

Akut bruselloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kullanımı

Diagnosis of acute brucellosis by polymerase chain reaction technique

Sabahat ÇEKEN¹, Sedat KAYGUSUZ², Dilek KILIÇ², Canan AĞALAR³

ÖZET

Amaç: Bruselloz, pek çok ülkede olduğu gibi ülkemiz için de önemli bir halk sağlığı sorunu olan zoonozdur. Özgül olmayan şikayetler ve bulgularla seyreden hastalığın tanısında altın standart olan kültürde bakteriyi üretmek oldukça zor ve zaman alıcıdır. Rutinde daha sık kullanılan serolojik yöntemlerin çapraz reaksiyonlardan dolayı özgülüğü düşüktür. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler yöntemler pek çok enfeksiyon hastalığı gibi brusellozun erken ve hızlı tanısında iyi bir alternatif yöntemdir. Bu çalışmada, bruselloz tanısında PZR yönteminin konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılması amaçlandı.

Yöntemler: Çalışma grubu bruselloz ön tanı 35 hasta ve 20 sağlıklı gönüllüden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundan serolojik çalışma için serum, PZR için tam kan alınırken, hastalardan ateşli oldukları dönemde kan kültürleri alındı. Tam kan örneklerinden elde edilen lökosit pelletlerinden DNA izolasyonu yapıldı ve brusella DNA' sını in house PZR yöntemiyle tespit edildi.

Bulgular: Hastaların Standart tüp aglütinasyon (SAT) değeri 1 olguda 1/80 iken, diğerlerinde $\geq 1/160$ idi. Bunların 16'sında kan kültürü pozitif bulundu. Kontrollerin SAT değerleri negatif idi. PZR yöntemiyle yapılan çalışmada hastaların %97'sinde pozitiflik saptanırken kontrollerin hepsi negatif bulundu.

ABSTRACT

Objective: Brucellosis is a zoonotic disease which is a public health problem in our country like many parts of the world. The illness has nonspecific symptoms and physical signs. Bacterial culture is gold standard in the diagnosis of brucellosis but it is difficult and time consuming, so serologic techniques are used routinely. But serologic techniques have low specificity because of cross reactions. Molecular methods like polymerase chain reaction (PCR) are good alternatives in the early and rapid diagnosis of brucellosis, as it is in other infectious diseases. The aim of this study was to compare PCR method with conventional methods in the diagnosis of brucellosis.

Methods: The study included 35 patients and 20 healthy volunteers. Sera for serology and whole blood samples for PCR were collected from each subject in both groups. DNA was extracted from peripheral mononuclear cells obtained from the blood samples and an in house PCR assay was used to detect brucella DNA.

Results: Standart tube agglutination (STA) titers of most patients were $\geq 1/160$, except one patient which was 1/80. Blood cultures were positive for 16 patients. The STA titers of all controls were negative. PCR was positive for 97% of the patients and all of the volunteers were negative.

¹ Dr. A. Y. Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, ANKARA

² Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, KIRIKKALE

³ Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Sabahat ÇEKEN

Dr. A. Y. Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enf. Hast. ve Klinik Mikrobiyoloji Kli., ANKARA

Tel : +90 532 798 91 21

E-posta / E-mail : sabahatceken@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 07.06.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 26.01.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.60437

Çeken S, Kaygusuz S, Kılıç D, Ağalar C. Akut bruselloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kullanımı. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(2): 91-98.

Sonuç: Kullanılan PZR yönteminin erken ve hızlı tanıda yüksek duyarlılıkta olduğu, bu nedenle bruselloz hızlı ve doğru tanısı için kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bruselloz, tanı, PZR

Conclusion: It is concluded that the tested PCR assay has high sensitivity in the diagnosis of brucellosis and it may be used in rapid and accurate diagnosis of brucellosis.

