

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYARBAKIR İLİNDE ÇOCUKLARDA GÖZLENEN BRUSELLOZUN ÇAPRAZ
BULAŞ DİNAMİĞİ VE İZOLATLARIN FİLOGENETİK SOYAĞACININ
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

TUBA DAL

TEZ YÖNETİCİSİ

PROF. DR. ALİ CEYLAN

HALK SAĞLIĞI ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR-2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYARBAKIR İLİNDE ÇOCUKLARDA GÖZLENEN BRUSELLOZUN ÇAPRAZ
BULAŞ DİNAMİĞİ VE İZOLATLARIN FİLOGENETİK SOYAĞACININ
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

BU TEZ TÜBİTAK TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR

PROJE NO: 214Z227

TUBA DAL

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. ALİ CEYLAN
HALK SAĞLIĞI ANABİLİM DALI
DİYARBAKIR-2017

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

Diyarbakır ilinde çocuklarda gözlenen
brusellozun kapraz bulaş dinamiği ve
izolatların filogenetik sayıncasının araştırılması

"....." isimli Doktora Tezi ...12.04.07 tarihinde tarafımızdan
değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı :
Tezi Teslim Eden :

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan

: Prof. Dr. - Rüney SAKA

Üye

: Prof. Dr. S. Erhan DEVECİ

Üye

: Prof. Dr. Ali CEYLAN

Üye

: Prof. Dr. Sami DAYAN

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Tarfik ÖZAN

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

.....

Doç. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bruselloz ülkemizde halen güncel bir halk sağlığı problemi olup özellikle çocuk hastaların tedavisinde güçlüklerle ve nükslere neden olmaktadır. Bu tezde, brusellozun endemik olduğu Diyarbakır yöresindeki çocuk bruselloz vakalarından izole edilen *Brucella* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve bu izolatların “multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA)” yöntemiyle moleküler epidemiyolojik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda, çocuklarda *Brucella melitensis*'in yaygın olduğu, Diyarbakır yöresinde suşlar arasında çapraz bulaş oranının yüksek olduğu ve kullanımda olan antibiyotiklerin etkinliğini koruduğu kanısına varılmıştır. Bulaşın önlenmesi için kontrol önlemlerinin gerekliliği ortaya konmuştur. Ülkemizde çocuk hastalarda enfeksiyona neden olan *Brucella* türlerinin antibiyotik duyarlılık sonuçlarını, MLVA tiplerini belirleyen bu doktora tezi TÜBİTAK Kimya, Biyoloji Araştırma Destek Grubu katkılarıyla gerçekleştirilmiştir.

Doktora eğitimim sırasında danışmanlığımı yürüten Prof. Dr. Ali CEYLAN başta olmak üzere Halk Sağlığı Anabilim Dalı hocalarım; Prof. Dr. Perran TOKSÖZ' e, Prof. Dr. Nuran ELMACI' ya, Prof. Dr. Fatma ÇELİK' e, Prof. Dr. Günay SAKA' ya ve tezime olan katkılarından dolayı Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Rıza Durmaz'a teşekkür ederim. Ayrıca T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu'na da teşekkürü bir borç bilirim.

TUBA DAL

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	III
ÖNSÖZ.....	IV
ŞEKİL DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
ÖZET.....	IX
SUMMARY.....	X
1- GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2- GENEL BİLGİLER.....	2
3- GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
4- BULGULAR.....	16
5- TARTIŞMA.....	31
6- SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
7- KAYNAKLAR.....	36
8- EKLER.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

1. **Şekil 1.** M16Orsay *Brucella* suşunun çeşitli lokuslarının (Sırasıyla Bruce 04 Bruce 07, Bruce 16, Bruce 30) monopleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (120 V, %2 agaroz)12
2. **Şekil 2.** Beş ayrı mültipleks PCR ve monopleks PCR sonuçlarının 120 V, %2 ‘lik elektroforez jel görüntüsü.....14
3. **Şekil 3.** Bir çalışma suşunun antibiyogram fotoğrafı20
4. **Şekil 4.** *B. melitensis* ve *B.abortus* standart suşları ve bazı hasta örnekleriyle yapılan Real Time PCR sonuçları21
5. **Şekil 5.** Bazı örneklere ait “Melting Curve” analizi22
6. **Şekil 6.** Karışım 1 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek)23
7. **Şekil 7.** Karışım 2 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek).....24
8. **Şekil 8.** Karışım 3 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek)..... 25
9. **Şekil 9.** Karışım 4 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek)..... 25
10. **Şekil 10.** Karışım 5 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek)..... 26
11. **Şekil 11.** Karışım 6 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek)26
12. **Şekil 12.** Çalışmaya dahil edilen 78 suşa ait cluster analizi28
13. **Şekil 13.** Brusella izolatlarına ait spanning tree29

TABLolar DİZİNİ

1. **Tablo 1.** Çalışmada *Brusella* türlerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.....10
2. **Tablo 2.** *Brusella* tür tayini için amplifikasyon koşulları..... 10
3. **Tablo 3.** *Brusella* MLVA çalışmasında kullanılan VNTR lokuslarına ait primer dizileri..... 11
4. **Tablo 4.** M16Orsay *Brusella* suşunun çeşitli lokuslarının monopleks olarak amplifikasyonu için PCR koşulları..... 12
5. **Tablo 5.** Múltipleks PCR ve Bruce 19 primeri ile yapılan monopleks PCR amplifikasyon koşulları13
6. **Tablo 6.** *Brucella melitensis* suşlarına karşı test edilen antibiyotiklerin MİK değerleri17
7. **Tablo 7.** *Brusella* izolatlarına ait MİK 50, MİK 90 değerleri.....19

KISALTMALAR DİZİNİ

1. ***B.melitensis***. *Brucella melitensis*
2. **RES**. Retiküloendotelyal sistem
3. **CRP**. C-reaktif protein
4. **ELISA**. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
5. **PCR**. Polymerase Chain Reaction
6. **CLSI**. The Clinical & Laboratory Standards Institute
7. **TMP-SMZ**. Trimetoprim-sulfametoksazol
8. **GM**. Gentamisin
9. **RIF**. Rifampisin
10. **TC**. Tigesiklin
11. **CRO**. Seftriakson
12. **SLS**. Sample Loading Solution
13. **MIK**. Minimum inhibisyon konsantrasyonu
14. **Bp**. Base pair
15. **LAP**. Lenfadenopati
16. **SM**. Splenomegali

ÖZET

Bruselloz enfekte hayvanlarla doğrudan temas, süt ve süt ürünlerinin taze olarak tüketilmesi, enfekte damlacıkların inhalasyonu ile bulaşabilen, brusella türlerinin neden olduğu bir hastalıktır. Özellikle çocuk hastaların tedavisinde güçlükler ve nökslere neden olmaktadır. Bu tezde brusellozun endemik olduğu Diyarbakır yöresinde izole edilen *Brucella* suşlarının tür düzeyinde tanımlanması, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) yöntemiyle moleküler epidemiyolojik analizlerinin yapılması amaçlandı.

Çalışmaya 2000-2013 yıllarında Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi'nde, brusella enfeksiyonu tanısı alan çocuklardan izole edilmiş toplam 77 *Brucella* suşu dahil edildi. Konvansiyel yöntemler ile suşların tür düzeyine tayini ve antibiyotik duyarlılık testleri gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle Brusella türleri tanımlandı ve ardından MLVA yöntemi ile suşların genotip tayini yapıldı.

77 hastanın 40'ı erkek, 37'si kız olup yaş aralığı 2-16 yaş (ortalama 9.14 ± 3.4 yaş) arasındaydı. Bütün hastalarda yakın zamanda pastörize edilmemiş süt veya süt ürünleriyle beslenme hikayesi mevcuttu. Karın ağrısı (58%), artralji (%56), miyalji (%40) en sık şikayetlerdi. En sık klinik bulgular arasında ateş, artrit, hepatomegali ve splenomegali yer alıyordu. Mevsimsel dağılım açısından sonbahar sonu ve yaz aylarında sıklık gösteriyordu. Suşların tamamının *B.melitensis biovar 3* olduğu saptandı. İki izolat seftriaksona dirençli bulunurken, suşların tamamı doksisisiklin, streptomisin ve trimetoprim-sülfametoksazole duyarlıydı. Tigesiklin ve Rifampisin için MİK aralıkları 0,016-0,23 ve 0,38-1,5 µg/ml olarak belirlendi. Moleküler epidemiyolojik analizler sonucunda 77 suшта 42 farklı MLVA-16 profili belirlendi. Bu 42 profilin 18 tanesi en az iki veya daha fazla suş içermekteydi. Geriye kalan 24 suş ise özgü profil gösterdi. Suşlar arasındaki kümeleşme oranı %66.7 olarak tespit edildi. Lokuslardan ayırım gücü en yüksek lokus Bruce 30 iken, bunu sırasıyla Bruce 16, Bruce 9, Bruce 7, Bruce 4 takip etti. Suşlarının tamamının MLVA-11'e göre genotip 122, MLVA-8'e göre ise genotip 43 olduğu ve Doğu Akdeniz genotipinde yer aldığı belirlendi.

Sonuç olarak yörede çocuklarda bruselloz halen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Suşlar arasında çapraz bulaş oranı yüksektir. Çalışmamız bölgede hayvan hareketliliğinin kontrol altına alınmasının, et ve süt ürünlerinin denetim altına alınmasının, çocukların beslenmesinde kontamine ürünlerden kaçınılmasına yönelik eğitim faaliyetlerinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

Anahtar Sözcükler: *Brucella*, MLVA, bulaş dinamiği

SUMMARY

Brucellosis is an infection disease caused by brucella species and is transmitted by direct contact with infected animals, consumption of fresh milk and dairy products, inhalation of bacteria of infected droplets. It causes difficulties and recurrences especially in the treatment of child patients. This study was aimed to identify the brucella species, to determine their antibiotic susceptibilities and to perform molecular epidemiological analyzes of the isolates by multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) method.

A total of 77 brucella strains isolated from children with brucella infection in Diyarbakır Children's Diseases Hospital between 2000 and 2013 were included in the study. Genotyping of the strains were done by MLVA Orsay 16 method.

Of the 77 patients, 40 patients were boys and 37 patients were girls, with ages ranging from 2 years to 16 years (mean, 9.14 ± 3.4 years). All patients had a history of recently consuming unpasteurized milk or dairy products. Abdominal pain (58%) and arthralgia (%56), and myalgia (40%) were the most frequent complaints. The most frequent clinical findings were fever, arthritis, hepatomegaly, and splenomegaly. The seasonal distribution showed an increase in late spring and summer. All of the Brucella isolates were found to be *B. melitensis biovar 3*. Two isolates were resistant to ceftriaxone, while all isolates were susceptible to doxycycline, streptomycin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Ranges of minimal inhibitory concentration (MIC) of tigecycline and rifampicin were 0.016-0.23 and 0.38-1.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Molecular epidemiological analyzes revealed 42 different MLVA-16 profiles. Eighteen of these 42 profiles included two or more strains. The clustering rate was 66.7%. In three strains four locus variants, in one strain five locus variants were found. Bruce 30 was the highly discriminatory locus and it was followed by Bruce 16, Bruce 9, Bruce 7, and Bruce 4, respectively. All of the strains were defined as genotype 122 according to MLVA-11 and genotype 43 according to MLVA-8, and were in the Eastern Mediterranean genotype.

In conclusion, brucellosis is still a significant public health problem in children in the region and high clustering rate indicates that most of the cases were related to each other and most probable originated from common source. Controlling of animal movements, meat and milk products and training activities about avoiding contaminated products of the children were necessary.

Keywords: *Brucellosis, MLVA, transmission dynamics*

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Bruselloz, insanlara enfekte hayvanlar ile temas ile, süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile veya inhalasyon yoluyla geçer. Bu enfeksiyon hastalığı, ülkemizde halen güncel bir halk sağlığı sorunudur. Türkiye Sağlık Bakanlığı tarafından 2015 yılında 4173 brusella olgusu bildirilmiş olup morbidite hızı 5,30/100000 olarak bildirilmiştir (1). Hastalarda oldukça geniş klinik bulgulara, rölapslara ve komplikasyonlara neden olan bruselloz mortalitesi düşük ancak morbiditesi yüksek bir hastalıktır. Genellikle bir meslek hastalığı olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak hijyen ve sanitasyon koşullarının yetersiz olduğu bölgelerde toplumun her kesimini ekleyebilir. Brusellozun çocuklarda da gözlenmesi, bu enfeksiyon hastalığının sadece bir meslek hastalığı olmadığını ortaya koymakta, önemini artırmaktadır (2-5). Bu tezde amaç, çalışma grubunda bruselloza yol açan brucella izolatlarının tür ve biyotiplerinin belirlenmesi, brusella izolatlarının in vitro antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, izolatlar arasındaki klonal heterojenitenin ve çapraz bulaş dinamiğinin ortaya konulmasıdır. Sunulan tezin başka bir amacı da elde edilen veriler sonucunda bölgedeki hekimlere ve topluma brusellozun çapraz bulaşının engellenmesi konusunda eğitimler verilmesi ve brusellozun endemik olduğu Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nin en kalabalık yerleşim yeri olan Diyarbakır'da, çocuk yaş grubundaki hastalarda gözlenen brusellozda çapraz bulaş zincirinin kırılması ve etkin tedavi protokollerinin oluşturulmasına katkı sağlanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Brucella türlerinin genel özellikleri

Brucella türleri aerobik, hareketsiz, 0.5x1.5 mikrometre boyutunda gram negatif kokobasil morfolojisinde hücre içi bakteridir. Bu bakterinin üremesi için uygun ısı 37°C (10-40°C) ve pH aralığı ise 6,6-7,4 olarak bildirilmektedir. Brucella, katalaz enzimine sahiptir. Oksidaz ve üreaz pozitifliği ise değişkendir. Mikroorganizma 60°C'de on dakikada, % 0,1'lik fenolle onbeş dakikada tahrip olur. Hayvanların yaşadığı yerlerdeki tozlarda altı hafta, suda on hafta, hayvanlara ait düşük örneklerinde 75 gün, çığ süttten yapılmış tuzsuz krema yağında yaklaşık beş ay, %10 tuz içeren salamura peynirde 1-2 ay, %17 tuz içeren salamura peynirde ise 30 gün canlı kalabilir (6-9). Brucella, hayvanlarda yaşamın her döneminde enfeksiyonlara neden olabilen, düşüklere, steriliteye ve mastite yol açabilen bir zoonozdur. Brusella türleri arasında *Brucella melitensis* (*B. melitensis*); esas olarak koyun ve keçilerde, *B. abortus* ise sığır ve mandada enfeksiyonlara sebep olur. Ayrıca *B. canis*: köpek, *B. ovis*: koyun, *B. suis*: domuz, *B. neomatae*: rat enfeksiyonlarından sorumludur (6-9).

