



BRUSELLOZDA TANI

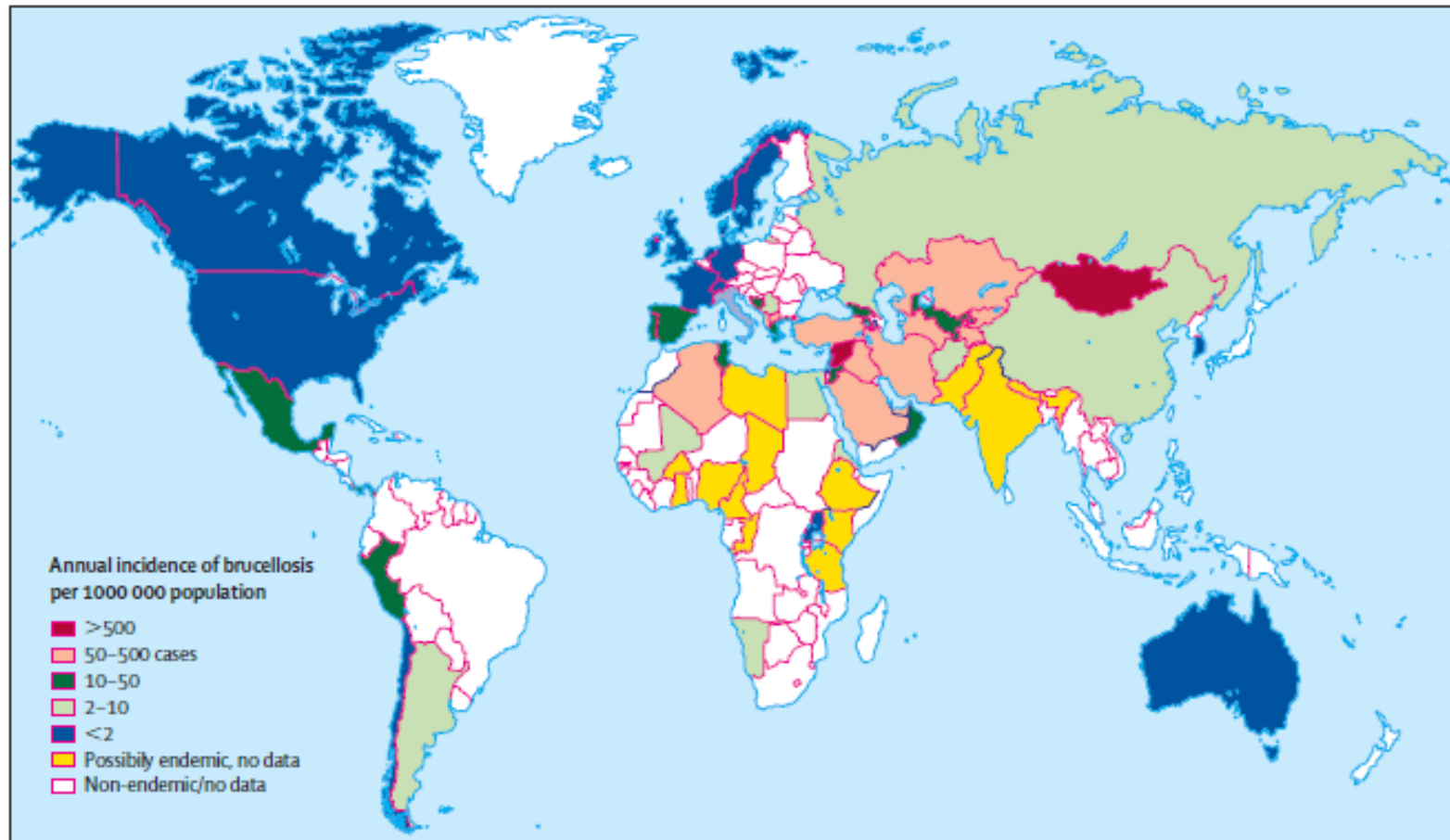
+

Dr. Şua SÜMER

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

The New Global Map of Human Brucellosis



Türkiye Verileri

- Ülkemizde bildirim zorunlu....
- 2011 verileri; 7177 kesin vaka
- 2012 verileri; 6757 kesin vaka
- Konya;
 - 2011; 110 kesin, 607 olası vaka
 - 2012; 277 kesin, 116 olası vaka

Mikrobiyolojik
Tetkikler

Anamnez
ve
Fizik Muayene

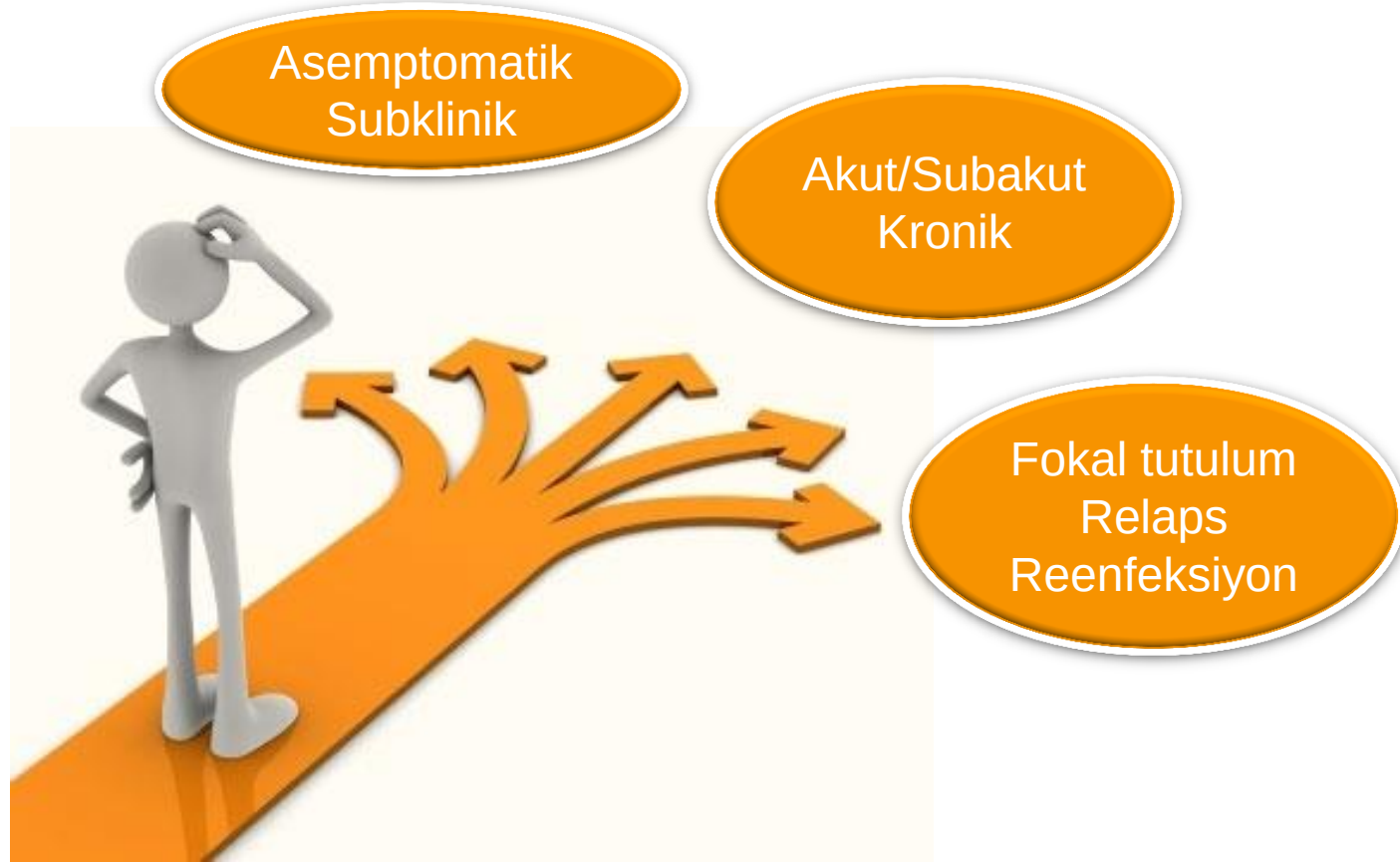


Biyokimyasal
ve
Hematolojik
Tetkikler

TANI

Anamnez ve Fizik Muayene

- ✓ Ateş
- ✓ Terleme
- ✓ Baş ağrısı
- ✓ Eklem ağrısı
- ✓ Bel ağrısı
- ✓ Karın ağrısı
- ✓ Halsizlik



Anamnez ve Fizik Muayene

- ✓ Ateş
- ✓ Hepatomegali
- ✓ Splenomegali
- ✓ Spinal vertebra hassasiyeti
- ✓ Artrit