Key Words: Brucellosis, diagnosis, PCR

GİRİŞ

Bruselloz, Brusella cinsi bakterilerin neden olduğu ve insanlara genellikle pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile ya da enfekte materyallere direk temasla bulaşabilen bir zoonozdur (1). Uzun süreli ve özgül olmayan şikayetlerle seyreden hastalık özellikle Akdeniz ülkeleri ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ülkemizde de endemik olarak görülmektedir (2, 3). Neden olduğu hastalık boyutunun ciddiyeti ve insanlar için uygun olmamasından dolayı biyoterörizm ajanı olarak da kullanılabilir (4). Brusellozun kesin tanısı mikroorganizmanın kan, kemik iliği veya diğer enfekte dokulardan üretilmesi ile konur. Brusella cinsi bakterilerin in vitro şartlarda zor ve yavaş üremeleri nedeniyle tanıda zorluklar yaşanmaktadır. Ayrıca önceden antibiyotik kullanımı da bakterinin üreme ihtimalini azaltmaktadır. Bu yüzden bruselloz tanısında serolojik tanı yöntemleri izolasyondan daha çok önem kazanmıştır (5, 6).

Serolojik tanıda standart tüp aglütinasyon testi (SAT) en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin duyarlılığı yüksek olmakla beraber, *Francisella tularensis* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı oluşan antikorlarla çapraz reaksiyon vermesinden dolayı, özgüllüğü düşüktür (7, 8). Ayrıca SAT uygun tedavi protokolünün seçiminde ve hastalığın seyrini göstermede önemli olan farklı immünglobulin sınıflarını da ayırt edemez. Akut bruselloz belirti ve bulguları olan hastalarda özgül antikorların varlığı ve titrelerinin saptanmasında SAT uygun bir testtir. Fakat inkübasyon döneminde, kronik bruselloz ve özellikle aşılama veya enfeksiyon sonucu oluşan antikorların ayrımında kullanımı sınırlıdır (9, 10).

Konvansiyonel tanı yöntemlerindeki bu olumsuzluklar nedeniyle moleküler tanı teknikleri iyi bir alternatiftir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) Brusella tanımlamasında kültür ve serolojik testlerden daha duyarlı olarak kabul edilmektedir (11, 12). Tüm klinik materyallerde çalışılabilir olması da bu yöntemin avantajıdır (11).

Bu çalışmada, bruselloz tanısında PZR yönteminin konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılarak erken ve doğru tanı için değerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubu Ocak-Haziran 2007 tarihleri arasında Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğimize başvuran ve klinik açıdan akut bruselloz olduğu düşünülen 35 hastadan oluşturuldu. Hasta grubu SAT değeri $\geq 1/160$ olan ve/veya kan kültüründe *Brucella* spp. üretilen hastalar ile SAT değeri $< 1/160$ olup Coombs'lu serumla tüp aglütinasyonu $\geq 1/320$ olan hastalar olarak belirlendi. Kronik bir hastalığı olanlar ve hastaneye başvurmadan önce antibiyotik kullanmış olanlar çalışmadan çıkarıldı. Kontrol grubu ise hastaneye başka sebeplerden başvuran klinik olarak bruselloz düşünülmeyen, SAT titresi negatif olan gönüllü kişilerden oluşturuldu.

Çalışma için etik kurul onayı alınarak çalışmaya katılan her hastaya çalışmanın amacı anlatıldı ve yazılı izinleri alındı. Her hasta tarafından standart bir anket (yaş, cinsiyet, telefon, şikayet, şikayetlerin süresi, kullanılan tedavi) dolduruldu. Hasta grubundan ateşli oldukları dönemde ikişer adet kan kültürü alındı. Her

hastadan serolojik inceleme ve PZR için kan örnekleri alındı.

Kültür:

Hastaların kan kültürleri Bactec 9050 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Md, USA) otomatize sistemi ile 30 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyonun 10, 20 ve 30. günlerinde üremeyen örneklerden kör pasajlar yapıldı. Brusella agar ve kanlı agar besiyerlerinde 48 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen yaklaşık 2 mm çapında, yuvarlak, saydam, hemolizsiz, pigmentsiz kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif kokobasil olarak görülen mikroorganizmalar biyokimyasal yöntemlerle tiplendirildi. Bunun için H₂S üretimi, oksidaz, katalaz, hareket, indol, Voges-Proskauer testi, sitrat, nitrat redüksiyonu, jelatin hidrolizi gibi biyokimyasal reaksiyonlar ve anti-Brucella poliklonal serum ile lam aglütinasyonu yöntemleri kullanıldı (5, 13, 14)