2.2. Tarihçe

İngiliz Ordusu doktoru Sör David Bruce 1886 ve 1887'de Malta adasında çalışmalar yaparken, Malta ateşinden etkilenen hastaların dalaklarından ilk kez Brucella'yı izole etmiştir. Bruce ilk olarak bu mikroorganizmaları, 1895'de *Micrococcus melitensis* olarak adlandırmıştır. Meyer ve Shaw adlı araştırmacılar, Malta ateşi ve Bang hastalığındaki etkenleri de kapsayan mikorganizmaların her ikisi için sırasıyla *Brucella melitensis*,

B.abortus isimlerini uygun görmüştür. Brucella haricinde Ochrobactrum, Mycoplana bakterileri de Brucellaceae ailesine aittir (9).

2.3. Genetik yapısı

Çoğu Brucella türü, yaklaşık 2,1 ve 1,2 Mbp'lik, iki halkasal kromozoma sahiptirler. Daha büyük olan kromozom I'in aksine, daha küçük olan kromozom II, bir replikasyon orjinine ve bir megaplazmidten köken aldığı öne sürülen genetik içeriğe sahiptir. Mikroorganizmanın kromozomundaki G+C içeriği %57'dir. İki kromozomlu genomun dışında bu kurala uymayan *B.suis* ise 3,1 Mbp'lik tek bir halkasal kromozoma sahiptir. Brucellanın kromozom I'i yaklaşık 2,100-2,200 açık okuma bölgesi (ORF) ve kromozom II'si tahminen 1,100-1,200 açık okuma bölgesine sahiptir (9). Çalışmalarda *B.melitensis*'e ait 3,091 ORF bölgelerinin Brucella patogenezinde rol oynadığı ve konak tropizmi sağladığı saptanmıştır (9).

2.4. Brusella enfeksiyonlarının patogenezi

Brusella bakterisi gastrointestinal sistem, deri, solunum yolu ile alındıktan sonra ilk olarak bölgesel lenf bezlerinde (mezenterik, servikal, aksiller, supraklaviküler) ürer. Ardından hematojen yolla retikülo endotelial sisteme (RES) ve tüm vücuda yayılır. Bakteri böylece karaciğerde, dalakta, kemik iliğinde, böbrekte, endokardda, merkezi sinir sisteminde ve genital organlarda yerleşebilir. Brusella, fakültatif hücre içi bir bakteri olup, fagositoz yapan hücreler içerisinde çoğalabilir. Nötrofillerde myeloperoksidaz-hidrojen peroksit sistemini inhibe ederek işlev görür. Makrofajlarda ise fagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek ve oksidatif hasara karşı koruyucu maddeler ve enzimler sentezleyerek, immun sistem ile mücadele eder. Brusellozun karakteristik histopatolojik görünümü ise karaciğer, dalak ve kemik iliğinde gözlenen; epitelooid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerle çevrili granülom yapılarıdır. Virülanstan sorumlu en

önemli faktör, S-LPS'dir. Brusella türleri arasında, *B. canis* ve *B. ovis* S-LPS bulundurmamaktadır, bu nedenle bu türlerin düşük virülansa sahip olduğu düşünülmektedir.

Brucella melitensis ise en virülan türdür. *B. suis* invaziv etkilidir. *Brucella suis* fokal nekroza ve süpürasyonlara neden olmaktadır. Brusella enfeksiyonlarında hem humoral hem de hücrel immunité etkindir (9).

Brusellanın S-LPS'ne karşı gelişen antikorların humoral immüniteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (10). Brusellozda oluşan antikorlar, IgM, IgG veya IgA tipindedir. Brusella enfeksiyonunun akut döneminde IgM tipi antikorlar meydana gelir ve hastalığın ilk haftasında saptanırlar. İkinci hafta sonrasında ise IgG artışı olur ve tedavi edilmeyen vakalarda en az bir yıl süreyle yüksek kalabilir. Tedaviye yanıt veren hastalarda ise tedavinin başlamasından sonra yaklaşık altıncı ayda kaybolur. Aktif bir enfeksiyon olmamasına rağmen, bazen IgM'ler aylar ya da yıllarca saptabilir. Bu nedenle tedaviye yanıtın izlenmesinde IgG antikor titresindeki düşüşten yararlanılabilir. Nüks olan olgularda ise antikor titreleri devam eder veya yeniden artış gösterir (9).

2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş

Evcil ve yabani hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilmesi nedeniyle dünyada oldukça yaygındır. Sıklıkla cilt, konjunktiva, gastrointestinal sistem ve inhalasyonla bulaşır (8). Veterinerlerde, mezbaha işçilerinde ve hayvancılıkla uğraşanlarda cilt, inhalasyon ve konjunktiva yolu ile geçiş gözlenmektedir. Çiğ süttten yapılan peynirin tüketilmesi ile bulaş geniş kitleleri etkilemektedir. Çiğ et yeme alışkanlığı olan bölgelerde et ile geçiş de mümkün olabilmektedir. İnsandan insana bulaş çok nadirdir. Kan transfüzyonu yoluyla, kemik iliği transplantasyonu ile, transplasental ya da perinatal yol ile bulaş da bildirilmektedir (8).

Bruselloz, Ortadoğu, Akdeniz, Latin Amerika, Güneydoğu Avrupa, Asya, Afrika, Karayipler’de yüksek düzeyde endemiktir (9). *B. abortus* geniş bir coğrafik yayılım göstermesine rağmen, *B. melitensis* insanlarda hastalığa neden olan en sık etkindir. Sığır Brusellozu, koyun ve keçi brusellozuna göre daha iyi kontrol edilmektedir. Ülkemizde İç Anadolu Bölgesi’nde özellikle Ankara Ovası’nda ve Konya yöresinde yaygındır. Ayrıca Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgesinde de sık gözlenen bir hastalıktır (2,5,11). Bruselloz besin hijyeni ve sanitasyonun iyi olmadığı ülkelerde her kesimi özellikle de çocuk yaş grubundaki popülasyonu da etkilemesinden dolayı geniş kitleleri etkileyen bir enfeksiyon hastalığı haline gelmiştir (3,4).

2.6. Klinik Önemi

Brusellozun inkübasyon süresi 1-3 hafta olup semptomlar genellikle nonspesifiktir. Sıklıkla ateş yüksekliği, halsizlik, terleme yakınması vardır. Ateş yavaş yavaş artış göstererek en yüksek seviyeye ulaşır, ardından aynı şekilde azalma olur (dalgalı ateş) (9). Özellikle çocukluk çağı bruselloz olgularında % 25’lere varan eklem yakınmaları gözlenebilmektedir (6,8). Hepatosplenomegali, lenfadenopati, artrit, anemi, lökopeni, trombositopeni en sık rastlanan klinik ve laboratuvar bulgular arasındadır. Özellikle hayvancılıkla uğraşan erişkinlerde, bruselloz subklinik olarak seyredilmektedir. Asemptomatik olan bu olgularda serolojik testler düşük titrede pozitif sonuç vermekte ve Kültürler negatif olarak tespit edilmektedir (7,8). Brusella enfeksiyonları akut, subakut, lokalize veya kronik enfeksiyon şeklinde gözlenebilir. Tanıda serolojik testlerden ve kan kültür yöntemlerinden yararlanılır (12). Bruselloz olgularının bir kısmında tedaviye rağmen rölaps gözlenebilir. Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda rölaps oranları % 6-10 olarak belirlenmiştir (8,9,12,14,27). Rölapsın nedeni kısa süreli veya uygun olmayan

dozlarda antibiyotik tedavisi, hastaların ilaç uyumunun iyi olmaması, antibiyotik direnci olabilir (2,5,11-15).

2.7.Bruselloz tanısı

Brusellozun semptom ve bulguları özgül değildir ve bir çok hastalığı taklit edebilir. Bu nedenle ayrıntılı anamneze ihtiyaç duyulmaktadır. Hastanın ailesinde benzer semptomlu bireylerin varlığı, ailede hayvancılık ile uğraşanların varlığı, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri tüketme öyküsü mutlaka sorulmalıdır. Ayrıca CRP (C-Reaktif protein) ve sedimentasyon yüksekliği, anemi, lökopeni ya da lökosit sayısının normal değerlerde olması, trombositopeni ve pansitopeni de görülebilir.

2.7.1. Kültür

Brusellozun tanısında kesin tanı yöntemi kültürdür. Bruselloz şüphesi olan hastalarda, ateşi olsun ya da olmasın en az iki kan kültürü alınması önerilmektedir. Günümüzde brucella bakterisinin üretilmesi için tam otomatik kan kültür sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerin pozitif üreme sinyali alınması için geçen süre; kan örnekleri için yaklaşık beş gün, kemik iliği örnekleri için ise yaklaşık yedi gündür. Çocuklarda yapılan çalışmalarda kan kültüründe *B.melitensis* üreme oranının % 2 ve %45 arasında değiştiği bildirilmiştir (16). Etkeni izole etmek için beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, eklem sıvısı, anne sütü, plevral sıvı, periton sıvısı, vajinal akıntı, doku ve abse örnekleri de kullanılabilir. Brusella için katı besiyeri olarak, serumlu Tryptose Agar, %5 koyun kanı eklenmiş Brucella Agar kullanılabilir. Bakterinin izolasyonu için %10'luk karbondioksitli ortam uygundur. Ekim yapılmasının ardından, besiyeri içeren petri kablari, 37 °C'de beş ile yedi gün arası inkubasyona bırakılır. Besiyerinde üreyen bakteri türleri, çeşitli biyokimyasal testler yardımı ile tanımlanır (6, 16).

2.7.2. Serolojik Testler

2.7.2.1. Rose-Bengal testi

Lateks agglütinasyon testi olup tarama testi olarak kullanılır (6, 9,16).

2.7.2.2. Standart tüp agglütinasyon testi (Wright Testi)

Standart tüp agglütinasyon testinde titrenin 1/160 ve üzerinde olması anlamlı olarak kabul edilir. Ayrıca iki hafta arayla alınan kan örneklerinde, titrede dört kat ve üzeri artış olması da aktif enfeksiyon olarak yorumlanır. Bazen hekime başvuran kişide klinik olarak güçlü bir şekilde bruselloz şüphesi olduğu halde, agglütinasyon testleri negatif sonuç verir.

Bundan IgG ve IgA tipindeki blokan antikorlar sorumlu tutulmaktadır. Böyle bir durum söz konusu olduğunda çalışmanın Coombs'lu yöntemle tekrarı gerekir. Ayrıca aktif enfeksiyonu saptamak için kullanılan diğer bir yöntem de 2-Merkaptoetanol kullanılarak yapılan aglütinasyon testidir. 2-Merkaptoetanol kullanımı, serumdaki Ig M'lerin bisülfid bağlarını yıkar ve böylece IgG'lerin saptanmasına yardımcı olur (9, 6, 16,17).

2.7.2.3. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

ELISA testleri, IgM, IgG ve IgA immünglobülin izotiplerini saptayabilen bir test olarak hastalığın tanısında kullanılabilirdiği gibi, hastalık evresini belirlemede ve izlemde kullanılabilir. ELISA, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olup kısa bir zaman diliminde kantitatif sonuç alınabilmesi ELISA'nın avantajları arasındadır. Özellikle nörobruselloz şüpheli olguların BOS incelemelerinde ve serolojik sürveyans çalışmalarında tercih edilen bir yöntemdir (17).

2.7.3. Moleküler tanı yöntemleri

2.7.3.1. PCR (Polimerase chain Reaction)

Direkt klinik örneklerde Brucella türlerinin saptanmasında konvansiyonel polimerase chain reaction (PCR) ve real-time PCR testleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde BCS P31 (31-kDa'luk hücre yüzey proteinini kodlar), BP26 (26-kDa'luk periplazmik proteini kodlar), 16SrRNA ve insertion sequence IS711 gibi Brucella türlerine spesifik hedef gen bölgeleri kullanılmaktadır. Moleküler testler bruselloz tanısında diğer testlere yardımcı olarak kullanılabilir, gelecek için ümit verici testlerdir. Ancak rutin tanıda yer alabilmeleri için standardizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır (18).

