

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE *BRUCELLA* CİNSİ
BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI**

F. Esin AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

MERSİN - 2007

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE *BRUCELLA* CİNSİ
BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI**

F. Esin AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

MERSİN - 2007

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE *BRUCELLA* CİNSİ
BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI**

F. Esin AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

Tez No :

MERSİN - 2007

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş
olan '*Süt ve Süt Ürünlerinde Brucella Cinsi Bakterilerin Araştırılması*' adlı çalışma ,
aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 18/06/2007

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Doç .Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi/ Danışman

Bu tez , Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı
kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteğini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ 'a, tez çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU 'na, çok değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Gönül ASLAN 'a, Sayın Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK ' e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ 'a ve Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN ' e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince laboratuvar ortamında yardım ve desteğini esirgemeyen başta Araştırma Görevlisi Seda TEZCAN olmak üzere arkadaşlarım doktora öğrencisi Şahin DİREKEL 'e, yüksek lisans öğrencisi Mahmut ÜLGER'e, tez çalışmam için gerekli örnekleri sahada toplamamda yardımlarını esirgemeyen Uzman N. Didem ÖCAL'a, yüksek lisans öğrencisi Serpil POLAT 'a ve Mersin Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tez örneklerimden izole ettiğim *Brucella* izolatlarını tiplendiren ve standart *Brucella* suşlarını temin eden Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brucella* Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı Şefi Sayın Dr. Sevil ERDENLİĞ ve personeline çalışmalarına katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her anında desteklerini, ilgilerini ve sevgilerini en derinden hissettiğim sevgili babam, annem ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Brusellozun Tarihçesi.....	3
2.2. <i>Brucella</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	5
2.3. <i>Brucella</i> Türlerinin Ayırt Edici Özellikleri	7
2.3.1 <i>Brucella abortus</i>	7
2.3.2. <i>Brucella melitensis</i>	8
2.3.3. <i>Brucella suis</i>	9
2.3.4 . <i>Brucella neotomae</i>	9
2.3.5. <i>Brucella ovis</i>	10
2.3.6. <i>Brucella canis</i>	10
2.4. Taksonomi	11
2.5. Rezervuarları	12
2.6. <i>Brucella</i> Türlerinin Antijenik Yapısı	13
2.7. <i>Brucella</i> Türlerinin Virulans Özellikleri	14
2.8. Dirençlilik	16

2.9. Bulaş yolları	17
2.10. Klinik Özellikleri	18
2.11. Komplikasyonlar	20
2.11.1. Osteoartiküler Enfeksiyonlar	20
2.11.2. Merkezi Sinir Sistemi enfeksiyonları	21
2.11.3. Solunum Sistemi Enfeksiyonları	21
2.11.4. Gastrointestinal Sistem ve Hepatobilier Sistem Enfeksiyonları	21
2.11.5. Ürogenital Sistem Enfeksiyonları	21
2.11.6. Kardiyovasküler Sistem Enfeksiyonları	22
2.11.7. Hematolojik Sistem Enfeksiyonları	22
2.11.8. Cilt Enfeksiyonları	22
2.11.9. Oküler Enfeksiyonlar	22
2.12. Epidemiyoloji	22
2.13. Korunma ve Kontrol	31
2.14. Brusellozun Laboratuvar Tanısı	31
2.14.1. Bakteriyolojik Tanı	31
2.14.2. Hayvan Deneyi	35
2.14.3. Serolojik Tanı	36
2.14.4. Moleküler Tanı	39
2.14.4. Bruselloz Tanısında PZR yöntemi	39
2.14.4.1. <i>Brucella</i> 'nın PZR ile cins-spesifik identifikasyonu	40
2.14.4.2. <i>Brucella</i> türlerinin ve biyovaryolarının PZR ile ayrımı	41
2.14.4.3. Örneklerden Direkt Olarak <i>Brucella</i> İdentifikasyonu İçin Geliştirilen PZR yöntemleri	42
2.15. Tedavi	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması	45
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	47
3.2.1. Kullanılan Cihaz ve Aletler	47
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
3.2.2.1. Moleküler Tanı İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
3.2.2.1.1. DNA saflaştırılması(ekstraksiyonu) için kullanılan solusyonlar	50

3.2.2.1.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solusyonlar	51
3.2.2.2. Bakteriyolojik Tanı İçin Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar	52
3.3. Örneklerden <i>Brucella</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	60
3.3.1. Bakteriyolojik Yöntem	60
3.3.2. Moleküler Yöntem	65
3.3.2.1. Süt Örneklerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile <i>Brucella</i> DNA'sının saptanması	65
3.3.2.1.1. Süt Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu İşlemi	65
3.3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İşlemi	66
3.3.2.1.3. <i>Brucella</i> DNA'sının amplifikasyonu	67
3.3.2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi İşlemi	68
3.3.2.1.5. Agaroz Jelde <i>Brucella</i> DNA'sının varlığının tespiti	69
4. BULGULAR	70
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
7. KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’de Bruselloz olgularının bölgelere göre dağılımı- 2004	26
Şekil 2.2. Bruselloz morbidite hızının en yüksek olduğu il-2004	27
Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı steril kaplar	47
Şekil 3.2. Farrell Broth Besiyeri	53
Şekil 3.3. Farrell Agar Besiyeri	54
Şekil 3.4. %5-10’luk CO ₂ ’li ortam sağlayan desikatör içerisinde inkübe olmuş kültürler	60
Şekil 4.1. <i>Brucella</i> kolonilerinin Farrell Agar’ da görünümü	70
Şekil 4.2. İzole edilen <i>Brucella</i> bakterilerinin Gram boyalı preparatta mikroskopik morfolojisi (x100)	71
Şekil 4.3. İzole edilen <i>Brucella</i> bakterilerinin Christensen’s üre agar besiyerinde pozitif üreaz aktivitesi	71
Şekil 4.4. İzole edilen <i>Brucella</i> bakterilerinin <i>B. melitensis</i> suşunun pozitif oksidaz deneyi	72
Şekil 4.5. İzole edilen <i>Brucella</i> bakterilerinin <i>B. melitensis</i> suşunun pozitif katalaz deneyi	72
Şekil 4.6. Örneklerden PZR yöntemi ile saptanan <i>Brucella</i> DNA’sının %1,5’luk agaroz jelde görüntüsü	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Brucella</i> türlerinin ayırt edici özellikleri.....	7
Çizelge 2.2. <i>Brucella</i> Vaka ve Ölüm Sayıları, Morbidite ve Mortalite Hızları, Türkiye, 1970-2005	25
Çizelge 2.4. <i>Brucella</i> Morbidite ve Mortalite Hızları, Türkiye, 1975-2005	27
Çizelge 2.5. İl Bazında Sığır Bruselloz Prevalansı	29
Çizelge 2.6. İl Bazında Koyun Bruselloz Prevalansı	30
Çizelge 3.1. Çiğ inek sütü örneklerinin toplandığı köylerin isimleri ve aylara göre toplanan çiğ inek sütü örneği sayısı	45
Çizelge 3.2. Çiğ koyun sütü örneklerinin toplandığı köylerin isimleri ve aylara göre toplanan çiğ koyun sütü örneği sayısı	45
Çizelge 3.3. Çiğ keçi sütü örneklerinin toplandığı köylerin isimleri ve aylara göre toplanan çiğ keçi sütü örneği sayısı	46
Çizelge 3.4. Aroma çeşidine göre dondurma örneği sayıları	46
Çizelge 3.5. Yapıldığı süt cinsine göre peynir örneği sayıları	46
Çizelge 3.6. Amplifikasyon reaksiyonu koşulları	67
Çizelge 4.1. Örneklerden izole edilen <i>Brucella</i> izolatlarının özellikleri	73
Çizelge 4.2. Süt örneklerinden <i>Brucella</i> izolasyon sonuçları	75
Çizelge 4.3. Taze peynir örneklerinde <i>Brucella</i> izolasyon sonuçları	76
Çizelge 4.4. Dondurma örneklerinde <i>Brucella</i> izolasyon sonuçları	76
Çizelge 4.5. İzole edildiği örneklere ve aylara göre <i>Brucella</i> suşları sayısı	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CDC	Centres for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi)
DIC	Disemine Intravasküler Koagülopati
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleofosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMB	Eosine Metylen Blue
FAO	Food and Agriculture Organisation for United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı)
Ig	İmmünglobülin
IL	İnterlökin
IS	İnserksiyon sekans
kDA	Kilodalton
LAP	Lenfadenopati
LPS	Lippolisakkarit
MRT	Milk Ring Test (Süt Halka Deneyi)
NAD	Nikotinamidadenindinükleotid
OIE	World Organisation for Animal Health (Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı)
OMP	Outer Membrane Protein (Dış Membran Proteini)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RTD	Rutin Test Dilüsyonu
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TMP-SMZ	Trimetoprim- Sülfometaksazol
WHO	World Health Organisation (Dünya Sağlık Teşkilatı)

ÖZET

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE *BRUCELLA* CİNSİ BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, Nisan 2006 - Mayıs 2007 tarihleri arasında toplam 664 adet örnek (240'ı çiğ inek sütü, 122'si çiğ koyun sütü, 95'i çiğ keçi sütü, 105'i dondurma, 102'si pastörize edilmemiş çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynir örneği) *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırıldı.