Seroloji:

Serolojik tanı için hasta ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinde Brusella antikorları SAT yöntemi ile araştırıldı. *B. abortus* S99 suşu ile hazırlanmış standart Brusella antijeni Ankara Refik Saydam Hızsıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edildi. SAT $\geq 1/160$ olan titreler pozitif olarak kabul edildi. SAT negatif olanlar serum fizyolojik (SF) ile üç defa yıkanıp Coombs reaktifi eklenerek tekrar sulandırıldı ve 37 °C'de 24 saat bekletilip aglütinasyon olup olmadığına bakıldı (10, 15 - 17). Coombs testi için kullanılan anti human globulin (Lorne Labs, Twyford, İngiltere) ticari olarak temin edildi .

PZR Uygulaması

PZR'de kullanılan DNA örnekleri hasta lökositlerinden elde edildi. Taze kandan lökosit izolasyonu için ficoll (PAA Laboratories GmbH, Haidmannwog, Pasing, Avusturya) kullanıldı. DNA, DZ DNA izolasyon kiti (Dr Zeydanlı, Türkiye) kullanılarak fenol kloroform yöntemi ile izole edildi.

DNA ekstraksiyonu için çalışmaya başlamadan önce Sol A'yı oluşturmak için tüp içerisine 1 ml

DNase-RNase serbest saf su eklendi. Sıvıdan 250-300 µl alınarak DNA izolasyonunda kullanıldı. 1,5 ml'lik endorff tüp içine 20 µl Sol A, üzerine 250 µl hasta lökosit süspansiyonu ve 500 µl Sol B konuldu. Tüp, solüsyonların karışması için alt üst edildi ve 42 °C'de 1 saat süreyle bekletildi. İnkübasyondan sonra tüpe 500 µl Sol C (iki fazlı olan solüsyonun alt fazından) konuldu. Karışım vortekslendi ve 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpte 2 faz olduğu görüldü. Berrak olan üst kısım temiz bir endorffa alınarak, üzerine 500 µl sol D ilave edildi ve hafifçe vortekslendi. Karışım daha sonra 10.000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpün üzerine 500 µl Sol E konuldu ve 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. Tüpler 37 °C etüve konularak alkol uçuruldu. Elde edilen bakteri DNA'sı 50 µl distile su ile sulandırıldı.

PZR Programı

B. abortus'un 31 kDa'luk antijenini kodlayan genin 223 baz çiftlik bölgesinin çoğaltılması için Baily ve arkadaşları tarafından tanımlanan B4 (5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3') (P1)ve B5 (5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG-3') (P2) primerleri (MWG, Almanya) kullanıldı (18). 500 µl P1+P2 (10 pmol) hazırlamak için 50 µl P1 (forward primer, 100 pmol) ve 50 µl P2 (reverse primer, 100 pmol) endorff tüpte birleştirildikten sonra üzerine 400 µl dH₂O ilave edildi. Toplam 50 µl reaksiyon hacmi oluşturacak şekilde 10X PZR buffer (Bioron/Almanya,) 5 µl, 25 mM MgCl₂ 4 µl, dNTP 0,2 µl, P1+P2 1,5 µl, Taq DNA polimeraz 0,5 µl, dH₂O 33,8 µl ve 5 µl DNA karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımları %95 °C'de 5 dk başlangıç ayrılması, 95 °C'de 15 sn ayrılma, 60 °C'de 1 dk bağlanma, 72 °C'de 1 dk uzama ısısı olmak üzere 40 döngü çoğaltma yapıldı. Çoğaltma ürünü %2 agaroz jelde yürütüldü. PZR reaksiyonunda pozitif kontrol olarak Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında var olan bir pozitif örnek, negatif kontrol olarak "DNA- RNA free" su kullanıldı.