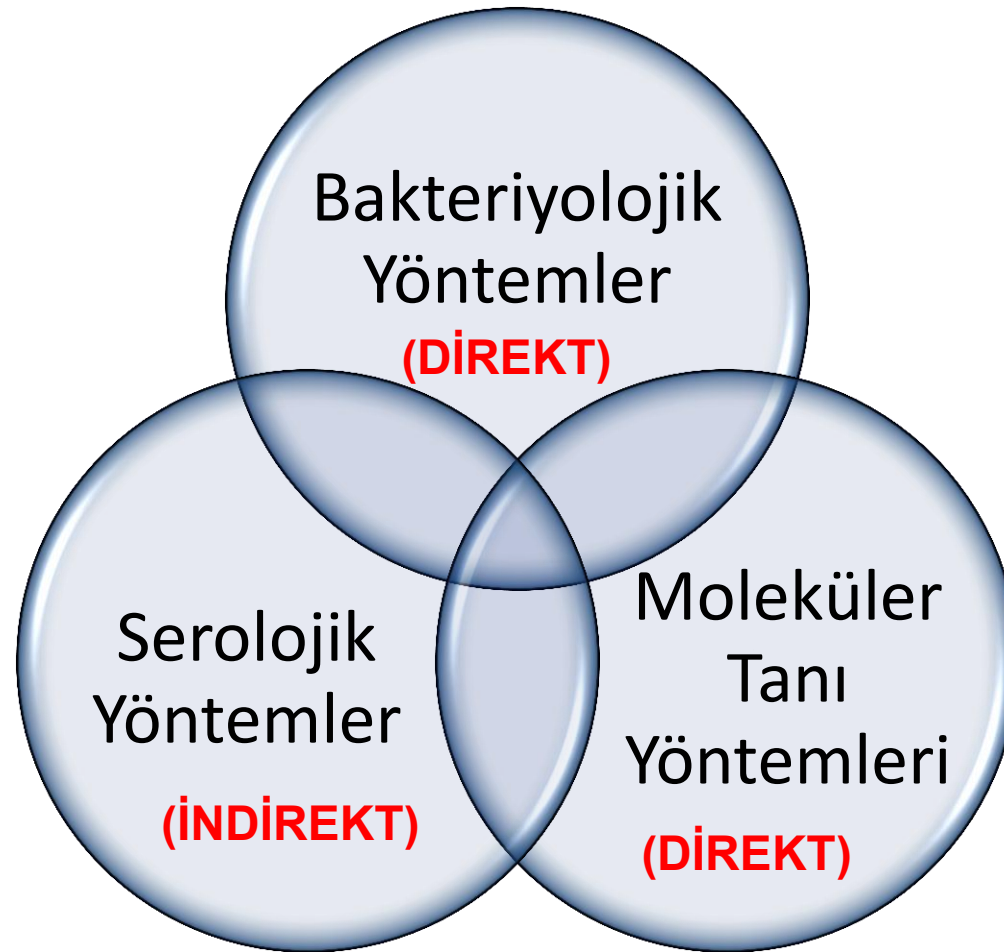
Biyokimyasal ve Hematolojik Tetkikler

- ✓ Hematolojik tetkikler;
 - Lökosit sayısı; normal, düşük veya yüksek
 - Hemoglobin düzeyi; düşük (anemi),
 - Trombosit sayısı; düşük (trombositopeni)

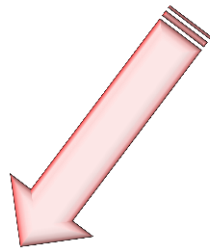
- ✓ Biyokimyasal tetkikler;
 - AST, ALT yüksekliği

- ✓ CRP yüksekliği
- ✓ ESR orta derecede yükseklik

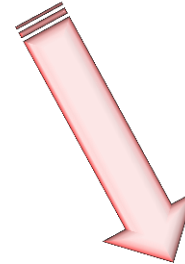
PANSİTOPENİ



Bakteriyolojik yöntemler



Kültür



Gram boyama

- Kültür tanıda **altın standart** yöntem
- **Fakat ?????**
 - Hastalığın süresi ve etkenin alt türü (akut, subakut, kronik...B.melitensis, abortus, suis vs..)

➤ Kan ve kemik iliğinden sıklıkla izole edilir

➤ Şüpheli örnekler 2 saat içinde ekilmelidir

➤ 2-8°C veya -20°C'de saklanabilir

➤ Doku örnekleri nemli tutulmalıdır

- Kültür tanıda **altın standart** yöntem
- **Fakat ?????**
 - Ekim yöntemi ve besiverleri

Tedavi sonrası takipte kullanılmaz

Relapsların teşhisinde duyarlılığı düşüktür

Aerosoller ile laboratuvar personeline bulaş riski vardır

kültüründen daha iyi sonuç verir

Mikrobiyolojik Tetkikler KÜLTÜR

MONOFAZİK

**BİFAZİK
(CASTENADA)**

**OTOMATİZE
SİSTEMLER**

KATI BESİYERLERİ

**Kanlı agar
Çukolata agar
Trypticase soy agar
Brucella agar
Thayer Martin by.
BCYE agar**

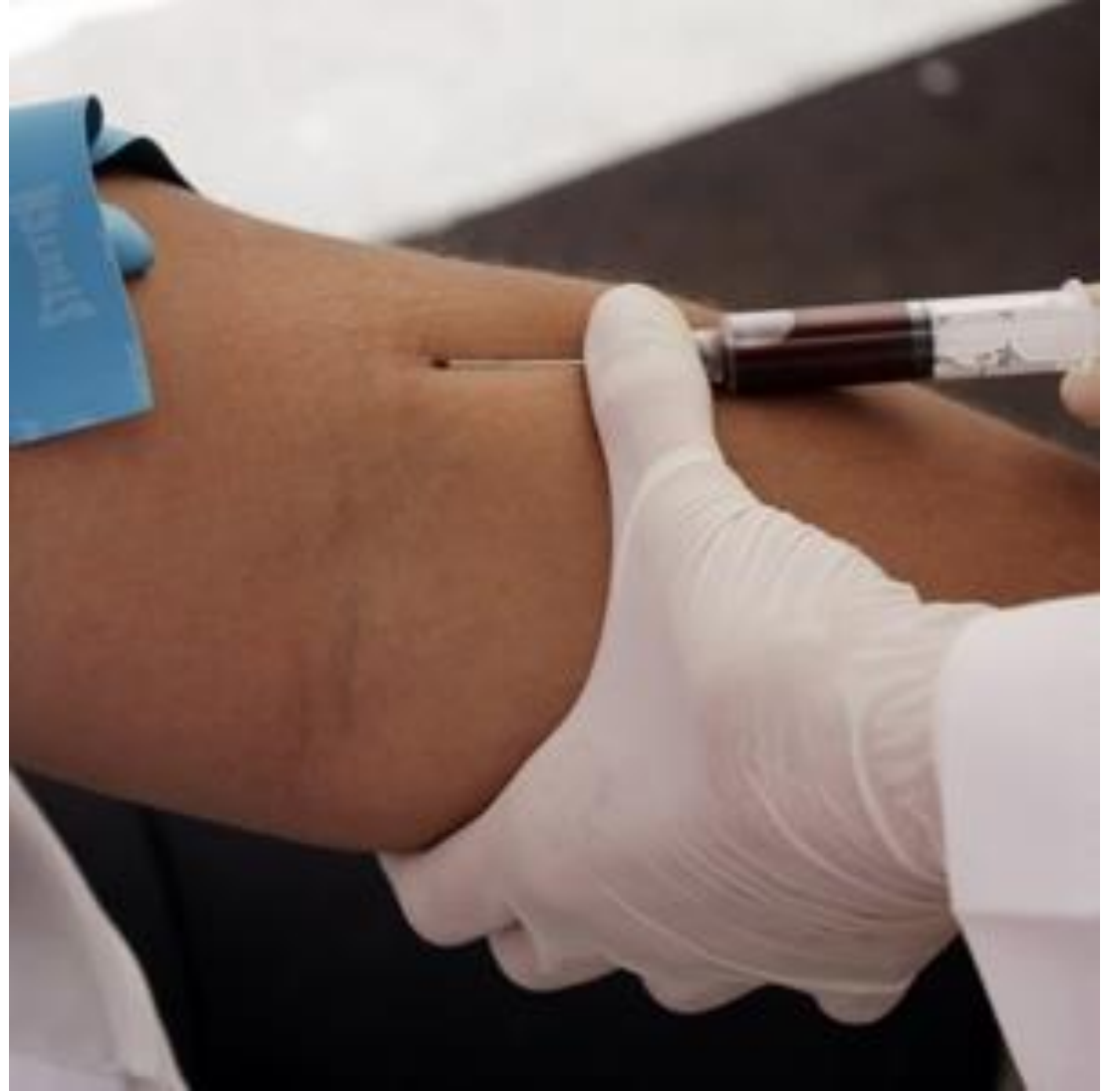
5 ml kan
Brain heart infuzyon agar
Brain heart infuzyon broth

