

Escherichia coli İnfeksiyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Antikorlarla *Brucella* Antijenleri Arasında Saptanabilen Reaksiyonların Değerlendirilmesi

Hatice Hasman, Başak Dokuzoğuz, Haluk Erdoğan, Ayfer Tđrkmen

Özet: Çalışmamız *E.coli* infeksiyonları sırasında oluşan antikorlar ile *Brucella* antijenleri arasında gözlenebilen çapraz reaksiyonlar ve tanıda yol açabilecekleri yanlış olasılığını araştırmak amacı ile planlandı. Kan, idrar, yara ve apse kültürlerinden *E.coli* üretilen 50 olgunun, etken izole edildikten en az 15 gün sonra alınan serum örneklerinde Wright aglütinasyon testi ile 1/20, 1/40, 1/80 ve 1/160 dilüsyonlarda *Brucella* antikorları bakımından çapraz reaksiyon araştırıldı. Ayrıca bruselloz gibi retiküloendotelial sistemi tutan, lenfoma ve lösemi tanısı almış 50 olgunun serum örneklerinde de aynı dilüsyonlarda Wright aglütinasyon testi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar kan donörlerinden seçilen 100 kişilik kontrol grubunun antikor titreleri ile karşılaştırıldı. Ortalama titrasyon değerleri *E.coli*, malignite ve kontrol gruplarında sırası ile $1/22.80 \pm 34.99$, $1/16.00 \pm 30.51$, $1/3.20 \pm 8.86$ olarak saptandı ve *E.coli* grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yapılan değişik çalışmalarda *E.coli* O157 serotipi ile *Brucella* kökenleri arasında antijenik ilişki olduğu ve çapraz reaksiyonlar gözlemlendiği bildirilmiştir. Biz çalışmamızda, *E.coli* O157 yanında diğer *E.coli* serotiplerinin infeksiyonları sırasında da oluşabilen antikorlardan kaynaklanabilecek çapraz reaksiyonları değerlendirdik ve şüpheli bruselloz olgularındaki serolojik testlerin yorumlanmasında, bu antikorların oluştuğu yalancı pozitifliklerin dikkate alınması gerektiği sonucuna vardık.

Anahtar Sözcükler: *Escherichia coli*, *Brucella*, malignite, çapraz reaksiyon.

Summary: Evaluation of reactions between antibodies due to *Escherichia coli* infections and *Brucella* antigens. Our study was planned to evaluate the cross-reaction between the antibodies occurred during *E.coli* infections and antibodies from *Brucella* infection, and to estimate the possibility of misdiagnoses. *E.coli* was isolated from blood, urine, wound and abscess cultures of 50 different patients whose serum samples were taken at least 15 days after the isolation of this causative agent. The cross-reaction was investigated between these serum samples and *Brucella* antigens via Wright agglutination test at 1/20, 1/40, 1/80 and 1/160 dilutions. In addition, Wright agglutination test was performed at the same dilutions with serum samples taken from 50 cases with lymphoma or leukemia, diseases involving the reticuloendothelial system like brucellosis. The results were compared with the agglutination results of the serum samples, which were taken from 100 blood donors used as a control group. The mean titration values for *E.coli*, malignancy and the control group were as follows: $1/22.80 \pm 34.99$, $1/16.00 \pm 30.51$, $1/3.20 \pm 8.86$ and statistically there was significant difference between the *E.coli* group and the control group. In various studies, it was reported that there was an antigenic relationship between *E.coli* serotype O157 and *Brucella* species and, cross-reactions can be seen. We evaluated the cross reactions which may result due to antibodies that may occur during infections caused by other *E.coli* serotypes beside *E.coli* O157. We concluded that in the interpretation of the serologic tests of suspected brucellosis cases, the false positive reactions due to these antibodies should be taken into consideration.

Key Words: *Escherichia coli*, *Brucella*, malignancy, cross-reaction.

