

Derleme

İnsanda Brucella Enfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Tanı Yöntemleri

Diagnostic Methods of Brucella infection diagnosis in humans

Duygu Eren Dağlar¹, Betil Özihak Baysan²

¹Aydın Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Aydın

²Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Antalya

Özet

Bruselloz insana enfekte gıda ürünleri, enfekte hayvanlarla direkt temas veya aerosollerin solunması ile insana bulaşan bir hayvan hastalığıdır. Tüm dünyada görülmesine rağmen hastalık Akdeniz Havzası, Orta Doğu, Arap Yarımadası, Meksika, Orta ve Güney Amerika, Balkan Yarımadası ve Hint Yarımadasında daha yaygındır. Brusellozun tanımlanması ve hastaya uygun klinik yaklaşım için öncelikle ayırıcı tanıda hastalıktan şüphelenmek ardından uygun laboratuvar testlerinin uygulanması ve uygun antibiyotik tedavisinin uygulanması ile mümkündür. Bruselloz herhangi bir doku ve organı tutabilen çoklu sistem hastalığıdır. Çok çeşitli klinik belirtilerle seyredebileceğinden klinik tanısı güç bir hastalıktır. Bruselloz tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri arasında kültür, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler yer almaktadır. Bu makalenin amacı, bruselloz tanısında kullanılan tanı testlerini gözden geçirmek ve tartışmaktır.

Anahtar Kelimeler: *Brucella*, Laboratuvar Tanısı, Kültür, Seroloji, Moleküler Yöntemler.

Abstract

Brucellosis is a disease of animals that transmitted to humans by the ingestion of infected food products, direct contact with an infected animal or inhalation of aerosols. Although it occurs worldwide, brucellosis is more common in Mediterranean basin, Middle East, the Arabian Peninsula, Mexico, Central and South America, the Balkan Peninsula and the Indian subcontinent. The identification and clinical management of brucellosis requires a combination of clinical suspicion, appropriate laboratory tests and consideration of antibacterial therapy. Human brucellosis is a multisystem disease that may involve any organ or system. Therefore clinical diagnosis of brucellosis is difficult because of the wide spectrum of clinical manifestations associated with them. The diagnostic methods to detect *Brucella* spp include culture, serology and molecular tests. The aim of this article is to review and discuss the laboratory tests in the diagnosis of human brucellosis.

Key words: *Brucella*, Laboratory Diagnosis, Culture, Serology, Molecular Tests.

Tarihçe:

Bruselloz, Akdeniz Ateşi, Malta Ateşi, ondulan ateş gibi farklı isimlerle anılan *Brucella* cinsi bakterilerle oluşan zoonotik bir enfeksiyon hastalığı olup muhtemelen hayvanların evcilleştirilmesinden günümüze var olan bir hastalıktır. Ancak ilk olarak Malta Adası'nda bulunan İngiliz Askeri Birliğinde Dr.David Bruce brusellozdan ölen İngiliz askerinin dalağından bakteriyi izole etmiştir. Daha sonra 1895 yılında Danimarka'lı hekim Bernhard Bang *Bacillus abortus* (*Brucella abortus*) adını verdiği bakteriyi düşük yapan sığırdan, 1914 yılında ise Traum *B. suis*'i domuzlardan izole etmiştir (1). *Brucella* genusunda hastalığa en sık yol açan tür olan *B. melitensis* dışında *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotoma*, *B. delphini*, *B. pinnipediae* ve *B. cetaceae* yer almaktadır (2).

Tüm dünyada görülmesine karşılık Akdeniz Havzası, Orta Doğu, Arap Yarımadası, Meksika, Orta ve Güney Amerika, Balkan Yarımadası ve Hint Yarımadasında daha yaygındır (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre bruselloz dünyada en sık rastlanan bakteriyel zoonotik enfeksiyon olup ve her yıl yaklaşık 500.000 yeni olgu bildirilmektedir (3).

Bruselloz Türkiye'de endemik olarak görülen bir hastalıktır. DSÖ verilerine göre 2005 yılında 14639 (21.48/100000) olarak bildirilen vaka sayısı yıllara göre azalmakla birlikte, 2010 yılında 7702 (10.59/100000) vaka bildirilmiştir (4).