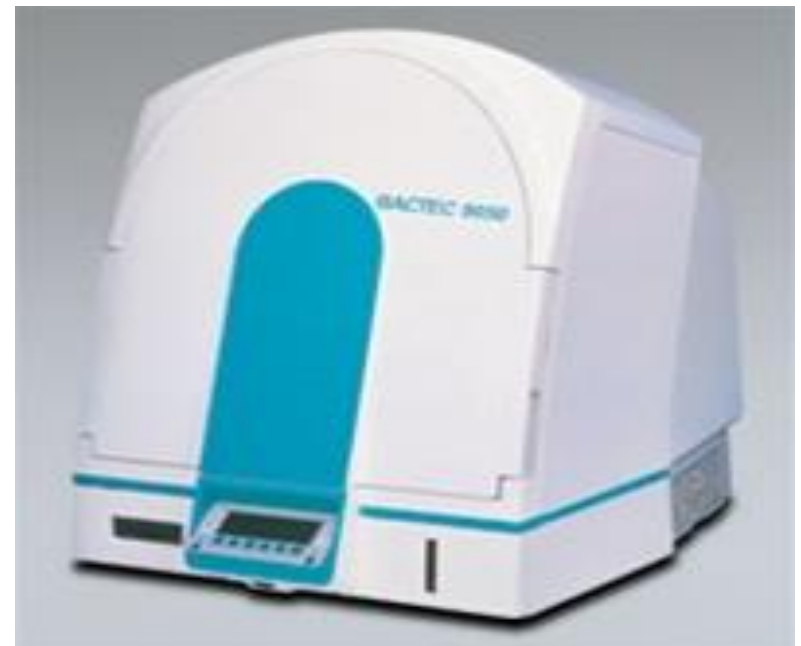


Castaneda bifazik besiyeri



37°C'de
30 gün inkubasyon





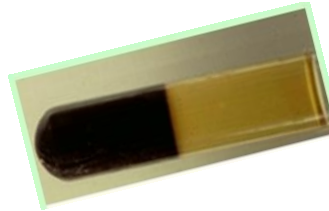
Lizis Santrifugasyon Yöntemi



50ml steril kapaklı tüp
20 ml steril distile su
5 ml kan
1.5 ml %4 sodyum sitrat



2000 devir

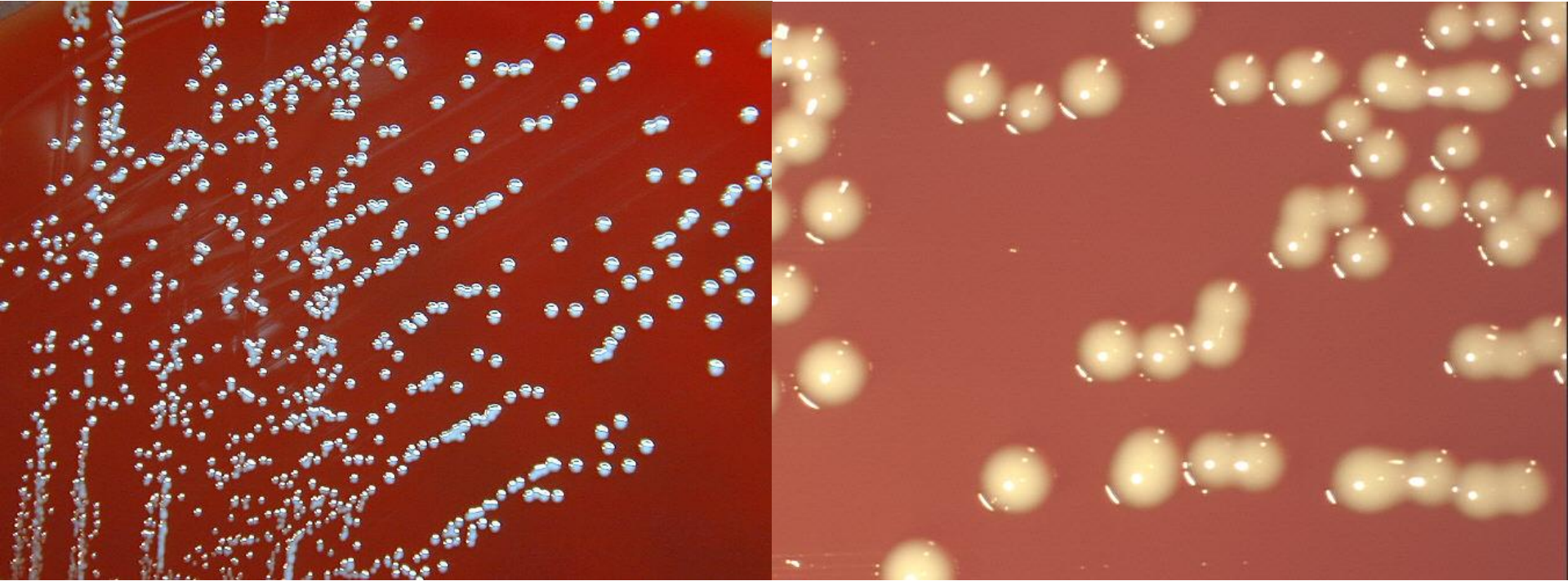


30 dakika



Brain heart infuzyon agar plakları

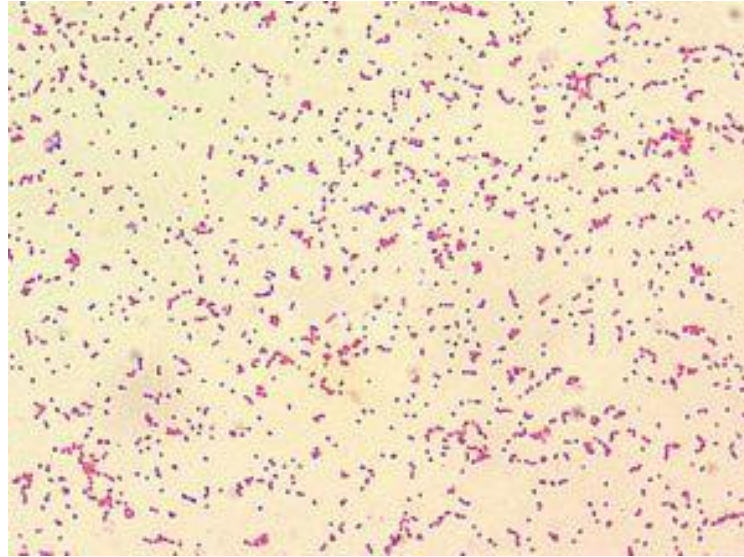
KANLI AGAR GÖRÜNÜMÜ



Kolonileri küçük, yuvarlak, saydam, şebnem tanesine benzer, nonhemolitik ve S tipi kolonilerdir

Mikrobiyolojik Tetkikler

GRAM BOYAMA



İnce, solgun boyanan gram negatif kokobasiller

➤API 20NE tiplendirme sisteminde;

Moraxella phenylpyruvica

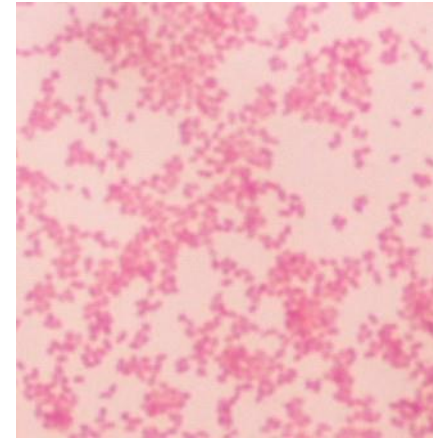
➤COMBO tip 5 (Dade-Microsan)

tiplendirme sisteminde; *Moraxella spp.*

➤Haemophilus-Neisseria tanımlama

panelinde (Dade-Microsan); *Haemophilus*

influenzae biotip 4



Kan kültürü ve Kemik iliği kültüründe üreme oranları

Tanı yöntemi	n	Hastalığın evresine göre tanı oranları (Semptomların süresi) (%)			
		Akut Bruselloz (≤8 hafta)	Subakut bruselloz (8-52 hafta)	Kronik bruselloz (≥52 hafta)	Ref.
KAN KÜLTÜRÜ					
Brucella broth ve subkültür	50	66.6	23.5	0	1
Castaneda yöntemi	50	83.3	40	25	2
Castaneda yöntemi	103	54.7	36.4	28.6	3
KEMİK İLİĞİ KÜLTÜRÜ					
Brucella broth ve subkültür	50	83.3	52	33	1
Castaneda yöntemi	50	97.2	90	50	2
Castaneda yöntemi	103	92.2	72.7	64.3	3

Expert Rev. Anti Infect. Ther. 9 (7), (2011)

1. Clin. Microbiol. Infect. 8(11), 749-752 (2002) Özkurt Z ve Ark.

2. J. Infect. Dis. 153(1), 122-125 (1986) Gotuzzo E ve Ark.

3. Int. J. Infect. Dis. 12(3), 303-307 (2008) Mantur BG ve Ark

MINIREVIEW

Detection of Brucellae in Blood Cultures

P. YAGUPSKY*

Clinical Microbiology Laboratories, Soroka Medical Center, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

TABLE 2. Time-to-detection of *Brucella* spp. by automated blood culture systems

System	Incubation for ≥ 14 days	Blind subculture	Patients (<i>n</i>)	Positive cultures (<i>n</i>)	Detection by instrument within:				Reference
					4 days		7 days		
					<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
BACTEC 460	Yes	Yes	15	15	0	0.0	15	100.0	2
	No	Yes	1	3	0	0.0	0	0.0	17
	No	Yes	?	56	? ^a	? ^a	? ^a	? ^a	27
BACTEC NR	Yes	Yes	8	12	0	0.0	1	8.5	12
	Yes	No	6	12	0	0.0	0	0.0	19
	Yes	No	19	19	0	0.0	? ^b	? ^b	15
	No	No	?	58	44	75.9	58	100.0	13
	Yes	Yes	21	27	2	7.4	21	77.7	31
	No	No	27	42	6	14.3	42	100.0	31
	NA ^c	Yes	1	2	0	0.0	?	?	35
	Yes	Yes	1	9	0	0.0?	? ^d	? ^d	35
BACTEC 9000	No	No	?	30	30	100.0	30	100.0	13
	Yes	Yes	16	42	37	88.1	41	97.6	32
	Yes	No	97	97	69	71.1	94	96.9	3
	Yes	Yes	18	18	10	55.6	18	100.0	26
Vital	Yes	Yes	18	18	1	5.6	8	44.4	26
BacT/Alert	Yes	Yes	5	11	1	9.1	1	9.1	5
	NA ^d	NA ^d	1	3	3	100.0	3	100.0	30
	Yes	Yes	5	9	9	100.0	9	100.0	23

^a Two cultures (3.6%) were detected by day 5, and twenty-seven (48.2%) were detected by day 10.