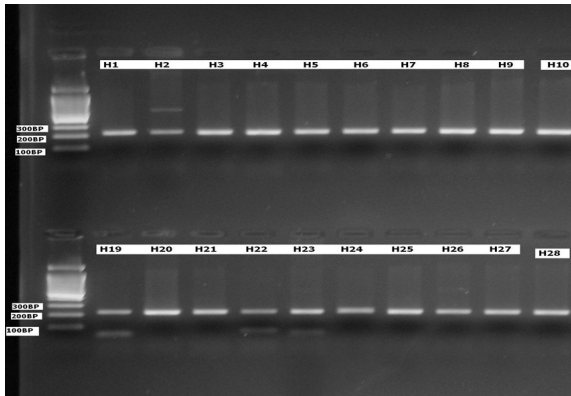
BULGULAR

Çalışmaya alınan bruselloz ön tanılı hastaların 20 (%57,1)'si erkek, 15 (%42,9)'i kadını idi. Kontrol grubu ise 12 (%60) erkek, 8 (%40) kadından oluşuyordu. Hastaların yaş ortalaması $42,1 \pm 16,4$, Kontrol grubunun ise $46,2 \pm 12,8$ idi. Gruplar arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,34$, student t test)

Hastaların 34'ünde SAT $\geq 1/160$ iken, titresi 1/80 olan bir hastada yapılan Coombs testinde de titre değişmedi. Hastaların 16' sında kan kültüründe üreme saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Hastaların SAT titreleri, kültürde mikroorganizma üreme oranları ve PZR pozitifliği

SAT titresi	Sayı (%)	Kültürde Üreme Sayı (%)	PZR Pozitifliği Sayı (%)
1/80	1 (3)	1 (3)	1 (3)
1/160	17 (49)	9 (26)	16 (46)
1/320	10 (28)	2 (5)	10 (28)
1/640	6 (17)	3 (8)	6 (17)
1/1280	1 (3)	1 (3)	1 (3)
Toplam	35 (100)	16 (45)	34 (97)



Şekil 1. Hasta grubunda PZR pozitifliğinin agaroz jelde gösterilmesi

Kültür ve seroloji ile bruselloz tanısı konulan hastaların in house PZR ile 34 (%97)'ünde pozitiflik tespit edildi. Kontrol grubunda bütün sonuçlar negatif olduğundan özgüllük %100 olarak belirlendi.

TARTIŞMA

Bruselloz, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu ve Güney Amerika'da önemli halk sağlığı sorunu olan bir zoonozdur. DSÖ her yıl 500.000 yeni bruselloz olgusunun saptandığını bildirmektedir. Bildirimlerin tam olmaması nedeniyle bu sayının daha da fazla olduğu tahmin edilmektedir (19). Ülkemizde bruselloz olgularının bölgelere göre dağılımına bakıldığında Kırıkkale ilinin de bulunduğu İç Anadolu Bölgesi, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinden sonra sonra üçüncü sırada gelmektedir (20). Kırıkkale'de 1998 - 2003 yılları arasında yapılan seroprevelans çalışmasında seropozitiflik oranı %5,2 olarak bulunmuştur (21).

Brusellozun tanısı kültür ve seroloji gibi konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemlere dayanmaktadır. Patojenin kan kültüründe üretilmesi altın standarttır. Fakat uzun bir inkübasyon süresi gerektirmesi, laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riski ve mikroorganizmanın üretilmesinin her zaman mümkün olmaması nedeniyle (%15-70) erken tanı için serolojik yöntemler öne çıkmıştır (1, 6). Brusella antijenlerine karşı antikorların araştırıldığı bu testlerin erken hastalık döneminde negatif olması, serolojik çapraz reaksiyonlar gösterebilmesi ve tedaviden sonra antikor yüksekliğinin uzun süre devam etmesine bağlı olarak tedavi takibinde kullanılmama gibi dezavantajları vardır (1, 11).

PZR yöntemi, pek çok enfeksiyon hastalığının tanısında kullanılan hızlı ve duyarlılığı yüksek moleküler bir tanı metodudur. Brusella enfeksiyonlarını tespit etmek için farklı PZR teknikleri ve ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Brusella DNA'sı elde etmek için insan ve hayvan doku örnekleri, kan, idrar, BOS, serum gibi pek çok materyal kullanılmıştır. En yaygın kullanılan klinik örnekler kan ve serumdur (5, 11).

