	- (5,3)	- (9,0)	-
15	-	-	+	-	1/1600	1/50	+ (16,4)	- (7,3)	+ (13,7)	- (3,8)	-
16	-	-	+	-	1/400	1/50	- (8,2)	- (3,6)	- (7,0)	+ (12,4)	-
17	+	-	+	-	1/200	1/50	+ (12,5)	- (4,1)	+ (11,9)	- (7,0)	+
18	+	+	+	-	1/800	1/50	- (9,1)	- (4,9)	- (7,5)	- (5,6)	-
19	-	-	+	-	1/800	1/50	- (6,7)	+ (11,2)	- (5,5)	- (3,1)	-
20	-	-	+	-	1/400	1/50	+ (14,8)	- (1,8)	+ (17,0)	- (1,4)	-
21	-	-	+	-	1/100	1/50	- (2,7)	- (6,7)	- (1,1)	- (9,1)	-
22	-	-	+	-	1/800	1/50	+ (12,0)	- (8,0)	+ (14,1)	- (8,2)	-
23	-	-	+	-	1/100	1/50	- (5,4)	- (5,4)	+ (14,8)	- (1,0)	-
24	+	+	+	-	1/400	1/50	+ (11,2)	- (4,2)	+ (16,0)	- (4,5)	-
25	-	-	+	-	1/400	1/50	+ (14,3)	- (3,9)	+ (10,2)	- (7,3)	-
26	-	-	+	-	1/100	1/50	+ (13,6)	+ (10,4)	+ (19,0)	- (2,8)	-
27	+	-	+	-	1/200	1/50	- (8,1)	- (8,8)	- (7,9)	- (3,7)	-
28	+	+	+	-	1/1600	1/50	+ (11,9)	- (2,9)	+ (15,2)	- (0,9)	+
29	-	-	+	-	1/400	1/50	- (6,6)	- (3,5)	+ (11,0)	+ (10,3)	-
30	-	-	+	-	1/800	1/50	+ (12,0)	- (6,1)	- (9,1)	- (6,0)	-
31	-	-	+	-	1/50	-	- (6,3)	-	- (5,3)	-	-
32	-	-	+	-	1/200	-	- (9,2)	-	- (7,4)	-	-
Ort.±SS							8,7± 4,1	6,3± 3,6	8,4± 4,9	5,9± 3,2	
P	0,125		0,0001		0,0001		0,006		0,012		-
	+ : Üreme var - : Üreme yok		+ : Aglutinasyon var - : Aglutinasyon yok								+ : Bakteri saptandı - : Bakteri saptanmadı

Çalışma ve kontrol grupları arasında RBT, TAT, Bc IgG ve Bc IgM değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,05$ )

### Tartışma

Bruselloz olduğu düşünülen hastalarda ilk yapılması gereken test RBT'dir. RBT'nin kolay yapılabilmesi, çabuk sonuç vermesi ve ucuz olması olumlu özellik-

hastalara RBT çalışıldı. RBT pozitif saptanan olgularda TAT ile antikor titresini belirledik. Çalışmamızda TAT ile RBT arasındaki uyumluluğu %96.8 olarak bulduk. Bu değer istatistiksel olarak iki test arasında güvenilirlik olduğunu göstermektedir.

Bruselloz tanısında TAT güvenilir bir yöntemdir. Uygun biçimde standardize edilmiş *Brucella* antijenleri kullanıldığında kültür pozitif olguların büyük çoğunluğunda titre 1/100 ve üzerinde bulunmaktadır.

## Bruselloz Tanı Yöntemlerinin Etkinliğinin Araştırılması

Kliniğimizde izlediğimiz bruselloz olgularında en önemli tanı kriterimiz TAT idi. Kan ve kemik iliği kültürü pozitif olgularımızın tümünde TAT 1/100 ve üzerindeydi. Akut infeksiyonlu hastalarda antikor titresinin 1/100 ve üzerinde olması sık karşılaşılan bir bulgu olsa da özellikle hastalığın erken döneminde olguların %1-22'sinde düşük titrelerde TAT pozitifliği ile karşılaşılabileceği unutulmamalıdır<sup>2,5</sup>. Bu hastalarda 2-3 hafta sonra tekrarlanan TAT'da titrenin genellikle 4 kat ve üzerinde arttığı bildirilmektedir. Çalışmamızda hastalarımızın 31 (%96.8)'inde TAT titresini 1/100 ve üzerinde saptadık.