^b Mean time-to-detection, 14 days (range, 7 to 30 days).

^c All positive cultures were detected within 7 days. NA, not applicable.

^d All positive cultures were detected within 20 days.

PCR

- Bcsp 31 geni 31 kDA immungenetik dış membran proteini
- PCR bakteri ile karşılaştıktan yaklaşık 10 gün sonra pozitif olur
- Tür ve biyotip ayrımında kullanılabilir
- Tam kan, serum, vücut sıvıları ve kültürden identifikasyon için kullanılabilir
- *Ochromobactrum anthropi*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* ile çapraz reaksiyon

MALİYET

Mikrobiyolojik Tetkikler MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

PCR

- Kültüre alternatif bir yöntem
- Nörobruselloz ve lokalize enfeksiyonlarda ön plana çıkmaktadır
- Daha fazla sayıda moleküler marker kullanımı sensitivite ve spesifiteyi artırır



Real-time/multiplex PCR (Sensitivite:%100 Spesifite:%93)

PCR



Gelecekte nükleik asit testleri altın standart test olarak kültürün yerini alabilir

Standardizasyon ?!!!!

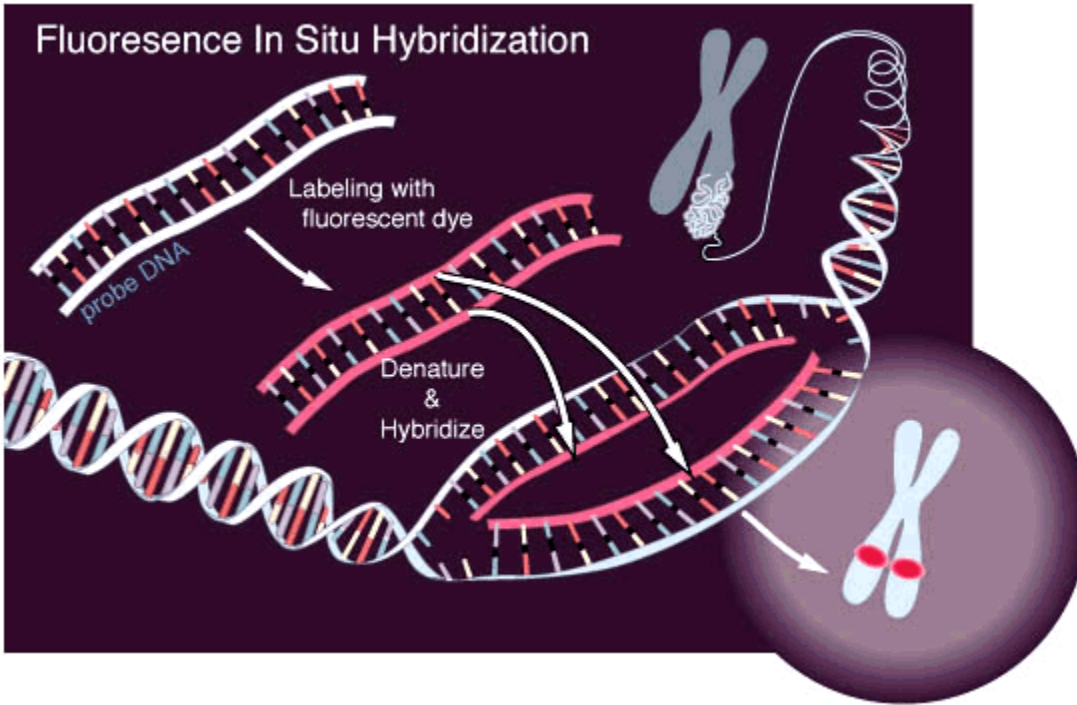


- ❖ Test kanda (+) sonuç verirken vücutta canlı bakteri olmayabilir
- ❖ Tedavi sonrası (-) PCR sonucu relaps olmayacağı anlamına gelmez

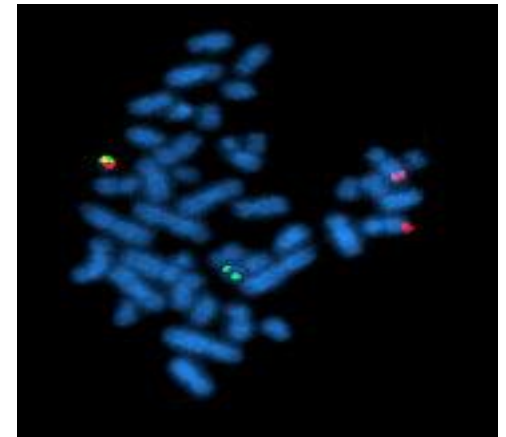
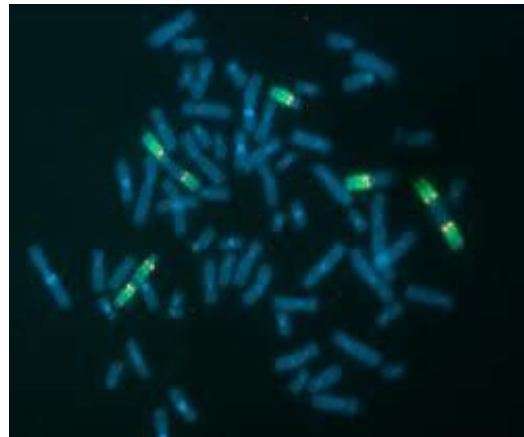
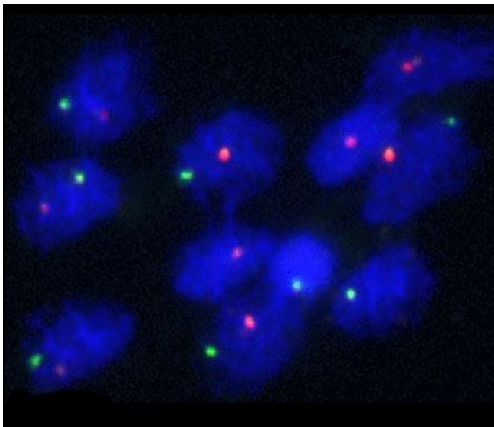
REAL TIME PCR DUYARLILIK ORANLARININ KAN KÜLTÜRÜ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Klinik bulgular	Hasta sayısı (%)	Pozitif Test Sonuçları	
		Kan Kültürü (%)	RT-PCR (%)
Akut bruselloz	34 (68)	13 (38.2)	31 (91.2)
Kronik Bruselloz	6 (12)	1 (16.7)	4 (66.7)
Fokal organ tutulumu	10 (20)	4 (40)	9 (90)
Menenjit	4 (8)	1 (16.7)	4 (100)
Epididimoorşit	4 (8)	2 (50)	3 (75)
Osteomyelit	1 (2)	1 (100)	1 (100)
Spinal epidural abse	1 (2)	0	1 (100)
Toplam	50 (100)	18 (36)	44 (88)

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)



- Nükleik asit izolasyonuna ve amplifikasyonuna gerek yok
- Ribozomal RNA dizilerine uygun floresan boya ile işaretli proplar
- Birkaç saat içinde cins düzeyinde identifikasyon



Mikrobiyolojik Tetkikler

SEROLOJİK YÖNTEMLER

Spot Test

Standart Tüp
Aggl. Testi

Rose
Bengal

Brusellozun serolojik
tanısı ilk olarak 1897'de
basit bir aglütinasyon testi
ile başladı.....