2.7.3.2. Moleküler epidemiyolojik yöntemler

Son yıllarda yayınlanan bu olgu serileri brusellozun ülkemiz için halen önemli bir halk sağlığı problemi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hastalığın kontrolü ve tedavisinde büyük katkılar sağlayan, brusellozda çapraz bulaş, kaynak ve yayılma yolları hakkında kanıta dayalı veriler sunan moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (18).

2.7.3.3. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

MLVA yöntemi, adli tıp biliminde, suç mahallerinde DNA izlerini karakterize etmek için, aynı zamanda babalık testleri için kullanılmıştır. Diğer bir kullanım alanı da mikroorganizmaların moleküler tiplendirilmesidir. Yöntem ilk kez Van Belkum ve ark.

Tarafından 1997'de, ilk kez *Haemophilus influenzae* için kullanılmıştır. Bakterilerde, variable number tandem repeat analysis (VNTR) lokusundaki tekrarların sayısı, farklı suşlar arasında farklılık gösterebilir. MLVA, çoğu bakteri türünün doğal olarak, mikrobiyal genomunda bulunan ardışık tekrarlanan DNA dizilerinin, sayısındaki değişimi kullanarak bakterilerin moleküler parmak izlerini değerlendirmeye amaçlar. Böylece bakteri izolatları arasındaki klonal ilişki tespit edilebilir ve elde edilen veriler dünya verileri ile kıyaslanabilir (18).

2.8. Tedavi

Hücre içi bir bakteri olan brusellanın fagolizozomu asidik bir ortamdır. Bu nedenle brusellozun tedavisinde intraselüler ortama geçebilen ve asit ortamda etki gösteren antibiyotikler tercih edilmelidir. Ayrıca bruselloz olgularında nüksler ile karşılaşıldığından, tedavi için monoterapi yerine kombine tedavi önerilir. Erişkin olguların tedavisinde, altı hafta süre ile tetrasiklin/doksisiklin ve streptomisin, doksisiklin ve rifampisin ya da ofloksasilin+rifampisin kombinasyonları kullanılır. Çocuk hastalar ise dört-altı hafta süreyle kullanılan trimetoprim-sülfometaksazol (TMP-SMZ) (10 mg/kg/gün) ve rifampisin (20 mg/kg/gün) kombinasyonu ile tedavi edilebilir. Bu kombinasyona gentamisin (5-7 mg/kg/gün, 5 gün) eklenebilir. Sekiz yaşın üzerindeki çocuklarda ise doksisiklin ve rifampisin kombinasyonu kullanılabilir (11). Nörobruselloz olgularında ise rifampisin, doksisiklin ve üçüncü kuşak sefalosporin kombinasyonu önerilir. Bruselloz tedavisi uzun bir süreç olup çocuklarda ortalama üç ay, erişkinlerde ise dokuz aydır. Endokarditli olgularda ise altı dokuz hafta süreyle rifampisin, doksisiklin, gentamisin, TMP-SMZ kombinasyonu ile tedavi önerilir (11).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Brucella suşları

Çalışmaya 2000-2013 Yıllarında Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi'nde çocuk hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve fenotipik yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanmış 77 Brucella izolatu dahil edildi. Bunun için -80°C'de 10%'luk skim milk besiyerinde saklanmış suşlar, soğuk zincir ile Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ve Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı. Ardından suşlar 10%'luk skim milkbesiyerinden, koyun kanlı agar besiyerine pasajlanarak canlandırıldı. Üreme gözlenen 77 *Brucella* izolatu ileri çalışmalarda kullanıldı. Bu 77 suşun tamamı geleneksel ve moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlandı. Suşların tamamının antibiyotik duyarlılık test sonuçları belirlendi. Ayrıca 77 örneğin MLVA çalışmaları yapıldı.

3.2. Antibiyotik Testleri:

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları gentamisin (GM), rifampisin (RIF), doksisisiklin (DC), tigesiklin (TC), seftriakson (CRO), trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) için E-test şeritleri kullanılarak yapıldı ve CLSI (Clinical Laboratory Standarts Instute) kriterlerine göre izolatların antibiyotik MİK (Minimum inhibitorkonsantrasyon) değerleri belirlendi. Minimum inhibitor konsantrasyonları belirlemek için %5 koyun kanı eklenmiş Mueller Hinton agar besiyeri kullanıldı. Öncelikle 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon, besiyerine yayıldı ve üzerine E-test şeritleri yerleştirildi. Besiyerlerinin, 35°C'de 24-48 saat boyunca, %5-10 CO₂'li ortamda inkübasyonunun ardından, sonuçlar değerlendirildi.

3.3. DNA izolasyonu

Brucella DNA örnekleri basit termolizat prosedürü ile hazırlandı. Bunun için bir öze dolusu bakteri kolonisi 200 µl TE buffer (10 mMTris [pH8.0], 1 mM EDTA) solüsyonunda süspanse edildi. Bulanıklık 0,5 McFarland olarak ayarlandı. Bakteri 100°C'de 10 dakika ısıtılıp ardından 13,000 × g'de 10 dakika nükleik asit içeren süpernatant oluşturmak üzere santrifüj edildi.

3.4. Brucella türlerinin Real Time PCR ile belirlenmesi

Brucella spp. için bcs31 gen bölgesi, *B.melitensis* için IS711 insersiyon elementi ve *B.abortus* için ise alkB geninin IS711 insersiyon elementlerine yönelik primer dizileri

kullanıldı (Tablo 1). PCR amplifikasyonu aşağıdaki koşullarda Real time PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Rotor gene Q, Qiagen, Hilden, Almanya) ile gerçekleştirildi (Tablo 1). PCR amplifikasyonu toplam 25 µl hacimde olacak şekilde, Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master mix 2X'den 12,5 µl, 10 pmol/µl'lik primer konsantrasyonlarından 1'er µl, 16µl su ve 2,5µl DNA kullanılarak hazırlandı (Tablo 2).

Tablo 1. Çalışmada *Brucella* türlerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri

Gen	Forward primer* Reverse primer*	Amplikon (bp)	Kaynak
<i>bcp31</i> (<i>Brucella</i> <i>spp</i>)	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG	223	(12)
BMEI1162 (<i>Brucella</i> <i>melitensis</i>)	AACAAGCGGCACCCCTAAAA CATGCGCTATGATCTGGTTACG	731	(12)
<i>alkB</i> (<i>B.abortus</i>)	GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC CATGCGCTATGATCTGGTTACG	498	(12))

Tablo 2. *Brucella* tür tayini için amplifikasyon koşulları

<i>Başlangıç</i> <i>Denaturasyon</i>	95°C	10dakika	1 kere
Denaturasyon	95°C	15saniye	
Bağlanma	60°C	1 dakika	45 kere
Uzama	72°C	30 saniye	
Final uzama	70°C	5 dakika	1 kere

3.5. MLVA (Multilocus variable number tandem repeat analysis) standardizasyon çalışmaları:

Bu yöntemin kullanılması sırasında standart bir suş olan M16Orsay *Brucella* suşu kullanılarak standardizasyon işlemleri yapıldı. Bunun için öncelikle standart suşun her bir lokusu için ayrı ayrı monopleks PCR'lar çalışıldı ve sonrasında standart suşun 16 lokusu için mültipleks PCR' reaksiyonları kuruldu. Çalışmada araştırılan lokuslar Panel 1 için Bruce 6, Bruce 8, Bruce 11, Bruce 12, Bruce 42, Bruce 43, Bruce 45, Bruce 55; Panel 2A için Bruce 18, Bruce 19, Bruce 20, Panel 2B için Bruce 4, Bruce 7, Bruce 9, Bruce 16, Bruce 30 şeklindeydi (Tablo 3).

Tablo 3. Brusella MLVA çalışmasında kullanılan VNTR lokuslarına ait primer dizileri

Mix	Loci	Forward primer	Reverse primer
1	Bruce21	CTCATGCGCAACCAAAAACA	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT
	Bruce45	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG
	Bruce11	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	CCAGACAACAACCTACGTCCTG
2	Bruce04	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG
	Bruce43	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	TATTTTCCGCCTGCCATAAAC
	Bruce08	ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC
4	Bruce16	ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT	GGCCATGTTTCCGTTGATTAT
	Bruce07	GCTGACGGGGAAGAACATCTAT	ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA
	Bruce12	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC
5	Bruce06	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC
	Bruce55	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT
	Bruce30	TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG
6	Bruce19	GACGACCCGGACCATGTCT	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT

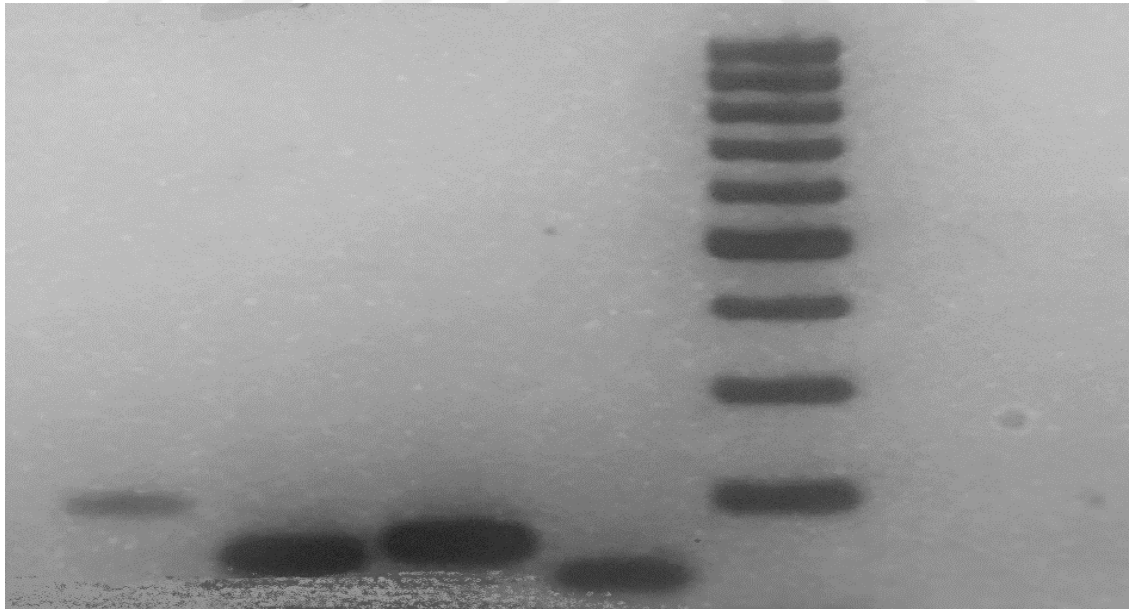
3.6. Monopleks PCR standardizasyon işlemleri:

Bunun için çeşitli lokuslara ait primerler kullanılarak standart suşa ait monopleks PCR karışımları hazırlandı. DreamTag Master Mix (2x) (ThermoFisherScientificInc., USA) 'den 12,5µl, forward ve revers primerlerden 1'erµl (10 pmol), 8 µlsu, 2,5µlM16Orsay BrucellaDNA solüsyonu kullanılarak 25 hacimde PCR karışımı hazırlandı ve Thermal cycler ile (RG6000; CorbettResearch) amplifiye edildi. Amplifikasyon için Tablo 4'de gösterilen amplifikasyon koşulları uygulandı.

Tablo 4. M16Orsay Brusella suşunun çeşitli lokuslarının monopleks olarak amplifikasyonu için PCR koşulları

Başlangıç Denaturasyon	96°C	5 dakika	1 kere
Denaturasyon	96°C	30 saniye	
Bağlanma	60°C	30 saniye	30 kere
Uzama	70°C	30 saniye	
Final uzama	70°C	5 dakika	1 kere

Elde edilen ürünler agaroz jelde yürütüldü. Standardizasyon çalışmaları bütün primerler için tekrarlandı. **Şekil 1**'de M16 *Brucella* suşunun çeşitli lokuslarının (Bruce 04 Bruce 07, Bruce 16, Bruce 30) monopleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 1. M16Orsay *Brucella* suşunun çeşitli lokuslarının (Sırasıyla Bruce 04 Bruce 07, Bruce 16, Bruce 30) monopleks PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (120 V, %2 agaroz).