Brusellozda TAT negatifliği ender bir durumdur. TAT negatif bulunan olgularda klinik tablo brusellozu kuvvetle düşündürüyorsa bu durumda 3 olasılıktan sözedilebilir: 1) Hastalığın erken dönemi, 2) Tam olmayan (blokan) antikorların varlığı, 3) *B. canis* infeksiyonu. Çetin ve ark.'nın yaptıkları çalışmada TAT negatif sonuç veren 3.893 örnekte blokan antikorların varlığı araştırılmış ve 40 (%1)'inde Coombs reaksiyonu kullanımı sonucu başlangıçta belirlenemeyen aglütinasyonun olduğu saptanmıştır<sup>6</sup>. Çalışmamızda RBT pozitif olan bir olguda TAT negatif olarak saptandı. Bir hafta sonra test tekrarlandığında sonucun 1/200'ün üstünde bulunması nedeniyle, bu durum hastanın çok erken dönemde müraعات etmesine bağlandı.

ELISA ile *Brucella* IgG ve IgM'nin saptanması bruselloz tanısında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır<sup>1,7,9</sup>. Bildirilen çeşitli ELISA çalışmalarında bu yöntemin akut olguları belirlemede en uygun teknik olduğu gösterilmiştir. Yeni bir infeksiyonda spesifik IgM düzeyi olguların % 99'unda yüksek değerlerde belirlenmiştir. Kronik olguların tamamında ise IgG antikorları belirlenmektedir. ELISA tekniği özellikle kronik brusellozun tanısında TAT ve RBT'den daha uygun sonuçlar vermektedir. Bazı araştırmacılar akut olgularda önce IgM ve daha sonra IgG artışına bağlı iki pik şeklinde artış gösteren ELISA pozitifliği saptarken, kronik olgularda tamamen IgG'den oluşan antikor varlığına değinmişlerdir. Brusellozlu olgularda yüksek titrelerde IgG antikor pozitifliğinin bir yıldan fazla sürmesi her zaman kronikleşme bulgusu olarak düşünülmemelidir. Çünkü başlangıçta IgG titrelerinin çok yüksek olduğu olgularda etkin tedaviye rağmen IgG antikor pozitifliği bir yıldan uzun sürebilmektedir<sup>9</sup>.

Memish ve ark. kan kültürü pozitif olan 68 hastada yaptıkları çalışmada ELISA IgM'nin duyarlılığını %45.6, özgüllüğünü %97 saptarken aynı değerleri ELISA IgG için sırasıyla % 79.1 ve %100 olarak bulmuşlardır<sup>5</sup>. ELISA IgM ve IgG'nin her birinin duyarlılığının TAT'a göre düşük olduğunu, buna karşın IgM ve IgG'nin beraber değerlendirildiğinde duyarlılık ve özgüllüğünün TAT'a benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, *Brucella* IgM'yi 12 hastada (%37.5), IgG'yi 13 hastada (%40.6) pozitif saptadık. Altı haftalık tedavi sonunda IgM yüksekliğini 8 hastada (%25), IgG yüksekliğini ise 6 hastada (%18.75) pozitif olduğunu gördük. Bu sonuçlarla ELISA tekniğiyle saptanan IgM ve IgG yapısındaki antikorların brusellozlu hastaların tanı ve tedavisinin takibinde kullanılabileceği değerlendirildi.

