

Adıyaman ilinde kan kültürlerinden izole edilen brucella türlerinin identifikasyonu

The identification of brucella species isolated from blood cultures in Adıyaman province

Sadık Akgün¹, Gülnur Tarhan¹, Hakan Sezgin Sayiner²

¹Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD Adıyaman, Türkiye

²Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları AD Adıyaman, Türkiye

Geliş Tarihi: 16.10.2017

Kabul Tarihi: 07.11.2017

Doi: 10.21601/ortadogutipdergisi.344696

Öz

Amaç: Brucellosis, brucella cinsi bakterilerin neden olduğu tüm dünyada hem hayvanlarda hem de insanlarda yaygın olarak görülen zoonotik bir enfeksiyondur. Bu çalışmada, Adıyaman ilinde izole edilen brucella cinsi bakterilerin türlerinin identifikasyonu yapılarak, biyotip dağılımı ve profillerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Kan kültürlerinde brucella cinsi bakteriler üreyen 40 hasta (22 erkek, 18 kadın) çalışmaya dahil edildi. Hasta örnekleri, kan kültürü için 10 gün boyunca inkübe edildi. Pozitif sinyal veren örnekler, %5 koyun kanlı agar besiyerine ekildi. 48 saat, 37 °C'lik sıcaklıktaki bir inkübatörde üremesi sağlandı. Gram boyama ile Gram negatif kokobasil olarak tesbit edilenler için, serolojik doğrulama yapıldı. Kültür antibiyogram cihazı kullanılarak identifiye edildi. Genotiplendirilmeleri için, Polymerase Chain Reaction yöntemi (PCR) kullanılarak çalışıldı.

Bulgular: Çalışmaya alınan 40 hastanın 22'si erkek, 18'i kadındı. İzole edilen bakterilerin tümü, tam otomatize kültür antibiyogram cihazı ile *Brucella melitensis* olarak saptandı. Biyovar tiplendirme çalışması, nedeni anlaşılamayan bir inhibisyondan dolayı, nükleik materyal amplifikasyonu başarısızlıkla sonuçlandı.

Sonuçlar: Ülkemizde olduğu gibi ilimizde de insanlarda bruselloz olgularının büyük çoğunluğunda etken olarak *Brucella melitensis* saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Brucella melitensis*, identifikasyon, kan kültürü

Abstract

Aim: Brucellosis is a zoonotic infection that is common in both animals and humans all over the world, caused by rucella bacteria. In this study, it was aimed to identify species of brucella bacterial isolates isolated in Adiyaman province and to determine biotype distribution and profiles.

Material and Method: Forty patients (22 males, 18 females) that brucella grew in their blood cultures, were included in the study. Patient samples were incubated for 10 days for blood culture. Positive signaling samples were plated on 5% sheep blood agar medium. Then, they were incubated for 48 hours at 37 °C. For those who were identified as Gram negative coccobacilli, using by Gram staining, serologic confirmation was performed. The bacterial strains were identified using an antibiogram device. For the genotyping, the Polymerase Chain Reaction (PCR) method was used.

Results: Of the 40 patients included in the study, 22 were male and 18 were female. All of the isolated bacteria were detected as *Brucella melitensis* with fully automated culture antibiogram device. The biovar studying failed due to an unknown inhibition in the amplification of the nucleic acid material.

Conclusion: As in our country, *Brucella melitensis* was detected as the causative factor in the majority of cases of brucellosis in humans, in our province too.

Keywords: *Brucella melitensis*, identification, blood culture

Giriş

Bruselloz; brusella cinsi bakterilerin neden olduğu, bütün dünyada özellikle de Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde, hem hayvanlarda hem de insanlarda yaygın olarak görülen zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır [1,2] Brucellaceae ailesinde enfeksiyonlara neden olan *Brucella abortus* (*B. abortus*), *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae* olmak üzere 6 önemli tür yer almaktadır [3]. Sığırları etkileyen *B. abortus*, domuzları etkileyen *B. suis*, koyun ve keçileri etkileyen *B. melitensis* türleri enfeksiyona sebep olan başlıca türlerdir ve konakçıya özgü olmayıp uygun koşullar atında kolayca diğer türlere ve insanlara bulaşabilmektedir [1-2].