Giriş

Bruselloz tanısında, kültür yöntemleriyle etkenin ge ve gđ ýremesi yđzđnden Wright aglütinasyon testi kabul gşren ve ođu olguda tanı koydurucu bir test olmaya devam etmektedir. *Brucella*, Gram-negatif bir kokobasil olmasından dolayı diğer Gram-negatif bakterilerle ortak antijenik yapılar i erir (1-6). Bu bakterilerden özellikle *Escherichia coli* O157 serotipinin neden olduğu infeksiyonlar sırasında oluşan antikorların, *Brucella* antijenleri ile aglütinasyon reaksiyonu vererek yalancı pozitif reaksiyonlara neden olabildiği gđsterilmiřtir (1,7,8). Yalancı pozitif reaksiyonlar, aslı etken dđndeki farklı bir bakteriyel ajanın antijenlerine karşı olu-

şan antikorlara bağlıdır. Sonuçta bu durum, özellikle sırasında pozitiflik saptanan şüpheli bruselloz olgularının tanısında karışıklık yaratmakta ve yanlışlara neden olabilmektedir. Çalışmamızda *E.coli* O157 serotipi yanında, diğer *E.coli* sularının da infeksiyon etkeni olduğu 50 olgunun serumunda, *Brucella* ile yalancı pozitif reaksiyon verebilen antikorları araştırdık. Ayrıca bruselloz gibi retiküloendotelial sistem (RES)đ tutan (9), bazen de klinik ve laboratuvar bulguları bakımından benzer özellikler gđsterebilen lenfoma ve lşsemili 50 olgunun serumlarıyla *Brucella* antijenleri arasındaki gözlenebilecek çapraz reaksiyonları araştırdık.

Yöntemler

Kan, idrar, yara ve apse kültürlerinden *E.coli* üretilen 50 olgunun, etken izole edildikten en az 15 gün sonra alđ-

Tablo 1. Her Üç Grupta Saptanan Titrasyon Değerleri ve Oranları

Gruplar	≥1/160		1/80		1/40		1/20		0		Toplam	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>E.coli</i>	1	(2.0)	8	(16.0)	3	(6.0)	11	(22.0)	27	(54.0)	50	(25.0)
Malignite	1	(2.0)	3	(6.0)	7	(14.0)	6	(12.0)	33	(66.0)	50	(25.0)
Kontrol	0	(0)	0	(0)	3	(3.0)	10	(10.0)	87	(87.0)	100	(50.0)
Toplam	2	(1.0)	11	(5.5)	13	(6.5)	27	(13.5)	147	(73.5)	200	(100)

nan serum örneklerinde Wright aglutinasyon testi ile 1/20, 1/40, 1/80 ve 1/160 dilüsyonlarda *Brucella* antikorları bakımından apraz reaksiyon araştırıldı. Ayrıca lenfoma ve lösemi tanısı almış 50 olgunun serum örneklerinde de aynı dilüsyonlarda Wright aglutinasyon testi yapıldı. Elde edilen sonuçlar kan donörlerinden seçilen 100 kişilik kontrol grubu ile aglutinasyon titrelere bakımından karşılaştırıldı, alımda Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden sağlanan *B.abortus* 99S suşundan hazırlanmış *Brucella* antijeni kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme her üç grubun ortalama titrasyon değerlerinin karşılaştırılması esasına dayalı olan Kruskal Wallis yöntemi ile yapıldı.

Sonuçlar

E.coli grubundaki 50 olgudan 31'ünün kadını (%62), 19'unun erkek (%38); malignite grubundaki 50 olgudan 19'unun kadını (%38), 31'ünün erkek (%62) ve kontrol grubundaki 100 olgudan 13'ünün (%13) kadını, 87'sinin (%87) erkek olduğu; gruplardaki yaş ortalamalarının *E.coli* grubunda 47.03 (19-80), malignite grubunda 41.40 (16-74) ve kontrol grubunda 31.30 (18-60) olduğu gözlemlendi. Yaş, cins, geldikleri bölge ve mesleki durumları bakımından gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmadı.