Bruselloz tanısı genellikle klinik belirti ve bulguların varlığında TAT'ın pozitif olması ile konulmaktadır. Ancak bu hastalığın kesin tanısı, etkenin kültürde üretilmesiyle mümkündür. Genelde kan ve bazen de kemik iliği kültürüne başvurulmasına karşın uygun durumlarda eklem sıvısı ve beyin omurilik sıvısı kültürlerinden de yararlanılmaktadır. Bu amaçla yıllardır konvansiyonel kan kültür sistemleri (Castaneda besiyeri gibi) kullanılmıştır. Bu besiyerinde inkübasyon süresi çok uzun (yaklaşık 30 gün) olsa da sonuçlar tatmin edicidir. Ancak son yıllarda kullanıma giren ve gittikçe yaygınlaşan yarı ve tam otomatik kan kültür sistemleriyle, bu bakteriler hem daha kısa sürede (genellikle ilk 7 gün içinde) hem de daha yüksek oranda (>%90) üretilmektedir<sup>10-13</sup>. Memish ve ark. konvansiyonel ve BACTEC 660 ve 9240 sistemleriyle bu oranı %38 (160/545) olarak bulmuşlardır<sup>5</sup>.

Yarı otomatik BACTEC NR 660 ve 730 gibi kan kültür sistemlerinde, diğer bakteriler gibi *Brucella* türleri de kısa sürede ve yüksek oranda üreyebilmektedir<sup>11,13</sup>. Yagupsky BACTEC NR 660 sistemini kullanarak ve pasaj yaparak 27 *B. melitensis* türünün 21 (%78)'ini 7 günde izole etmiştir<sup>13</sup>. Geri kalanlar ise 3 hafta içinde izole edilmiştir. Ülkemizde Gedikoğlu ve ark. da BACTEC 9120 sistemiyle ilk 4 gün içinde 30 *B. melitensis* türünün hepsini izole etmişlerdir<sup>11</sup>. BACTEC 9240 sistemi ile yapılan iki ayrı çalışmada üreyen izolatların %93 ve %100'ünün ilk 5 gün içinde ürediği belirlenmiştir<sup>8,10</sup>. Bu çalışmanın verileri üreyen izolatların zaman içinde elde edilme oranlarını yansıtmakta olup brusellozlu olgularda total üreme oranlarını yansıtmamaktadır. Ülkemizde yapılan bruselloz çalışmalarında konvansiyonel besiyerlerinde (Castaneda besiyeri dışı) kan ve kemik iliği kültürlerinin pozitiflik oranları birbirlerine benzer (yaklaşık olarak %25) bulunmuştur<sup>2</sup>.

Çalışmamızda ise, BACTEC 9240 ve Bact/ALERT kültür sistemi kullanarak kan kültür pozitifliğini %18.7, kemik iliği kültür pozitifliğini ise %28.1 olarak bulduk. Hem kemik iliği hem de hemokültürde *Brucella* bakterisi izole edilen 6 (%18.75) hasta saptandı. Bu oranlar ülkemizde yapılan sonuçlar ile benzer olmakla beraber dış kaynaklı çalışmalara göre düşük kalmıştır. Çalışmamıza aldığımız hastaların büyük bir kısmı bize başvurmadan önce başka bir sağlık kuruluşuna müraعات etmişlerdir. Bruselloz gibi uzun süreli ateş, nonspesifik belirti ve bulgularla seyreden bir hastalıkta başka bir neden

düşünülerek antibiyotik başlanması şaşırtıcı değildir. Hastaların antibiyotik kullanmasının kan ve kemik iliğinde bulunan bakteri sayısını önemli ölçüde azalttığı ve kültür pozitiflik oranını düşürdüğü sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda 9 hastada kemik iliğinde üreme saptandı. Bu 9 hastadan aynı zamanda 6'sında kan kültüründe de etken üretildi. Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak *Brucella* bakterisinin kemik iliğinde üreme oranı daha yüksek bulundu. Kemik iliği ve kan kültürü pozitif olan hastaların tamamında RBT pozitif olarak saptandı. Yine bu hastaların tümünde TAT titresi 1/100 ve üzerinde bulundu. Kemik iliğinde *Brucella* üretilen hastalardan ikisinde PCR ile serumda etken saptanırken bir hastada PCR ile etken saptanmasına rağmen kemik iliği ve kan kültüründe üreme görülmemiştir. Kemik iliğinde üreme bulunan hastalardan 4'ünde *Brucella* IgM normal titrenin üzerinde bulundu. Bu rakamın düşük kalması tetkik yapıldığı sırada hastalığın çok erken dönemde olup yeterli serolojik cevabın oluşmamasına bağlandı.