Epidemiyoloji:

Hastalık başta pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri olmak üzere enfekte besinlerin yenmesi, enfekte hayvan dokuları ile direkt temas veya enfekte partikülleri içeren aerosollerin solunması ya da kazayla burun, göz ve ağıza inokülasyonu

ile insana bulaşır. Kan ve kemik iliği nakli, cinsel temas ve sperm bankaları yoluyla bulaşma saptanan nadir vakalar bildirilmiştir. Etkenin anne sütünde bulunması nadir görülen yenidoğan bruselloz vakalarının bulaş yolunu açıklayabilir. Bruselloz laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar arasında da önemli bir yer tutar. (2).

Klinik ve Patogeneze

Bruselloz; gece terlemeleri, ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, halsizlik, poliartralji gibi nonspesifik semptomlarla karakterize olan, hemen hemen her organ sistemini etkileyebilen bir hastalıktır (5). Deri, hematolojik, gastrointestinal, genitouriner, solunum, osteoartiküler, kardiyovasküler ve nörolojik bozukluklarla seyredebilir. Klinik belirtilerin çok geniş spektrumlu olması nedeniyle bruselloz bir çok enfeksiyon hastalığının yanında enfeksiyöz orjinli olmayan hastalıklarla da karışabilmektedir. *Brucella* türleri intrasellüler bakteriler olmaları nedeniyle mononükleer fagositik hücrelerde yaşamlarını sürdürüp çoğalma yeteneğindedirler. Bu özellikleri nedeniyle bruselloz fokal komplikasyonlar ve relapsların görülebildiği uzun süren, kronikleşebilen bir hastalıktır. Spondilit, sakroileit ve artrit gibi osteoartiküler belirtiler en sık görülen fokal komplikasyonlar iken, endokardit ve nörobruselloz en fazla ölüme yol açan komplikasyonlardır (5).

Laboratuvar Tanısı:

Tanıda kültür, seroloji ve/veya moleküler testler kullanılmaktadır.

Kültür: Brusellozun kesin tanısı kan, kemik iliği, diğer dokular ve vücut sıvılarından bakterinin izolasyonu ile konur. Bakterinin izolasyon oranları hastalığın dönemine,

hastanın önceden antibiyotik tedavisi alıp almamasına, kültürü yapılan örneğe göre değişir. Bifazik Ruiz-Castaneda şişelerinin kullanıldığı konvansiyonel kan kültüründe 6 hafta gibi uzun inkübasyon süresi gerekmektedir. Bu yöntem ile üreme oranları akut vakalarda %40-90 iken kronik ve komplike vakalarda %5-20'lere düşmektedir. Lizis santrifüjasyon yöntemi ile üreme oranları konvansiyonel yöntemle göre daha yüksek olup akut vakalarda %90, kronik vakalarda ise %70'lere ulaşabilmektedir (6). Yöntem santrifüj aşamasının ardından besiyerine ekim işlemlerini içermekte, bu işlemler sırasında aerosol oluşumuna yol açarak laboratuvar çalışanları için tehlike oluşturabilmektedir (2). BACTEC ve BactAlert gibi otomatize kan kültür sistemlerinde izolasyon oranları konvansiyonel yöntemle göre daha yüksektir. Otomatize sistemlerde vakaların büyük bölümünde etken yedi günden daha kısa sürede izole edilmektedir (7). Kemik iliği kültürlerinde izolasyon oranları periferik kan kültürlerine göre %15-20 daha fazladır (2). Kemik iliği kültürleri antimikrobiyal tedavi alan hastalarda daha başarılıdır (5).