Her üç grupta olgu sayısına göre saptanan titrasyon değerleri Tablo 1'de izlenmektedir. Ortalama titrasyon değerleri *E.coli*, malignite ve kontrol gruplarında sırası ile 1/22.80 – 34.99, 1/16.00 – 30.51, 1/3.20 – 8.86 olarak; minimum titrasyon değerleri tüm gruplarda 0 olarak ve maksimum titrasyon değerleri ise *E. coli* ve malignite grubunda >1/160 iken, kontrol grubunda 1/40 olarak saptandı. Ortalama titrasyon değerleri bakımından *E.coli* grubu ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$ (Tablo 2)).

İrdeleme

Yapılan alımda *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *B.abortus* ve *B.melitensis*'ün aynı karbonhidrat sekanslarının i eren O antijenlerini taşıdıkları ve antijenik olarak benzer

Tablo 2. Grupların Ortalama, Minimum ve Maksimum Değerleri

Gruplar	Ortalama ± SD	Minimum	Maksimum
<i>E.coli</i> *	1/22.80 – 34.99	0	>1/160
Malignite	1/16.00 – 30.51	0	>1/160
Kontrol	1/3.20 – 8.86	0	1/40

* $p < 0.05$

oldukları gösterilmiş; lipopolisakarid (LPS) yapıları arasında serolojik apraz reaksiyonlar izlenmiştir (1-6).

E.coli'nin dış membranında matriks porinler (OmpC ve OmpF), bir heat-modifiable protein (OmpA) ve mu-rein lipoprotein yapıları saptanmıştır. Benzer yapılar Gram-negatif bakterilerin büyük bir çoğunluğunda da gösterilmiş ve bunların tüm bu mikroorganizmalar i in esansiyel yapıları olduğu şne sınırlanmıştır (10). *B.abortus*'ün dış membran proteinlerinin analizinde saptanan üç grup proteinden, grup 2 i in Omp 2b ve Omp 2a ve grup 3 i in Omp 25 ve Omp 31 olarak belirlenen yapıları izole edilmiş; Omp 2b ve 2a'nın porinler olduğu gösterilmiştir. Tüm *Brucella* kşkenlerinde antijenik olarak sdeş olan grup 2 proteinleri ile *E.coli*'nin Omp F yapıları ve diğer Gram-negatif bakterilerin porinleri arasında benzerlik olduğu izlenmiştir (10,11). Grup 3 proteinlerinden Omp25'in *E.coli*'deki OmpA proteinine karışık geldiği, bir porin olduğu şne sınırlanmış Omp 31'in ise *B.melitensis*'de olduğu gibi *E.coli*'de de üretildiği saptanmıştır (11). Ayrıca hayvanlar üzerinde yapılan alımlarda, *B.ovis* ile diğer bakteriler arasında da yalancı pozitiflik olabileceği üzerinde durulmuştur (12).

Normalde serumda *E.coli*'nin LPS, lipoprotein ve hemolizin gibi etkili antijenlerine karşı antikorların bulunabileceği ve bunların infeksiyon sonrasında arttığı bilinmektedir. Saçılık bireylerin serumlarında bazı *E.coli* suşlarının Omp A proteinine karşı çoğunluğu IgG grubu olan antikorlar gösterilmiş; ayrıca OmpC, OmpF ve diğer membran proteinlerine karşı da antikorlar bulunabileceği üzerinde durulmuştur (13). *E. coli* O157:H7 izole edilen hemolitik hemolitik sendromlu (HUS) olguların serumlarında ise OmpA ve diğer dış membran proteinlerine karşı IgG antikorları ile yüksek konsantrasyonlarda spesifik IgM antikorları saptanmıştır (1,14).