240 inek sütü örneğinden 1'inde (%0,42) , toplam 457 süt örneğinden ise 1'inde (% 0,22) hem kültür hem de PZR yöntemiyle *Brucella melitensis* biovar 1 izole edildi . Kültür işlemi ile *Brucella* açısından negatif olarak saptanan bütün süt örneklerinin PZR işlemiyle de *Brucella* açısından negatif olduğu saptandı. 105 dondurma örneğinden 1'inde (%0,95) kültür yöntemiyle *Brucella melitensis* biovar 3 izole edilirken PZR işlemiyle *Brucella* DNA' sı saptanamadı. Peynir örneklerinden kültür işlemi ile *Brucella* izole edilmedi.

Sonuç olarak, bu çalışma Mersin ilinde süt ve süt ürünlerinde *Brucella* cinsi bakterilerin bulunduğunu, süt ve süt ürünlerinin Bruselloz bakımından risk oluşturabileceğini göstermiştir.

Bu çalışma ile PZR yönteminin *Brucella* türlerinin tanısı ve tiplendirmesinde tek başına yeterli olmadığı, kültür ve klasik tiplendirme testleriyle beraber değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Hastalığın kontrol altına alınabilmesi için bakteriyolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin standardize edilmesi ve bu konuda daha çok araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: *Brucella*, bruselloz, süt ve süt ürünleri, Farrell agar, PZR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *BRUCELLA* BACTERIA IN MILK AND DAIRY PRODUCTS

In this study, between the period of April 2006 - May 2007, totally 664 specimens (240 raw cow's milk samples, 122 raw ewe's milk samples and 95 raw goat's milk samples collected from 10 villages which belongs to Mersin city, 105 ice-cream samples collected from 40 different pastry shops and 102 fresh white cheese samples made of raw milk collected from various street bazaars and small scale markets) were investigated for the presence of *Brucella* bacteria.

Of 240 cow's milk samples; 1 (0,42%) sample , a total of 457 raw milk samples; 1 (0,22%) sample was detected as positive for *Brucella melitensis* biovar 1 by both PCR assay and bacteriological examination. The milk samples detected as negative for *Brucella* bacteria by bacteriological examination were also detected as negative for *Brucella* DNA by PCR assay. A total of 105 ice-cream samples; 1 (%0,95) sample was detected as positive for *Brucella melitensis* biovar 3 by bacteriological examination but it was detected as negative for *Brucella* DNA by PCR assay . No *Brucella* bacteria was isolated from fresh white cheese samples by bacteriological examination.

In conclusion, this study demonstrated the presence of *Brucella* bacteria in milk and dairy products in Mersin district and that these products carry the risk for Brucellosis.

Additionally; this study indicated that isolation and identification of *Brucella* species by PCR assay is not enough when its used as a single method without applying classical culture and identification techniques. Many additional research and standardised molecular techniques and bacteriological diagnostic methods are needed for the control of the disease.

Key words : *Brucella*, brucellosis, milk and dairy products, Farrell agar, PCR

1.GİRİŞ

Bruselloz, insan ve hayvanlarda, *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, bulaşıcı ve genellikle subakut veya kronik seyirli bir zoonozdur. Sığır, koyun, keçi, domuz, koç gibi hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan bruselloz evcil hayvanlarda önemli kayıplara neden olur. İnsanlarda uzun süren bir hastalığa neden olan bruselloz fizik yetersizliği ve iş gücü kaybına neden olurken, tedavi ve hastane giderleri de önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır. Enfekte hayvanların süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile insanlara bulaştığı için halk sağlığı yönünden de önemlidir (1, 2, 3).

Bruselloz, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir. Dünyada birçok ülkede bruselloz ile mücadele kampanyaları başlatılmış ve birkaç ülke sığır brusellozunu büyük ölçüde eradike etmeyi başarmış olmasına karşın, koyun ve keçi brusellozu ise başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünyanın birçok yerinde halen yaygın bir şekilde devam etmektedir. Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ülkeleri, Avustralya ve Yeni Zellanda'da yıllar süren yoğun çabalarla bruselloz büyük ölçüde eradike edilmiştir. Buna karşın bazı Güney Avrupa ülkelerinde, özellikle Akdeniz Bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Hint Yarımadası, Afrika, Orta ve Güney Amerika'nın bir kısmında insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir. Akdeniz ülkelerinde ise bu enfeksiyon bir çok hastalık arasında ön sırada yer almaktadır. Türkiye'de ise hayvan bruselloz prevalansı sığır popülasyonunda %1.43, koyun popülasyonunda %1.97 olarak tespit edilmiştir (1, 3, 4, 5, 6, 7).

Gelişmekte olan ülkelerde kontrol programları ile hayvanlarda hastalık oranının azaltılamaması nedeniyle insanlarda bruselloz halen yaygın olarak görülmektedir. Sütlere pastörizasyon gibi işlemlerin uygulanmaması, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi gibi beslenme alışkanlıkları ve kötü hijyenik şartlar insanlarda enfeksiyon riskini artırmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise hastalık genelde hayvanlarda kontrol altına alındığı halde, dışarıya seyahat eden veya güvenli olmayan hayvan ürünlerini tüketen

bireyler ve mesleki olarak maruz kalan gruplarda (çiftçiler, veteriner hekimler, laboratuvar ve mezbaha çalışanlarında) görülmektedir (3).

Akdeniz ve Orta Doğu ülkelerinde insanlarda yıllık bruselloz insidansı her 100.000 kişide 1-78 vaka arasında değişmektedir. Ancak hastalığın yaygın olduğu ve hayvanlarda kontrol programları uygulanmayan bölgelerde 550'nin üzerinde vaka bildirilmiştir. Hayvanlarda kontrol tedbirlerinin zorunlu olduğu bazı Güney Avrupa ülkelerinin bir kısım topluluklarında 100.000 kişide 77 vaka bildirilmiştir. Dünya'da 100 ülkeden yılda 500.000'in üzerinde bruselloz vakası bildirilmektedir (3).

İnsan brusellozu birçok ülkede bildirim zorunlu bir hastalık olmasına rağmen, resmi rakamlar gerçek enfekte insan sayısını yansıtmamaktadır. Vakaların bildirilenden 10-25 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bunun başlıca nedeni vakaların çoğunlukla doğru teşhis edilememesidir (3).

İnsanlara hastalığın bulaşması, enfekte hayvanlarla direkt temas, sekresyonların derideki çatlak ve çiziklerle teması, aerosollerin inhalasyonu ve pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin (taze peynir, krema vs.) tüketimi ile olur (1, 8, 9, 10, 11).

Dünya'da ve ülkemizde bruselloz için temel bulaş kaynağı pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimidir. Yurdumuzda oldukça fazla miktarda üretilen süt ve süt ürünlerinin büyük çoğunluğu hijyenik olmayan şartlarda, ilkel yöntemlerle çiğ süttten üretilmekte ve hazırlanmaktadır. Akdeniz yöresinde bruselloz olgularının incelendiği araştırmalarda yöre halkının hastalığı ve bulaş yollarını bilmelerine karşın kaynatılmadan üretilen süt ve süt ürünlerini tükettikleri, kaynatma ve pastörizasyon gibi işlemlerden geçirilmiş sütlerden tereyağı ve peynirlerin gerek yapımının zor olması gerekse damak zevkine uygun olmaması nedeniyle bu alışkanlıklarını bırakmadan üretime ve tüketime devam ettikleri bildirilmiştir. Bu durumun önüne geçilmediği ve etkin önlemler alınmadığı sürece bruselloz ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak güncelliğini koruyacaktır (12) .

Bu nedenle bu çalışmada süt ve süt ürünlerinin bruselloza yol açma riskinin saptanması amacıyla Mersin merkeze bağlı köylerden toplanan sütlerde, Mersin merkezde kurulan semt pazarlarından ve şarküterilerden toplanan çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynir örneklerinde ve dondurma örneklerinde *Brucella* cinsi bakterilerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Brusellozun Tarihçesi:

Daha önceleri Malta Humması, Akdeniz Ateşi, Gibraltar ateşi, Rock humması, Kıbrıs Ateşi, Bang ateşi, Ondülan Ateş olarak bilinen Bruselloz dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen bir zoonozdur (8, 9, 10, 11) .

M.Ö.450 yılında *Epidemics* adlı eserinde Hippocrates, ilk kez tekrarlanan ateş sonucu 4 ay içerisinde öldürücü olan bir hastalıktan bahsetmiştir (13,14).