İnsanlarda görülen bruselloz olgularının çoğundan *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* türleri sorumlu olup, *B. melitensis* insan brusellozunun nedeni olarak en sık rapor edilen tiptir ve vakalardan sıklıkla izole edilmektedir. Sığırlarda ve diğer büyük baş hayvanlarda enfeksiyon oluşturan *B. abortus* ise dünya genelinde özel bir coğrafi dağılım göstermemektedir. Ve en virulan tip olup şiddetli akut hastalıkla ilişkilidir. *B. suis*; *B. melitensis* ve *B. abortus*'dan daha az görülmektedir. *B. canis*, birçok ülkede köpeklerin yaygın enfeksiyon etkenidir. İnsan brusellozu etkeni olarak seyrek rastlanılmaktadır. Rapor edilen vakalar genellikle hafif seyirlidir [2-4].

Bu türler fenotipik ve antijenik özelliklerine göre biyovar (bv)/biyotiplere ayrılmaktadır. *B. melitensis*'in üç, *B. abortus*'un yedi, *B. suis*'in beş biyovarı bulunurken diğer türlerin ise birer biyovarı bulunmaktadır. *Brucella* türlerinde konak özgüllüğü kesin olmayıp, *B. melitensis* ve *B. suis* gibi türlerde çapraz enfeksiyonlar görülebilmektedir. Brusella türlerinin tanımlanması ve biyotiplendirilmesi, kontrol ve eradikasyon programlarının hazırlanması, bölge veya ülke düzeyinde hakim olan tür/biyotiplerin belirlenmesi, yeni biyotiplerin saptanması, aşı suşlarının takibi ve serolojik tanıda kullanılan optimal suşların seçimi bakımından önemlidir [5-8].

Hastalığın yaygınlığı, farklı bölgelerde nüfusun sosyal ve kültürel özelliklerine göre değişmektedir. DSÖ'nün verilerine göre bruselloz dünyada en sık rastlanan bakteriyel zoonozdur ve her yıl 500.000'den fazla yeni olgu bildirilmektedir [4-9].

Ülkemizde bruselloz, endemik bir enfeksiyon olup, her yaş ve cinsiyette görülmekte olup, hastalık görülme oranı 15-35 yaş arasında en yüksektir. Cinsiyetler arasında görülme sıklığı olarak belirgin bir fark görülmemektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1970 yılında 37 olarak bildirilen olgu sayısı (0.1/100.000) giderek artış göstermiş ve 2004 yılında 18.563 (25.6/100.000) olgu saptanmıştır.

Türkiye’de özellikle Ankara ovasında, Konya yöresinde, Güneydoğu Anadolu’da, Diyarbakır ve Urfa yörelerinde yaygındır. Hastalık kırsal kesimde büyük şehirlere oranla daha sık görülmektedir [6-11].

Brucelloz çok çeşitli manifestasyonlarla ve kardiyovasküler, hematopoetik, iskelet sistemi, sinir sistemi, deri ve gastrointestinal sistem gibi birçok sistem tutulumuyla belirebilir. Tedavide ana amaç, hastanın semptomlarının ve komplikasyonlarının azaltılması, relapsların önlenmesidir. Bakteriler hücre içinde yerleşim gösterdiği için tedavide birden fazla antibiyotiğin uzun süre (6-8 hafta) uygulanması gereklidir [3,11,12].

Son zamanlarda moleküler yöntemlerin enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılmaya başlanmasıyla, özellikle laboratuvar tanısı zor veya uzun süreler alan enfeksiyon etkenlerinin de kısa sürede tanısı ve tiplendirilmesi mümkün hale gelmiştir. Brusellanın rutin tanısında da bugün çeşitli teknolojilere dayalı moleküler yöntemler rutin tanı laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte konvansiyonel yöntemler ile kültür halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Brusella izolatlarının tür ayrımında serolojik ve biyokimyasal testler pratikte kullanılmakla birlikte kesin sonuç uzun zaman almaktadır. Bu nedenle son yıllarda moleküler yöntemler Brusella tanısı, biyotiplendirmesi ve tür ayrımında tercih edilmektedir [13-21].

Gereç ve Yöntem

Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na 2015-2017 tarihleri arasında gönderilen ve kan kültürlerinde brucella cinsi bakteriler üreyen 40 hasta (22 erkek, 18 kadın) çalışmaya dahil edildi. Çalışmada kullanılan kitler ve sarf malzemeleri Adıyaman Üniversitesi TIPFMAP/2015-0007 kodlu Bilimsel Araştırma Projesi desteği ile temin edilmiştir. Hastalardan alınan kan örneklerinden kan kültürü aerob şişelerine (Aerob Vial, BD, USA) 5-10 ml kadarı inoküle edildi. Bu şişeler, 10 gün boyunca inkübasyon cihazında (Bactec Fx, BD, USA) inkübe edildi. Pozitif sinyal veren örneklerden, bir enjektör yardımıyla birkaç damla alınarak, içinde %5 koyun kanlı agar besiyeri olan plaklara ekim yapıldı. Plaklar, 48 saat, 37 °C’lik sıcaklıktaki bir