3.7. Múltipleks PCR standardizasyon işlemleri

Múltipleks PCR için kullanılacak olan primerlerden “forward” olanları floresan boylarla işaretlendi. Herbir karışımdaki işaretli primerlerin boyları birbiriyle çakışmayacak şekilde tasarlandı. Bunun için Karışım 1, Karışım 2, Karışım 3, Karışım 4, Karışım 5, Karışım 6 olmak üzere altı adet primer karışımı hazırlandı. Karışımlarda kullanılan primerler aşağıda belirtildi:

Múltipleks Karışım 1: Bruce 21, Bruce 45, Bruce 11

Múltipleks Karışım 2: Bruce 04, Bruce 43, Bruce 08

Múltipleks Karışım 3: Bruce 16, Bruce 07, Bruce 12

Múltipleks Karışım 4: Bruce 06, Bruce 55, Bruce 30

Múltipleks Karışım 5: Bruce 42, Bruce 09, Bruce 18

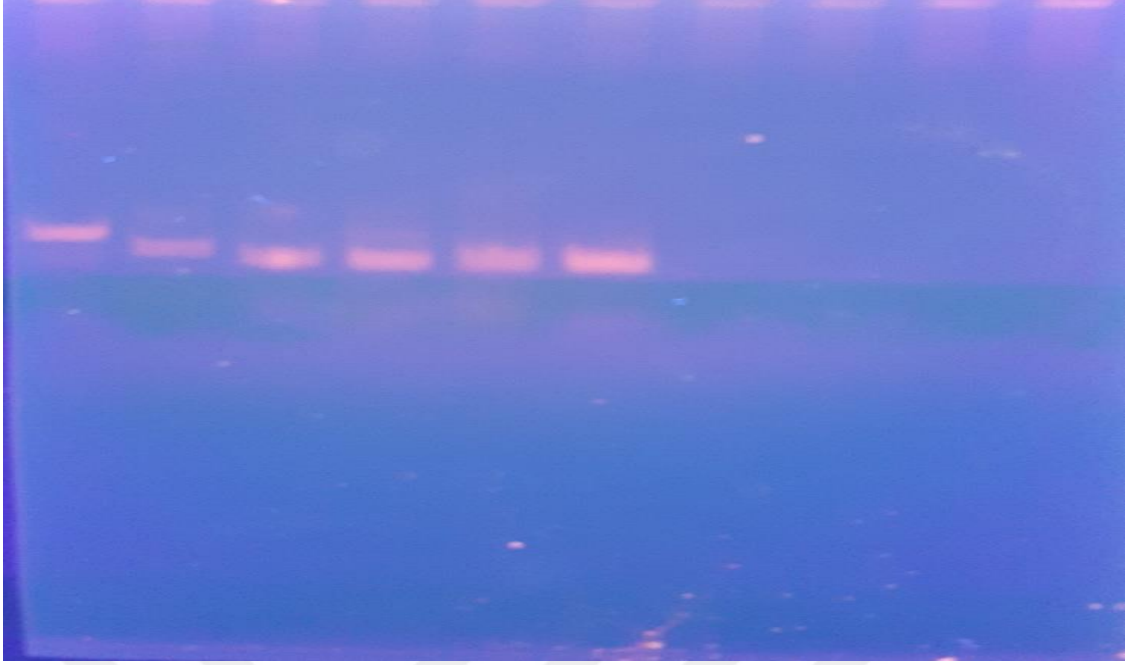
Monopleks Karışım 6: Bruce 19

Yukarıda belirtilen primer karışımları kullanılarak beş ayrı múltipleks PCR reaksiyonu kuruldu. Múltipleks PCR karışımları toplam 25 µl hacimde olacak şekilde, DreamTag Master Mix (2x) (ThermoFisher ScientificInc., USA), herbirprimerin uygun konsantrasyonları ve 5 µlM16Orsay Brucella suşu DNA solüsyonu ile hazırlandı. Ayrıca DreamTag Master Mix (2x) (ThermoFisherScientificInc., USA) ’den 12,5 µl, Bruce 19 forward primerden ve revers primerden 1’er µl, 8 µl su, 2,5 µl M16Orsay Brucella suşu DNA solüsyonu kullanılarak 25 hacimde monopleks PCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon işlemleri thermal cycler (RG6000; Corbett Research) cihazında Tablo 5’ deki koşullarda gerçekleşti.

Tablo 5. Múltipleks PCR ve Bruce 19 primeri ile yapılan monopleks PCR amplifikasyon koşulları

<i>Denaturasyon</i>	<i>96°C</i>	<i>5 dakika</i>	<i>1 kere</i>
Denaturasyon	96°C	30 saniye	
Bağlanma	60°C	30 saniye	30kere
Uzama	70°C	30 saniye	
Final uzama	70°C	5 dakika	1 kere

Ardından PCR sonrası elde edilen ürünler jel elektroforezinde yürütüldü ve bant oluşup oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 2). UV ışık altında bant varlığı gözlemlendikten sonra elde edilen ürünler kapiller elektroforez için kullanıldı.



Şekil 2. Beş ayrı mütipleks PCR ve monopleks PCR sonuçlarının 120 V, %2 'lik elektroforez jel görüntüsü. Soldan sağa miks 1,2,3,4,5 ve sonuncu bant monopleks PCR'a aittir.

3.8. Kapiller elektroforez ve fragman analizi:

Bu işlem için 3 µl PCR reaksiyon ürünü 1/50 oranında H₂O içinde dilüe edildi.

20 µl Sample Loading Solution (SLS) ve 0,5 µl "map marker 1000" pipetaj ve vorteksenerek birbiri içinde iyice karıştırıldı. 3-5 µl dilüsyon ürünü, SLS+ map marker karışımına eklenerek hepsinin iyice karışması sağlandı. Örnekler plate'e yüklenerek üzerlerine birer damla mineral yağı damlatıldı. Beckman Coulter CEQ 8000 DNA Analysis System cihazında VNTR programında çalışma başlatıldı.

3.9. Çalışma suşlarında MLVA çalışmaları:

Standardizasyon tamamlandıktan sonra çalışmaya dahil edilen 77 suşun MLVA çalışmaları, kapiller elektroforez ve fragman analizleri yapıldı.

3.10. Sonuçların analizi

Kapiller elektroforez sonrasında her bir suş için test edilen 16 lokusun PCR ürün büyüklüğü "base pairs" (bp.) belirlendi ve bu değerler kullanılarak o suşa ait MLVA formülü çıkarıldı. Cluster analizinde UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) algoritması ve kategorik uzaklık kullanıldı. Genetik çeşitlilik (Hunter-Gaston diversity index [HGDI]) ve

confidence intervaller www.hpabioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl web sitesinde yer alan araçlar yardımıyla hesaplandı. *B. melitensis* izolatlarının MLVA-16Orsay genotipleri referans suşlara ait ve daha önceki izolatlara ait verilerle karşılaştırıldı (17). Hastaların özellikleri ve genotipler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde ise ki-kare testi kullanıldı.

3.11. Sonuçlarının Karşılaştırılması

Elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları, moleküler tiplendirme ve klasik epidemiyolojik veriler birleştirilerek; MLVA tipleriyle direnç profili ve belirli bir klinik form ile ilişki olup olmadığı analiz edildi.



4.BULGULAR

4.1.Hastalara ait bulgular

77 hastanın 40'ı (% 55) erkek, 37'si (% 45) kızdı ve yaşları 2 yıldan 16 yıla kadar (ortalama 9.13 ± 3.6 yıl) idi. Tüm hastalarda yakın zamanda pastörize edilmemiş süt veya süt ürünleri tüketme hikayesi mevcuttu. Hastaların en sık şikayeti ateş (%80) ve karın ağrısı (%58) olup bunu sırasıyla artralji (% 56) ve miyalji (% 40) takip ediyordu. En sık görülen bulgular ise ateş (%80), artrit (%45), hepatomegali (%5) ve splenomegali (%4) idi. Çocuklarda görülen bruselloz vakalarının büyük çoğunluğu (%99) geç ilkbahar ve yaz aylarında (Mayıs, Haziran, Temmuz) görülüyordu.

4.2. Brusella suşları

Çalışmaya dahil edilen 77 izolatta üreme gözlemlendi. Geleneksel yöntemler ile suşların tür düzeyinde tayini sonucu üreme gözlenen 77 izolatın tamamının *Brucella melitensis biovar 3* olduğu belirlendi.

4.3. Antibiyogram sonuçları

İzolatlara ait antibiyogram sonuçları Tablo 6' de gösterildi. Antibiyogram sonuçlarına göre Brusella izolatlarının ikisi seftriaksona dirençli bulunurken, suşların tamamı doksisisiklin, streptomisin ve trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı olarak bulundu. Break point değerleri CLSI'de henüz belirlenmemiş olan Tigesiklin ve Rifampisin için MİK aralıkları 0,016-0,23 ve 0,38-1,5 µg/ml olarak saptandı (Tablo 7). Bir çalışma suşuna ait antibiyogram çalışması ise Şekil 3' de gösterildi.

Tablo 6. *Brucella melitensis* suşlarına karşı test edilen antibiyotiklerin MİK değerleri

SIRA NO	Ceftriaxone (CRO) µg/ml	Trimetoprim-sülfametoksazol** (SXT) µg/ml	Rifampicin*** (RD) µg/ml	Doxycycline (DO) µg/ml	Gentamicin (CN) µg/ml	Tigecycline*** (TGC) µg/ml
1	0,094	0,004	0,5	0,016	0,38	0,016
2	0,25	0,006	0,5	0,032	0,38	0,016
3	2*	0,002	0,38	0,064	0,5	0,016
4	0,38	0,008	0,38	0,064	0,38	0,016
5	0,125	0,006	0,5	0,016	0,38	0,016
6	0,94	0,004	0,5	0,032	0,38	0,23
7	0,125	0,016	1	0,047	0,38	0,016
8	0,38	0,003	0,38	0,023	0,38	0,032
9	0,125	0,004	0,5	0,023	0,5	0,032
10	0,19	0,023	0,75	0,023	0,5	0,047
11	0,19	0,023	0,75	0,032	0,38	0,032
12	0,19	0,032	1	0,032	0,38	0,064
13	0,19	0,023	1	0,023	0,38	0,047
14	0,19	0,023	1	0,032	0,38	0,047
15	0,19	0,016	0,75	0,023	0,38	0,047
16	0,125	0,023	1	0,023	0,5	0,047
17	0,125	0,023	1	0,032	0,5	0,047
18	0,19	0,023	1,5	0,023	0,38	0,047
19	0,38	0,023	1	0,064	0,5	0,064
20	0,19	0,008	0,75	0,016	0,19	0,032
21	0,19	0,032	0,75	0,032	0,38	0,047
22	0,75	0,094	0,75	0,032	0,5	0,047
23	0,125	0,008	0,75	0,016	0,038	0,038
24	0,125	0,023	0,75	0,023	0,5	0,047
25	0,125	0,032	1,5	0,047	0,5	0,047
26	0,094	0,004	0,75	0,016	0,038	0,016
27	0,19	0,023	0,75	0,032	0,38	0,047
28	0,038	0,016	1	0,047	0,38	0,064
29	0,5	0,016	0,75	0,047	0,38	0,064
30	0,125	0,023	0,75	0,023	0,25	0,032
31	0,19	0,023	0,75	0,023	0,5	0,047
32	0,19	0,023	0,75	0,032	0,38	0,032
33	0,19	0,032	1	0,032	0,38	0,064
34	0,19	0,023	1	0,023	0,38	0,047
35	0,19	0,023	1	0,032	0,38	0,047
36	0,19	0,016	0,75	0,023	0,38	0,047
37	0,125	0,023	1	0,023	0,5	0,047
38	0,125	0,023	1	0,032	0,5	0,047
39	0,19	0,023	1,5	0,023	0,38	0,047
40	0,38	0,023	1	0,064	0,5	0,064

41	0,19	0,008	0,75	0,016	0,19	0,032
42	0,19	0,032	0,75	0,032	0,38	0,047
43	0,75	0,094	0,75	0,032	0,5	0,047
44	0,125	0,008	0,75	0,016	0,038	0,038
45	0,125	0,023	0,75	0,023	0,5	0,047
46	0,125	0,032	1,5	0,047	0,5	0,047
47	0,094	0,004	0,75	0,016	0,038	0,016
48	0,19	0,023	0,75	0,032	0,38	0,047
49	0,038	0,016	1	0,047	0,38	0,064
50	2*	0,016	0,75	0,047	0,38	0,064
51	0,125	0,023	0,75	0,023	0,25	0,032
52	0,5	0,016	0,75	0,047	0,38	0,064
53	0,125	0,016	1	0,016	0,19	0,047
54	0,38	0,003	0,38	0,032	0,38	0,016
55	0,125	0,004	0,5	0,064	0,5	0,047
56	0,19	0,023	0,75	0,064	0,038	0,064
57	0,19	0,023	0,75	0,016	0,5	0,064
58	0,19	0,032	1	0,016	0,5	0,032
59	0,19	0,023	1	0,032	0,038	0,047
60	0,19	0,023	1	0,064	0,38	0,032
61	0,19	0,016	0,75	0,023	0,38	0,064
62	0,125	0,023	1	0,032	0,38	0,047
63	0,125	0,023	1	0,032	0,25	0,047
64	0,19	0,023	1,5	0,023	0,5	0,047
65	0,38	0,023	1	0,032	0,38	0,047
66	0,19	0,008	0,75	0,023	0,38	0,047
67	0,19	0,032	0,75	0,023	0,38	0,047
68	0,75	0,094	0,75	0,032	0,38	0,064
69	0,125	0,008	0,75	0,023	0,38	0,047
70	0,125	0,023	0,75	0,064	0,5	0,016
71	0,125	0,032	1,5	0,016	0,5	0,047
72	0,094	0,004	0,75	0,032	0,38	0,064
73	0,19	0,023	0,75	0,032	0,5	0,064
74	0,038	0,016	1	0,016	0,19	0,032
75	2*	0,016	0,75	0,023	0,38	0,047
76	0,125	0,023	0,75	0,047	0,5	0,032
77	0,19	0,023	0,75	0,016	0,038	0,064
Kontrol suşu	0,047	0,008	1,5	0,094	0,25	0,032

*CLSI break point değerleri (doksisisiklin \leq 1 μ g/ml duyarlı, SXT \leq 2 duyarlı, Streptomisin \leq 8 duyarlı) göre dirençli suşlar. ** Trimetoprim-sülfametoksazol için 1/9'lük orana sahip ilacın sadece trimetoprim kısmının MİK değerler gösterildi.***Tigesiklin ve Rifampisin için CLSI breakpoint değerleri bulunmamaktadır.