Yapılan bir alımda 10 brusellozlu olgudan tümünün serumlarının *E.coli* O157 LPS'leri ile reaksiyon verdiği, buna karşın ancak bazı serumların *Y. enterocolitica* O9 LPS'leri ile reaksiyon verdiği gösterilmiştir. Aynı karbonhidrat sekanslarının paylaşmalarına karşın, serolojik reaksiyonlarda gözlenen bu farklılığın *Y. enterocolitica* O9'un LPS moleküllerindeki farklı fiziksel konfigürasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sonuçta farklı bir gruba olarak *E.coli* O157, *Y. enterocolitica* O9, *B.abortus* ve *B.melitensis* O antijenleri aynı karbonhidrat yapılarının paylaşsa da, bu benzerliklerin aynı apraz serolojik reaksiyonlarla sonuçlanmasının gerekmediği şne sınırlanmıştır (6).

Dört yaşında HUS tanısı konulan ve dışkı kültüründen *E.coli* O157:H7 izole edilen bir olguda *B.abortus* ag-

İytilasyon titresi 400 ve *E.coli* O157 ağıltınasyon titresi 6400 olarak saptanmış ve bu sonucun apraz reaksiyona bağılı olduğu gösterilmiştir (7). Yukarıda *E.coli* O157 subu ile ilgili olarak yapılan bu alımların yanında bizim alımlarımızda, serolojik idantifikasyon yapılmaksızın diğer *E.coli* suşları ile ortaya çıkan infeksiyonlara bağılı olarak da yalancı pozitifliklerin oluşabileceği gözlemlendi ve *E.coli* grubu ile kontrol grubu arasında, *B.abortus* antijenleri ile elde edilen ortalama ağıltınasyon titreleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı (Tablo 1).

, alımlarımızda bruselloz gibi RESÜ tutan, bazen de klinik ve laboratuvar bulguları bakımından benzer özellikler gösteren lenfoma ve lösemili olguların serumlarında da, *Brucella* antijenleri ile apraz reaksiyon verebilecek antikorları araştırıldı. Ancak titrasyon değerleri bakımından bu olgular ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadı. Ünlü gözlemlendi (Tablo 1).

Canbolat ve Karakartal (15)ün yaptığı bir alımda, normal serumlarda *Brucella* antijenlerine karşı oluşmuş antikorlara hi rastlanmadı halde, 34 lenfomalı hasta serumundan 5ünde (%14.7), 66 lösemili hasta serumundan 1ünde (%1.51) aynı antikorların pozitif olduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir alımda ise, klinik tablosu bruselloza benzeyen hastalıklardan 25 tıberküloz, 15 sıtma, 25 aktif lenfoma, 25 sarkoidoz, 60 kollajenoz ve 100 nedeni bilinmeyen ateş olgusunun serumlarında *Brucella* antijenleri ile apraz reaksiyon araştırılmış ve sadece 2 olguda (1/20 ve 1/40 dilüsyonlarda) pozitif reaksiyon saptandı bildirilmiştir (16).

Genel popülyasyonda *Brucella* ağıltıninleri bakımından deünlük oranlarda seropozitiflik saptanabilmektedir. , alımlarımızda kan donörlerinden oluşan kontrol grubunda *Brucella* ağıltınin titrelerinin seropozitiflik oranı 1/40 dilüsyonda %3, 1/20 dilüsyonda %10 bulunmuş (Tablo 1), yapılan bir alımda ise aynı oran %8 olarak bildirilmiştir (17). Umman bşlgesindeki genel popülyasyon üzerinde yapılan bir alımda ise %2 oranında seropozitiflik saptanmış ve bu seropozitifliğin apraz reaksiyona bağılı olarak *Y.enterocolitica* O9, *E.coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* ve *Salmonella* serotip O:30 suşları da dahil olmak üzere diğer mikroorganizmalara bağılı olarak gözlenebileceği üzerinde durulmuştur (2-5,8,18).

Sonu ta tım bu bulgular ve bizim bulgularımız bruselloz bşpheli olgularda, *E.coli* O157 yanında diğer *E.coli* serotiplerine karşı oluşan antikorların da, *Brucella* antijenleri ile yalancı pozitif sonu lara yol a abileceğini doğurulmaktadır.