ELISA

BRUCELLACAPT

Dot-
immunobinding
(DIA) ve
Dipstick testi

Kompleman
Fiksasyon
Testi

Mikrobiyolojik Tetkikler

SEROLOJİK YÖNTEMLER

İmmunfloresan test

Radioimmünassay

Brusellozun serolojik
tanısında kullanılan testler
halen geliştiriliyor

Floresan
Polarisation Assay

Double-gel
immündefüzyon
S-LPS, Counter
Immünelektroforez
(CIEP)

Antikor yanıtını araştırdığımız temel antijen lipopolisakkarit yapısındaki antijenlerdir



S-LPS

lipid A molekülü,
ayırt ettirici yağ asitleri,
glukoz,
mannoz,
kinovozamin içeren bir kor bölgesi
4-amino, 4-6 dideoksimannoz

Antikor yanıtını araştırdığımız temel antijen lipopolisakkarit yapısındaki antijenlerdir

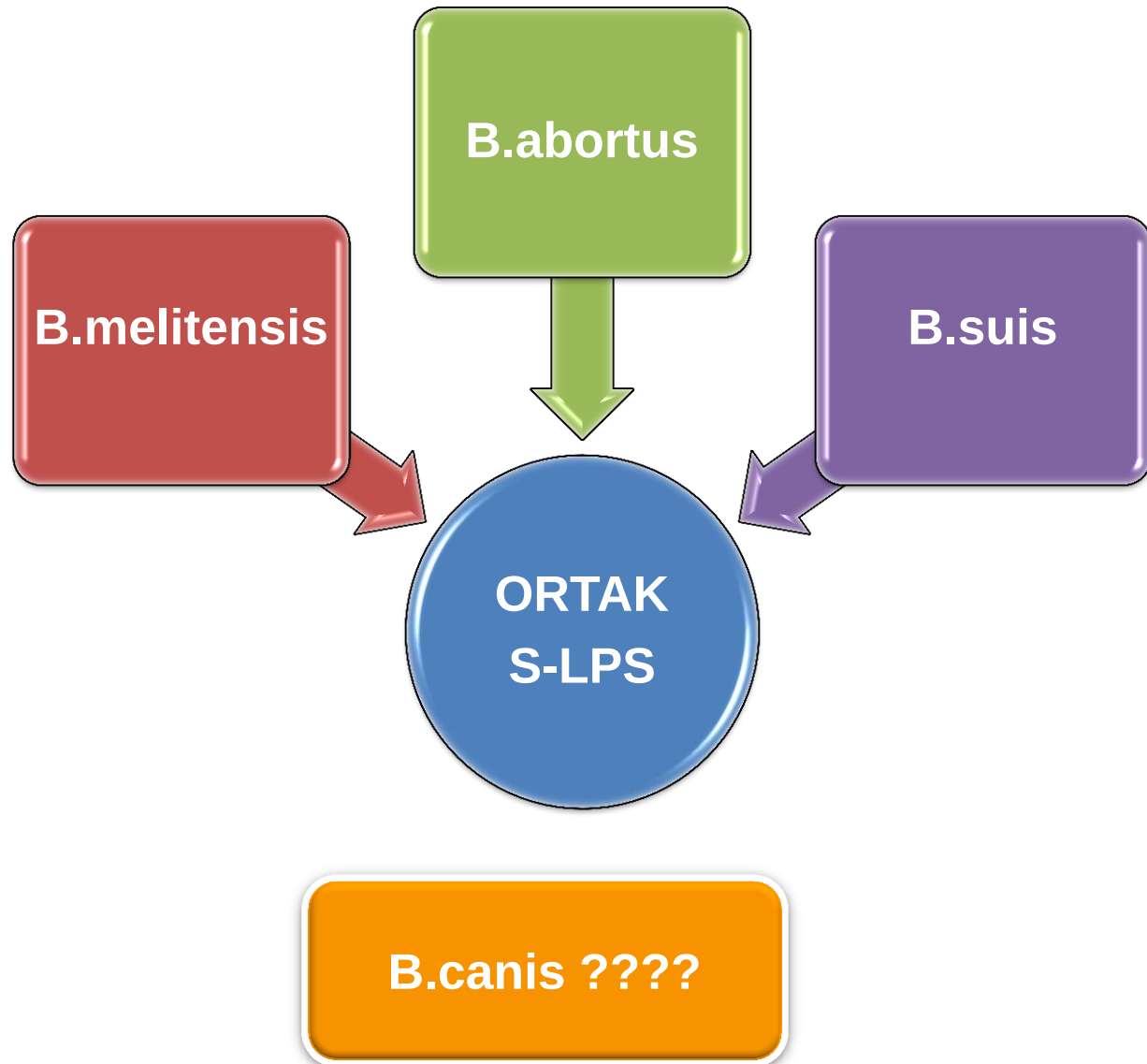


S-LPS

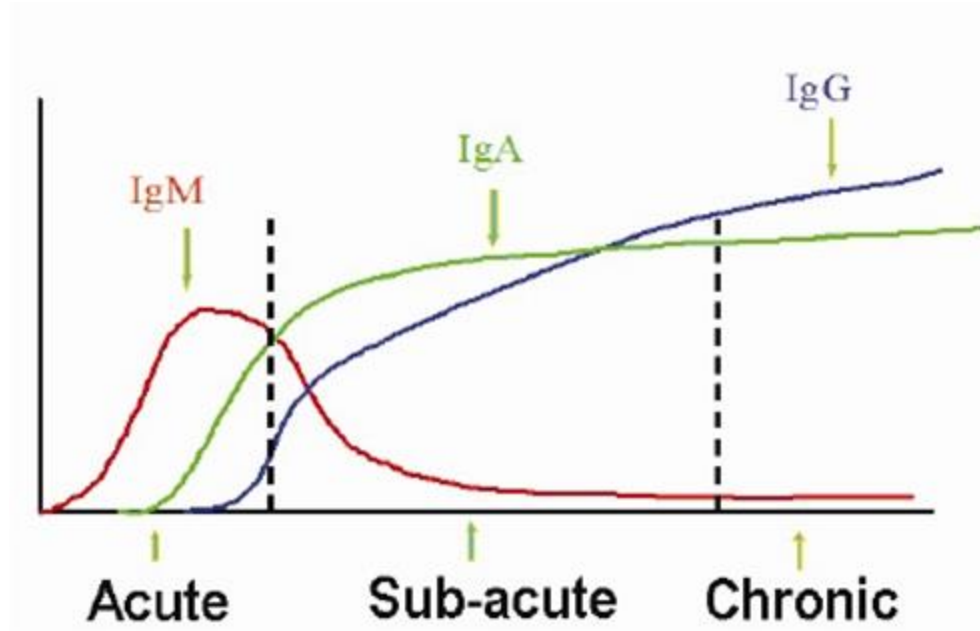
lipid A molekülü,
ayırt ettirici yağ asitleri,
glukoz,
mannoz,
kinovozamin içeren bir kor bölgesi

4-amino, 4-6 dideoksimannoz

**serolojik yalancı pozitiflikten
sorumlu**



Brusella enfeksiyonu sırasında immün cevap



Bruselloz evresi	IgM	IgG	IgA
Akut	↑↑↑↑	↑↑↑ (IgG1 ve IgG3)	↑
Kronik	∅	↑↑ (IgG1 ve IgG4)	↑↑
Relaps	∅	↑↑	↑

Serolojik Testlerdeki Sorunlar.....

- Erken dönemde negatif olması
- Tedavisi tamamlanan hastalarda aglütinasyon titrelerinde pozitifliklerin devam etmesi
- Kronik bruselloz, relaps ve reenfeksiyon durumlarında serolojik testlerin yorumlanmasının güç olması
- Brusellozun endemik olduğu bölgelerde toplumda antibrusella antikorlarının yaygın olması
- Blokan antikorların varlığında bağlı bazı serolojik testlerin yanıltıcı olması

Rose Bengal

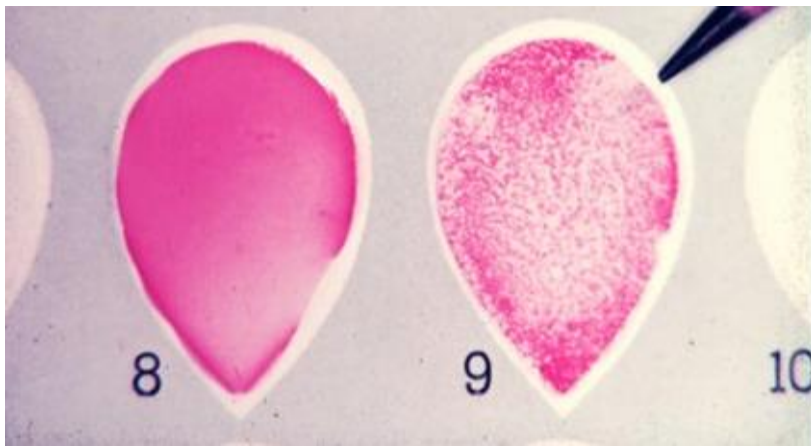
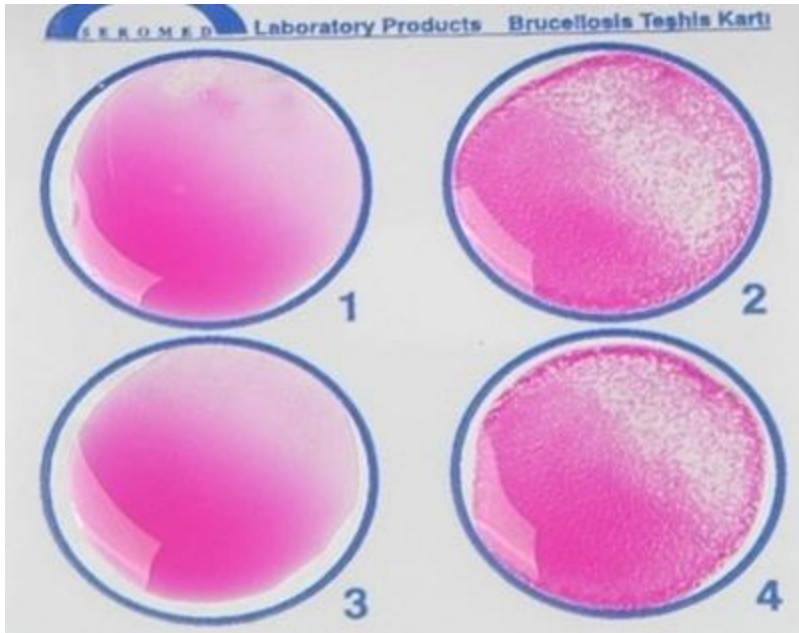
- Brucella abortus suşunun S kolonilerinin süspansiyonu
Rose Bengal boyası
pH: 3.65

SENSİTİVİTE: %96-100 arasında değişir

SPESİFİTE: Endemik bölgelerde %76.9'a düşebilir

- Pozitif sonuçlar mutlaka kültür ve/veya STA ile doğrulanmalıdır
- En hızlı ve duyarlı tarama testidir.