Tablo 7. Brusella izolatlarına ait MİK 50 ve MİK 90 değerleri

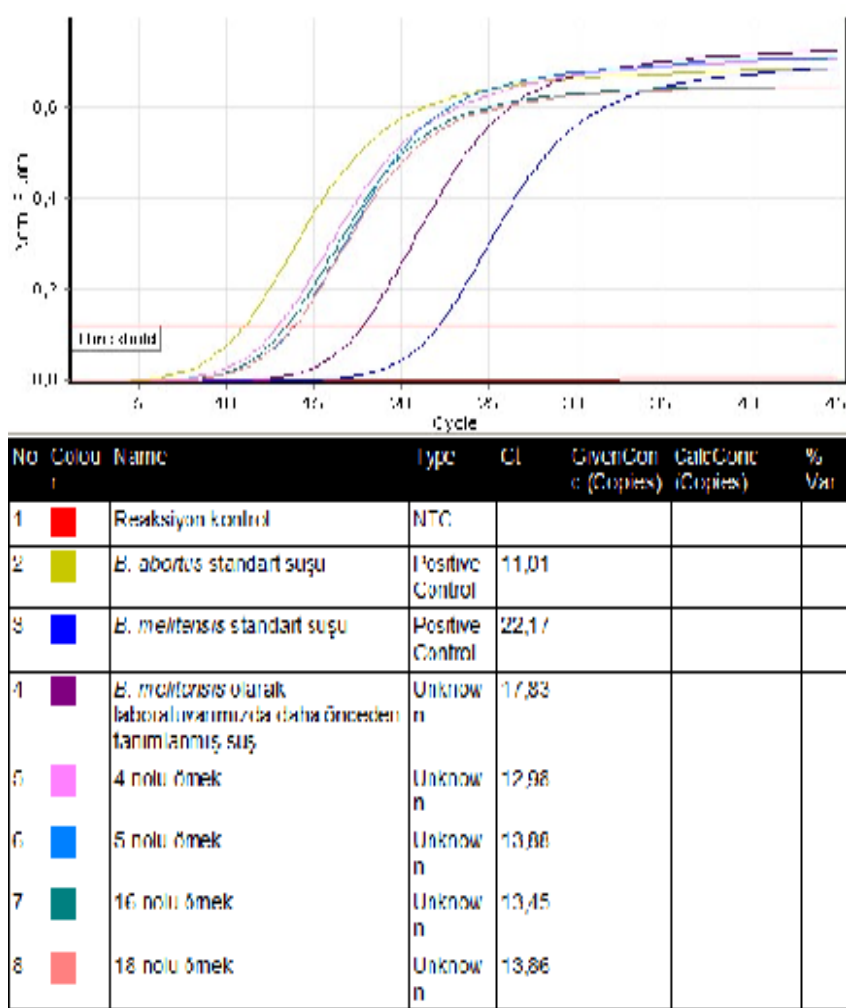
Antibiyotikler	MİK (µg/ml)	MİK 50	MİK 90	M16 standart suşunun MİK değeri (µg/ml)
Seftriakson	0.94-2.00	0.19	0.19	0.047
Trimetoprim- Sülfametoksazol	0.002-0.032	0.023	0.032	0.008
Rifampisin	0.5-1.00	1.0	1.0	1.5
Doksisiklin	0.016-0.064	0.032	0.047	0.094
Gentamisin	0.038-0.50	0.38	0.5	0.25
Tigesiklin	0.016-0.064	0.047	0.064	0.032



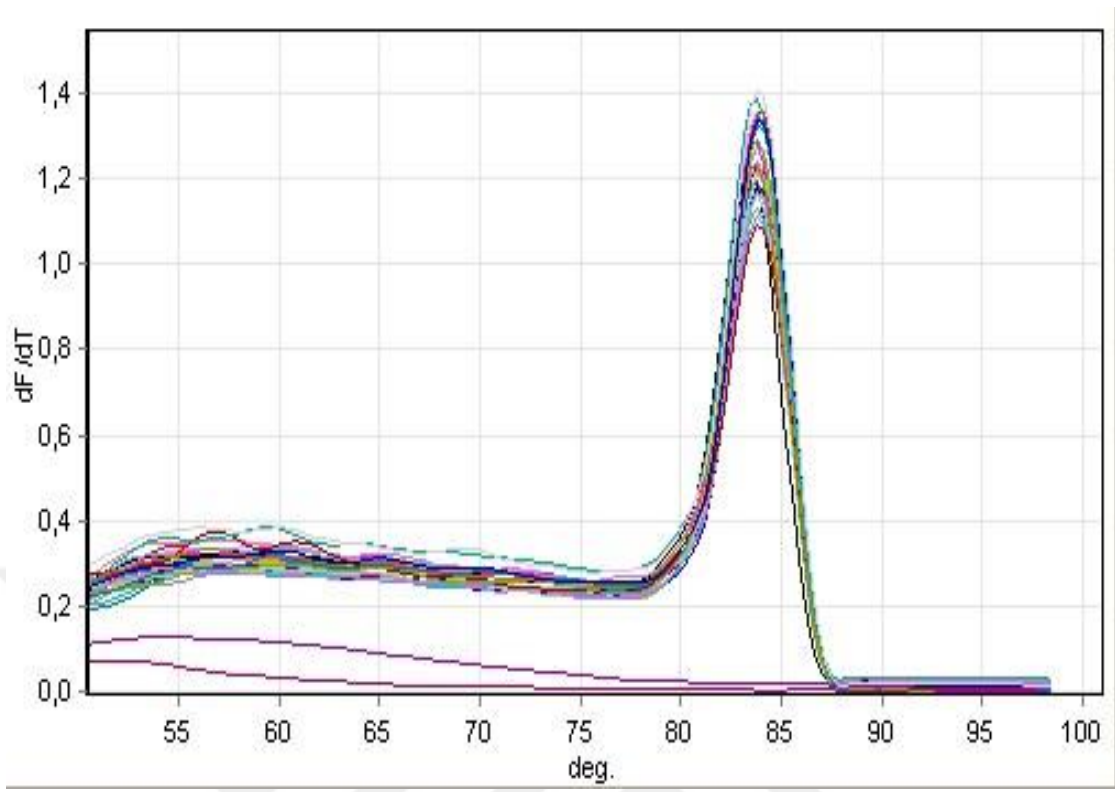
Şekil 3. Bir çalışma suşunun antibiyogram fotoğrafı

4.4.Brusella türlerinin belirlenmesine ait PCR sonuçları

Çalışmada 77 suşa ait moleküler incelemeler Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı ve Realtime PCR çalışmaları ile suşların tamamının *Brucella melitensis* olduğu belirlendi. *B.melitensis* ve *B.abortus* standart suşları ve bazı hasta örnekleriyle (4,5,16,18 nolu örnekler) yapılan Real Time PCR sonuçları ve Melting Curve analizleri Şekil 4 ve Şekil 5'de gösterildi.



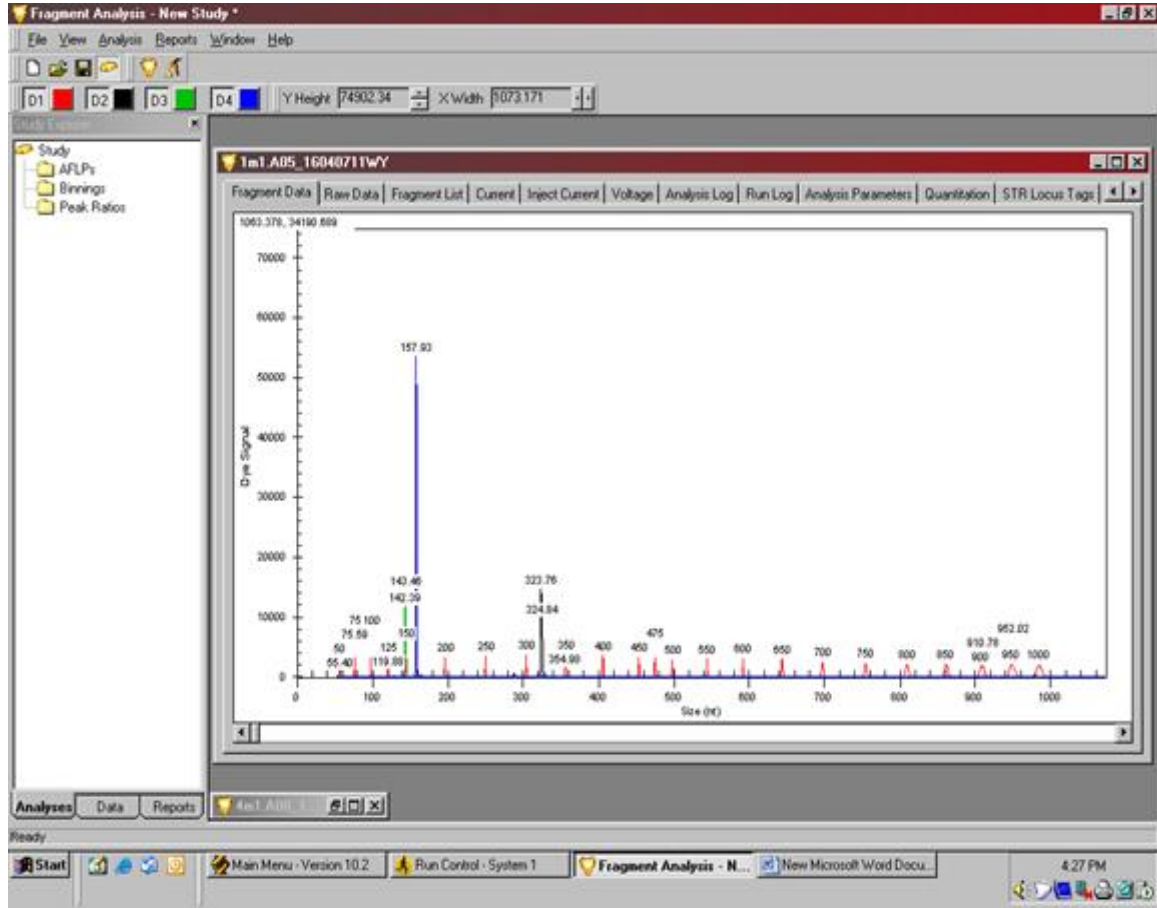
Şekil 4. *B. melitensis* ve *B.abortus* standart suşları ve bazı hasta örnekleriyle yapılan Real Time PCR sonuçları



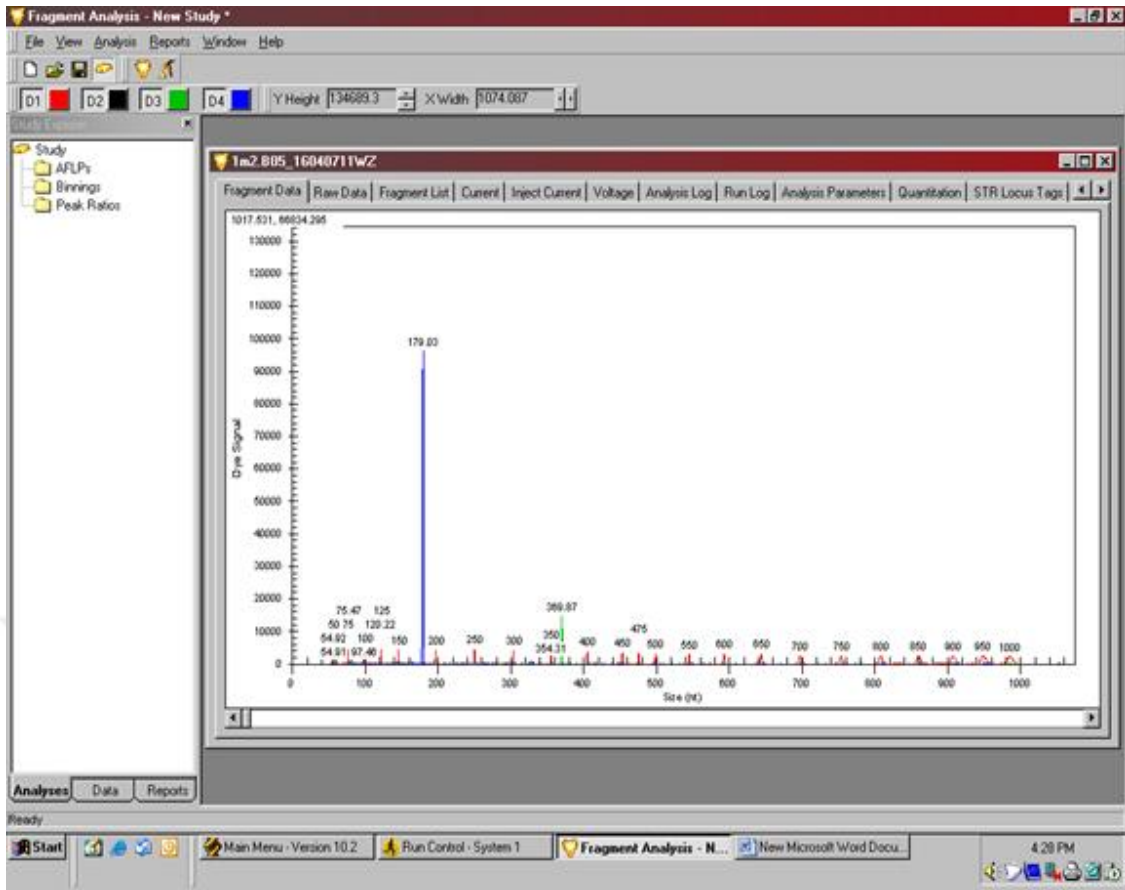
Şekil 5. Bazı örneklere ait “MeltingCurve” analizi

