

## Klinik Araştırma

# Brusellozis Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Etkinliğinin Serolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Virülans Genlerinin Saptanması

Engin Vedat SEYHAN<sup>1,a</sup>, Yusuf YAKUPOĞULLARI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

## ÖZ

**Amaç:** Bruselloz, çoklu organ tutulumuna neden olan önemli bir zoonotik enfeksiyon olup hastalığın tanısında kullanılan kültür ve serolojik testlerin etkinliği sınırlıdır. Bu çalışmada, Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) bruselloz tanısındaki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya, Rose-Bengal Aglutinasyon testi pozitif olan ve klinik olarak brusellozis düşünülen 60 hasta ve bu özellikleri taşımayan 60 kontrol numunesi dahil edildi. Numunelerde *Brucella spp.* DNA'sı real-time PCR yöntemi ile araştırıldı. Pozitif örneklerde PCR yöntemi ile tür ayırımı yapıldı ve omp19, wbkA, manA, mviN, ure ve perA virülans genleri çalışıldı.

**Bulgular:** Hasta grubunda bulunan ve klinik değerlendirme ve serolojik testlerle akut hastalık veya relaps tanısı alan 32 hastanın 19'unda *Brucella spp.* DNA'sı pozitif saptanırken kontrol numunelerinin hiçbirinde pozitif sonuç alınmadı. Buna göre PCR'in duyarlılığı %59.3 ve özgüllüğü ise %100 olarak hesaplandı. Pozitif bulunan hastaların hepsinde patojenin *Brucella melitensis* olduğu ve çalışılan tüm virülans genlerini taşıdığı saptandı.

**Sonuç:** Moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ve hastadan bakteriyemi olduğu dönemde numune alınması PCR'in bruselloz tanısındaki etkinliğini artırabilir. Pozitif bulunan hastaların hepsinde patojenin *B. melitensis* olarak tanımlanması bölgemizde brusellozun insana bulaşının temel olarak küçükbaş hayvanlardan gerçekleştiğini göstermiş olup buna uygun kontrol önlemlerinin alınmasına gereksinim vardır.

**Anahtar Sözcükler:** *Brucella Spp.*, Bruselloz, Serolojik Testler, PCR, Virülans.

## ABSTRACT

**Comparison of the Efficacy of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Brucellosis By Serological Methods and Detection of Virulence Genes**

**Objective:** Brucellosis is an important zoonotic infection that causes multi-organ involvement, and the effectiveness of culture and serological tests used in the diagnosis of the disease is limited. In this study, it was aimed to investigate the effectiveness of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the diagnosis of brucellosis.

**Material and Method:** Sixty patients with positive Rose-Bengal Agglutination test and clinically suspected brucellosis and 60 control samples without these features were included in the study. The DNA of *Brucella spp.* was investigated in the samples by real-time PCR method. In the positive samples, the species identification was made, and virulence genes including omp19, wbkA, manA, mviN, urea and perA were studied with PCR.

**Results:** *Brucella spp.* DNA was found to be positive in 19 of 32 patients in the patient group who were diagnosed with acute disease or relapse by clinical evaluation and serological tests, and no positive result was obtained in any of the control samples. Accordingly, the sensitivity and specificity of PCR were calculated as 59.3% and 100%, respectively. It was determined that *Brucella melitensis* was the infecting agent in all positive patients and carried all the virulence genes studied.

**Conclusion:** Developing molecular methods and taking samples from the patient during the period of bacteremia may increase the effectiveness of PCR in the diagnosis of brucellosis. The identification of the pathogen as *B. melitensis* in all positive patients indicated that the transmission brucellosis to humans in our region was mainly from sheep and goats, and appropriate control measures should be taken accordingly.

**Keywords:** *Brucella Spp.*, Brucellosis, Serological Tests, PCR, Virulence.

**Bu makale atıfta nasıl kullanılır:** Seyhan EV, Yakupoğulları Y. Brusellozis Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Etkinliğinin Serolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Virülans Genlerinin Saptanması. Fırat Tıp Dergisi 2024; 29(3): 123-128.

**How to cite this article:** Seyhan EV, Yakupoğulları Y. Comparison of the Efficacy of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Brucellosis By Serological Methods and Detection of Virulence Genes. Fırat Med J 2024; 29(3): 123-128.