Bulaştan sonraki on gün içerisinde *Brucella* spp.'yi tespit edebilen PZR'ye dayalı testler; geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında sürat ve duyarlılık açısından daha ümit verici olarak değerlendirilmektedir. Bununla beraber *Brucella* spp. için yapılan çeşitli PZR yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılığı farklı olup, örneğin hazırlanması, "primer" tespiti ve DNA izolasyon yöntemleri tam olarak standardize edilememiştir (5, 22).

Bruselloz tanısında mikroorganizmanın tür düzeyinde tespiti tedaviyi çok fazla etkilemediği için çok gerekli değildir. Bu yüzden Brusella PZR çalışmalarında seçilen hedef genler ve primer çiftlerinin mümkün olduğunca bütün türler ve biyotipler için duyarlı olan ve diğer bakterilerle negatif sonuç verecek özgüllükte olmasına çalışılmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmada Fekete ve ark., *B. abortus*'un 43 kDa'luk bir dış membranını kodlayan bölgeyi hedef olarak seçmişlerdir (23). Baily ve ark.'nın 1992'de yaptığı çalışmada ise 31 kDa'luk *B. abortus* antijenini kodlayan 223 baz çiftlik BCSP31 hedef sekansı kullanılmıştır. B4 ve B5 primerleri ile yapılan PZR yöntemi *B. abortus* ve *B. melitensis* için duyarlı ve özgül bulunmuştur (23).

Belçika'da Herman ve ark. tarafından *B. abortus*'un 16S rRNA gen sekansından elde edilen primerler kullanılarak yapılan PZR sonucunda güvenilir sonuçlar elde edilmiştir (24). Yine İspanya'da Romero ve ark. tarafından yapılan çalışmada aynı sekanstan 6 farklı primer kullanılarak Brusella tespit edilmiştir (25). Brusella türlerinin RNA homolojisinin %100'e yakın olmasından dolayı *B. abortus*'un 16S geninden seçilen primerlerin diğer Brusella türlerini de tespit edebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmaların özgüllüğü test edildiğinde *Ochrobacterium anthropi* dışında filogenetik olarak akraba olan hiçbir mikroorganizma pozitif bulunmamıştır (24, 25).

PZR çalışmalarında, duyarlılığın en önemli etkenlerinden biri uygun primer çiftleri çalışmaya dayanmaktadır. Navarro ve ark., 31 kDa'luk *B. abortus* antijenini kodlayan (B4/B5), 16S rRNA gen sekansından elde edilen (F4/R2) ve bir dış

membran proteini olan Omp2'den (JPF/JPR) elde edilen primerleri kullanarak yaptıkları çalışmada; F4/R2'nin Brusella DNA'sını belirlemede etkili primer çifti olduğunu bildirmişlerdir (26). Nimri ve ark.'nın F4/R2 primerini kullanarak yaptıkları çalışmada ise duyarlılık %85,7, özgüllük %100 olarak bildirilmiştir (27).

Queipo-Ortuno ve ark.'nın B4 ve B5 primerlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, hastalardan alınan 50 tam kan örneğinin hepsinde PZR pozitif bulunurken, 60 kontrolden alınan örneklerden sadece biri pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre PZR'nin bruselloz tanısında %100 duyarlı, %98,3 özgül olduğu rapor edilmiştir (28). Matar ve ark. aynı primerleri kullanarak 17'si akut, 3'ü relaps olmak üzere, 20 hastada yaptıkları çalışmada PZR'nin duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Negatif kontrol olarak kullanılan 9 tifolu hasta ve 30 sağlıklı kişide ise PZR negatif bulunmuştur. Bu çalışmada sonuçların 24 saatten kısa bir sürede alınmasının klinisyen için erken ve doğru tanı sağladığı vurgulanmıştır (29).