1751 yılında bir Akdeniz adası olan Minorca'da İngiliz Ordusu'nda hekim olarak görev yapan Cleghorn, Hippocrates'in tanımladığı hastalığa uyan ateşli bir hastalıktan bahsetmiştir (13).

Sir William Burnett (1779-1861), İngiliz ordusu donanmasında görev yapan denizci subaylarda görülen çeşitli ateşleri birbirinden ayıran ilk hekimidir (13, 14).

Bu hastalığın klinik özelliklerini kendi hastalığından yola çıkarak ilk defa 1861 yılında Mısır'da İngiliz Kraliyet kuvvetlerinde çalışan Jeffery Allen Marston (1831-1911) bildirmiştir. Bu hastalık o zaman "Akdeniz Ateşi" olarak bilinmekteydi. Marston, Malta ateşi hakkında detaylı bilgileri belgeleyen ilk kişidir (13,14).

İngiliz ordusunda hekim olarak görev yapan ve bir mikrobiyolog olan Sir David Bruce (1855-1931), 1887 yılında Malta Adası'nda Malta ateşine neden olan mikroorganizmayı *Micrococcus melitensis* olarak isimlendirmiştir. Bu mikroorganizmayı Malta ateşinden ölmüş bir askerin dalağından izole etmiştir. Mikroorganizmanın yaz aylarında daha çok enfeksiyon yaptığını ve rezervuarının keçiler olduğunu tespit etmiştir. Keçilerin süt, idrar ve kanlarından da mikroorganizmayı izole etmiştir (8, 9, 10, 11, 13, 14).

1897'de M.L. Hughes, 844 hastada yaptığı çalışmalar sonucunda "Ondülan Ateş" hakkında bir monografi hazırlamıştır (13,14).

1897'de Wright, Bruce tarafından tarif edilen mikroorganizmanın hasta serumlarını aglütine ettiğini göstermiştir (13).

Danimarka'lı bir veteriner hekim olan Bernhard Bang (1848-1932); 1897'de ilk kez sığırlarda, atlarda, koyunlarda ve keçilerde düşüğe neden olan mikroorganizmayı *Bacterium abortus* olarak isimlendirmiştir. Mikroorganizmayı doğum yapan sığırların

uterus duvarından izole etmiştir. Hastalığa “Bang Ateşi” adı verilmiştir (8, 9, 10, 11, 13, 14).

1906 yılında Zammit, enfekte keçilerden aynı mikroorganizmayı izole etmiş, bu nedenle devlet personeline keçi sütünden yapılmış süt ürünlerinin tüketilmesini yasaklamıştır (13) .

1914 yılında Traum; ABD’nin Indiana eyaletinde prematüre doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden *Brucella suis*’ i izole etmiştir (8,13).

1920 yılında Amerika’lı bakteriyolog olan Alice Evans; Bang’in ve Sir David Bruce’un isimlendirdiği türlerin aslında hemen hemen aynı özelliklere sahip olduğunu bulmuştur. Günümüzde artık bu mikroorganizmaların ait olduğu cins Bruce’a ithafen *Brucella* olarak isimlendirilmektedir (13,14).

1920 yılında Meyer ve Shaw; daha önce tanımlanan türleri *Brucella* cinsi altında toplamıştır (10).

Huddleson ve Abell; bu bakterilerin H₂S üretme aktivitelerini, tiyoin ve fuksin boya larına duyarlılıklarını araştırmışlardır (10).

Buddle(1953) ve Boyes(1956) tarafından Yeni Zelanda’da koçlardan *B. ovis*, 1968 yılında, Carmichael ve Bruner tarafından köpeklerden *Brucella canis* izole edilmiştir (8, 9, 10).

Brucella neotomae; 1957 yılında Stoenner ve Lacman tarafından Utah’da çöl farelerinde izole edilmiştir. Rusya ve Alaska’da ren geyiklerinden *Brucella rangiferi* izole edilmiştir (8,9).

Son yıllarda balina, fok, yunus ve su samuru gibi deniz memelilerinden izole edilen etkenler önceleri *Brucella maris* olarak isimlendirilmiş ancak, son yapılan araştırmalarda bu hayvanlardan izole edilen *Brucella* izolatlarının, omp2a ve omp2b genlerindeki DNA polimorfizmine göre kara memelilerinden izole edilen *Brucella* türlerinden ayrıldıkları ortaya konulmuş ve deniz memelilerinde en azından iki yeni tür olarak *Brucella pinnipediae* ve *Brucella cetaceae*’ nin bulunduğu ileri sürülmektedir (11) .

Ülkemizde ise; ilk defa 1915 yılında Hüsamettin Kural ve Mahmut Sabit Akalın, Kuleli Hastanesi’nde yatan bir askerde *Brucella melitensis*’ den kaynaklanan bir enfeksiyonu saptamışlardır. 1931 yılında sığırlarda rastlanan bruselloz ilk kez Zühtü Berke tarafından izole edilmiştir. Koyun ve keçilerden 1943’de Golem, 1944’de de

Köylüoğlu ve Aktan *Brucella* cinsi bakterileri izole etmişlerdir . İnsanlarda *Brucella canis*'in neden olduğu enfeksiyon ise ülkemizde ilk kez 1984 yılında Diker, İstanbulluoğlu ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (8,15) .

2.2. *Brucella* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri:

Brucella türleri Gram negatif kokobasil görünümünde, 0,5- 0.7 µm eninde, 0,6- 1.5µm boyunda çok kısa zincirler veya küçük kümeler oluşturabilen mikroorganizmalardır. Kapsül ya da spor oluşturmazlar. Flajellaları yoktur, hareketsizdirler. Aerob mikroorganizmalar olup terminal elektron yakalayıcı olarak oksijen ve ya nitratı kullanan ve sitokroma dayalı elektron transport sistemi bulunmaktadır. Kemoorganotropik olan bu bakteriler, üreme ortamlarında aminositler, thiamine, nicotinamide ve magnezyum iyonları gibi zenginleştiricilere gereksinim duyarlar. Bazı suşlar için nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzları içeren besiyerlerinin kullanımı üremeyi indükleyebilir. Besiyerine serum, gliserin, glukoz veya kan eklemesi üremeyi arttırır fakat hemin (X faktör) veya NAD [Nikotin-amid adenin dinükleotid (V faktör)] gibi destekleyicilere gerek duymazlar. *Brucella* bakterileri kanlı agar ve çikolata agarda zayıf ürerken Mac Conkey agar, Eosine Methylene Blue (EMB) agar veya diğer enterik besiyerlerinde üremezler (8, 9, 10, 11, 13, 16).

Bütün *Brucella* türleri aerobiktir ve üremeleri için oksijene gereksinim duyarlar. *B. abortus* ilk izolasyonlarında mikroaerofilik olup üremek için %10'luk CO₂' li ortama gereksinim duyarlar. Optimum üreme ısıları 37°C' dir. 20°C- 40°C arasındaki sıcaklıklarda da üreme olabilir. pH: 6.8-7'de ürerler. İnkübasyondan 2-3 gün sonra sonra kolonileri görülebilir ancak 4-5 gün sonra 2-3 mm büyüklüğe ulaşır. Kolonileri hemolizsizdir. Şeffaf besiyerlerinde çok açık bal sarısı, şeffaf, konveks, düzgün kenarlı, S tipi, parlak, küçük, su damlası gibi koloniler oluştururlar. Pigment oluşturmazlar. *B. melitensis* ve bazı *B. abortus* suşları zamanla esmer-kahverengi bir renk alırlar. S tipi olmayan koloniler de oluşturabilirler. *B. canis* ve *B. ovis* R tipi koloniler yaparlar. İnsanlar da dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda intraselüler olarak yerleşen patojenlerdir (8, 9, 10, 11, 13, 16).

Karbonhidratlardan asit oluştururlar. Genelde metabolizmaları oksidatifdir. Oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. Nitratları nitrite indirgerler. Sütte hafif alkali

reaksiyon yaparlar. Jelatini eritmez ve indol oluşturmazlar. Nitritten gaz oluşturlar. Voges-Proskauer testi negatiftir (8, 9, 10, 11, 13, 16).

Organik kükürtlü bileşikler parçalamada sonucunda *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* H₂S oluşturur. *B. suis* en uzun süre (3-5gün) ve en fazla miktarda, *B. abortus* orta süre (2 gün) ve miktarda, *B. melitensis* ise en az süre (1 gün) ve miktarda kükürtlü hidrojen yapar (9).

Brucella türleri üremeleri için CO₂ gereksinimleri, üreaz ve H₂S üretimi, bazik fuksin ve tiyonin ve tiyonin mavisi boylarına duyarlılıkları türlere göre değişir. Boya duyarlılıkları biyovarlara ayırımında kullanılır. Besiyerlerine belli konsantrasyonlarda konulan thionin, bazik fuksin, kristal viyole ve pironin gibi maddeler karşısında *B. melitensis* inhibisyona uğramadan ürer. *B. abortus* yalnız thionin tarafından inhibe olur. *B. suis* ise thionin dışındaki bazik fuksin, kristal viyole, pironin tarafından inhibe edildiği halde thioninden etkilenmeyerek üremesini sürdürür. Ayrıca inozitol, mannoz, ramnoz ve trehaloz gibi karbonhidratları fermente etme bakımından da türler arasında ayrılıklar görülmektedir (9).