bakteriyolojik inkübatörde bekletilerek bakteri üremesi sağlandı. Üreyen mikroorganizmalardan, Gram boyama sonucu Gram negatif kokobasil olarak tesbit edilenler, brucella antiserumundan 1-2 damla ile birkaç koloni bakteri bir lam üzerinde karıştırılıp, 5-10 dakikada antijen-antikor aglütinasyonu görülerek, serolojik doğrulama yapıldı. Tekrar %5 koyun kanlı agar besiyeri olan plaklara pasaj yapıp, 48 saat bakteriyolojik inkübatörde bekletildikten sonra üremesi olgunlaşan kolonilerden, tam otomatize kültür antibiyogram cihazına (Vitek-2 Compact, Biomerieux, France) üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygun kitler (GN, Biomerieux, France) kullanılarak identifiye edildi. Biyovar tiplendirilmesi için mikroorganizmalar, real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) yöntemi, üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygun kitler (Brucella QLP2.0, fluorion, iontek), izolasyon cihazı (MagPurix System, Taiwan) ve detection sistemi fluorion detection system, iontek, China) kullanılarak çalışıldı.

Bulgular

Çalışmaya alınan hastaların 22 (%55)’si erkek, 18 (%45)’i kadın ve yaş ortalaması 43,5 olup, en küçük hasta 16, en büyük hasta ise 86 yaşındaydı. İzole edilen bakterilerin tümü (%100) tam otomatize kültür antibiyogram cihazı (Vitek-2 Compact, Biomerieux, France) ile *B. melitensis* olarak saptandı. Biyovar tiplendirme için çalışmaya alınan mikroorganizmalar, nedeni anlaşılamayan bir inhibitör etkenden dolayı, nükleik materyal amplifikasyon ve kopyalama sayısında yeterli düzeye ulaşamadığından test başarısızlıkla sonuçlandı.

Tartışma

Uygun tedavi ve eradikasyon çalışmaları ile birçok gelişmiş ülkede prevalansı giderek azalan brucelloz ülkemiz ve özellikle bölgemiz için hala endemik bir hastalıktır. Brusellozun insanlarda oluşturduğu hastalığın önemi, tanı ve tedavisinin zor uzun olup, kronik morbiditeye yol açmasıdır (3,17-21).

Cekovska ve ark. [22] çalışmasında, 16 kan kültüründen, *Brucella* türünün izole edilmesinde Bact /Alert inkübasyon sistemi ile, otomatize VITEK 2 kompakt sistemi kullanılarak alınan sonuçlara göre; suşların tümü *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda da tüm suşlar *B. melitensis* olarak identifiye edildi.

Çerekçi ve ark. [6] bruselloz tanısı almış hastaların klinik örneklerden izole edilen 187 Brusella suşunun, konvansiyonel yöntemler ile tür/biyovarlarının saptanması ve konvansiyonel yöntemlere alternatif olabilecek multipleks-gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (M-RT-PCR) yönteminin performansının değerlendirildiği çalışmada, konvansiyonel yöntemler ile Brusella suşlarının tamamı B. melitensis biyovar 3 olarak tanımlanmıştır. M-RT-PCR yöntemi ile de suşların tamamı B. melitensis olarak saptanmıştır. M-RT-PCR yönteminin sonuçları, referans yöntem olarak kabul edilen konvansiyonel biyotiplendirme ile %100 uyumlu olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayı destekleyen bulgular elde edilmiş olup, çalışılan suşların tümü B. melitensis olarak tesbit edilmiştir.

Zahidi ve ark. [23], Malezya'da, bruselloz tanısı almış 41 hastanın kan kültüründen elde edilen izolatların, gram boyama, oksidaz testi vb. konvansiyonel yöntemlerle tesbit edilerek, high-resolution melt (HRM) analizine tabi tutulmuş. Analiz sonucuna göre; 41 suşun 40'ı B. melitensis olarak tesbit edilirken, 1'i B. canis olarak tanımlandı. Çalışmamızın sonuçlarına yakın bir değer elde edilmiştir.

Kuveyt'te yapılan ve 75 brusella isolatının, konvansiyonel yöntemler 4 farklı moleküler yöntem (16S rRNA gene sequencing, real-time PCR, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR ve multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)-8, MLVA-11 ve MLVA-16) ile tanımlandığı çalışmada türlerin tümü B. melitensis olarak tesbit edilmiştir [24]. Bizim çalışmamızda da türlerin tümü B. melitensis olarak tesbit edilmiştir.