PCR başta viral hepatitler olmak üzere enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde ve tedavilerinin takibinde önemli bir yere sahiptir. Kan, vücut sıvıları ve dokularından alınan çok az miktarlardaki örnekler etkenin saptanması için yeterli olabilmektedir. Kan ve kemik iliği kültüründe *Brucella* bakterisinin üretilme şansı yüksek olmakla birlikte laboratuvar personelinin kontamine olma şanssızlığı vardır. Otomatize kültür sistemlerinde dahi etkenin üretilmesi için ortalama 5 güne ihtiyaç olmakla beraber bu süre 28 güne kadar uzayabilmektedir. PCR ile uygun örnek alındıktan sonra 24 saat içinde etken saptanabilmektedir. Ancak, testin uygulanması için pahalı cihazlar ve yetişmiş personel gerekmektedir.

Casano ve ark. periferik kan hücreleriyle yaptıkları çalışmada primer olarak *B. abortus*'un 31 kilodaltonluk antijenini kodlayan 223 bç'lik DNA sekansını kullanmışlardır. Bu çalışmayı özellikle hastalığın başlangıç aşamasında olan olgularda yanlış negatif serolojik tanıyı ortadan kaldırmak için yapmışlardır. Casano ve ark. erken brusellozlu olgularda PCR'nin hastalığın teşhisinde güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir<sup>14</sup>.

Morata ve ark. 32 hastadan oluşan serilerinde, kan ve fokal komplikasyon gelişen dokularda PCR testi ile kültür yöntemlerini karşılaştırmışlardır. 34 doku örneğinden %97'sinde PCR ile bruselloz tanısı konurken bu oran çeşitli kültür yöntemleri ile %29.4'te kalmıştır. Hastaların % 11.4'ünde serolojik testler ya negatif ya da tanı koydurucu değer altında çıkmıştır. RBT hastaların % 91.2'sinde pozitif çıkarken bu oran TAT ve Coombs'lu TAT sırasıyla %73.5 ve %88.5 olmuştur<sup>15</sup>.

Çalışmamızda; olguların sadece 3'ünde (%9) PCR ile pozitif sonuç elde edildi. Bu 3 hastadan 2'sinde kemik iliği pozitif saptandı. Yine bu hastalarda RBT ve

TAT pozitif saptanırken, iki olguda serum *Brucella* IgM titresi normal değer üzerinde bulundu. Çalışmamızda PCR'nin, serumdaki bakterinin saptanmasında anlamlı olmadığı görüldü. Bu sonuç, *Brucella* bakterilerinin kanda intraselüler yerleşim göstermesine, serumda çok az miktarda bulunmasına ve bazı hastalara tanı öncesinde başka sağlık kuruluşları tarafından çeşitli antibiyotiklerin verilmesine bağlandı.

Çalışmamızda, hastalarımızdaki karaciğer enzim yüksekliği üst sınırı 3 katını aşmamış ve bu enzim yükselmeleri tedavi ile 3 haftada normal düzeylere inmiştir. Olgularımızda transaminaz ve ALP yüksekliği sırasıyla %41 ve %28 olarak saptanmıştır.

CRP ve ESH inflamatuvar olaylarda artan akut faz reaktanlarıdır. Çalışmamızda tedaviden önce olguların 17'sinde (%53.1) ESH yüksek iken, tedaviden sonra sadece 3 (%9.3) hastada sedimantasyon yüksekliği devam etmiştir. CRP'nin yüksek saptandığı hasta sayısı ise tedaviden önce 21 (%65.6) iken tedavi sonrasında 10 (%31.25) olmuştur. Bu her iki akut faz reaktanı da tedavinin takibinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda, tedavi öncesinde çalışma grubunda BK sayısı 7.068±2.959 iken tedavi sonrasında 6.861±1.098 olmuştur. Bizim çalışmamızda BK'nin bruselloz tedavisinin takibinde anlamlı olmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak;

RBT hızlı sonuç veren, güvenilir ve ucuz bir tarama testidir.