Rose Bengal Tarama Testi



Yalancı pozitiflik;

- ✓V.cholerae
- ✓F.tulerensis
- ✓Y.enterocolitica
- ✓M.tuberculosis
- ✓Lenfoma

Rose Bengal Testinin Tanısal Değeri

	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD	NPD
Bruselloz öyküsü/Brucella spp. teması olmayanlar	93.8	94.3	0.97	0.90
Tekrarlayan Brucella spp. temas öyküsü olanlar	91.7	91.2.	0.98	0.69
Bruselloz geçirmiş olanlar	91.6	76.9	0.89	0.91

Spot Test

- Tam kan kullanılarak yapılan lam aglütinasyon testidir.
- Özellikle kitle taramalarında parmaktan alınan kan ile çalışılır

Standart Tüp Aglütinasyon (STA) Testi

- Brucella aglütinini saptamada altın standart yöntemdir.
- **ANTİJEN:** B.abortus'un S kolonilerinden hazırlanan fenolle inaktive

STA testi uygun tedavi protokolünün seçiminde ve hastalığın seyrini göstermede önemli olan farklı immünglobulin sınıflarını ayırt edemez

• Tek baş

nollü

- **SPESİFİTE:** %100 (Hastalığın (2-ME) ne göre düşebilir)
 - Diğer proteinlerle olan çapraz reaksiyonlardan
 - Romatoid faktör aktivitesi ile oluşan IgM

Dithiothreitol (DTT)

Standart Tüp Aglutinasyon (STA) Testi



Standart Tüp Aglütinasyon (STA) Testi

Yalancı pozitiflik

- *F. tularensis*
- *Y. enterocolitica*
- *V. cholera*
- *Salmonella* spp.
- *S. maltophilia*
- *E. coli* O157
- Brucella deri testi

Yalancı negatiflik

- Agamaglobulinemi
- Hastalığın erken dönemi
- *B.canis* infeksiyonları
- Kronik bruselloz
- Blokan antikor varlığı
- Prezon olayı

Standart Tüp Aglütinasyon (STA) Testi

- Akut bruselloz belirti ve bulguları olan hastaların taranmasında STA testi **uygun** bir testtir

- ➤ inkübasyon döneminde
- ➤ kronik brusellozda
- ➤ aşılanma veya infeksiyon sonucu oluşan antikorların ayırımında

maz

alabilir.

KULLANIMI SINIRLIDIR

2-ME ve Rivanol

- Redüktan ajanların varlığında STA testi spesifik IgG antikorlarını ölçebilir
- 2-ME veya rivanol uygulamalarından sonra oluşan aglütinasyon IgG ile ilişkilidir
- STA'ya göre bir tüp azalma anlamlı kabul edilir
- Brusellozda relaps varlığını tespit etmede kullanılır