B. abortus ve *B. suis* biyokimyasal ve serolojik farklılıklarına göre biyovarlara ayrılırken *B. melitensis* serolojik özelliklerine göre biyovarlara ayrılır. *B. melitensis* bazik fuksin, tiyonin ve tiyonin mavisi boylarına dirençlidir. *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. abortus* yoğun inokülümelerde üreaz pozitifken *B. suis* 5 dakika içerisinde üreaz üretirler. Ayrıca cins spesifik monoklonal antikor kullanılarak uygulanan koagülünasyon yöntemleri ile *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*'e ait A ve M antijenleri saptanabilir (8, 9, 10, 11, 16).

Ayrıca bu etkenlerin tiplendirilmesinde bakteriyofajlara duyarlılıkları da önemli bir kriterdir. Tiplendirmede Weybridge (Wb), Tbilisi (Tb), Berkeley (Bk₂), Firenze (Fi) fajlarından yararlanılır (16).

Günümüzde *Brucella* türleri ticari kit sistemleri ile tanımlanmamaktadır. *Brucella* türlerini; Nonenterik API 20NE sistemi *Moraxella phenylpyruvica*, MicroScan Negative COMBO Tip 5 sistemi (Dade-MicroScan, West Sacramento, CA) *Moraxella* olarak, Haemophilus-Neisseria İdentifikasyon (HNID) paneli (Dade-MicroScan) ise *Haemophilus influenzae* biyotip IV olarak tiplendirmiştir. Bir vakada Nonenterik API 20NE sistemi ile *B. melitensis* tanımlanması yapan bir teknisyenin bruselloz olduğu bildirilmiştir (11).

Tür	Biovar	CO2	H2S	Üreaz	Boyalarda Üreme					Aglütinasyon			Tb fajı erime		Konak
					Thionin			Fuksin		Anti A	Anti M	Anti R	RTD	10.000xRTD	
					a	b	c	b	c						
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	D	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	Koyun
	2	-	-	D	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Keçi
	3	-	-	D	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	İnsan
<i>B. abortus</i>	1	+,-	+	1-2 h	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	Sığır İnsan
	2	+	+	1-2 h	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
	3	+,-	+	1-2 h	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
	4	+,-	+	1-2 h	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	
	5	-	-	1-2 h	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
	6	-	-+	1-2 h	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
	7	-	-+	1-2 h	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
	8	+	-	1-2 h	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
	9	-,+	+	1-2 h	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
<i>B. suis</i>	1	-	++	0-30 dk	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	Domuz
	2	-	-	0-30 dk	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	Domuz
	3	-	-	0-30 dk	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Douz, İnsan
	4	-	-	0-30 dk	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Ren geyikleri
	5	-	-	0-30 dk	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	Kemiriciler
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	0-30 dk	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Neotoma lepida
<i>B. ovis</i>	1	+	-	0	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	Koç
<i>B. canis</i>	1	-	-	0-30 dk	+	+	+	-	±	-	-	+	-	-	Köpek, insan

a: 1/20.000 b :1/50.000 c:1/100.000 A: Mono spesifik abortus serumu, M: Mono spesifik melitensis serumu R: anti R *Brucella* serumu, Tb :Tbilisi , RTD : Rutin test dilüsyonu –Boya deneyleri, Trypticase Soy Agar veya Tryptose Agar’da yapılmıştır.

Çizelge 2.1. *Brucella* türlerinin ayırt edici özellikleri (9)

2.3.Brucella Türlerinin Ayırt Edici Özellikleri:

Brucella cinsinde enfekte ettikleri konak hayvanlara göre 6 tür yer almaktadır; *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis* and *B. neotomae* . Bunlardan sadece *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. canis* insanlarda enfeksiyon yapar (8, 9, 10, 11, 16).

2.3.1. *Brucella abortus* [(Schmidt & Weis, 1901) Meyer & Shaw 1920]

B. abortus öncelikle sığırları enfekte etmekle beraber bufalolar, develer, geyikler, köpekler, atlar, koyunlar ve insanları da enfekte eder. Katalaz ve oksidaz pozitiflerdir. İlk izolasyonlarında %10 CO₂'e gereksinim duyarlar. H₂S üretirler. Genelde üreyi hidrolize ederler fakat bazı suşlar üreyi hidrolize etmeyebilir. Bazı fuksin, metil viyole, pyronin, safranin O varlığında ürerler. Thionin varlığında üremezler. Nitratları nitrite indirgerler. S tipi koloniler A, M veya hem A hem M yüzey antijenleri içerebilir. Spesifik antiserumları aglütine etme özellikleri biyovarlara göre

değişir. L-alanine, D-alanine, L-asparagine, L-glutamic acid, D-galactose, D-glucose, D-ribose, ve *meso*-erythritol'ü okside ederler. D-xylose, L-arginine, DL-citrulline, DL-ornithine ve L-lysine'ini okside etmezler. S tipi kolonileri Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Firenze (Fz), M51-S708, Berkeley (Bk), MC/75 ve D grubu *Brucella* fajları ile lize olurlar. S tipi olmayan koloniler ise *Brucella* R fajı ile lize olur. Yedi biyovarı vardır. Biyovarlar için referans suşlar şunlardır (16) ;

<u>Biyovar</u>	<u>Referans sus</u>
Biyovar 1	<i>Brucella abortus</i> 544
Biyovar 2	<i>Brucella abortus</i> 86/8/59
Biyovar 3	<i>Brucella abortus</i> Tulya
Biyovar 4	<i>Brucella abortus</i> 292
Biyovar 5	<i>Brucella abortus</i> B3196
Biyovar 6	<i>Brucella abortus</i> 870
Biyovar 9	<i>Brucella abortus</i> C68

2.3.2. *Brucella melitensis* [(Hughes 1893) Meyer & Shaw 1920]

B.melitensis çoğunlukla koyun ve keçilerde hastalık oluşturur fakat sığırları da enfekte edebilir. İnsanlar için en tehlikeli *Brucella* türüdür. Katalaz ve oksidaz pozitifler. Üremeleri için CO₂' e gereksinim duymazlar. H₂S üretmezler. Çoğunlukla üreyi hidrolize ederler fakat bazı suşları üreyi hidrolize etmeyebilir. Bazik fuksin, tiyonin, metil viyole, pironin, ve tiyonin mavisi boya ları varlığında ürerler. Nitratları nitrite indirgerler. S tipi kolonileri monospesifik antiserumlarla M, A veya her iki yüzey antijenleri ile aglütinasyon reaksiyonu verirler. D-glucose, *meso*-erythritol, L-alanine, D-alanine, L-asparagine ve L-glutamic asidii okside ederler. L-arabinose ve L-lysine'i okside etmezler. S tipi kolonileri Bk fajına duyarlıdır fakat Wb, Tb, Wb, Fz, M51-S708, MC/75, D ve R grubu fajlarla lize olmazlar. S tipi olmayan koloniler bütün fajlara dirençlidir. Üç biyovarı vardır. Biyovarlar için referans suşlar şunlardır (16);

<u>Biyovar</u>	<u>Referans sus</u>
Biyovar 1	<i>Brucella melitensis</i> 16M
Biyovar 2	<i>Brucella melitensis</i> 63/9
Biyovar 3	<i>Brucella melitensis</i> Ether

2.3.3. *Brucella suis* (Huddleson 1929):

B. suis diğer *Brucella* türlerine kıyasla konak yelpazesi daha geniş bir türdür. 5 biyovarı vardır. *B. suis* biyovar 2 ve 3 en çok domuzları enfekte ederken, *B. abortus* biyovar 4 ren geyiklerini ve vahşi karibuları, *B. suis* biyovar 5 ise kemiricileri enfekte eder. Biyovar 2 hariç bütün biyovarlar insanları enfekte eder. Katalaz ve oksidaz pozitifler. Üremeleri için CO₂' e gereksinim duymazlar. Biyovar 1 çok miktarda H₂S üretirken diğer biyovarlar üretmezler. Üreyi çok hızlı hidrolize ederler. Tiyonin varlığında ürerler fakat bazik fuksin, metil viyole, pyronin, safranin O ve malaşit yeşili varlığında üremezler. S tipi kolonilerde biyovar 4 hariç A tipi yüzey antijeni fazladır. Biyovar 4'de eşit miktarda A ve M tipi yüzey antijeni bulunur. D-ribose, D-glucose, meso-erythritol, D-xylose, L-arginine, DL-citrulline, DL-ornithine ve L-lysine'i okside ederler. L-asparagine, L-glutamic acid, L-arabinose ve D-galactose oksidasyonu biyovarlar arasında farklılık gösterir. L-alanine ve D-alanine'ni okside etmezler. S tipi kolonileri Wb, M51-S708, Bk, MC/75 ve D grubu *Brucella* fajları ile lize olur. Fz grubu ve Tb grubu fajlarla belirli bir düzeyde lize olurlar. S tipi olmayan koloniler fajlarla lize olmazlar. Beş biyovarı vardır. Biyovarlar için referans suşlar şunlardır (16);