Serolojik Testler: Brusellozun tanısında en yaygın kullanılan testlerdir. Hastalığın ilk haftasında IgM antikor yanıtı, ardından 10-14 gün içinde IgG antikor yanıtı ortaya çıkar (2). Her iki antikor tipi dördüncü haftada pik yapar. Hastalığın erken döneminde serolojik testler negatif çıkabileceğinden klinik olarak bruselloz şüphesi olan vakalarda serolojik testlerin 1-2 hafta sonra tekrarlanması gerekmektedir (5). Serolojik testler tedaviye yanıtın izlenmesine de olanak sağlar. Antikor titreleri uygun tedavinin başlanmasından sonra azalmaya başlar ancak tedavi başarısına ve negatif kan kültürlerine rağmen, vakaların %15-20'sinde anlamlı yüksek titrelerin (genellikle IgG ve bazen IgM) aylar hatta yıllarca devam edebildiği gösterilmiştir (2, 5). Bu durum aktif enfeksiyon, geçirilmiş enfeksiyon ve klinik olarak önemi olmayan *Brucella* türleri ile temas sonucu oluşan yanıtı ayırt etmeyi güçleştirmektedir. IgG antikorlarının hızlı düşüşü başarılı tedavi için prognostik gösterge iken, tedavi sonrası persistan yüksek IgG titreleri aktif hastalığa işaret edebilmektedir. Fokal komplikasyonu olan hastalarda antikor titreleri daha yavaş düşer, relaps olduğunda ise IgG ve IgA antikorlarında ikinci bir yükselme görülür, IgM antikorlarında ise yükselme görülmez.

Serolojik tanı yöntemlerinde genellikle *B. melitensis* ve *B. abortus*'tan elde edilen çeşitli antijenler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılan antijen smooth lipopolisakarit (S-LPS)'tir. S-LPS antijeni *Escherichia hermanni*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1 ve *Yersinia enterocolitica* O:9 LPS'i ile çapraz reaksiyon verebilmektedir. *B. canis* ve *B. suis* pürütlü koloniler oluşturduğundan bu türlerle oluşan enfeksiyonlarda S-LPS antijenlerinin kullanıldığı serolojik testlerle negatif sonuç elde edileceğinden, bu türlerle oluşan enfeksiyonlarda tanı testlerinde dış membran protein antijenleri kullanılmalıdır (2).

Rose Bengal Testi (RBT): Rose Bengal boyası ile boyanmış *B. abortus* 1119-3 (USDA) suşunun asit tampondaki süspansiyonunun antijen olarak kullanıldığı kart formatında bir aglütinasyon testidir. S-LPS spesifik IgM, IgG ve IgA antikorlarını saptar. Brusella enfeksiyonu geçirmemiş veya *Brucella* türleri ile temas öyküsü olmayan hastalarda tanı değeri yüksektir (5). Test akut ve kronik olgularda eşit tanı değerine sahiptir, antijen süspansiyonu asit tamponda hazırlandığı için de test sonuçları prezon fenomeni (hasta serumunda antikor fazlalığı nedeniyle düşük

sulandırılarda aglütinasyonun görülmemesi olayı) ve blokan antikorlardan etkilenmez (8). Testin duyarlılığı %99'un üzerindedir, ancak *Brucella* türleri ile temas etmiş sağlıklı bireylerde ve antijen olarak S-LPS kullanıldığından diğer gram negatif bakterilerle çapraz reaksiyon sonucu yalancı pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir (9). Bu nedenle DSÖ RBT ile elde edilen pozitif sonuçların diğer testlerle doğrulanmasını önermektedir (8). Ruiz Mesa ve ark.'nın (10) yaptığı bir çalışmada bruselloz geçirme öyküsü ve temas öyküsü olmayan bireylerde testin duyarlılık ve özgüllüğü %93.8; %94.3, *Brucella* türleri ile tekrarlayan teması olan bireylerde testin duyarlılık ve özgüllüğü %91.7; %91.2; bruselloz geçirme öyküsü olan bireylerde testin duyarlılık ve özgüllüğü %96.1; %76.9 olarak bildirilmiştir. Gomez ve ark. (11) brusellozun endemik olduğu bir bölgede yaptıkları çalışmada RBT'nin duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %100 ve %97 olarak saptamışlardır.