STA ve 2-ME testlerinin karşılaştırılması

STA => 1:320

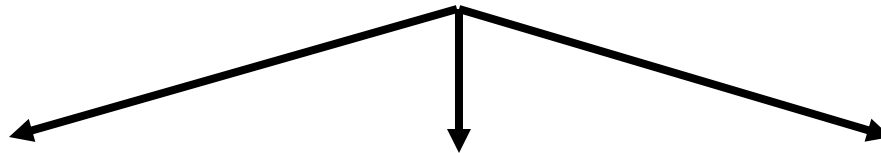
IgM + IgG

STA ve 2-ME testlerinin karşılaştırılması

STA => 1:320

IgM + IgG

2-ME

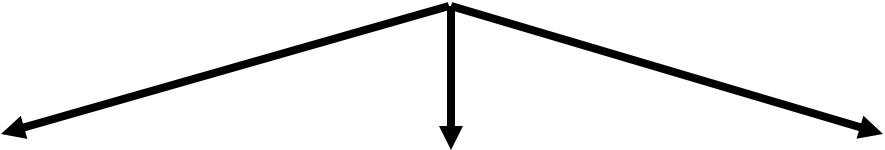


STA ve 2-ME testlerinin karşılaştırılması

STA => 1:320

IgM + IgG

2-ME



Negatif

Akut enfeksiyon

Coombs Testi

STA $\leq 1/160$ fakat klinik bruselloz ile uyumlu olan hastalar

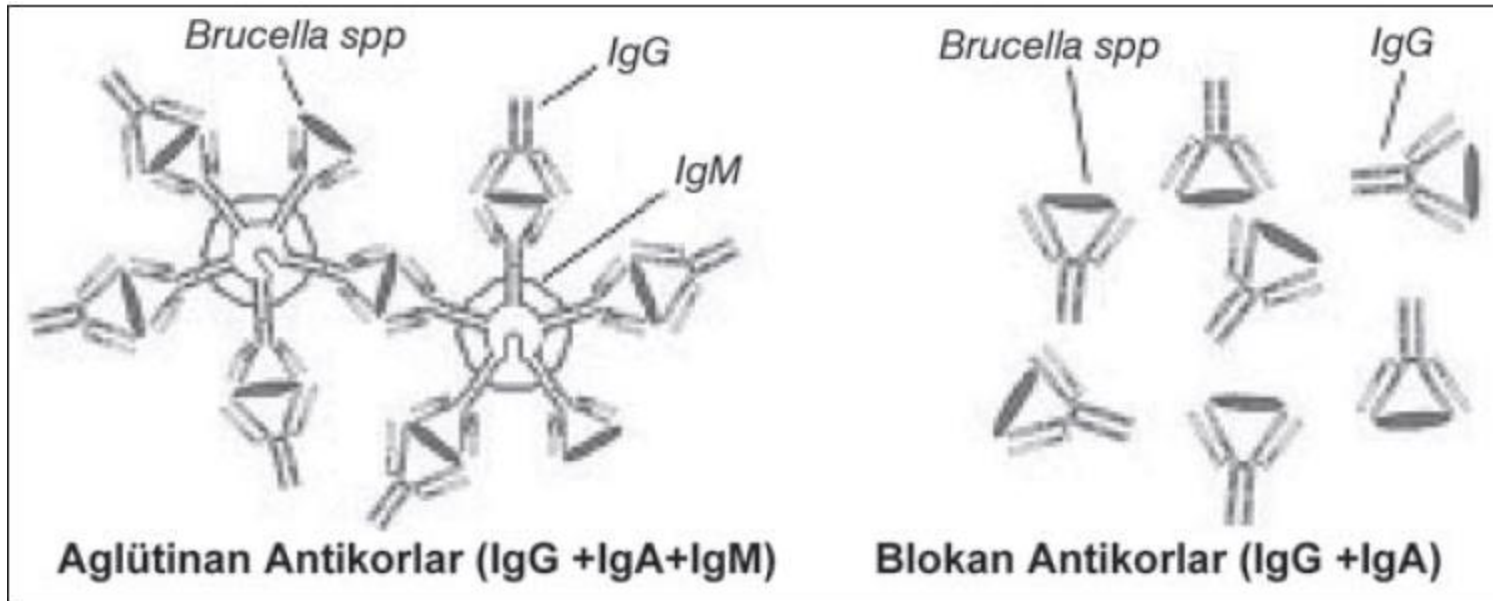


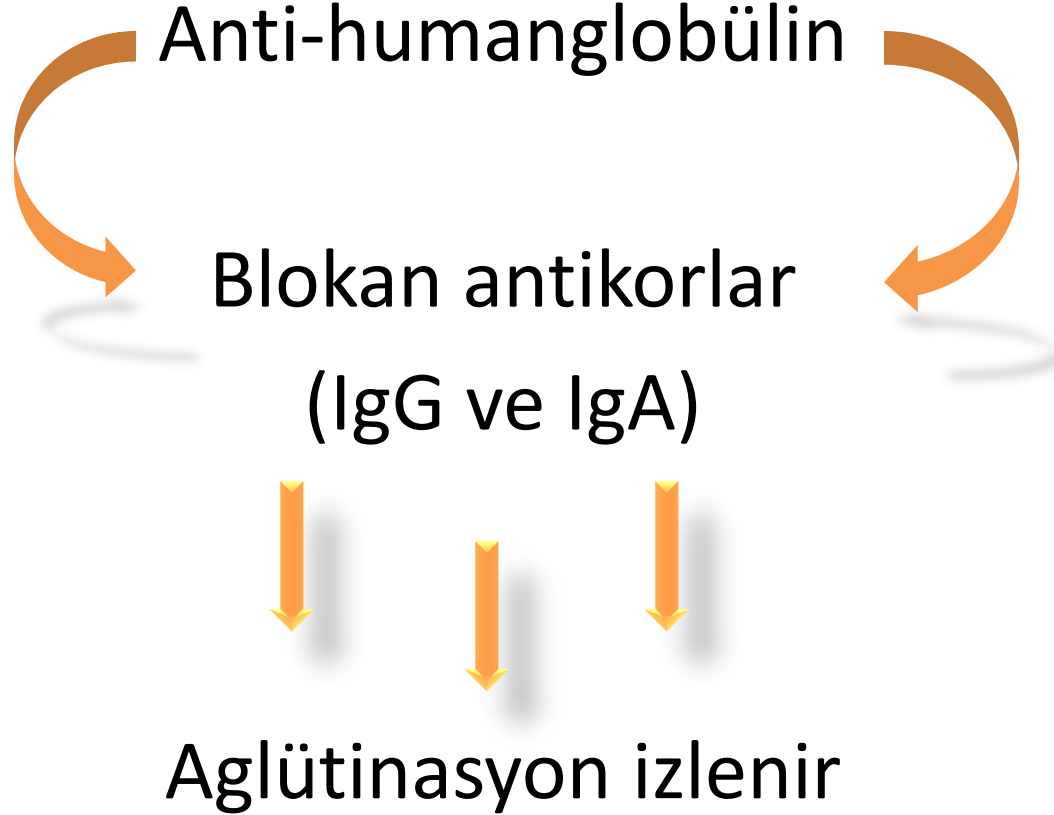
Blokan antikorlar (IgG ve IgA)



Aglütinasyon görülmez

- İnkomplet veya blokan antikorlar hastalığın akut safhasında olduğu gibi çok yüksek konsantrasyonlarda olmazlarsa klasik aglütinasyon testlerinde aglütine olmazlar
- Aglütinasyon anti-human globulin eklenmesi ile indüklenir



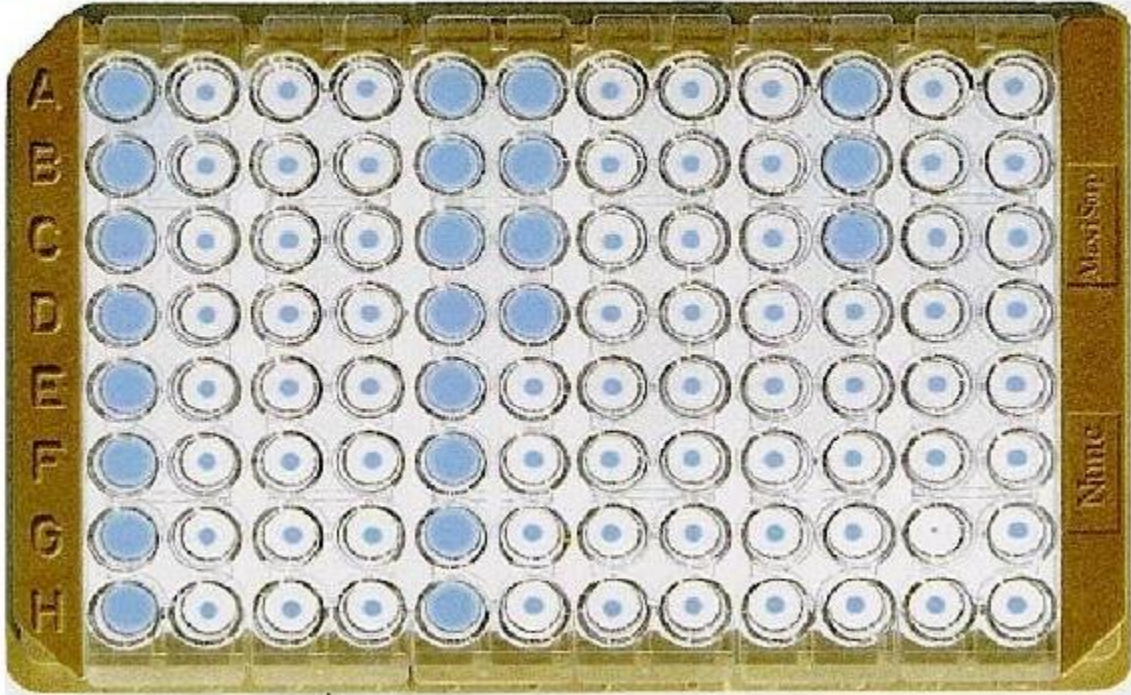


Relapsta ve kronik brusellozda coombs testi ile ölçülen titreler STA ile ölçülenlerden yüksektir

BRUCELLACAPT

- Kuyucuklarda gerçekleşen bir Coombs'lu Brucella aglütinasyon testidir.
- Coombs testi ile sensitivite ve spesifitesi aynıdır.
- Coombs testine göre daha kolaydır.
- Coombs testi gibi ikinci basamak bir testtir.
- STA ile saptanamayan eski olguları saptayabilir.
- Ancak hiçbir zaman Rose Bengal testinin yerini alamaz, daha pahalı ve yavaştır.

Şekil 1. Brucellacapt testinde pozitif ve negatif reaksiyonlar



ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of serological diagnostic tests for human Brucellosis in an endemic area

Filiz Arabacı¹, Mehmet Oldacay²

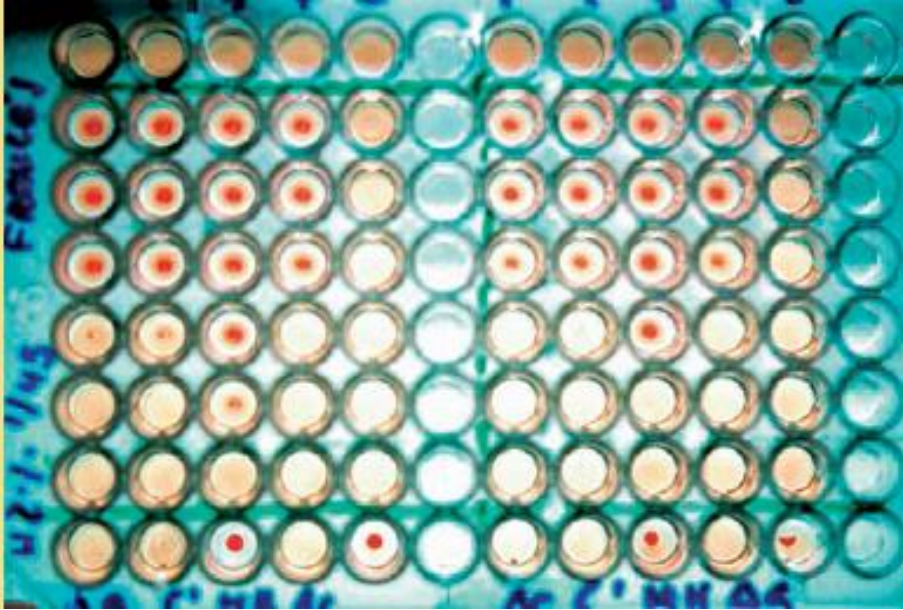
¹ Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology Çanakkale State Hospital, Çanakkale, Turkey

² Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology Çanakkale State Hospital, Çanakkale, Turkey

Table 1. Distribution of serological test results from sera of symptomatic patients and controls.