**ORCID IDs:** E.V.S. 0000-0002-3168-9459, Y.Y. 0000-0002-5545-3467.

*Brucella spp.*, gram-negatif kokobasil morfolojisinde ve intraselüler enfeksiyon yapan zoonotik bir bakteri olup bruselloz olarak adlandırılan hastalığa neden olur. Hastalığın insanlara bulaşı çoğunlukla enfekte koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanların pastörize edilmemiş et ve süt ürünlerinin tüketilmesi veya bu hayvanların idrar, kan ve vücut sıvılarına temas edilmesi sonucu ortaya çıkar. Bruselloz insanlarda akut,

subakut ve kronik enfeksiyonlar şeklinde görülebilen, çoklu organ ve doku tutulumu yapan ve bazen de hayatı tehdit eden önemli klinik tablolar oluşturur (1). Bruselloz, ateş, eklem ve kas ağrıları ve kilo kaybı gibi özgül olmayan semptomlara yol açtığından hastalığın klinik tanısında sorunlarla karşılaşılmaktadır (2). Ayrıca, etkenin yavaş üreme hızı ve bakterinin kanda bulunmadığı dönemlerin olması gibi nedenlerle bakteriyel hastalıkların kesin laboratuvar tanı metodu olan kültü-

rün etkinliği %50 dolayındadır (3). Bu nedenle, bruselloz tanısında günümüze kadar en çok kullanılan tanı yöntemleri hastanın serumunda etkene karşı üretilmiş antikörlerin saptandığı serolojik testler olmuştur. Ancak bu testlerin yaklaşık 24 saatlik inkübasyon süresi gerektirmesi, okuyucu kaynaklı yorumlama hatalarına açık olması ve %68-90 dolayında duyarlılık göstermeleri nedeniyle daha hızlı ve doğru tanı yöntemlerine gereksinim duyulmuştur (4, 5).

Bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), klinik örneklerde bulunan 5-50 KOB/ml yoğunluktaki bakteriyel DNA'yı saptayabilecek bir duyarlılığa sahiptir (6). Bu yöntem, sadece bir enfeksiyon hastalığının tanısında değil aynı zamanda patojenin taşıdığı ve hastalığın şiddeti ile ilişkili virülans özelliklerini kodlayan gen bölgelerini saptayabildiği için de klinik olarak önemli sonuçlar üretebilir (7). Ancak, ülkemiz gibi brusellozun yaygın kabul edildiği bir bölgede PCR'in tanısal etkinliğini bildiren çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Ayrıca, yıllar içinde moleküler mikrobiyolojik yöntemlerdeki belirgin gelişime rağmen bölgemizde son yıllarda yapılan çalışma yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada, Doğu ve Güney-Doğu Anadolu bölgesinde önemli bir merkez olan hastanemize, bruselloz şüphesi ile gelmiş hastalarda PCR yönteminin tanısal etkinliğinin saptanması, suşların tür tayini ve virülans genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile laboratuvar personelinin etkene maruz kalma riskini azaltarak, serolojik testlere göre daha kısa bir sürede ve yorumlama hatalarına neden olmadan hastalık tanısının yapılabilir olup-olmadığı ortaya konulacaktır. Ayrıca, saptanan kökenlerin virülans gen epidemiyolojileri hakkında önemli veriler sağlanacaktır ki bu konuda ülkemizden bildirilen veri miktarı yok denecek kadar azdır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Bu makale bir numaralı yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.**

### Çalışma Dizayını ve Örneklerin Seçimi

Prospektif olarak yapılan bu çalışmaya, 01 Ocak 2018 ile 31 Temmuz 2018 tarihleri arasında İnönü Tıp Merkezi'nin çeşitli servis ve polikliniklerinden bruselloz ön tanısı ile Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen hasta serum örnekleri alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilecek hasta sayısı Power Analizi ile hesaplanmıştır. Buna göre; PCR ve serolojik yöntemlerin tanı etkinliğinin saptanabilmesi için aradaki farkın 0.20 olacağı ve uyumsuz oranın 0.25 olacağı öngörüsüyle %95 güven düzeyinde ( $\alpha=0.05$ ) ve %80 güç ile ( $\beta=0.20$ ) gereken minimum örnek sayısı grup başına 59 olarak hesaplanmıştır. Bu veri ışığında çalışmaya 60 pozitif ve 60 negatif olmak üzere toplam 120 örnek dahil edilmiştir.