Biyovar

Biyovar 1
Biyovar 2
Biyovar 3
Biyovar 4
Biyovar 5

Referans suş

Brucella suis 1330
Brucella suis Thomsen
Brucella suis 686
Brucella suis 40
Brucella suis 513

2.3.4. *Brucella neotomae* (Stoenner & Lackman 1957):

B. neotomae çöl farelerini enfekte eder. Diğer türler ile ilgili vakalara rastlanmamıştır. Katalaz pozitifler. Oksidaz negatifler. Üremeleri için CO₂'e gereksinim duymazlar. H₂S üretirler ve üreyi çabuk hidrolize ederler. Bazik fuksin, tiyonin mavisi ve safranin O varlığında üremezler. Tiyonin varlığında ürerler. Nitratları nitrite indirgerler. S tipi kolonilerinde A tipi yüzey antijeni baskındır. L-asparagine, L-glutamic acid, L-arabinose, D-galactose, D-glucose, meso-erythritol ve and D-xylose' u okside ederler. L-alanine, D-alanine, L-arginine, DL-citrulline, DL-ornithine ve L-lysine'i okside etmezler. D-ribose oksidasyonu değişkendir. Peptonlu besiyerlerinde D-

glucose, D-galactose, L-arabinose ve D-xylose' u fermente ederler. S tipi kolonileri Wb, M51-S708, Fz, Bk, MC/75 ve D grubu brucella fajları tarafından lize edilirler. Tb fajı kısmı lizis yapar. R tipi ve M tipi koloniler fajlarla lize olmazlar. Biyovarları yoktur. Referans suş *Brucella neotomae* 5K33' dür (16).

2.3.5. *Brucella ovis* (Buddle 1956):

B. ovis koçlarda epididimit enfeksiyonlarından sorumludur. Dişi koyunlarda düşüklere neden olduğu bildirilmiştir. Keçiler deneysel olarak *B. ovis* ile enfekte edilebilmiştir. Diğer hayvan türlerini ve insanları enfekte etmezler. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftirler. Üremeleri için CO₂' e gereksinim duyarlar. H₂S üretmezler. Üreyi hidrolize etmezler. Metil viyole ile inhibe olurlar. Bazik fuksin ve tiyonin varlığında ürerler. Nitratı nitrate indirgeyemezler. S tipi koloni oluşturmazlar. İlk izolasyonda R tipi koloniler yaparlar. Rough (R)–spesifik yüzey antijenleri diğer S tipi olmayan brucella antijenleri ile çapraz reaksiyon verir. L-alanine, D-alanine, L-asparagine, D-asparagine, L-glutamic acid, DL-serine ve adonitolü okside ederler. L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-ribose, meso-erythritol, D-xylose, L-arginine, DL-citrulline, DL-ornithine ve L-lysine i okside etmezler. Tb, Wb, M51-S708, Fz, Bk, MC/75, D or R grubu Brucella fajları ile lize olmazlar. R/O fajı ile lize olurlar. Biyovarları yoktur. Referans suş *B. ovis* 63/290' dır(16).

2.3.6. *Brucella canis* (Carmichael & Bruner 1968):

B. canis erkek köpeklerde epididimoorşit, dişi köpeklerde ise düşüklere neden olur. İnsanlarda enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir fakat diğer hayvan türlerinde enfeksiyon henüz bildirilmemiştir. Katalaz ve oksidaz pozitifler. Üremeleri için CO₂' e gereksinim duyarlar. H₂S üretmezler. Üreyi çok çabuk hidrolize ederler. Nitratları nitrate indirgerler. Üremeleri bazik fuksin ile inhibe olur. Tiyonin ile inhibe olmaz. S tipi koloniler oluşturmazlar. İlk izolasyonlarında R veya M tipi koloniler oluştururlar. Rough (R) – spesifik yüzey antijenleri diğer S tipi olmayan Brucella antijenleri ile çapraz reaksiyon verir. D-ribose, D-glucose, L-arginine, DL-citrulline, DL-ornithine, L-lysine i okside ederler. Mezo-erythritol oksidasyonu değişkendir. L-alanine, D-alanine, L-asparagine, L-glutamic acid, L-arabinose, D-galactose u okside etmezler.

Tb, M51-S708, Wb, Fz, Bk, MC/75, D, R, ve R/O grubu brucella fajları ile lize olmazlar. Biyovaları yoktur. Referans suş *B. canis* RM6/66'dır (16).

2.4. Taksonomi :

Yıllar boyunca *Brucella* türlerinin taksonomisi tam olarak belirlenememiştir. 1985 yılında Verger ve ark. DNA-DNA hibridizasyon tekniğini kullanarak 51 *Brucella* suşunu tiplendirmişler ve bütün izolatların birbirleriyle % 96 ± 4 homolojiye sahip olduklarını saptamışlardır. Bu araştırmacılar bütün *Brucellae* ailesinin tek bir türünün olduğunu (*B. melitensis*) bildirmişlerdir. Daha önce adlandırılan türleri ise *B. melitensis*' in biyovaları şeklinde isimlendirmişlerdir (*B. melitensis* biovar *melitensis*, *B. melitensis* biovar *abortus* gibi). *Brucella* suşlarıyla yapılan Multilokus Enzim Elektroforetik Analiz çalışmaları da monospesifik cins kavramını desteklemiştir. *Brucella* türlerinin biyokimyasal ve serolojik özelliklerinin, virulanslarının ve rezervuarlarının farklı olması nedeniyle bu tanımlama tam olarak kabul görmemiştir. Ayrıca her türe özgü OMP gen bölgeleri bulunmaktadır. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle yapılan moleküler çalışmalar sonucunda türler *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B.suis* olarak birbirinden ayrılmıştır. Fakat bu yöntem türler arası biyovaları birbirinden ayıramamıştır. Geleneksel yöntemlerden biri olan tiyonin ve fuksin boyalarına dirençten sorumlu, 36 kDa OMP proteinini kodlayan omp2 porin geni *Brucella* türlerinin ayırımında kullanılan gen bölgesidir (11, 16).

Diğer bakterilerden farklı olarak *B. suis* biovar 3 dışında bütün *Brucella* türlerinin, genomlarında iki kromozom bulunmaktadır. *B. melitensis* 16 M suşunun bütün genom analizi yapılmış kromozomlardan birinde 1.177.787 baz çifti diğerinde ise 2,117,144 baz çifti olmak üzere , toplam 3.294.935 baz çifti olduğu bulunmuştur. Her bir kromozom bakterinin replikasyonu ve hayatsal faaliyetleriyle ilgili fonksiyonlara sahiptir (11,16).

Brucella türlerinde plazmidler, transformasyon ve konjugasyon görülmez. DNA-RNA hibridizasyon ve 16S rRNA dizi analizi çalışmaları *Brucella* türlerinin *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bartonella*, *Ochrobactrum* ve *Phylobacterium* türleriyle filogenetik olarak ilişkili olduğunu göstermiştir (11,16).

Brucella türlerine en yakın tür *Ochrobactrum anthropi* hibridizasyon grup 2 (yeni adı *Ochrobactrum intermedium*)' dur. *Brucella* türlerine spesifik primerlerle

yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'na dayalı yöntemlerde yanlış pozitifliklere yol açarlar. *Brucella* türleri günümüzde *Proteobacteria* aleminde, *Rhodospirilli* sınıfında, *Rhizobiales* takımında, *Brucellaceae* ailesinde yer almaktadır (11).

2005 yılında ‘‘International Committee on Systematics of Prokaryotes-Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*’ altkomitesi 6 *Brucella* türü tanımlamıştır ve bu tür isimleri kesin olarak geçerlilik kazanmıştır. Bu komiteye göre *Brucella* (Meyer&Shaw 1920) cinsine ait türler şu şekilde yayınlanmıştır (17);

- *Brucella melitensis* (Hughes 1893, Meyer&Shaw 1920),
- *Brucella abortus* (Schmidt 1901) Meyer&Shaw 1920),
- *Brucella suis* (Huddleson 1929),
- *Brucella ovis* (Buddle 1956),
- *Brucella neotomae* (Stoenner and Lackman 1957),
- *Brucella canis* (Carmichael and Bruner 1968)

Ayrıca, 2001 yılında Cloeckart ve arkadaşları tarafından isimlendirilmiş '*Brucella cetaceae*' and '*Brucella pinnipediae*' türleri de komite tarafından alınan kararla ilerleyen zamanlarda resmi olarak *Brucella* cinsine ait tür listesine ekeleneyeceği bildirilmiştir (17).