Biz de çalışmamızda daha önce pek çok çalışmada kullanılan *B. abortus*'un 31 kDa'luk antijenini kodlayan genin 223 baz çiftlik bölgesini hedef alan B4 ve B5 primerlerini kullanarak bir PZR yöntemini uyguladık (28, 30). Hasta grubunda pozitiflik oranı tarafımızca %97 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu oran diğer çalışmalardaki gibi yüksek duyarlılıkta idi.

PZR yöntemi için hangi materyalin daha uygun olduğunu belirlemek de önemlidir. Mitka ve ark., Yunanistan'da 200 hastada dört farklı PZR yöntemi ile serum, tam kan, lökosit (buffy coat) kullanarak yaptıkları çalışmada lökosit ve tam kanın Brusella PZR için en uygun materyaller olduğu, özellikle relapsları belirlemede tedavi sonrası serumda bulunan bakteri miktarının çok az olmasından dolayı yalnızca negatifliğe neden olabileceği belirtilmiştir (31). Bizim çalışmamızda da hastalardan EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden elde edilen lökosit pelleti kullanılarak yapılan PZR yönteminde aldığımız sonuçlar Mitka ve ark.'nın sonuçlarına benzemektedir.

Al- Nakkas ve ark.'nın tam kan kullanarak yaptıkları bir çalışmada 89'u kültür pozitif olan 199 Bruselloz hastasının 193'ünde PZR pozitif bulunmuştur. Farklı enfeksiyonları olan 244 hastada ise Brusella PZR negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre duyarlılık %97, özgüllük %100 olarak belirtilmiştir (32).

Morata ve ark., bruselloz tanısında periferik kanda yapılan PZR testinde etkili olabilecek parametreleri incelediği çalışmada kan örneklerinde hemoliz sonucu bulunan hem bileşenlerinin ve ortamda bulunan toplam DNA miktarının PZR sonucunu etkileyebileceğini düşünmüşler ve kültür ve/veya seroloji ile bruselloz tanısı alan 32 hastada Brusella DNA'sını araştırmışlardır. Lökosit pelletinin iki defa yerine dört/beş kez yıkanmasının agaroz jel elektroforezinde DNA'yı saptamayı kolaylaştırdığı, toplam DNA miktarının azalmasının da sonucu olumlu etkilediğini gözlemişlerdir. Bu yöntemle 25 sağlıklı kontrolde DNA negatif bulunmuştur (33). Bu çalışmanın sonuçlarını gören Navarro ve ark. aynı yöntemi 10 akut brusellozlu hasta ve beş sağlıklı kontrolde denemişler, fakat sonuçta sadece beş hasta ile iki kontrolde PZR pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışmada yalancı negatifliğin nedeninin kanda bulunan bakteri DNA'sının miktarının düzeyinin saptanabilecek seviyeden daha az olması olarak belirtilirken, yalancı pozitifliğin ise konvansiyonel yöntemlerle saptanamayan asemptomatik enfeksiyona veya başka bakterilerle olan enfeksiyonun çapraz reaksiyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür (34).

Bizim çalışmamızda, tam kandan ayrılan lökosit pelleti serum fizyolojikle iki/üç defa yıkanarak hazırlandı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu sayının ortamda bulunan hemoglobinin ve antikoagülanlar gibi yalancı negatifliğe neden olabilecek maddelerin uzaklaştırılması için yeterli olduğu görüldü.

Ülkemizdeki bir çalışmada iki farklı gen bölgesi hedeflenerek yapılan PZR'de Brusella türlerinde insersiyon bölgesinin (IS6501) çoğaltılması ile %51,7, 31 kDa 'luk B. abortus antijenini kodlayan genin 223 baz çiftlik bölgesinin çoğaltılması ile ise %48,3 duyarlılık bulunmuş, duyarlılık oranının düşük

bulunmasını hastalığın patogeneziyle ilgili olduğu ve periferik kan hücrelerinde saptanma oranının düşük olabileceği belirtilmiştir (35).

PZR çalışmalarında daha ideali bulmak adına yeni yöntem arayışları da devam etmektedir. Vroni ve ark., akut bruselloz tanısında bir enzim immuno assay PZR (PCR-EIA) gibi daha yeni bir yöntemle yaptıkları çalışmada tam kanda %81,5, serumda %79 duyarlılık, her iki materyalde de %100 özgüllük gibi ümit verici sonuçlar elde etmişlerdir (36).