Rose-Bengal testi pozitif olan ve klinik olarak bruselloz düşünülen hasta numuneleri çalışma grubunu oluşturmuştur. Rose-Bengal, kültür ve diğer serolojik

testleri negatif olan ve klinik olarak bruselloz düşünülmeyen numuneler ise kontrol grubunu oluşturmuştur.

Bu çalışma, İnönü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2018/53 sayılı kararı ile etik onay almış olup İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 2018/53 numaralı proje desteği ile desteklenmiştir.

### Serolojik Testler

Çalışmada, Rose-Bengal Testi (Seromed Ltd., Türkiye), Standart Tüp Aglutinasyon Testi (Seromed Ltd., Türkiye) ve Brucella Coombs'lu Jel Testi (ODAK Brucella Coombs Gel Matrisi kiti; ME-SA Med. Ltd., Türkiye) olmak üzere üç farklı serolojik yöntem kullanıldı.

### Real-Time PCR ile *Brucella spp.* DNA'sının Saptanması

Hastalara ait serum örneklerinden veya BACT/ALERT 3D (bioMérieux, Fransa) tam otomatize kan kültür cihazında yapılan kan kültüründe üreyen *Brucella spp.* izolatlarından bakteriyel DNA QIASymphony Otomatize DNA Ekstraksiyon Cihazında (Qiagen, Almanya) QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kitleri kullanılarak özütlendi.

Örneklerde bulunan *Brucella spp.* DNA'sı, FTD Tropical Fever Real-Time Multiplex PCR kiti (Fast Track Diagnostic, Lüksemburg) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) PCR termal döngü cihazında amplifiye edildi. Oluşan amplifikasyonlar, optik modül kuyucuklarından yayılan floresan sinyallerinin analiz algoritması kullanılarak PC tabanlı izleme ekranı üzerinde gözlendi. PCR ürünlerinin izlenmesi ve yüksek çözünürlükte ayrıştırılması için QIAxel DNA High Resolution kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak pozitif ve negatif örnekler tespit edildi. Test için negatif ve pozitif kontroller kullanıldı.

### PCR ile *Brucella melitensis* Saptanması

Real-time PCR ile pozitif bulunan örnekler ve *Brucella spp.* olarak tanımlanan kültür izolatlarında *B. melitensis* DNA'sı saptamak için in-house PCR testi yapıldı. Bunun için *B. melitensis* genomu üzerinde bulunan 99 bp'lik gen bölgesini hedef alan UF1 (F: 5'-GGCTATCGGCTGGGAAAGG-3') ve UR1 (R: 5'-CCTTCCGAAGAAAATACCCCT-3') DNA primerleri (Ella Biotech, Almanya) kullanıldı. Termal döngü cihazında ürün amplifiye edildi ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

### PCR ile Virülans Genlerinin Tespiti

*Brucella spp.* DNA'sı pozitif bulunan örneklerinde *omp19*, *wbka*, *manA*, *mviN*, *ure* ve *perA* genleri olmak üzere toplam altı adet virülans geni in-house PCR yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla; 550 bp'lik *omp19* geninin çoğaltılması için F: 5'-TGATGGGAATTTCAAAGCA-3' R: 5'-GTTTCCGGGTCAGATCAGC-3' primeri, 931 bp'lik *wbka* geninin çoğaltılması için F: 5'-AATGACTTCCGCTGCCATAG-3' R: 5'-

ATGAGCGAGGACATGAGCTT-3' primeri, 271 bp'lik *manA* geninin çoğaltılması için F: 5'-TCGATCCAGAAACCCAGTTC-3' R: 5'-CATACACCACGATCCACTGC-3' primeri, 344 bp'lik *mviN* geninin çoğaltılması için F: 5'-GCAGATCAACCTGCTCATCA-3' R: 5'-GGCCATAGATCGCCAGAATA-3' primeri, 1282 bp'lik *ure* geninin çoğaltılması için F: 5'-GCTTGCCCTTGAATTCCTTTGTGG-3' R: 5'-ATCTGCGAATTTGCCGGACTCTAT-3' primeri ve 716 bp'lik *perA* geninin çoğaltılması için F: 5'-GGAACGGTGGCACTACATCT-3'R: 5'-GGCTCTCTGTGTTCCGAGTT-3' primeri sentezletirilerek (Ella Biotech, Almanya) kullanıldı. Termal döngü cihazında ürün amplifiye edildi ve agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi.