Serum aglütinasyon testi (SAT): 1897 yılında Wright ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem bruselloz tanısında referans yöntem olarak kabul edilir (11). Yöntem ile total antikorlar (IgM, IgG ve IgA) saptanır. Testin duyarlılığı %92 özgüllüğü ise %100'dür (12). Olası prezon fenomeni serum dilüsyonunun 1:1280'e uzatılması ile önlenir. Standardize edilmiş antijen ile test uygulandığında test ile elde edilen titreler hastalığın dönemleri ile uyumludur. Beraberinde uyumlu bir klinik tablo ve temas öyküsü varsa, 1:160 ve üzerindeki titreler genellikle aktif brusellozu gösterir (5, 9). Hastalığın başlangıç döneminde hatta bakteriyemik hastalarda titre 1:160'ın altında olabilir. İki serum örneği arasındaki süre iki haftadan az olmayacak şekilde akut ve konvelesan dönemde alınacak serum örneklerinde titrenin dört kat veya üzerinde artması enfeksiyonu kanıtlar. 1:160'ın altındaki titrelerin tanıyı ekarte edemeyeceği, bazı vakaların akut dönemde negatif olabilmesi, çift serum örneği alınmadan tanının gözden kaçırılabilceği unutulmamalıdır. Komplike vakalar ve kronik vakalarda yalancı negatif sonuç elde etme oranı yüksektir. Kronik vakalarda oluşan blokan antikorlar nedeniyle elde edilen yalancı negatif sonuç Coombs testi veya Brucellacapt testlerinin uygulanması ile giderilebilir. Tedavi başarısı ve SAT titrelerinin düşüklüğü arasında korelasyon bulunduğu hastalar klinik ve serolojik olarak takip edilmelidir. Kliniği düzelen hastanın ne kadar süre serolojik olarak takip edileceği belirlenmemiştir. Başarılı antibiyotik tedavisi ile klinik kür elde edilen hastaların %3-5'inde iki yıl sonra SAT titreleri yüksek olarak saptanabilmektedir (5).

Coombs testi: Blokan, aglütine olmayan, eksik antikorları saptamak için kullanılan bir testtir. Test kronik seyirli hastalıkta ve relaps sırasında *Brucella* antikor titrelerindeki küçük değişikliklerin saptanmasına olanak sağlar. Testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %92-%100'dür (13).

Brucellacapt testi: Brucellacapt (Vircell, İspanya) immün yakalama temelli kolay uygulanan ve 18-24 saatte sonuç alınan bir testtir (2). Blokan antikorlarda dahil olmak üzere total antikorları saptayan test Coombs testinin alternatifidir. Persistan hastalığı olan bireylerde Brucellacapt testi ile saptanan yüksek titreler hastanın takibi sırasında yavaş düşme gösterir (5). Yapılan bir çalışmada persistan hastalığı olan olguların %90'ında tedavinin başlangıcında $\geq 1:2560$ olan titrelerin tedavinin 15. ayına gelindiğinde, hiçbirinde 1:320'nin altına düşmediği gösterilmiştir (14). Özellikle relaps gelişen hastalarda Brucellacapt ve Coombs testi ile titrelerin çok yavaş azalma gösterdiği, SAT ile karşılaştırıldığında titrelerde dönem dönem artışların olduğu

gözlenir. Bu değişiklikler bakteremik relapslarda daha belirgindir. Başarılı tedavi ve klinik olarak iyileşmenin ardından Brucellacapt testinde SAT ve Coombs testlerine göre titrelerde daha belirgin ve daha hızlı bir azalma saptanır (5). Bu nedenle Brucellacapt testi enfeksiyonun aktivitesinin belirlenmesinin iyi bir göstergesidir, özellikle hastaların izlenmesinde yararlı bir testtir. Ancak relaps ve kronik hastalığı olan bazı hastalarda düşük afiniteli antikorlarda küçük değişiklikler gözlenir, bu değişiklikler en iyi Coombs testi ile saptanır.