Real time PZR (RT-PZR) hızlı, kapalı sistemlerde çalışıldığından kontaminasyon riski düşük ve kullanılan DNA miktarının daha az olduğu bir PZR yöntemidir. RT-PZR yönteminde reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizi aynı anda devam etmektedir ve yarım saat kadar kısa bir sürede serum, kan ve doku örneklerinde uygulanabilmektedir (21, 36).

Debeaumont ve ark.'nın yaptığı çalışmada 17 kültür pozitif bruselloz hastasının 11'inde RT-PZR yöntemi ile Brusella DNA'sı saptanırken, 60 kontrol hastasının ise hepsi negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre testin duyarlılığı %64,7, özgüllüğü %100 olarak bildirilmiştir (37).

Queipo Ortuno ve ark.'nın 60 bruselloz hastası ve 65 kontrolden alınan serum örneklerinde Eş Zamanlı PCR (qRT-PZR, Roche Diagnostic) yöntemi ile yaptıkları çalışmada duyarlılık %91,9, özgüllük %95,4 bulunmuştur. Bu yöntemin hem hızlı sonuç verdiği, hem bir bakteri hücresine denk gelen 5 fg DNA'yı saptayabildiği, hem de kapalı kapiller tüplerde çalışıldığından dolayı, kontaminasyonun engellendiği belirtilmiştir (38). Yine aynı araştırmacıların qRT-PCR ile PZR-ELISA yöntemini karşılaştırdıkları başka bir çalışmada; qRT-PCR %93,3 duyarlı, %94,6 özgül bulunurken, PZR-ELISA %90 duyarlı, %91,9 özgül bulunmuştur. Sonuç olarak serum örneklerinde çalışılan qRT-PCR yönteminin tam kan kullanılan PZR-ELISA kadar duyarlı olduğu bildirilmiştir (39). Bu yöntemle yapılacak çalışmalarda serumun da kullanılabilmesi belirtilmiştir. Bu nedenle serum kullanılarak yeni çalışmalar yapılması uygulama kolaylığı da getirecektir.

PZR yönteminin Bruselloz tedavisine yanıtta kullanılabilirliğini araştıran çalışmalar da yapılmıştır. Navarro ve ark. yaptığı bir çalışmada Bruselloz tanısı olan 18 hastadan relaps olan yedi hasta ve relaps olmayan 11 hastanın qRTPCR sonuçları karşılaştırıldığında DNA yükü ilk üç haftada hızlıca azalmasına rağmen tedavisi sonunda relaps olanlarla olmayanların Q-PZR sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. (12) Başka bir çalışmada ise 30 hastanın tanı anında, tedavi bitiminde ve tedavi bittikten sonraki 2., 4. ve 6. aylarda seroloji, kültür ve PZR yöntemleri karşılaştırılmış; başlangıçta PZR testi pozitif olan 29 hastadan 28'inin tedavi sonunda PZRsi negatif bulunurken relaps olan iki hasta ve relaps şüphesi olan dört hastanın PZR testleri daha sonra pozitif

bulunmuştur. PZR yönteminin sadece tanı için değil, tedavi takibi ve relapsları erken saptamak için çok faydalı bir yöntem olduğu belirtilmiştir (40).