### Elektroforez ve Görüntüleme

Elektroforez işlemi için DNA yükleme kuyucuklarına 10 µl PCR amplifikasyon ürünlerinden pipetle yükleme yapıldı ve 100 volt akımda 2.5 saat elektroforez işlemi uygulanarak oluşan amplifikasyon ürünleri yürütüldü. Elektroforez işlemi sonunda yürütülen DNA bantları ultraviyole ışık altında değerlendirildi. Pozitif ve negatif bantlar saptandı.

### Veri Analizi

Elde edilen kalitatif veriler sayı ve oran olarak ifade edildi. Kullanılan PCR yönteminin brusellozu olan hastaları tanımlama performansına ait duyarlılık, özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri hesaplandı.

## BULGULAR

### Serolojik Test Sonuçları

Hasta grubunda bulunan 60 örneğin Rose-Bengal aglütinasyon testi pozitif, kontrol grubunda bulunan 60 hastanın Rose-Bengal aglütinasyon testi negatifti. Hasta grubunda bulunan örneklerin STA ve Coombs'lu *Brucella* Jel testleri 1/40 ila 1/2560 titreler arasında pozitif saptandı.

Standart tüp aglütinasyon testinde akut hastalık göstergesi olarak 1/160 titre ve üstünü sağlayan toplam 50 (%83.3) numune bulunuyorken geri kalan 10 (%16.6) hasta numunesinin tüp aglütinasyon titreleri 1/40 ila 1/80 aralığında tespit edildi. STA'da 1/1280 titrede 13 hasta, 1/2560 titrede 1 hasta pozitif bulunurken Coombs'lu *Brucella* Jel testinde 1/1280 titrede 17 hasta, 1/2560 titrede 2 hasta pozitif saptanmıştır. Tüp aglütinasyon testleri ile 1/160 titre ve üstü değer elde edilen 50 hastanın yapılan incelemeler sonucunda 18'inin takipli ve tedavi altındaki hastalar olduğu, geri kalan 32'sinin ise akut hastalık veya relaps tanısı aldığı saptandı.

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubunun serolojik test sonuçları tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmaya alınan 60 hasta ve 60 kontrol grubunda elde edilen serolojik test sonuçlarının hasta sayısına göre dağılımları.

| GRUPLAR                | (-) | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 |
|------------------------|-----|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| <b>Hasta Grubu</b>     |     |      |      |       |       |       |        |        |
| STA                    | 0   | 2    | 8    | 8     | 16    | 12    | 13     | 1      |
| (n= 60)                |     |      |      |       |       |       |        |        |
| <b>Hasta Grubu</b>     |     |      |      |       |       |       |        |        |
| Coombs'lu Aglütinasyon | 0   | 2    | 8    | 6     | 10    | 15    | 17     | 2      |
| (n= 60)                |     |      |      |       |       |       |        |        |
| Kontrol Grubu          | 60  | -    | -    | -     | -     | -     | -      | -      |

### Real Time PCR Sonuçları

Çalışmaya alınan toplam 60 pozitif hastanın 19'unun (%31.6) serum örneklerinde real-time PCR yöntemiyle *Brucella spp.* DNA'sı saptanırken kontrol grubunu oluşturan 60 hastanın kan örneğinin hiçbirinde pozitif sonuç alınmadı. Hasta grubunda bulunan ve serolojik testler ile akut hastalık veya relaps tanısı alan 32 hastanın 19'unda (%59.3) real-time PCR yöntemiyle *Brucella spp.* DNA'sı saptandı. Hasta grubundaki geri kalan 28 hastanın kan örneklerinde real-time PCR yöntemiyle *Brucella spp.* DNA'sı saptanmadı.

Serolojik testler ile bruselloz tanısı alan hastalarda PCR yönteminin hasta grubunda bulunan 60 hasta için saptama duyarlılığı %31.6; 1/160 ve üstü aglütinasyon titresi saptanan 50 hastayı saptama duyarlılığı %38 ve tedavi altında ve takipli hastalar dışlandıktan sonra akut hastalık veya relaps olarak tanı konulmuş 32 hasta için tanı duyarlılığı %59.3 olarak hesaplandı. PCR yönteminin özgüllüğü ise %100 olarak bulundu. PCR yönteminin Pozitif Prediktif Değeri %100 olarak bulunurken Negatif Prediktif Değeri %59.4 olarak saptandı. PCR yöntemi için hesaplanan tanı performans değerleri tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** PCR ile saptanan tanı performans değerleri.

| Test Performans Parametreleri | Hasta Grubu (n= 60) | ≥1/160 Olan Hastalar (n= 50) | ≥1/160 ve Akut Hastalık Tanısı Alanlar (n= 32) |
|-------------------------------|---------------------|------------------------------|--|
| Duyarlılık (%)                | 31.6                | 38                           | 59.3   |
| Özgüllük (%)                  | 100                 | 100                          | 100  |
| PPD* (%)                      | 100                 | 100                          | 100  |
| NPD** (%)                     | 59.4                | 69.3                         | 87.1   |

\*PPD: Pozitif prediktif değer, \*\*NPD: Negatif prediktif değer.