ELISA: Yöntem ile total immünglobulin ya da tek tek IgM, IgG, IgA antikorları saptanabilmektedir. İlk çalışmalarda bruselloz tanısında etkin bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Gomez ve arkadaşlarının çalışmasında (11) IgM; IgG; IgA ELISA testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %60-%100; %84-%100; %96-%98 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar ticari ELISA IgM testinin düşük duyarlılıkta olduğunu, ELISA testlerinin konvansiyonel testlere üstünlüğünün olmadığını belirtmişlerdir. Çeşitli çalışmalarda ELISA yöntemi ile ilgili bildirilen yüksek duyarlılık ve özgüllük ile ilgili olarak, farklı ticari kitlerde farklı antijenlerin kullanılması bu duruma yol açabileceğini belirtmişlerdir. Welch RJ ve ark. (15) çalışmalarında ELISA IgG ve IgM sonuçlarını SAT ile karşılaştırmışlardır. IgG ve IgM için genel uyum, duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %56.3, %41.7, %65; %77.4, 83.3, 73.7 olarak saptamışlardır. Düşük özgüllük neticesinde ortaya çıkabilecek yalancı pozitif sonuçlar nedeniyle Centers for Disease Control and Prevention, aglütinasyon temelli olmayan testlerin bruselloz tanısının doğrulanmasında kullanılmamasını önermektedir.

Moleküler Yöntemler: Direkt klinik örneklerde *Brucella* türlerinin saptanmasında konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve real-time PZR testleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde BCS P31 (31-kDa'luk hücre yüzey proteinini kodlar), BP26 (26-kDa'luk periplazmik proteini kodlar), 16SrRNA ve insertion sequence IS711 gibi *Brucella* türlerine spesifik hedef gen bölgeleri kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılığı %50-%100 arasında değişmektedir. Duyarlılıklardaki farklılık kullanılan DNA ekstraksiyon yöntemleri, saptamada kullanılan yöntemler ve kullanılan klinik örneğin farklılığına bağlı olabilir. Moleküler testler bruselloz tanısında rutinde kullanılan diğer testlerin yanında yardımcı test olarak kullanılabilecek, gelecek için ümit verici testlerdir. Ancak rutin tanıda yer alabilmeleri için standardize edilmelerine ihtiyaç vardır (2).

Sonuç olarak dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam eden Bruselloz tanısında; kullanılacak testlerin standardizasyon, yalancı negatif ve yalancı pozitif sonuç verme gibi kısıtlamalarının olması ve hastalığın klinik döneminin önemi göz önünde bulundurulmalıdır.

Kaynaklar

1. Young EJ. Brucella species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2921-25.
2. Petersen JM, Schrieffer ME, Araj GF. Francisella and Brucella. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington DC; 2011. p. 751-69.
3. Chen Z, Wang Y, Wang Z, Ke Y, Zhen Q, Yuan X, Zhang W, Lu Y, Song H, Huang L. Improvement and advancement of early diagnosis of human brucellosis in window period. Clin Infect Dis 2013; 57(2): 322-3.
4. <http://data.euro.who.int/cisid/>
5. Dhauk SA, Nöckler K. Implication of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. Expert Rev Anti Infect Ther 2011; 9(7): 833-45.
6. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis 2007; 7: 775-86.
7. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents 2010; 36(1): 12-7.
8. Diaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyon I. The Rose Bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. Plos Negl Trop Dis 2011; 5(4): e950.
9. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. Geneva (Switzerland): World Health Organization 2006.
10. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzales J, Reguera JM, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero JD. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin Microbiol Infect 2005; 11(3): 221-5.
11. Gómez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escibano MA, Muñoz A, López C. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. Clin Vaccine Immunol 2008;15(6):1031-3.
12. Guerrier G, Daronat JM, Morisse L, Yvon JF, Pappas G. Epidemiological and clinical aspects of human Brucella suis infection in Polynesia. Epidemiol Infect 2011; 139: 1621-5.
13. Alışkan H, Çolakoğlu S, Turunç T, Demiroğlu YZ, Yazıcı AC, Arslan H. Brusellozun tanısında Brucellacapt testinin tanı değerinin araştırılması. Mikrobiyol Bül 2007; 41: 591-5.
14. Mile B, Katerina S, Zaklina S, Ivan V. The role of Brucellacapt test for follow-up patients with brucellosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2010; 33: 435-42.
15. Welch RJ, Litwin CM. A comparison of Brucella IgG and IgM ELISA assays with agglutination methodology. J Clin Lab Anal 2010; 24:160-2.

Sorumlu Yazar:

Duygu Eren DAĞLAR

Aydın Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
AYDIN