4.5. MLVA analizi ve kapiller elektroforez sonuçları

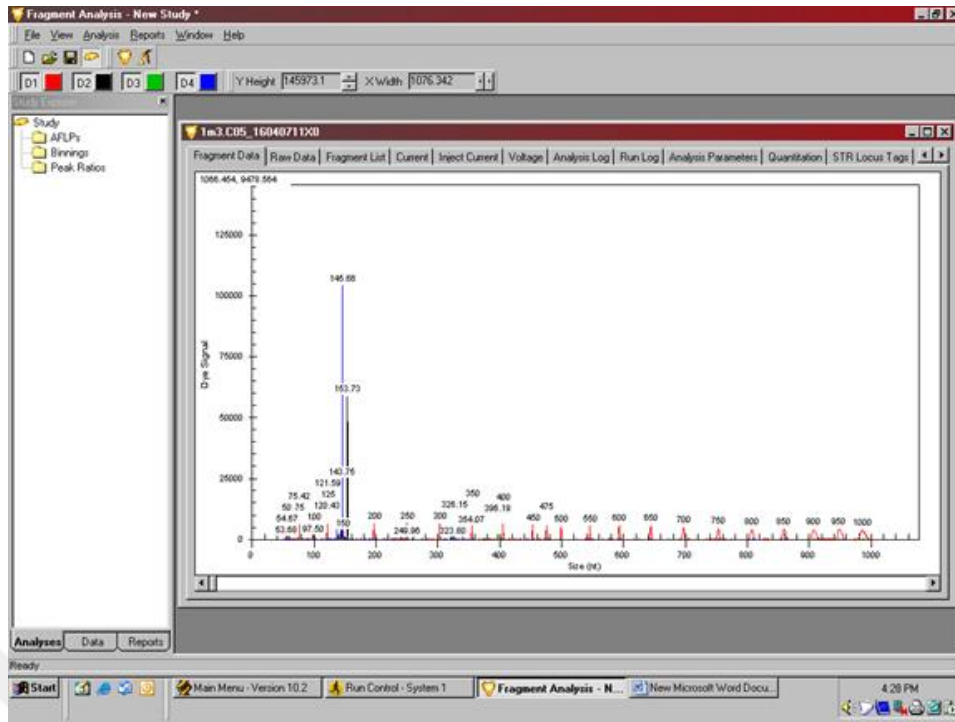
Kapiller elektroforez sonrasında ‘‘Map Marker’’ yardımıyla her bir suş için test edilen 16 lokusun PCR ürün büyüklüğü ‘‘basepairs’’ (bp.) belirlendi. Çalışmada kullanılan 1 nolu örneğe ait fragman analiz sonuçları **Şekil 6-11**’de gösterilmiştir.



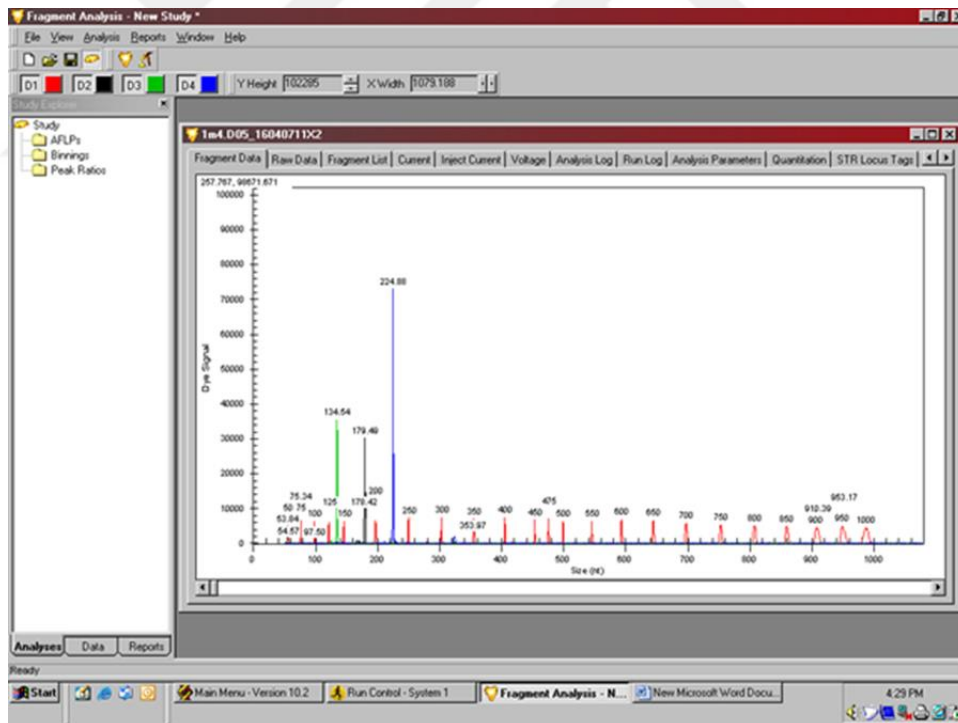
Şekil 6. Karışım 1 fragmant analiz sonuçları (1 no’lu örnek)



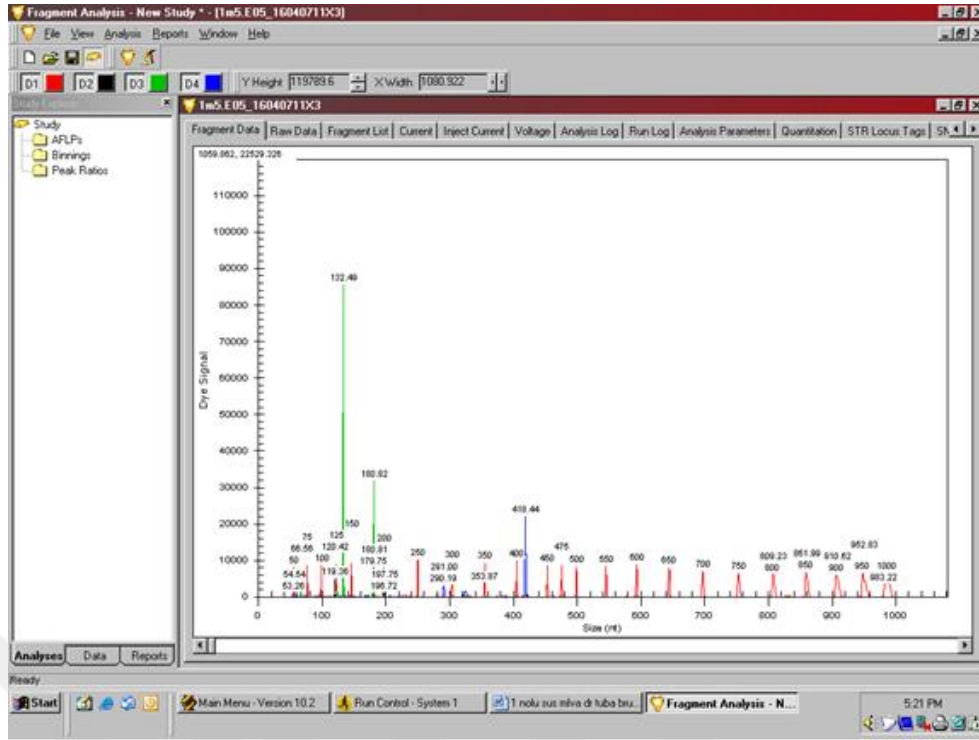
Şekil 7. Karışım 2 fragmant analiz sonuçları (1 no'lu örnek)



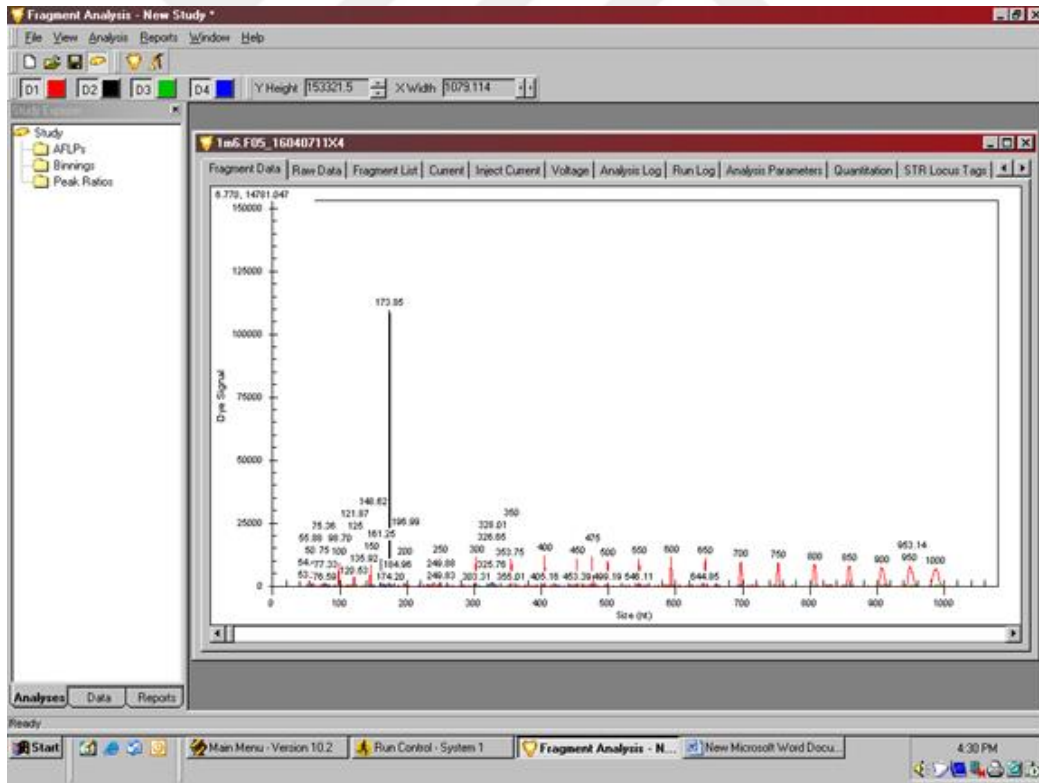
Şekil 8. Karışım 3 fragmant analiz sonuçları (1 no'lu örnek)



Şekil 9. Karışım 4 fragmant analiz sonuçları (1 no'lu örnek)



Şekil 10. Karışım 5 fragmant analiz sonuçları (1 no'lu örnek)

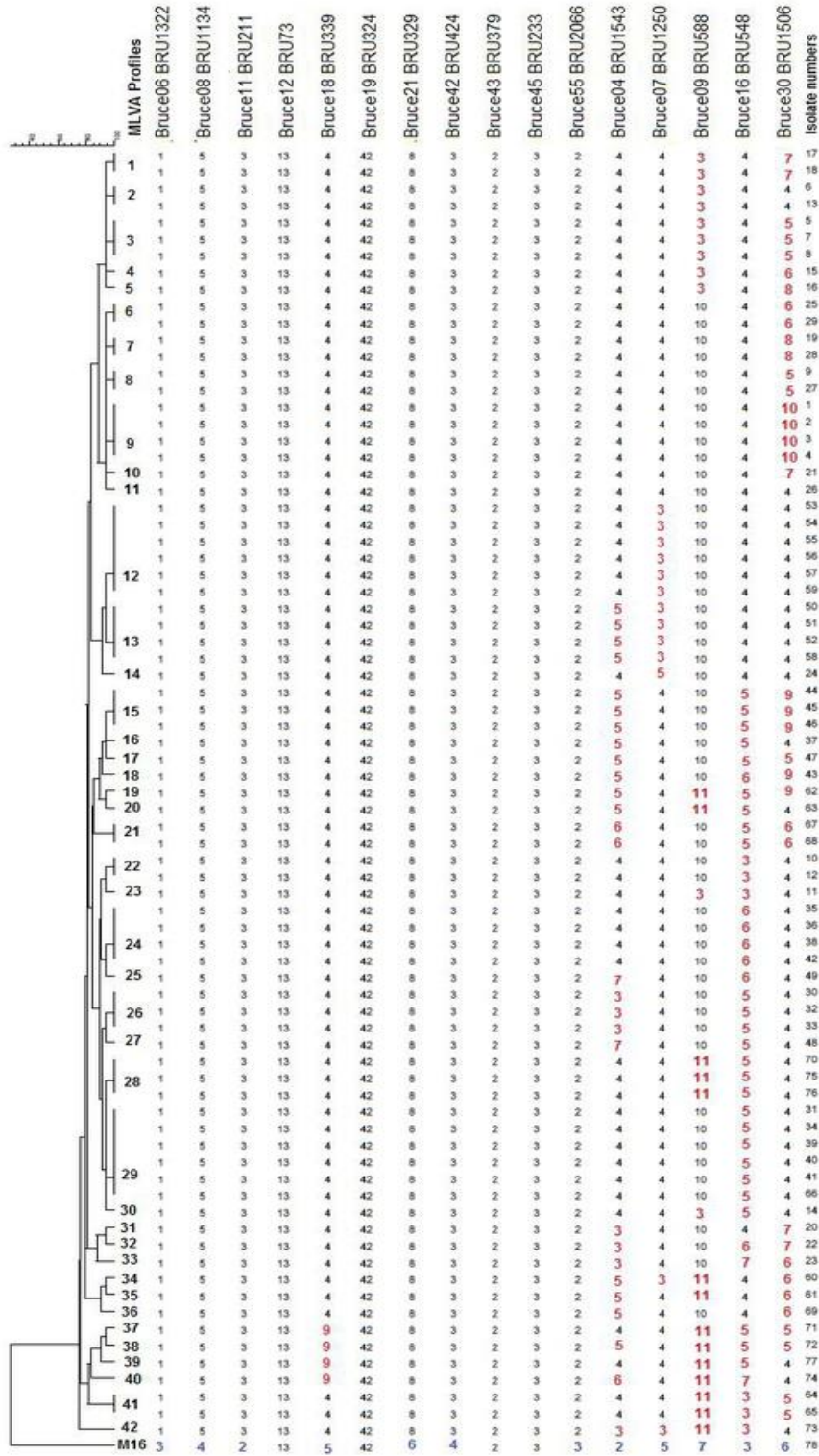


Şekil 11. Karışım 6 fragmant analiz sonuçları (1 no'lu örnek)