### Tür Tayini ve Virülans Genleri

*Brucella spp.* DNA'sı saptanan 19 hastanın hepsinde yapılan PCR işlemi ile etkenin *B. melitensis* olduğu bulunurken bunun dışında başka bir tür saptanmadı. Virülans genleri için yapılan PCR işlemi sonucunda PCR-pozitif tüm hastalarda çalışılan *omp19*, *wbKA*, *manA*, *mviN*, *ure* ve *perA* genlerinin hepsi pozitif olarak sonuçlandı.

## TARTIŞMA

Bruselloz, tanısı zor olan enfeksiyonlardan biri olma özelliğini halen devam ettirmektedir. Hastalığın neden olduğu tanısız sorunlar, klinik değerlendirme aşamasından itibaren başlamaktadır (8). Kan kültürü; uygulama kolaylığı ve olası başka etkenleri de ortaya koyması nedeniyle en fazla kullanılan yöntem olmuştur. Ancak, hastanın bakteriyemik olmadığı bir dönemde numune alınması, etkenin çoğunlukla hücre içi yerleşimi ve bakterinin yavaş üreme hızı nedeniyle kan kültürü hastaların çok az bir kısmında pozitif sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, rutin klinik tanıda hasta kanında *Brucella spp.*'ye karşı gelişen antikorların saptandığı indirekt tanı metotlarından serolojik testler en fazla kullanılan yöntemler olmuştur. Ancak bu testlerin, en az bir gün sürmesi, hastanın serumunda bulunan antikorların özelliği ve kullanıcı hataları nedeniyle sıkça yanlış negatif olarak sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile brusellozun laboratuvar tanısında standardize edilmiş, hızlı sonuç verebilen, yüksek duyarlık ve özgüllükle çalışan yeni test metotlarına gereksinim devam etmektedir (9).

Brusellozun laboratuvar tanısında PCR'in kullanımı gittikçe artmış ve gelecek adına ümit vadeden bir yöntem olma özelliği kazanmıştır. Ancak, PCR'in bruselloz tanısındaki etkinliği hakkında hem sınırlı sayıda çalışma bulunmakta hem de yapılan çalışmalarda oldukça değişken aralıklarda tanısız performans değerleri bildirilmektedir. Dolayısı ile brusellozun endemik olarak bulunduğu bölgemizde PCR yönteminin tanı etkinliğinin saptanması, patojenin tür ayrımının yapılması ve taşıdığı önemli virülans genlerinin varlığının araştırılması hem klinik tanı yöntemlerinin yeniden gözden geçirilmesi hem de mevcut bilimsel bilgiye katkı yapma potansiyeli nedeniyle önemlidir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Kuyumcu'nun 2017 yılında İstanbul'da çalışmada, bruselloz tanısında serolojik testlerin etkinliği karşılaştırılmış ve bruselloz tanısı alan 12 hastadan dördünün (%33) kan kültürü pozitif saptanmıştır (10). Çalık ve Gökengin'in yaptığı ve 1990-2009 tarihleri arasında Türkiye'de yapılan bruselloz çalışmalarının incelendiği derlemede 4209 hastanın 1019'unun kan kültürü pozitif bulunmuş ve kan kültürünün hastaların ancak %24'ünü saptadığı bildirilmiştir (11). Çeken ve arkadaşlarının (12) akut bruselloz tanısında PCR testinin etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarında 35 hastanın 16'sında (%45) kan kültürü pozitif saptanmıştır. Yaptığımız bu çalışmada ise Rose-Bengal testi pozitif olan 60 hasta arasında akut hastalık veya relaps tanısı alan 32 hastanın dokuzunda (%28.1) kan kültürü pozitif bulunmuştur. Kan kültürü yönteminin duyarlılığının düşük olması ve etkeni saptamak için geçen sürenin uzun olması nedeniyle brusellozun laboratuvar tanısında serolojik testler önemli bir yer tutmakta ve rutin tanıda daha sık kullanılmaktadır (13).