2.5. Rezervuarları:

Zoonotik bir enfeksiyon olan brusellozun rezervuarı evcil hayvanlardır. *Brucella* cinsine ait her bir tür patojendir. *Brucella* bakterilerinin memeli hayvanların yanında böceklerde ve kenelerde de enfeksiyon yaparlar. Ayrıca sürüngenler ve amfibiler deneysel olarak *Brucella* bakterileri ile enfekte edilebilmiştir (10,11).

B. abortus, ineklerde görülebildiği gibi atlarda, bizonlarda, bufalolarda ve Tibet sığırlarında görülmüştür. *B. abortus* sığırlarda patojeniktir fakat koyunları, keçileri, köpekleri, bizonları, bufaloları atları ve insanları da enfekte eder. *B. abortus*' un 7 biyovarı vardır (10,11,16)

B. melitensis, koyunları ve keçileri enfekte edebildiği gibi develeri, sığırları ve alpakaları da enfekte etmektedir. *B. melitensis* 3 biyovara ayrılır (10,11,16).

B. suis genelde domuzlarda enfeksiyon oluşturur. *B. suis* 'in 5 biyovarı vardır. *B. suis* biyovar 1, 2, 3 domuzlar için patojendir. *B. suis* biovar 4, Arktik bölgelerde ren geyiği ve karibularda, Biyovar 5 ise kemirgenlerde enfeksiyon yapar. Brezilya ve

Kolombiya’ da *B. suis* biovar 1’in sığırlarda da enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (10,11,16).

B. canis, insanlarda enfeksiyon yapabildiği gibi köpeklerde de yavru atmaya neden olabilmektedir. Bakteri ayrıca tilkilerden ve kurtlardan da izole edilmiştir. *B. canis* tek bir biyovara sahiptir İnsanlarda nadiren enfeksiyon oluşturur ve enfeksiyonların çoğu laboratuvar kaynaklıdır (10,11,16).

B. melitensis, *B. abortus* ve *B. suis* insanlar için patojendir ve *B. melitensis* en virulan suştur. Koyunlardan izole edilen *B. ovis*, kemirgenlerden izole edilen *B. neotomae* ve deniz memelilerinden izole edilen *B. cetaceae* ve *B. pinnipediae* türleri insanlar için patojenik değildir (10,11).

1997 yılında İskoçya’da çeşitli deniz memelilerinden ve bir yunustan bir *Brucella* türü izole edilmiştir. Daha sonra foklardan ve susamurlarından da aynı suş izole edilmiştir. *B. maris* olarak adlandırılan bu türün 2 biyovarı vardır. Düşük yapmış şişe burunlu yunusların fetuslarından izole edilen tür *B. delphini* olarak adlandırılmıştır (11).

Moleküler yöntemlerle yapılan tiplendirme çalışmaları sonucunda balinalardan, foklardan ve yunuslardan izole edilen *Brucella* türünün diğer *Brucella* türlerinden dış membran proteinleri (OMPs) ve LPS yapıları açısından farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. *Brucella* cinsine özgü IS711 gen bölgesi deniz memelilerinden izole edilen *Brucella* türlerinde de ortaktır fakat kromozomdaki lokalizasyonu diğer türlerden farklıdır. Omp genlerinden sekanslama yapılmış ve deniz memelilerinden izole edilen suşların genomik açıdan birbirinden çok farklı olduğu görülmüştür. Dış membran proteinini kodlayan omp2 gen bölgesinde görülen polimorfizmlere dayanılarak deniz memelilerizi izolatları “*B. pinnipediae* ve *B. cetaceae*” olarak 2 yeni tür altında toplanmıştır. Yapılan çalışmalarda sığırlar deniz memelilerinden izole edilen türlerle enfekte edilmiş, bu türlerin de sığırlarda enfeksiyon oluşturduğu bulunmuştur. Bu konu ile ilgili filogenetik çalışmalar halen devam etmektedir (11).

2.6. *Brucella* Türlerinin Antijenik Yapısı :

B. melitensis, *B. abortus* ve *B. suis*’ in lipopolisakkaritlerinin A (Abortus) ve M (Melitensis) olarak adlandırılan 2 farklı antijenik determinantı vardır. Bu determinantlar biyovarların ayırımında kullanıldığı gibi aynı zamanda *Brucella* bakterilerinin

virulansından da sorumludurlar. Organizmada lipopolisakkarit (LPS) determinatlara karşı monoklonal antikorlar oluşturulur. Lam aglütinasyon ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemleriyle A ve M epitoplara spesifik monoklonal veya poliklonal antikorlar saptanarak serovarlar arası farklılık ve A/M antijenik determinatlarının oranı belirlenmektedir. *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'de A antijeni, M antijeni veya hem A hem de M antijeni bulunabilmektedir. Fakat *B. canis* ve *B. ovis*'de A ve M antijenik determinantları bulunmaz. Somatik A ve M antijenleri *Brucella* bakterilerinde ayrı oranlarda bulunurlar. *B. melitensis*'te daha çok M ve daha az miktarda A antijeni bulunur (A/M = 1/20). *B. abortus* ve *B. suis*'de daha az oranda M ve daha çok oranda A antijeni bulunur. (A/M= 20/1). Bu nedenle aglütinin absorpsiyon testleri kullanılarak *B. melitensis*'i diğerlerinden serolojik olarak ayırmak mümkün olduğu halde *B. abortus* ile *B. suis*'i birbirinden ayırmak olanaksızdır (8, 9, 10, 11).

Brucella cinsi bakterilerin ayrıca *Salmonella*'ların Vi antijenine benzeyen L antijenleri de gösterilmiştir. Daha çok *B. abortus* tiplerinde bulunan L antijeni yeni izole edilen bakterilerde bulunur ve *B. abortus* bakterilerinin immun serumlarla aglütinasyonuna engel olmaktadır (8,9).

Brucella cinsi bakteriler antijenik reaksiyonlarda *Afipia clevelandensis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 *Escherichia hermanni* , *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi bakterilerle çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır (8, 10, 16).

2.7. *Brucella* Türlerinin Virulans Özellikleri

Antijenik varyasyon dışında *Brucella* türleri ekzotoksin gibi çeşitli virulans faktörleri üretmezler. Bilinen ekzotoksinleri yoktur. Hücre duvarının bir komponentinin toksik olduğu tespit edilmiştir. Bu toksinin enterik bakterilerin endotoksini ile benzer olduğu ve hastalık patogenezinin yardımcı olduğu düşünülmektedir. Endotoksin niteliğindeki bu maddenin virulan ve avirulan suşlarda aynı yapı ve miktarlarda olduğu fakat virulan suşların avirulan olanlara göre hücre içinde daha çabuk üredikleri belirtilmektedir (8, 9,11).

Brucella türlerinin seri pasajları sonucunda antijenik varyasyonlar oluşur. S tipi koloniler zamanla R tipi kolonilere dönüşebilirler. R tipi koloniler virulansını ve

spesifik antikorlara karşı reaktivitesini kaybetmiş kolonilerdir. Daha çok *B. melitensis*' de S-R varyasyonu ile birlikte geriye dönücü olmayacak şekilde bir virulans azalması görülür. Hücre duvarındaki lipopolisakkaritlerin (LPS) glikolizasyonundan sorumlu gen ekspresyonunda meydana gelen baskılanma antijenik varyasyonlara neden olmaktadır. S tipi koloniler polimorfonükleer lökositlere (PMNL) ve lizozomal degranulasyona dirençlidir (8, 9, 10, 11) .

Endotoksine karşı duyarlı olmanın, hastalandırıcılıkta rolü olduğu sanılmaktadır. Ayrıca bir çok hayvanın fetüs zarlarında *Brucella*'lar için bir gelişme faktörü olan erythritol(eritrol) yapısında bir madde izole edilmiş olup gebe hayvanların *Brucella*'lara karşı duyarlı olmaları bu şekilde açıklanmaktadır. İnsan plasentasında eritrol bulunmaz. Bu nedenle insanlarda genellikle *Brucella* enfeksiyonlarına bağlı abortuslara rastlanmaz (8,9).