Sonuç olarak; Brusellozun endemik olduğu ülkemizde geleneksel olarak kullanılan serolojik yöntemlerin hastalığın erken döneminde, kronik ve relaps olgularda ve tedaviye cevabın takibinde sorun yarattığı bilinmektedir. Tanıda altın standart olarak kullanılan kültürün, duyarlılığı düşük ve uzun sürede sonuç alınabilen bir yöntem olması nedeniyle, PZR yönteminin daha kısa sürede sonuç verebilmesi, duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması, diğer yöntemlere göre laboratuvar personeline bulaş riskinin düşük olması nedenleriyle, brusellozun tanısında iyi bir alternatif seçeneği oluşturacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Young EJ, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 2669-73.
2. Sözen TH. Bruselloz. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; 636-42.
3. Mehmet Uluğ, Nuray Can-Uluğ. Brusellozlu 78 Olgunun Değerlendirilmesi. Klimik Dergisi, 2010; 23(3): 89-94.
4. Kılıç S, Babür C. Biyolojik silah olarak bakteriler "Kategori B ajanlar". Türk Hij Den Biyol Derg 2006; 63: 47-66.
5. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification. Clin Lab, 2003; 49: 487-505.
6. Kılıç S. Mikrobiyolojik Tanı. Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics, 2012; 5 (1): 46-66.
7. Kılıç S, Çelebi B, Bayram Y, Çitil B. *Francisella tularensis* antikortarı ile çapraz reaksiyonlarının araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(2): 65-70.
8. Kocabeyoğlu Ö. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica*. Serotip 0:3 ve 0:9 Arasındaki Antijenik İlişkinin Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 1990; 24(3): 218-25.
9. Aktas. O. Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. ANKEM Derg, 2003; 17: 336-39.
10. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-A Review of literature. Part 2: Serological Tests for brucellosis. Clin Lab, 2003; 49: 577-89.
11. Navarro E, Casao MA, Solera J. 2004. Diagnosis of human brucellosis using PCR. Expert Rev Mol Diagn, 4(1): 115-23.
12. Navarro E, Segura JC, Castaño MJ, Solera J. Use of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Monitor the Evolution of *Brucella melitensis* DNA Load During Therapy and Post-Therapy Follow-Up in Patients with Brucellosis. Clin Infect Dis, 2006; 42 (9): 1266-73.
13. Erdenliğ S. Türkiye'de Brucella kökenleri. Klimik Derg, 2003; 16: 214-6.
14. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi. 4. Baskı. İzmir, 2000; 475-80.
15. Fındık D. Bruselloz tanısında sorunlar. Klimik Kongre kitabı. 2005: 104-7.
16. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi. 4. Baskı. İzmir, 2000; 227-8.

17. Badur S. Brusellozda Serolojik Tanı ve Seroepidemioloji. *Klimik Derg*, 1990; 3: 1-1720.
18. Baily GG, Kranhn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of melitensis and abortus by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 1992; 95: 271-7.
19. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis*, 1992; 14(1): 131-40.
20. Yüce A, Alp-Çavuş S. Türkiye’de bruselloz: Genel bakış. *Klimik Derg*, 2006; 19(3): 87-9.
21. Apan TZ, Kaygusuz S, Kılıç D, Yıldırım A, Aksoy A, Ayaşlıoğlu E. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Polikliniklerine Başvuran Kişilerde Bruselloz Seroprevalansı. *İnfeksiyon Derg*, 2004; 18(2): 175-8.
22. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J*. 2010; 51(4): 306-13.
23. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 1990; 69: 216-27.
24. Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1992; 6: 2099-101.
25. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of DNA by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 615-7.
26. Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002; 34(2): 147-51.
27. Nimri LF. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect Dis*, 2003; 3: 5.
28. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 2927-30.
29. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton antigen DNA. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 477-8.
30. 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: 127-31.
31. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods *J Clin Microbiol*, 2007; 45(4): 1211-8.
32. Al-Nakkas A, Mustafa AS, Wright SG. Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *J Med Microbiol*, 2005; 54(8): 727-30.
33. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 2243-6.
34. Navarro E, Escribano, J, Solera, J. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(5): 1654-5.
35. Çırak MY, Hızıl K. Brusellozisin tanısında iki farklı gen bölgesini hedefleyen polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin değeri. *Mikrobiyol Bul*, 2002; 36: 271-6.
36. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. 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*, 2004; 23(3): 194-9.
37. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005; 24(12): 842-5.
38. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-Ordonez MA, Pachon ME, Gonzalez M, Morata P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and meltingcurve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect*, 2005; 11(9): 713-8.
39. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between LightCycler real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with wholeblood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis*, 2005; 40: 260-4.
40. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pichardo C, Colmenero JD. Posttreatment Follow-Up of Brucellosis by PCR Assay. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(12): 4163-6.