Brusellozun serolojik tanısında en fazla kullanılan testlerden birisi STA testidir. Bu testte, 1/160 ve üzeri titreler aktif enfeksiyonu gösterse de özellikle endemik

bölgelerde geçirilmiş enfeksiyon olasılığı da göz önüne alınıp hastanın klinik bulguları da birlikte değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir (14). Tansel ve arkadaşlarının (15) Trakya Bölgesinde yaptıkları bir çalışmada, STA testinin duyarlılığı %87.5 olarak saptanmıştır. Serum Tüp Aglutinasyon testi çok sık kullanılan bir yöntem olmasına rağmen; blokan antikorlarının varlığı bruselloz tanısını güçleştirmektedir. Blokan antikorlar nedeni ile STA testi göz ardı edilmeyecek oranda yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Kan kültüründen sonuç almanın uzun sürmesi ve duyarlılığının düşük olması, serolojik testlerde yaşanan çapraz reaksiyonlar, yalancı negatiflik, hastalığın tedavisinden sonra da kanda antikor varlığının olması, postzon ve prozon olaylarının gerçekleşme olasılığı gibi olumsuz durumlar nedeniyle son yıllarda bruselloz tanısında PCR gibi moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (14,16).

Bu çalışmada üç aşamada PCR metodu kullanılmıştır. Bunlar; *Brucella spp.* DNA'sının hasta serumunda saptanması, PCR ile pozitif olarak saptanan numunelerde etkenin hangi tür olduğunun belirlenmesi, pozitif örneklerde altı adet virülans geninin varlığının araştırılmasıdır.

Uluslararası literatürde bruselloz tanısında PCR'in etkinliğinin gösterildiği az sayıda çalışma olmakla birlikte testin etkinliğinin çok daha yüksek saptandığı sonuçlar bulunmaktadır. Elfaki ve arkadaşlarının (18) bruselloz hastalarına ait serum örneklerinde etken DNA'sının saptanmasına yönelik PCR testinin kullanılması ile ilgili yaptıkları çalışmada bruselloz semptomları olan 25 akut hasta değerlendirmeye alınmıştır. Standart tüp aglutinasyon testinin duyarlılığı %84 ve PCR testinin duyarlılığı ise %96 olarak bulunmuştur. Colmenero ve arkadaşlarının (19) 2005 yılında yaptıkları çalışmada ise İspanya'da nörobruselloz tanısı alan 6 hastada SYBR Green I tabanlı real-time PCR testinin etkinliği araştırılmış; STA testinin duyarlılığı %66.6, kültür duyarlılığı %33.3 ve PCR testinin duyarlılığı ise %100 olarak bulunmuştur. Mitka ve arkadaşlarının (20) 2007 yılında yaptıkları çalışmada, akut bruselloz ve relapslarda PCR testi diğer konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Çalışma için bruselloz teşhisi konan 200 hastadan toplam 4926 örnek toplanmıştır. Bunların 1642'si periferik tam kan örneği, 1642'si buffy coat ve 1642'si de serum örnekleri olup PCR testi için dört farklı primer kullanılmıştır. Bu çalışmada PCR testinin duyarlılığı tam kan, buffy coat ve serum örneklerinde sırasıyla %95.5 ile %100, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD ise %93.5 ile %100 arasında bulunmuştur (20). Baddour ve Alkhalifa'nın (21) yaptığı çalışmada, insanda periferik kanda *Brucella spp.* DNA'sının tespiti için üç farklı PCR tekniği kullanılmıştır. PCR testinin özgüllüğü üç testte de %100 olarak bulunmuş, duyarlılıkları ise sırası ile %53.1, %88.4 ve %98 olarak tespit edilmiştir. Li ve arkadaşlarının (21) 2018 yılında yaptıkları çalışmada, Pekin'de bir hastanede bruselloz spondilit tanısı alan 31 hastaya ait doku örneklerinde real-time PCR testinin tanı etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada STA testinin duyarlılığı %80.6,

özgüllüğü %100, PPD %100, NPD ise %76.9 olarak bulunmuştur. Real-Time PCR testinin duyarlılığı ise %93.5, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD ise %90.9 olarak saptanmıştır (22).