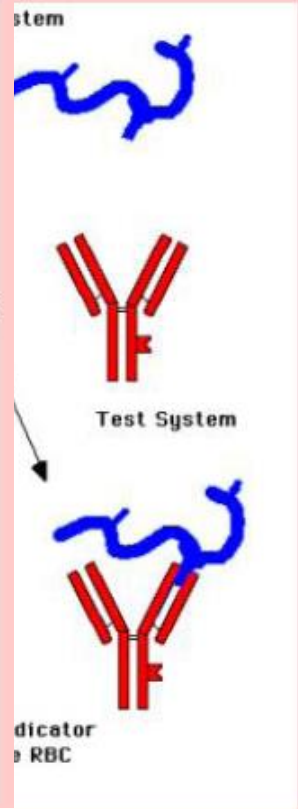
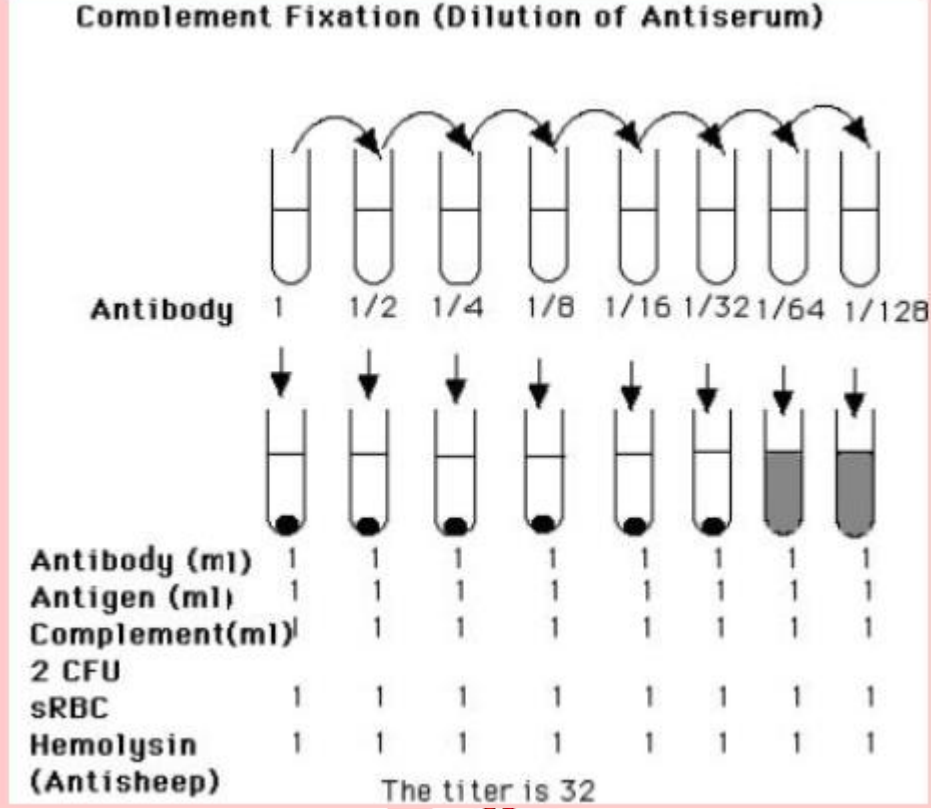
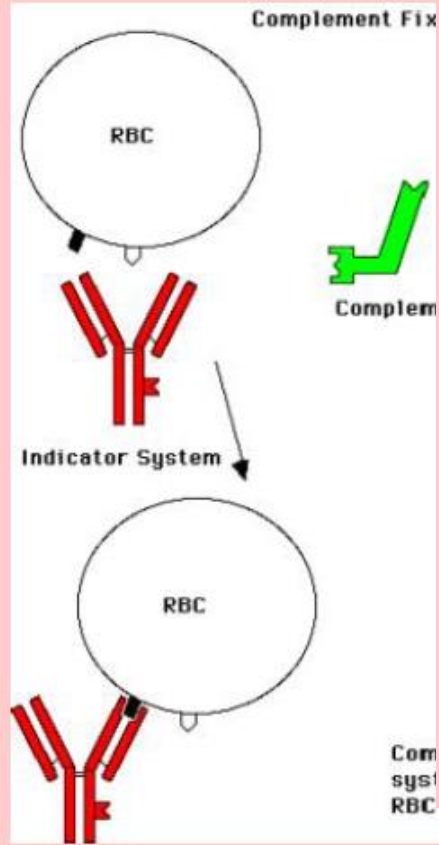
Titers	No. of patient sera (n=131)				No. of control sera (n=105)			
	R.Bengal	SAT	Coombs	B.Capt	R.Bengal	SAT	Coombs	B.Capt
0	117	40	19	13	91	99	102	103
1/40	56	22	82	5	12	2	2	1
1/80	34	20	12	5	2	3	1	1
1/160	20	17	10	9	2	1	0	0
1/320	5	18	23	25	0	0	0	0
1/640	4	9	49	23	0	0	0	0
1/1280	0	2	21	14	0	0	0	0
1/2560	0	3	16	15	0	0	0	0
1/5120	0	0	2	27	0	0	0	0

Kompleman Fiksasyon Testi



➤ KFT en sensitif ve en spesifik konvansiyonel serolojik yöntem olması nedeniyle brucelloz tanısında doğrulama testi olarak kabul edilmektedir

➤ Kronik brucelloz tanısında en değerli testtir



İndikatör komplemanla birleşmediği için
dibe çöker

Hasta reaksiyonu (+) olarak değerlendirilir

İndikatör komplemanla birleştiği için
hemolize olur

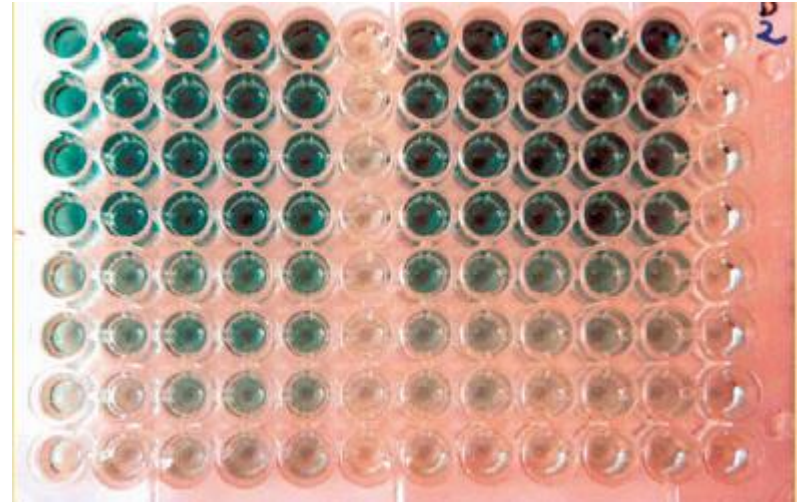
Hasta reaksiyonu (-) olarak değerlendirilir

ELISA

- **ANTİJEN:**
 - ✓ Bakterinin soluble antijenleri (S-LPS veya nativ hapten polisakkaridi gibi)
 - ✓ Hücre ekstraktları (dış membran, sitoplazmik proteinler)
- Kan kültürü pozitif hastalarda;
 - ✓ Spesifitesi %99.5
 - ✓ Sensitivitesi %100
- Brucella antikorları direkt olarak sandwich ELISA ile saptanabilir

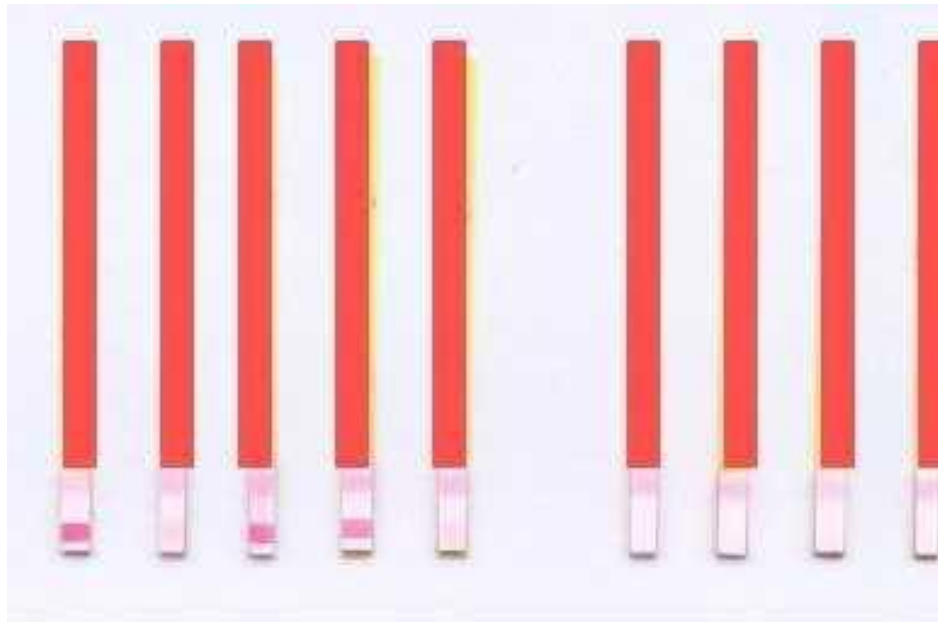
ELISA

- Akut brusellozda yüksek düzeyde IgG, IgM ve IgA saptanır.
- Kronik hastalarda orta derecede yüksek IgG saptanır.
- Brusellozun tam iyileşmesinden sonra çok düşük düzeydeki IgG antikorları uzun süre kalabilir.
- **Tanıdaki güvenilirlik ??????**
- **Titresiz tanı ?????**



DIPSTICK TESTİ

Akut olgularda IgM tespitinde kullanılır
Hızlı tanı testi, sensitivitesi %89



Brucellosis patients

Controls

BRUSELLOZ TANISI

I.BASAMAK

ROSE BENGAL

KÜLTÜR

Moleküler
Yöntemler

POZİTİF

NEGATİF
(yalancı negatiflik)

STA

ELISA

IgM (+)
IgG (+/-)

Akut enfeksiyon

IgG (+)
IgM (-)

Kronik enfeksiyon, relaps

Titre yüksek
(Akut enf.)

Titre düşük

15 gün sonra
tekrar

4 kat artış
(Akut enf.)

Coombs testi

Titre artışı
Blokant antikor
(Akut enf, kronik enfeksiyon veya relaps)

II.BASAMAK

Sonuç olarak.....

- Bakterinin kültür veya PCR yöntemleri ile gösterilmesi her zaman tercih edilen tanı yöntemidir.
- Tanıda hiçbir zaman tek başına serolojik testlere göre hastalığın evresine karar verilmemeli hastanın öyküsü, şikayetleri ve fizik muayenesi ile serolojik testler birlikte yorumlanmalıdır
- Serolojik testler arasında temel test STA testi olup diğer testlerin yorumlanması her zaman STA ile birlikte yapılmalıdır.



İlginiz için teşekkürler...