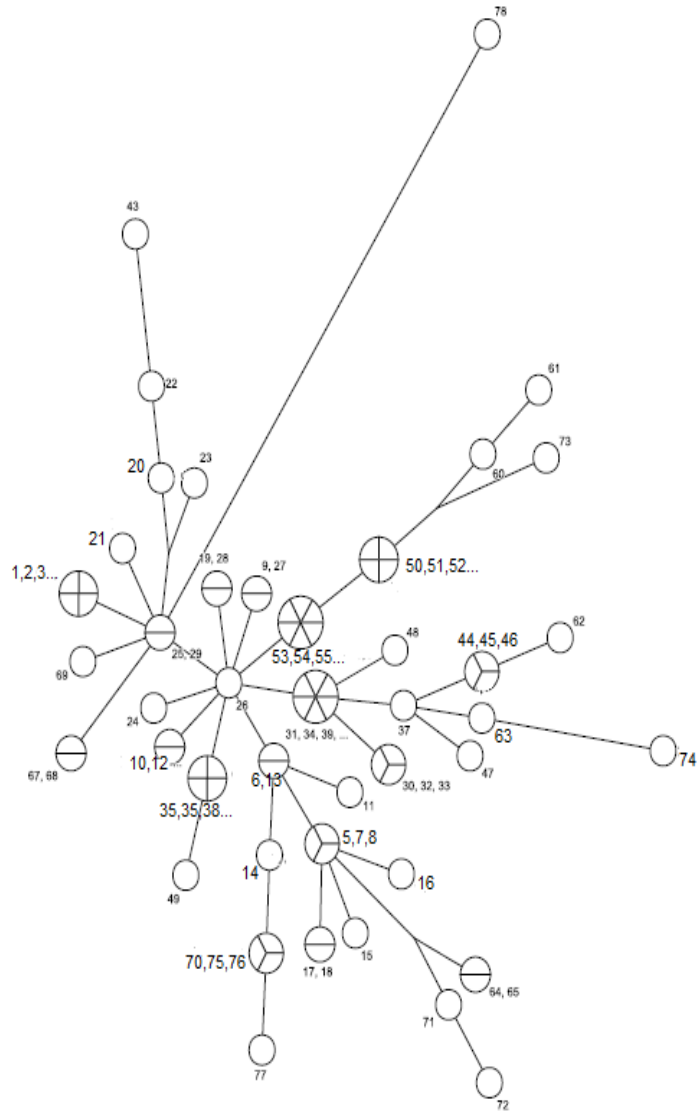
4.6. MLVA analiz sonuçları

Kapiller elektroforeze tabi tutulan PCR ürünlerinin büyüklüğü bp olarak belirlendikten sonra, her bir VNTR lokusuna ait tekrar sayıları bulundu (Şekil 12). Bulunan rakamlar yardımıyla Brucella izolatlarına ait cluster analizi yapıldı (Şekil12). Ayrıca izolatlara ait “spanning tree” oluşturuldu (Şekil 13).





Şekil 12. Brucella izolatlarına ait cluster analizi



Şekil 13. Brusella izolatlarına ait spanning tree

Yapılan MLVAOrsay 16 genotiplendirme analizleri sonucunda 77 suşta 42 farklı MLVA16 profili belirlendi. Bu 42 profilin 18 tanesi küme olup her bir küme 2 veya daha fazla suş içermekteydi. Geriye kalan 24 suş ise özgü profil gösterdi. Çalışılan suşlar arasındaki kümeleşme oranı % 66.7 olarak tespit edildi. Çalışmada 32 suşta ((6,13,25,29,19,28,9,27,1,2,3,4,7,53,55,56,57,59,10,12,35,36,38,42,31,34,39,40,41,66,14) tek lokus varyasyonu (single locus variante: SLV), 26 suşta (17,18,5,7,8,15,16,50,51,52,58,37,11,49,30,32,33,48,70,75,76,20,69,77), iki lokus varyasyonu (DLV), 15 suşta (44,45,46,47,43,63,67,68,22,23,61,71,74,64,65) üç lokus varyasyonu (TLV) saptandı. Üç suşta (72,62,60) dört lokusta varyasyon, bir suşta ise beş lokusta varyasyon tespit edildi. Standart *Brucella melitensis* suşu 12 farklı lokusta varyasyon gösterdi. Lokuslardan ayırım gücü en yüksek lokus Bruce 30 iken, bunu sırasıyla Bruce 16, Bruce 9, Bruce 7, Bruce 4 takip etti. İlk 11 lokusun ayırım gücünün olmadığı belirlendi. Suşlarının tamamının MLVA 11'e göre 122 genotipinde, MLVA8'e göre ise genotip 43 olduğu gözlemlendi. Suşların tamamı Doğu Akdeniz genotipindeydi (Şekil 12, 13).

5.TARTIŞMA

Bruselloz ülkemizde halen güncel bir halk sağlığı problemi olup özellikle çocuk hastaların tedavisinde güçlükler ve nüksler neden olmaktadır. Morbiditesi yüksek, mortalitesi düşük olan bu hastalığın ülkemiz çocuklarındaki yaygınlığı ile ilgili kapsamlı bir veri bulunmamaktadır. Bu konu ile ilgili yayınlanan serilerden 2011 yılında yapılan bir çalışmada 15 çocuk hastada başvuru sırasındaki en sık yakınmaları ateş (%93.3), halsizlik (%86.6), iştahsızlık (%80), terleme (%66.6), eklem ağrısı ve/veya şişliği (%53.3); en sık saptanan fizik muayene bulguları artrit (%46.6), lenfadenopati (%26.6), splenomegali (%6.6) ve makülopapüler döküntü (%6.6) olduğu bildirilmiştir. Hastaların %17'sinde serum aminotransferaz düzeylerinde artış, %63'ünde eritrosit sedimentasyon hızında (ESR) ve %72'sinde C-reaktif protein (CRP) düzeylerinde artış saptanmıştır. Vakaların tümüne kombine antibiyotik tedavisi uygulanmasına rağmen bir hastada rölaps gözlenmiştir (11). Altı yıllık sürede 32 brusellalı çocuk hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, olguların %87,5'inde çiğ süt ve süt ürünü yeme öyküsü, %12,5'inde hayvan temas öyküsü bulunurken, %12,5 hastada kaynak tespit edilememiştir. Kombine tedaviye rağmen üç hastada rölaps görülmüştür (14). Toplamda 82 çocuk bruselloz hastanın dahil edildiği bir vaka serisinde ise olguların çoğununun (%76.8) kırsal kesimde yaşayan, tarım ve hayvancılıkla uğraşan ailelerin çocukları olduğu gözlenmiş, en sık başvuru nedenleri olarak ateş (%86.6), eklem ağrıları (%75.6), halsizlik (%51.2) ve terleme (%37.8) kaydedilmiştir (15). Çalışmalar bruselloz olgularının yaz aylarında arttığı yönündedir (3,11,14). Sunulan tez çalışmasında da literatür ile benzer şekilde tüm hastalarda yakın zamanda pastörize edilmemiş süt veya süt ürünleri tüketme hikayesi mevcuttu. Olguların çoğu yaz aylarında tespit edildi ve ateş, artrit, hepatomegali ve splenomegali en sık bulgular arasında yer alıyordu.

Son yıllarda yayınlanan olgu serileri brusellozun ülkemiz için halen önemini koruduğunu göstermektedir. Bu nedenle hastalığın kontrolü ve tedavisinde büyük katkılar sağlayan, brusellozda çapraz bulaş, kaynak ve yayılma yolları hakkında kanıta dayalı veriler sunan moleküler epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. MLVA yöntemi, Brucella suşlarının genotiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan ve sonuçlarının dünya verileriyle kıyaslanmasına da olanak veren ayırım gücü oldukça yüksek olan bir yöntemdir (19).

Onaltı lokuslu MLVA yöntemi yardımıyla dünyada izole edilen Brucella izolatları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi mümkün olmuştur. Brusellozun yayılmasında

lkeler arasındaki hayvan hareketliliğinin, kontamine et ve süt ürünleri ile beslenmenin rolü büyük olduğundan her ülkenin o ülkede yaygın olan genotipi belirlemesi hastalıktan korunma ve yayılmasını önlemeye yardımcı olacaktır.

inde yapılan bir MLVA alışmada 24 Brusella izolatının tamamı *B.melitensis* olarak belirlenmiştir. MLVA-8'e (Panel 1) göre suşların 7'si genotip 45, 1 suş genotip 42, 1 suş ise genotip 62 olarak sınıflandırılmıştır. MLVA 16 (Panel 1+2A+2B)'ye göre suşların hiçbirinin bilinen genotipler ile aynı olmadığı gözlenmiştir (20).

Kazakistan'da yapılan bir çalışmada ise 128 *B.melitensis* suşu MLVA ile test edilmiştir. MLVA-8 sonuçlarına göre *B. melitensis* suşlarının çoğunlukla genotip 42 (n=108) içinde yer aldığı bunu sırasıyla genotip 43 (n=2) ve 63 (n=19)'n izlediğii ve bu suşların Doğu Akdeniz grubu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. MLVA-16 ile 128 *B.melitensis* suşunun 25 farklı genotipte olduğu, bir değişken lokus dışlandıktan sonra yapılan MLVA-15 analizinde ise suşların Akdeniz Bölge'sinden kaynaklanan suşlardan farklı olduğu %77'sinin in'den izole edilen kökenlerle aynı olduğu gözlenmiştir (21).

İtalya'da yapılan bir çalışmada ise 84 *B.melitensis* izolatında MLVA-16 ile 56 genotip saptanmıştır. Bunlardan 43 genotip özgü profil göstermiştir. Seksen bir suşun Batı Akdeniz grubu ile ilişkili olduğu kaydedilmiştir. İtalya'da yapılan bu çalışmada bir insan suşunun bir hayvan izolatıyla aynı genotipte bulunması epidemiyolojik ilişkinin varlığını doğrulamıştır (22).

Ülkemizde sekiz yıllık bir dönemde Türkiye'nin tüm coğrafi bölgelerinden 162 insan Brucella izolatı arasındaki epidemiyolojik ilişki ve genetik çeşitliliğinin araştırıldığı bir alışma Kılıç ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 161 izolat *B. melitensis* biovar 3, bir izolat ise *B. abortus* biovar 3 olarak saptanmıştır. Toplamda 16 lokusun araştırıldığı MLVA-16 yöntemi ile 105 genotip saptanmış, izolatların yarısına yakınında çapraz bulaş belirtilmiştir. Çalışmada MLVA-16'ya göre genotip 42 ve 43 en yaygın genotipler olarak belirlenmiştir. Yapılan moleküler tiplendirme ile aile içi, laboratuvar içi ve aynı ürünün tüketimine bağlı çapraz bulaşmaların gösterilmesinde yöntemin oldukça etkin olduğu vurgulanmıştır. Çalışma sonuçları en az on yıllık bir süre içinde belirli alanlarda genotip persistansının olası olduğunu yansıtmıştır. Türkiye insan Brucella izolatlarının Doğu Akdeniz filogenetik grubuna dahil olduğu ve komşu ülkelerin izolatları ile ilgili olduğu gösterilmiştir (3).

Sunulan tez çalışmasında da Kılıç ve arkadaşlarının çalışmasına benzer biçimde yaygın olarak saptanan *Brucella melitensis* biovar 3 izolatları arasında çapraz bulaş oranı oldukça yüksek bulunmuş olup Diyarbakır'da çocuklardan izole edilen *Brucella* suşlarının çoğunun Doğu Akdeniz filogenetik grubuna dahil olduğu ve komşu ülkelerin izolatları ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Suşlarının tamamının MLVA 11'e göre 122 genotipinde, MLVA-8'e göre ise genotip 43 olduğu gözlemlendi. Kılıç ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde Bruce 4, Bruce 16, Bruce 30 lokuslarının ayırdediciliği yüksek bulundu. Standart suşun 10 farklı lokusta varyasyon göstermesi yöntemin ayırım gücünün yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda 78 suşta kümeleşme oranı %66.7 olarak tespit edildi. Yüksek kümeleşme oranında, çalışmamızın lokal bir hastanede çocuk hastalardan izole edilen suşlar üzerinde yapılmış olmasının etkisi olabilir.