Yaptığımız bu çalışmada ise geçirilmiş enfeksiyon ve takipli hastalar çıkarıldıktan sonra geri kalan 32 hastanın 19'unun (%59.2) serum örneklerinde real-time PCR yöntemi ile etkenin DNA'sı saptanmıştır. Kullanılan PCR testinin özgüllüğü ve PPD'i %100; NPD'i ise %87.1 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlarda duyarlılık düzeyi uluslararası literatür bilgilerine yakın fakat göreceli olarak düşük bulunmuştur. Bu durumun olası nedenleri olarak bazı faktörler dikkat çekmiştir. Hasta numunesi olarak çalışmamızda serolojik testler için laboratuvara gönderilen ve ateşli dönem takibi yapılmadan alınan serum örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda bruselloziste kanda bulunan ve bakteriyemiye neden *Brucella spp.* yükünün oldukça düşük olduğu bildirilmektedir (23). Brusella, hücre içi yerleşen bir etken olduğundan kanda daha çok fagositik hücreler içine yoğunlaşmaktadır. Ayrıca, bakterinin kanda bulunan DNA'sının saf olarak izole edilmesinde kullanılan yöntem ve ticari kitlere göre önemli farklılıklar oluşmaktadır. Dolayısıyla, bazı çalışmalarda bildiriliği üzere tam kan kullanılması veya *Brucella spp.* DNA'sını daha iyi düzeyde özütleyen ticari ekstraksiyon kitlerinin kullanılması testin etkinliğini arttıracak bir husus olarak görülebilir (24). Ancak yine de hastadan tek numune alınarak tanıya gidilmesinde ve PCR'in serum etkinliğinin gösterilmesi yönünden elde ettiğimiz sonuç önemlidir. Test için hastadan ateşli dönemde veya ateş yükselmesi öncesi dönemde numune alınması kandaki bakteri sayısı arttığı için önemli olup bu durumda hasta kanındaki etken DNA'sı daha bol bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan real-time PCR kitinin test saptama limiti  $>10^3$  KOB/ml olduğu için bu düzeyin altındaki bakteriyemilerde testin yanlış negatif sonuçlanmış olması da olasıdır. Dolayısı ile daha hassas real-time PCR kitlerinin geliştirilmesi ile olası yanlış negatiflikler önlenebilecektir.

Brusella türlerinin bu güne kadar belirlenen en önemli virülans genleri *omp19*, *wbka*, *manA*, *mviN*, *üre* ve *perA* olup çalışmamızda da bu genler araştırılmıştır. Bu genler tarafından kodlanan faktörler bakterinin enfeksiyon patogenezine, doku yayılımına ve optimal olmayan koşullarda hayatta kalma özelliğine katkı sunan etkiler sağlamaktadır. Çalışmaya alınan ve *Brucella*

*spp.* DNA'sı saptanan tüm örneklerde çalışılan bu altı virülans geninin hepsi pozitif bulunmuştur. Bu sonuç, ilimiz ve bölgemizdeki suşların önemli virülans özelliklerini taşıdığına bir göstergesi olmuştur. Mirnejad ve arkadaşlarının (25) çalışmasında İran'ın farklı bölgelerinden izole edilen *B. melitensis* ve *B. abortus* suşlarında bulunan virülans faktörleri moleküler yöntemler ile araştırılmış ve multipleks PCR yöntemi ile *manA* %100, *mviN* %94.9, *omp19* %93.6, *perA* %92.3, *wbka* %89.7 ve *üre* %74.4 oranında tespit edilmiştir. Rahdar ve arkadaşlarının (7) yine İran'da yaptığı çalışmada sinovyal sıvı örneklerinden bruselloz etkeni ve bunlarda bulunan virülans genlerinin çeşitliliği multipleks PCR yöntemi ile araştırılmış ve *virB*, *omp31*, *cbg*, *zhuA* ve *manA* geni *B. melitensis* suşlarının hepsinde (%100) saptanmıştır. *Brucella abortus* suşlarında ise *zhuA* virülans geni %60, *manA* geni ise %80 oranında tespit edilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışma ülkemizde saptanan *B. melitensis* suşlarındaki virülans genleri hakkındaki yayınlanmış olan çok az düzeydeki veriye önemli katkı sağlayacaktır.