Ülkemizde ve özellikle de bölgemizde bruselloz vakaları ve tedavi protokolü toplum sağlığı açısından önemini korumaktadır. Özellikle rekürren ya da tedaviye yanıtız olgularda biyotiplendirme gerekebilmektedir. Mevcut yöntemlerle biyotiplendirme zor olmakta hatta sonuç alınamamaktadır. Dolayısıyla tanıda, biyotiplendirmenin daha kolay bir şekilde yapılabilmesi ile ilgili çalışma yapılmasının faydalı olacağı kanısındayız.

Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi TIPFMAP/2015-0007 kodlu Bilimsel Araştırma Projesi desteği ile yapılmıştır. Yazarların çıkara dayalı bir ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

1. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 199-204, 10. Baskı, Barış Yayınları, Fakülte Kitabevi, İzmir, 2000.
2. Gotuzzo E, Cellillo C. Brucella. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (Eds). Infectious Diseases. 2nd Edition. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1992;1513-21.
3. Yuce A, Alp Cavus S. Brucellosis in Turkey. A review. Klimik Journal 2006;19:87-97.
4. Lindquist D, Chu MC and Probert WS. (Ceviren Z. Cetinkaya): Francisella ve Brucella, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (Eds) (Çeviri Ed: A. Basustaoğlu): Klinik Mikrobiyoloji 9. Baskı:815-834, Atlas Kitapçılık, Ankara 2009.
5. Kose S, Kilic S and Ozbel Y: Identification of Brucella species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey, J Basic Microbiol 2005;45:23-327.
6. Cerecki A, Kilic S, Bayraktar M, Uyanik MH, Ekrem Yasar E, Esen B. Comparison of Conventional Methods and Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification and Typing of Brucella Isolates of Human Origin. Mikrobiyol Bul 2011;45:392-400.
7. Hall WH: Modern chemotherapy for brucellosis in humans, Rev Infect Dis 1990; 12:1060-99.
8. Ozsut H: Bruselloz tedavisi. Klimik Derg 1990;3:26-9.
9. Rolain JM, Maurin M and Raoult D: Bactericidal effect of antibiotics on Bartonella and Brucella spp.: clinical implications, J Antimicrob Chemother 2000;46:811-4.
10. Anđ O ve Yumuk Z: Bruselloz. Cev: Madkour's Brucellosis. Ed: M.M. Madkour, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.
11. Smith LD and Ficht TA: Pathogenesis of Brucella. Crit Rev Microbiol 1990;17:209-30.
12. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ and Colmenero JD: Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis, J Clin Microbiol 2001;39:3743-6.

13. Bricker BJ, Ewalt DR and Halling SM: Brucella 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs), *BMC Microbiol* 2003;11:15.
14. Coppola N: New diagnostic frontiers in brucellosis, *Infez Med* 2001;9:130-6.
15. Eşel D, Sümerkan B, Ayangıl D, Telli M. Brucella melitensis suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Agar Dilüsyon ve E-Test yöntemlerinin karşılaştırılması. *ANKEM Derg* 2004;18:196-9.
16. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004;4:115-23.
17. Cengiz AT ve Dolapçı Gİ: Brucella'ların özellikleri ve brusellozda tanı yöntemleri, *Ankara Ü Tıp Fak Mec* 1997;50:41-6.
18. Aktas O: Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı, *ANKEM Derg* 2003;17:336-9.
19. Young EJ. Brucella species. In: Mandel GI, Bennet JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone. Philadelphia 2000;2386-93.
20. Sozen TH. Bruselloz. In "İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi" Eds. Willke Topcu A, Soyletir G, Doğanay M. 486-91, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1996.
21. Kılıç D, Kurt H, Sozen TH, Kandilci S. Kan Kültürlerinden izole edilen brucella cinsi bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları ve klinik yönünden değerlendirilmesi, *İnfeksiyon Derg* 1994;8:59-62.
22. Cekovska Z, Petrovska M, Jankoska G, Panovski N, Kaftandzieva A. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of brucella blood culture isolates. *Prilozi* 2010;31:117-32.
23. Zahidi JM, Yong TB, Hashim R, Noor AM, Hamzah SH, Ahmad N. Identification of Brucella spp. isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis. *Diagn Microbiol and Infect Dis* 2015;81:227-33.
24. Mustafa AS, Habibi N, Osman A, Shaheed F, and Khan MW. Species identification and molecular typing of human Brucella isolates from Kuwait. *PLoS One* 2017;12: e0182111.

Sorumlu Yazar: Sadık Akgün, Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 400 Yataklı Ünitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, 02200 Adıyaman, Türkiye
E-mail: sakgungizem@hotmail.com