Brucella türleri fakültatif intraselüler mikroorganizmalardır. Mikroorganizma konak immun sisteminden kaçarak hücre içinde yaşamını sürdürür. Bakteri insanlara enfekte doku, kan veya mukozalara direkt temasla deri yoluyla, kontamine et, süt ve süt ürünleri ile sindirim yoluyla ve damlacık enfeksiyonu şeklinde inhalasyonla bulaşmaktadır. Bakteri konağa giriş yaptıktan sonra fagosite edilir, adenin-guanin monofosfat kaynaklı baskılama ve intraselüler miyeloperoksidaz-peroksit ile ilişkili savunma mekanizmaları, toksik serbest oksijen radikallerini bloke eden süperoksit dismutaz üretimi sayesinde hücre içinde canlı kalmayı başarır. Bakteriler lenf ve kan yoluyla yayılarak retiküloendotelial sistemi (karaciğer sinüzoidleri, dalak, kemikiliği) tutarlar. Bu bölgelerde bakterileri taşıyan PMNL'ler dejenere olurlar ve bakterileri ortama bırakırlar. Makrofajlar ve monositlerce endosite edilen bakteriler bu hücreler içerisinde çoğalırlar. Bruselloza özgü ondulan (dalgalı) ateş fagositik hücrelerden bakteri ve bakteri komponentlerinin salınımı ile ilişkilidir. Bakterinin periferik sirkülasyona katılmasıyla bir çok organ tutulabilir. Relapslar ve hastalığın tekrar ortaya çıkması mikroorganizmanın virulansı ve konağın immün yanıtı arasındaki dengeye bağlıdır. Diğer intraselüler mikroorganizmalarda olduğu gibi humoral bağışıklık devreye girer fakat hücre içindeki bakterinin yok edilmesinde hücrel immün yanıt mekanizmaları rol oynar. Tümör nekroz faktör α (TNF- α), TNF- γ , interlekin -1(IL-1), IL-2 gibi aktive makrofajlarca üretilen sitokinler hücrel immün yanıtta rol oynarlar. Caron ve ark. *Brucella* bakterilerinin aktive insan makrofajlarında TNF- α

ekspresyonunu inhibe eden faktörler sentezlediklerini bildirmişlerdir. Bu aktivite sayesinde *Brucella* bakterileri konak immün sisteminden etkilenmeden hücre içinde canlı kalabilmektedirler. Ayrıca ilginç bir şekilde intraselüler ribozomal proteinlerin aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabildiği görülmüştür. Bu proteinlerin potansiyel etkileri aşı çalışmaları kapsamında ayrıntılı olarak incelenmektedir (11).

2.8. Dirençlilik :

Brucella türleri 60 °C' de ısıtmakla 10 dakikada, %1'lik fenol eriğiğinde ise 15 dakikada ölürlür. Pastörizasyon esnasında çabuk ölmelerinin epidemiyolojik değeri vardır. Süt içinde 17 gün yaşadığı, tereyağında 142 gün canlı kaldığı, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, çeşme suyunda 8 °C'de 57 gün, 25 °C'de ise 10 gün canlılığını koruduğu, insan idrarında en az 7 gün, hayvan dışıkısında açıkta 100 gün, ahırların duvar ve döşemesinde 4 ay canlı kaldığı bildirilmiştir. Normal mide asidi mikroorganizmayı öldürmeye yeterlidir. Hayvanların barındığı ahır tozlarında 6 hafta, suda 10 hafta canlılığını sürdürebilir. Toprakta 10 haftadan, gübrede 2 yıldan, 4-8°C'de saklanan keçi peynirinde ise 6 aydan daha uzun süre yaşadığı gösterilmiştir. Düşük yapmış hayvan fetüsünde 75 gün, enfekte çiğ süttten yapılmış dondurmada 30 gün, çiğ süttten yapılmış tuzsuz krema yağında buzdolabında 142 gün, % 10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün yaşayabilir. Tereyağında 4 ayda, oda ısısındaki peynirde 2 ayda ölmektedir. Tulum ve kaşar peyniri uzun süre bekletildiği için, yoğurt ise asiditesi fazla olduğundan hastalığı bulaştırmazlar. Güneş ışığında 1-12 saatte, 60°C'de 10 dakikada, 100°C'de hemen ölürlür. Çeşme suyunda 4-8°C'de birkaç ay, 0°C'de 2.5 yıl, dondurulmuş dokularda birkaç yıl, nemli toprakta 60 gün ve 20°C'de % 40 nemli ortamda 144 gün canlı kalabilirler. İdrarda 30 gün, atık fötuslarda en az 75 gün ve uterus akıntılarında 200 günden fazla canlı kalabilir. Çiğ süttten yapılan tuzsuz krema yağında buzdolabında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, %17 tuz içerede ise 1 ay canlı kalır. Etlerin normal dinlendirilmesi süresince oluşan pH değişikliği (asitlik) ette bulunabilecek *Brucella* mikroorganizmalarını öldürmeye yeterlidir (3, 8, 9,18).

Brucella bakterileri; streptomisin, tetrasiklin, rifampisin, 3.kuşak sefalosporinler ve TMP-SMZ'e duyarlı, penisilinlere dirençlidir (8, 9,18).

2.9. Bulaş Yolları

Bruselloz; sindirim yolu ile, bütünlüğü bozulmuş deri veya mukoz membranlardan direk temas ile ve inhalasyon yolu ile bulaşır. Mikroorganizma ile çalışan laboratuvar personeli, enfekte süt ürünleri, etler ve hayvan atıkları ile temasta olan kişiler, enfekte gıdaları tüketen kişiler risk grubunu oluşturur (10,11).

Hayvanlar arasında bulaş sindirim yoluyla, deri yoluyla ve mukoz membranlar yoluyla gerçekleşir. Mikroorganizma lenf nodlarına yerleşir ve bakteriyemi başlar. Bazı hayvanlarda (sığırlarda *B. abortus*) bakteri uterus ve meme bezlerine yerleşir ve çoğalır. Bakteri gebe hayvanların koryonik membranlarında üremesi durumunda yavru atma olayı gerçekleşir. Bakteri zamanla süt, vajinal akıntı ve idrara da geçer (11) .

İnsandan insana bulaş görülmemiştir. Fakat hayvandan insana ve hayvandan hayvana bulaş görülmektedir. İnsandan insana bulaş ancak enfekte donörlerden kan transfüzyonu veya kemik iliği transplantasyonu yapılması sonucunda görülür. Neonatal enfeksiyon transplasental yolla veya enfekte anneden bebeğe geçebilir. Türkiye’den bildirilen bir vaka raporunda brusellozlu bir annenin 3 aylık bebeğine anne sütü ile enfeksiyon bulaştırdığı bildirilmiştir. Ayrıca insandan insana cinsel yolla ile bulaşın da nadiren olabileceği bildirilmekte olup, bu konu halen tartışmalıdır (10, 11, 19).

Günümüzde gelişmiş ülkelerde Bruselloz en çok pastörize olmamış süt ürünlerinin tüketilmesiyle veya brusellozun endemik olduğu bölgelere seyahat sonucu bulaşmaktadır. Enfekte hayvanların steril vücut sıvıları veya organları ile temas halinde olan meslek gruplarında görülmektedir. Yoğurt, sütün kaynatılması ile yapıldığından ve mayalama işlemi sırasında asidik ortam olduğundan bulaş için kaynak oluşturmaz. Yine kaynamış sütle hazırlanan kaşar ve tulum peyniri ile de hastalık oluşmaz. Enfekte hayvanın etinin, özellikle dalak, karaciğer gibi organlarının yeterince pişirilmeden yenmesi ile de enfeksiyon alınabilir. Canlı brusella aşılı ile kaza inokülasyonları veteriner hekimlerde bulaşa neden olabilir. Ayrıca, brusella bakterisi ile enfekte kan ve sıvıların veya canlı brusella aşısının kazayla konjunktivaya sıçraması sonucu konjunktiva yoluyla da bulaşabilir. Laboratuvar çalışanlarında bakterilerin kültür işlemleri sırasında inhalasyonu veya deri bütünlüğünün bozulduğu yerlerden direkt temas ile bulaş olabilir. Nadir olarak kan transfüzyonu, kemik iliği transplantasyonu ile ve plasentadan geçiş olabilir (8, 9, 10, 11, 18, 20) .

İnhalasyonla bulaş nedeniyle Brucella bakterileri potansiyel biyoterörizm ajanı olarak ilan edilmişlerdir. 1940'lı yıllarda Amerika Birleşik Devletleri ve bazı ülkelerde *B. suis* bakterileriyle biyolojik silah üretimi yapılmıştır (11).

2.10. Klinik Özellikleri:

Brucella enfeksiyonu çok sayıda semptoma sahip olması nedeniyle tanı konulması güç olan bir hastalıktır. Enfeksiyon sistemik ve sistemik olmayan bir çok hastalığı taklit eder. İnkübasyon periyodu 2-3 hafta sürer. Semptomlar ilk haftada görülmeye başlar. Ateş, gece terlemeleri, üşüme, titreme, baş ağrısı, miyalji, artralji ve çeşitli nonspesifik semptomlar görülebilir. Bakteriyeimli hastalarda hem ateş hem de artrit birlikte seyredebilir. Ayrıca lenfadenopati, splenomegali, hepatomegali de görülür. Ülseratif mukokutanöz lezyonları ve subkutanöz abseleri olan kişilerde eritema nodosum benzeri lezyonlar, makülopapüler veya papülonodüler kızarıklık ve derin ven trombozu gibi kutanöz ve vasküler komplikasyonlar gelişebilir. Haftalarca, aylarca veya yıllarca süren periyodik ateşler nedeniyle kullanılan “Ondülan(Dalgalı) ateş” kavramı *B. melitensis* enfeksiyonu başta olmak üzere bruselloz ile eşdeğer olarak kullanılan bir isimdir. Ateş periyodik olarak 2-3 hafta boyunca geceleri yükselir, gün içinde normale düşer. Daha sonra hasta kendini iyi hisseder fakat tekrarlayan ateş kendini gösterir ve zamanla hastalık kronikleşir. Eklemlerde, kemiklerde, dalakta, karaciğerde süpüratif lezyonlar oluşur. Akut veya kronik bruselloz esnasında iskelet sistemi, sinir sistemi, solunum sistemi, hepatobiliyer ve gastrointestinal kanal, kardiovasküler sistem ve ürogenital sistem gibi çeşitli sistemlerde komplikasyonlar gelişebilir. Kemoterapi alan immün sistemi baskılanmış kimselerde, nötropenik hastalarda brusellozun antimikrobiyal tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılması önerilmektedir (11).