Çocuklarda *Brucella* enfeksiyonlarının tedavisinde trimetoprim-sülfametoksazol, rifampisin, gentamisin ve sekiz yaşından büyük çocuklar için doksisisiklin kombine tedavileri uygulanmakta, tedavi amprik olarak yapılmaktadır (23). Tedavide başarısızlıklar ve rölapların gözlenmesi nedeniyle *Brucella*'nın yaygın görüldüğü bölgelerde uygun tedavi politikalarının belirlenmesi için *Brucella* izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternlerinin bilinmesi ve alternatif tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önemlidir (21,23,24). Ülkemizde izole edilen *Brucella* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili sınırlı sayıda çalışmalardan 2013 yılında Van yöresinde yapılan bir çalışmada 75 kökenden, 73'ü *B. melitensis* biovar 3, iki köken *B. abortus* biovar 3 olarak tanımlanmıştır. Doksisisiklin en etkili antibiyotik olarak bildirilmiştir. Bunu sırasıyla tigesiklin, trimetoprim-sülfametoksazol ve siprofloksasin takip etmiştir. Çalışma sonucunda tigesiklinin tedavide bir alternatif olabileceği, azitromisin ise tedavi için uygun bir antibiyotik olmadığı belirtilmiştir (25). Bayram ve arkadaşlarının 2011 yılındaki çalışmasında ise yine Van yöresinden 56 *Brucella* izolatı çalışmaya dahil edilmiş ve bütün kökenler *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) 90 değerleri doksisisiklin, streptomisin, rifampin, trimetoprim-sülfametoksazol ve tigesiklin için sırasıyla 0.064 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 0.125 mg/L ve 0.094 mg/L olarak tespit edilmiştir (6). Sunulan bu projede sadece iki izolat seftriaksona dirençli bulunurken, suşların tamamı doksisisiklin, streptomisin ve trimetoprim-sülfametoksazole duyarlıydı. Tigesiklin ve Rifampisin için MİK aralıkları 0,016-0,23 ve 0,38-1,5 µg/ml

olarak saptandı. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarından elde ettiğimiz veriler, halihazırda kullanılan antibiyotik tedavilerinin geçerli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bruselloz yöre için halen önemli bir halk sağlığı problemi olup çocuk hastalar arasında çapraz bulaş yaygındır. Diyarbakır'da çocuklardan izole edilen *Brucella* suşlarının hepsi *B.melitensis biovar 3* olup Doğu Akdeniz filogenetik grubuna dahildir. Suşlarının tamamının MLVA 11'e göre genotip 122, MLVA 8'e göre ise genotip 43 olduğu gözlemlendi. Çalışmamız bölgede hayvan hareketliliğinin kontrol altına alınmasının, et ve süt ürünlerinin denetimlerinin sıklaştırılmasının, çocukların beslenmesinde pastörize / kaynatılmış süt tüketilmesine yönelik eğitim faaliyetlerinin gerekliliğini ortaya koymuştur.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

- *Brucella melitensis* Diyarbakır'da yaşayan çocuklarda önemli bir halk sağlığı problemidir.
- Çalışılan suşlar arasındaki kümeleşme oranı %66.7 olup suşlar arasındaki çapraz bulaş oranı yüksektir.
- Suşlarının tamamının MLVA-11'e göre genotip 122, MLVA-8'e göre ise genotip 43 olduğu gözlenmiştir.
- Bruselloz tedavisi için kullanımda olan antibiyotikler halen etkilidir.
- Diyarbakır'da çocuklardan izole edilen *Brucella* suşlarının çoğunun Doğu Akdeniz filogenetik grubuna dahil olduğu gösterilmiştir. Ülkemize çeşitli ülkelerden giriş yapan hayvanların *Brucella* açısından denetlenmesi ve kontrolü gereklidir.

7. KAYNAKLAR

1. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı Verileri. “<https://www.thsk.gov.tr>. Son erişim tarihi: 25.04.2017.
2. Dal T, Celen MK, Ayaz C, Dal MS, Kalkanli S, Mert D, Yildirim N, Aktas E, Arserim N. Brucellosis a major problem: A Five years experince. *Acta Medica Mediterranea* 2013; 164 (1). 665-70.
3. Kılıç S, Ivanov N, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaslıoğlu E, Uyanık MH, Alıskan H, Yaşar E, Bayramoğlu G, Arslantürk A, Vergnaud G, Kandardjiev TV. MLVA GENOTYPING OF HUMAN BRUCELLA ISOLATES FROM TURKEY. *Journal of clinical microbiology* 2011;02:538.
4. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5(5):213.
5. Sari E, Sari I, Say A, Guven F, Ulutas A. The evaluation of Brucellosis in children in an endemic region of Turkey, Van. *Gaziantep Medical Journal* 2013;19(1):1-4.
6. Hacımustafaoğlu MK. Brusellozis. *Güncel Pediatri* 2004; 2:39-43.
7. Rubach MP, Halliday JE, Cleaveland S, Crump JA. Brucellosis in low-income and middle-income countries. *Current Opinion Infectious Diseases* 2013; 26(5): 404-12.
8. Sanaei Dashti A, Karimi A. Skeletal Involvement of *Brucella melitensis* in Children: A Systematic Review. *Iranian Journal of Medical Sciences* 2013; 38: 286–92.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Brucella*. *Tıbbi Mikrobiyoloji* (altıncı baskı), Ankara, 2011, Atlas Kitapçılık,824-828.
10. Campbell GA, Adams LG: The Long-Term Culture of Bovine Monocyte-Derived Macrophages and Their Use in the Study of Intracellular Proliferation of *Brucella abortus*. *Vet. Immunol. Immunopatol* 1992; 34: 291-305.
11. Karadağ-Öncel E, Özsürekci Y, Cengiz AB, Kara A, Ceyhan M, Çelik M, Özkaya-Parlakay A. Çocukluk çağında bruselloz: Hacettepe Üniversitesi deneyimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011; 54:135-41.
12. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time

- multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B.abortus* and *B.melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1290-3.
13. Dulger AC, Aslan M, Ceylan MR, Olmez S, Karadas S, Akdeniz H. The Syndrome of Inappropriate Secretion of AntiDiuretic Hormone in Patients With Brucellosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.21780/abstract>. 29 Mayıs 2014.
 14. Hasim o, Dalgic N. A Clinical and Laboratory Evaluation of 32 Cases of Brucellosis. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi/Journal of Pediatric Infection* 2013; 1:61-7.
 15. Abuhandan M, Güzel B, Çakmak A, Çiçek A. Çocuklarda Bruselloz: 82 Olgunun Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Journal of Pediatric Infection* 2012; 6:74-8.
 16. Eskazan, AE, Dal MS, Kaya S, Dal T, Ayyildiz, Soysal T. Two cases of autoimmune hemolytic anemia secondary to brucellosis: a review of hemolytic disorders in patients with brucellosis. *Internal Medicine* 2014; 53(11), 1153-1158.
 17. TC Sağlık Bakanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Rehberi. Brusellozun mikrobiyolojik tanısı, Ankara, 2015 Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 3-26.
 18. Al Dahouk S, Flèche PL, Nöckler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 69(1):137-45.
 19. Menshawy AM, Perez-Sancho M, Garcia-Seco T, Hosein HI, García N, Martinez I, Sayour AE, Goyache J, Azzam RA, Dominguez L, Alvarez J. Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *Biomed Res Int* 2014; 353876.
 20. Zhang F, Li Z, La X, Ma X, Zhang Y, Ji P, Jiang M, Hu J, Zhang Z, Lu X, Ding J. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Brucella* isolates from patients in Xinjiang China. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(9):15726-23.
 21. Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, Kairzhanova A, Tarlykov P, Filipenko M, Dymova M, Abisheva G, Jailbekova A, Kamalova D, Chsherbakov A, Tulegenov S, Akhmetova A, Sytnik I, Karibaev T, Mukanov K. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16. *Infection, genetics and evolution* 2015; 34(8):173-80.

22. Garofolo G, Di Giannatale E, De Massis F, Zilli K, Ancora M, Cammà C, Calistri P, Foster JT. Investigating genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Italy with MLVA-16. *Infection, genetics and evolution* 2013;19:59-70.
23. Alavi SM, Alavi L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Caspian Journal of Internal Medicine* 2013;4(2):636–41.
24. Maquart M, Le Flèche P, Foster G, Tryland M, Ramisse F, Djønne B, Al Dahouk S, Jacques I, Neubauer H, Walravens K, Godfroid J, Cloeckert A, Vergnaud G. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BioMed Central Microbiology* 2009;145.
25. Parlak M, Güdücüoğlu H, Bayram Y, Çıkman A, Aypak C, Kılıç S, Berктаş M. Identification and Determination of Antibiotic Susceptibilities of *Brucella* Strains Isolated from Patients in Van, Turkey by Conventional and Molecular Methods. *International Journal of Medical Sciences* 2013; 22(10):406–11.
26. Bayram Y, Korkoca H, Aypak C, Parlak M, Cıkman A, Kilic S, Berктаş M. Antimicrobial Susceptibilities of *Brucella* Isolates from Various Clinical Specimens. *International Journal of Medical Sciences* 2011;3(8):198-202.

8.EKLER

8.1 ETİK KURUL BELGELER



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : 26379996 / 148

03./9/2014

KONU : 03.09.2014 Tarih ve 143 Sayılı Kurul Kararı

Sayın: Yrd. Doç. Dr. Tuba DAL
Yıldırım Beyazıt Üniveristesi Tıp Fakültesi
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği

Sorumlu Araştırmacılığını yapmış olduğunuz “**Diyarbakır İlinde Çocuklarda Gözlenen Brusellozun Çapraz Bulaş Dinamiği Ve İzolatların Filogenetik Soyağacının Araştırılması**” isimli çalışmanız Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **03/09/2014** tarih ve **143** sayılı kararı ile başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesi etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Yrd. Doç.Dr. Halil KARA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Karar No: 143	Karar Tarihi: 03.09.2014
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Diyarbakır İlinde Çocuklarda Gözlenen Brusellozun Çapraz Bulaş Dinamiği Ve İzolatların Filogenetik Soyağacının Araştırılması
SORUMLU ARAŞTIRMACI / KOORDİNATÖR ÜNVANI/ADI/SOYADI/UZMANLIK ALANI	Yrd. Doç. Dr. Tuba DAL / Tıbbi Mikrobiyoloji

ETİK KURUL ÜYELERİ

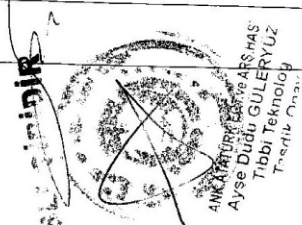
Unvanı/Adı/Soyadı Ek Üyeliği	Etik kurul Görevi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)		Katılım (**)		İmza
				E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd .Doç.Dr.Halil KARA	Başkan	Farmakoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr.Mehmet KILIÇ	Başkan Yardımcısı	Genel Cerrahi	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr.Osman ERSOY	Bildirimlerden sorumlu olan üye	Gastroenteroloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr.Rahmet GÜNER	Üye	Enfeksiyon Hastalıkları	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yıllık izin
Doç. Dr.Cemile BİÇER	Üye	Tıbbi Biyokimya	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yıllık izin
Doç. Dr.Fatih EKİCİ	Üye	Fizyoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yıllık izin
Doç. Dr.Hakan TUNÇ	Üye	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	Ankara Fizik Tedavi ve Reh. EAH	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr Mesut AKYOL	Üye	Biyoistatistik	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr.Gülay GÜLEÇ CEYLAN	Üye	Tıbbi Genetik	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç Dr.Nagihan UĞURLU	Üye	Göz Hastalıkları	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr.Asiye Çiğdem ŞİMŞEK	Üye	Halk Sağlığı Bilim Doktoru	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Arş. Gör. Halil Alperen IŞIK	Üye	Hukukçu	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Sağlık Mensubu Olmayan Rafet DERDİYOK	Üye	Öğretmen	Emekli	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

(*) Araştırma ile İlişki Durumu
(**) Toplantıya Katılım Durumu



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULUNUN ADI	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
AÇIK ADRES	Eskişehir Yolu 7.Km Bilkent /ANKARA			
TELEFON	0 312 291 25 25 / 36 45			
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Diyarbakır İlinde Çocuklarda Gözlenen Brusellozun Çapraz Bulaş Dinamiği Ve İzolatların Filogenetik Soyağacının Araştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI /KOORDİNATÖR ÜNVANI/ADI/SOYADI/UZMANLIK ALANI	Yrd. Doç. Dr. Tuba DAL / Tıbbi Mikrobiyoloji		
	DİĞER ARAŞTIRMACILARIN ÜNVANI/AD SOYAD	Prof.Dr.Rıza DURMAZ, Prof.Dr.Cibali AÇIKGÖZ, Dr.Alper KARAGÖZ, Uzm.Dr.Fatma BACALAN , Prof.Dr.Ali CEYLAN		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI/ KOORDİNATÖR/BULUNDUĞU MERKEZ	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi Türkiye Halk Sağlığı Kurumu		
	DESTEKLEYİCİ ve DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	TUBİTAK		
	ARAŞTIRMANIN TASARIMI	Nicel <input type="checkbox"/> Nitel <input type="checkbox"/> Bileşik <input type="checkbox"/> Retrospektif <input checked="" type="checkbox"/> Kesitsel <input type="checkbox"/> Prospektif <input type="checkbox"/> Diğer (.....)		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Akademik Amaçlı <input checked="" type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez <input type="checkbox"/>	Çok Disiplinli <input type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 143	Karar Tarihi: 03.09.2014		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvurusu dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu			
ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI:	Yrd. Doç.Dr. Halil KARA			



8.2. ORJİNALLİK RAPORU

Bruselloz.pdf x

100%

10%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	www.guncelpediatric.com Internet	178 words — 8%
2	library.cu.edu.tr Internet	31 words — 1%
3	ÇIKMAN, Aytakin, AYDIN, Merve, GÜLHAN, Barış, PARLAK, Mehmet, GÜLTEPE, Bilge, KALAYCI, Yıldız, BİLMEN BAYINDIR, Fulya, SOLMAZ, Sinem and ÖZEKİNCİ, Tuncer. "Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus İzolatlarının Antibiyotik Direnci ve Azalmış Vankomisin Duyarlılığının Araştırılması: Çok Merkezli Bir Çalışma", Mikrobiyoloji Derneği, 2015. Publications	14 words — 1%
4	journal.frontiersin.org Internet	9 words — < 1%
5	acikerisim.deu.edu.tr Internet	8 words — < 1%