Akut bruselloz tanısı pratik olarak klinik belirti ve bulguların varlığında TAT'ın pozitif olması ile konulabilmektedir. Yalnız, akut enfeksiyonlu olgularda hastalığın erken döneminde antikor titresinin düşük olabileceği akılda tutulmalıdır.

Brusellozun tanısında kan ve kemik iliği kültürü en değerli yöntemlerdir. Kan kültürünün elde edilme yöntemi kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Kemik iliği kültürü invaziv bir yöntem olması nedeniyle, klinik bulguları brusellozla ilgili olduğu halde serolojik test sonuçları negatif, nedeni açıklanamayan ateşi, artriti ve hematolojik bozuklukları olan olgularda öncelikli olarak yapılmalıdır.

PCR testinin, hastalığın tanısında serumda çalışılmasının değeri yoktur. Etkin sonuçları elde edebilmek için bruselloz düşünülen hastaların kan mononükleer hücreleri kullanılarak PCR uygulanmalıdır. Beyin omurilik sıvısı, eklem sıvıları, idrar, komplikasyon bulunan doku örnekleri de PCR için uygun alanlardır.

ELISA yöntemi ile *Brucella* türlerine karşı oluşan IgG ve IgM yapısındaki antikorların hastalığın tanı ve tedavisinin takibinde yeri olmakla birlikte özel ekipman gerektirmesi ve aglütinasyon testlerine göre duyarlılığının düşük olması yöntemin değerini zayıflatmaktadır.

## Bruselloz Tanı Yöntemlerinin Etkinliğinin Araştırılması

ESH ve CRP akut faz reaktanları olarak hastalığın tedavisinin izlenmesinde güvenle kullanılabilir testlerdir. BK sayısının takibi ise anlamlı değildir.

### Kaynaklar

1. Young EJ. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5 th edition. Philadelphia: Churchill – Livingstone; 2000: 2386-93.
2. Taşova Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, İnal S, Aksu HSZ. Bruselloz: 238 erişkin olgunun klinik, laboratuvar ve tedavi özelliklerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 1998; 12: 307-12.
3. Göktaş P, Sümer S, Oktay G, Göktaş S. Bruselloz tanısında iki testin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cem Dergisi* 1991; 21: 199-203.
4. Mert A, Tabak F, Dumankar A, Kadıoğlu P, Bilir M, Yavuz S, Soy M, Baliç İH, Gümüş M, Yazıcı H, Aktuğlu Y. Brusellozda karşılaşılabilecek hastalıklarda brusella antikorları aranması. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 1995; 26: 205-8.
5. Memish Z, Mah MW, Mahmoud SA, Shaalan MA, Khan MY. *Brucella* bacteremia: clinical and laboratory observations. *J Infect* 2000; 40: 59-63.
6. Çetin ET, Çoral B, Bilgiç A, Bilgehan E, Sipahioğlu Ü, Gürel M, Kılıçturgay K, Arıkan E, Özenci H, Babacan M, Mutlu G, Yılmaz S, Sarısayın F, Eroğlu M. Türkiye' de insanda bruselloz insidansının saptanması. *Tr J Med Sci* 1990; 14: 324-34.
7. Kostoula A, Bobogianni H, Vrioni G, et al. Detection of *Brucella* IgG, IgM and IgA antibodies with ELISA method in patients with brucellosis. 11<sup>th</sup> ECCMID 1-4 April 2001, Istanbul, Turkey. Congress Book; Abstract: P611.
8. Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 283-90.
9. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 131-40.
10. Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2673-4.
11. Gedikoğlu S, Helvacı S, Özakin C, Gökırmak F, Kılıçturgay K. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 730 and BACTEC 9120 systems. *Euro J Epidemiol* 1996; 12: 649-50.
12. Yagupsky P, Peled N, Pres J, Abu - Rashid M, Abramson O. Rapid detection of *Brucella melitensis* from blood cultures by a commercial system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 605-7.
13. Yagupsky P. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 660 blood culture system. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1899-901.
14. Casanas MC, Queipo – Ortuno MI, Rodriguez - Torres A, Orduna A, Colmenero JD, Morata P. 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* 2001; 20: 127-131.
15. Morata P, Queipo - Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez - Gonzalez JJ, Colmenero JD. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J. Clin Microbiol* 2001; p 3743-6.