, alımlarımızda bşpheli bruselloz olgularının serolojik tanısında ve özelliklerle sınııda pozitifliklerin deünlendirilmesinde, öncelikle *E.coli* infeksiyonlarından kaynaklanabilecek yalancı pozitifliklerin dikkate alınması gerektiği sonucuna vardık.

Kaynaklar

- Chart H, Scotland SM, Rowe B. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157:H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 285-90
- Gourdon F, Beytout J, Reynaud A. Human and animal epidemic of *Yersinia enterocolitica* O9, 1989-1997, Auvergne. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 719-21
- Kittelberger R, Bundesen PG, Cloeckaert A. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O9. Evaluation of the -M and -C epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infection. *Vet Microbiol* 1998; 60: 45-57
- Drancourt M, Brouqui P, Raoult D. *Afpia clevelandensis* antibodies and cross-reactivity between *Brucella* spp and *Yersinia enterocolitica* O9. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 748-52
- Gerbier G, Garin-Bastuji B, Pouillot R. False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O9 in a field trial. *Vet Res* 1997; 28: 375-83
- Chart H, Okubadejo A, Rowe B. The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enterocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. *Epidemiol Infect* 1992; 108: 77-85
- Notenboom RH, Borczyk A, Karmali MA, Duncan LMC. Clinical relevance of a serological cross-reaction between *Escherichia coli* O157 and *Brucella abortus*. *Lancet* 1987; 26: 745
- Idris MA, Mañwald M, El-Mauly KN, Ruppel A. Human brucellosis in Dhofar, Sultanate of Oman. *J Trop Med Hyg* 1993; 96: 46-50
- Young EJ. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 2053-60
- Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect Immun* 1982; 35: 979-89
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 145:1-8
- Kittelberger R, Laybourn BJ, Reichel MP, Ross GP, Lisle GW, Joyce MA. Attempted definition by immunoblotting of the cases of reactivity in suspected false-positive sera in the *Brucella ovis* complement fixation test. *NZ Vet J* 1996; 170-4
- Griffiths E, Stevenson P, Thorpe R, Chart H. Naturally occurring antibodies in human sera that react with the iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985; 47: 808-13
- Chart H, Scotland SM, Smith HR, Rowe B. Antibodies to *Escherichia coli* O157 in patients with haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome. *J Clin Pathol* 1989; 42: 973-6
- Canbolat A, Karakartal G. Malign lenfoproliferatif hastalıklarda *Brucella* antijenine karşı oluşan antikor insidansı [...zet]. In: Tımbay E, Anđ ..., Karakartal G, eds. 1. *Ulusal Infeksiyon Hastalıkları Kongresi* (20-23 Nisan 1987, İzmir) *Kongre Kitabı*. İstanbul: Tırk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınđ, 1987: 235
- Mert A, Tabak F, Dumankar A, et al. Kliniği bruselloza benzeyen hastalıklarda ağıltınasyon testleri ile brusella antikorları aranması [...zet]. In: Eraksoy H, Yenen OĐ, eds. 5. *Ulusal Infeksiyon Hastalıkları Kongresi* (4-6 Eylül 1995, İstanbul) *Kongre Kitabı*. İstanbul:Tırk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınđ, 1995: 74
- Kalkan A, Felek S, Akbulut A, Papila , , Kılıç SS. Risk gruplarında *Brucella* ağıltınin titrelerinin dağılını ve alımla siresinin seropozitifliğe etkisinin araştırılması [...zet]. In: Ağa fidan A, Badur S, Kılık i G, eds. XXVII. *Tırk Mikrobiyoloji Kongresi* (7-10 Mayıs 1996, Antalya) *Program ve Özet Kitabı*. İstanbul: Tırk Mikrobiyoloji Cemiyeti ve Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 1996: 133
- Goicochea CE, Gotuzzo E, Carillo C. Cholera-*Brucella* cross-reaction: a new potential diagnostic problem for travelers to Latin America. *J Travel Med* 1996; 3: 37-9