#### Sonuç

Bu çalışmada, PCR'in bruselloz tanısındaki etkinliği, tür tayini ve virülans gen sıklığı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre PCR'in brusellozlu hastaların önemli bir kısmını birkaç saatte doğru tanımlamış olması ve hiç yanlış-pozitif sonuç vermemiş olması önemli bulunmuştur. Daha duyarlı PCR kitlerinin kullanılması, hastadan bakteriyemik olduğu dönemde numune alınmasına azami dikkat edilmesi, daha hassas DNA özütleme kitlerinin tercih edilmesi ile PCR'in tanı duyarlılığını arttırabileceği öngörülmüştür. Bu çalışma ile ayrıca, ilimiz ve bölgemizde *B. melitensis*'in etken olarak bulunduğu ve bu suşların önemli virülans genlerinin hepsini taşıdığı saptanmıştır. Ülkemizden bildirilen daha önceki veriler ile birlikte elde ettiğimiz bu sonuç bölgemizdeki bruselloz olgularının neredeyse tamamının küçükbaş hayvan kaynaklı olduğunu göstermiş olup hastalığın azaltılması ve eradike edilmesi için öncelikle bu hayvan grubundan çalışmalara başlanması gerekliliğini de ortaya çıkartmıştır. Ülkemizde brusellozlu hastaların hızlı ve doğru tanımlanması, uygun ve etkin antimikrobiyal tedaviye alınmaları ve ayrıca özellikle küçükbaş hayvanlarda hastalığın hızlı bir şekilde kontrol altına alınmasına ve eradike edilmesine olan gereksinim devam etmektedir.

**KAYNAKLAR**

1. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against Brucella. *J Vet Sci* 2017; 18: 281-90.
2. Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Morata P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis. *Clin Chim Acta* 2017; 469: 1-9.
3. Shehabi A, Shakir K, El-Khateeb M, Qubain H, Fararjeh N, Shamat AR. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J Infect* 1990; 20: 5-10.
4. Bhaskar S, Anupam J, Anuradha V. Lab diagnosis of brucellosis. *Pediatr Infect Dis* 2016; 8: 40-4.
5. Rahman AA, Berkvens D, Saegerman C et al. Seroprevalence of brucellosis in patients with prolonged fever in Bangladesh. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10: 939-46.
6. Romero C, Lopez-Goni I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of Brucella spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3735-7
7. Rahdar HA, Golmohammadi R, Mirnejad R, Atae RA, Alishiri GH, Kazemian H. Diversity of virulence genes in Brucella melitensis and Brucella abortus detected from patients with rheumatoid arthritis. *Microb Pathog* 2018; 118: 247-50.
8. Madkour MM. Bruselloz. Ang O, Yumuk Z. İstanbul: Nobel, 2008.
9. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech* 2013; 32: 177-88.
10. Kuyumcu ÇA. Brusellozun Serolojik Tanısında Kullanılan Coombs Gel Testi ile Elisa ve STA Testlerinin Karşılaştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, 2017.
11. Calik S, Gokengin A. Human brucellosis in Turkey: a review of the literature between 1990 and 2009. *Turk J Med Sci* 2011; 41: 549-55.
12. Ceken S, Kaygusuz S, Kilic D, Agalar C. Akut bruselloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kullanımı. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2015; 72: 91-8.
13. Güzelant A, Kurtoğlu MG, Kaya M, Keşli R, Terzi Y, Baysal B. Brusellozis'in tanısında brucella-capt'in diğer serolojik testler ile karşılaştırılması. *Selçuk Tıp Dergisi* 2009; 25: 125-31.
14. Us AD. Temel İmmünoloji ve Seroloji, 1. Baskı. Ankara, Hipokrat Kitapevi, 2016: 183-6.
15. Tansel O, Yavuz M, Kuloglu F, Akata F. Trakya Üniversitesi Hastanesine başvuran 40 bruselloz olgusunun değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17: 1-4.
16. Al Dahouk S, Nockler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 833-45.
17. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brusellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 115-23.
18. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of Brucella DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 1-7.
19. Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P. Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1025-7.
20. 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: 1211-8.
21. Baddour MM, Alkhalifa DH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of Brucella DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol* 2008; 54: 352-7.
22. Li M, Zhou X, Li J, Sun L, Chen X, Wang P. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Medicine* 2018; 97: 62.
23. Queipo-Ortuño MI, Tena F, Colmenero JD, Morata P. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 109-14.
24. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of Brucella spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J* 2010; 51: 306-13.
25. Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Molecular investigation of virulence factors of Brucella melitensis and Brucella abortus strains isolated from clinical and non-clinical samples. *Microb Pathog* 2017; 109: 8-14.