Brusellozlu hastaların çoğunda dalakta, kemik iliğinde ve lenf nodlarında granulozlar oluştuğu gözlemlenmiştir ve tüm hastalarda lökopeni, pansitopeni, mikroanjyopatik hemolitik anemi, trombositopeni görülmüştür (11).

Hastalığın birbirinden farklı 4 klinik tablosu bilinmektedir(12,18):

- Asemptomatik Enfeksiyon (Ambulan Tip)
- Akut Enfeksiyon
- Subakut Enfeksiyon(Ondülan tip)

- Kronik Enfeksiyon

Asemptomatik enfeksiyon; ancak yapılan serolojik taramalarla ortaya çıkarılabilen ve belli başlı bir hastalık tablosu ve yakınmaya yol açmayan durumdur. Bu enfeksiyon türü daha çok hayvanlarla sık temasta bulunan yüksek risk gruplarında belirlenir. Kişi bakteriyi taşır ve ancak immünesi baskılandığında belirgin enfeksiyon tablosu gelişir (12,18).

Akut enfeksiyon; hastalığın tipik ve klasik formudur. Genellikle öğleden sonraları kendini gösteren huzursuzluk hissi, kırgınlık, güçsüzlük, iştahsızlık, baş ağrısı, artralji, miyalji gibi genel enfeksiyon belirtileri ile sinsi olarak başlar. Akşam saatlerinde üşüme ve titreme ile ateş yükselmeye başlar, her gün birkaç diziyem artarak 8 -10 günde 39-40 °C'ye ulaşır. Birkaç saat süren ateş, sabaha doğru bol terleme ile normale iner. Eğer tanı konmamış ve tedaviye başlanmamışsa ateş tekrar hergün kademe kademe olmak üzere düşer ve 2. haftanın sonunda normale iner. Hastada geçici bir iyilik hali başlamakla birlikte, 8 -10 gün sonra aynı ateşli dönem tekrar başlar (ondülan ateş). Pratikte ondülan ateşe sık rastlanmamaktadır. Brusellozda ateş genellikle remittan veya intermittan olarak seyredir. Hastalık böylece arka arkaya ateşli-ateşsiz dönemler halinde aylarca sürebilir, hasta kilo kaybeder. Hastalarda bu ateş periyodlarının bulunması dışında, ikinci en sık yakınmalar, gezici eklem ve kas ağrılarıdır. Bazı olgularda diz, dirsek, ayak bileği ve el parmakları gibi eklemlerde geçici şişlikler görülebilir. Olguların % 60'ında tek eklem tutulumu söz konusudur. Hastalığa eşlik eden en sık tutulum, sakroiliak eklemdir. Eklem tutulumu olanlarda, uygun tedavi yapılmasına rağmen relaps ve reenfeksiyonlar sıklıkla problem yaratmaktadır. Orşit, bazı olgularda tek başlangıç bulgusu olabildiği gibi, sıklıkla bir refakat bulgusu da olabilmektedir. Bazı nadir olgularda ise hasta tipik bir menenjit tablosuyla hekime gelebilir. Bruselloz tüm sistemleri içine alan klinik belirtilere sahiptir. Hastalar pek çok yakınma ile başvurur, ancak sıklıkla ateş dışında objektif bulgu yoktur. Hastaların fizik muayenesinde solukluk, halsizlik ve ateş yüksekliği dışında; 1/2 olguda splenomegali, 2/3 olguda hepatomegali saptanır. Önceleri yumuşak ve hafif ağrılıyken, tedavisiz olgularda zamanla sert kıvam alırlar. Olguların 1/5'inde servikal ve inguinal bölge başta olmak üzere Lenf Adenopati (LAP) saptanabilir (12,18).

Subakut enfeksiyon; hekimler için önemli tanısal yanılgılara yol açan, hafif ateş, halsizlik ve iştahsızlık gibi yakınmalarla kolaylıkla grip olduğu sanılan bir klinik tablodur. Birkaç tekrar sonrasında asemptomatik hale geçebildiği gibi, akut hastalığa da dönüşebilir (12,18).

Kronik enfeksiyon; en az 1 yıldır semptomların sürdüğü olgularda söz konusudur. Bu olguların büyük çoğunluğunu, hastalığın başlangıcında uygun protokollerle tedavi edilmiş veya kemik, eklem, karaciğer ve dalakta fokal süpüratif tutulumu olan hastalar oluşturmaktadır. Daha çok 40 yaş üstü popülasyonda görülmüştür. Olguların 1/5'inde hiçbir akut enfeksiyon anamnezi ve aktif enfeksiyon kanıtı olmaksızın, psikiyatrik veya romatolojik hastalıkları anımsatan, sıklıkla karışıklık ve hatalı tanıya yol açan belirti-bulgular saptanabilir. Hastalarda kronik yorgunluk, depresyon ve eklem ağrıları bazen tek yakınma olabilir. Olguların bir kısmında siklik episklerit ve üveit gibi göz patolojileri gelişebilmektedir. Bu tanının konulduğu hastaların çoğunluğu günümüzde Kronik Yorgunluk Sendromu ya da Kronik Lyme Hastalığı tanılarını alan hasta grubunu oluşturmaktadır (12,18)).

2.11. Komplikasyonlar:

2.11.1. Osteoartiküler Enfeksiyonlar: Kemik ve eklemleri tutan artrit, bursit, sakroileit, spondilit ve osteomyelit, artralji, artrit, spondilit, tenosinovit, Bruselloz enfeksiyonlarında en sık görülen komplikasyonlardır. Pediyatrik hastalarda akut brusellozda artrit ve sakroileit görülürken, kronik brusellozda ve brusellozdan başka hastalıklara sahip bireylerde daha çok spondiloit, vertebral osteomyelit, osteit ve paravertebral abseler görülür (11,12,18).

Başta *B. melitensis* enfeksiyonları olmak üzere brusellozda, olguların % 20-85'inde osteoartiküler tutulum belirlenmiştir. Ateşle beraber en önemli ikinci bulgu kas ve eklem ağrılarıdır. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ateş ve terleme azalırken, hareket sistemi bulguları ön plana çıkar. Hastalığın geç dönemlerinde, yakınmaların nonspesifik olması nedeniyle tanı koymak güçleşir. Hastaların bir kısmı nörotik oldukları düşünülerek psikiyatri kliniklerine dahi gönderilebilirler. Kas ağrıları bazen erken dönemde çıkar ve tek bulgu olabilir. Eklem bulguları hastalığın 3. ve 4. haftasında en siktir (11, 12,18).

2.11.2. Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonları: Bruselloz olgularının %5'i nörobrusellozdur. Hastaların bir kısmında kas ve eklem ağrılarının yanısıra baş ağrısı da bulunur. Meningoensefalit, menenjit, meningomiyelit, miyelit, parezi, parestezi, depresyon, kronik yorgunluk sendromu, psikoz ve nadiren de Guillain-Barré sendromu gelişimi başlıca nörolojik komplikasyonlardır. Meningoensefalite rağmen olguların sadece 1/3'ünde ense sertliği belirlenebilir. BOS tetkikinde lenfositik pleositoz, artmış protein ve normal veya hafif azalmış glukoz değerleri belirlenir. Nörobruselloz tanısında, BOS kültürü %75 negatiftir, fakat kan kültüründe izolasyon şansı daha yüksektir. BOS'da *Brucella* IgG, IgM ve IgA antikorlarının ELISA ile araştırılması oldukça değerlidir. Kronik bruselloz olgularında, hastanın yatkinliği da varsa psikoz gelişebilir (8, 9, 11, 12, 18).

2.11.3. Solunum Sistemi Enfeksiyonları: İnhalasyon yoluyla enfeksiyonun alındığı vakalarda; bronşit, bronkopnömoni, akciğerde soliter veya multipl nodül, akciğer apsesi, hiler lenfadenopati ve plevral effüzyon meydana gelebilir (8,9,11,12,18).

2.11.4. Gastrointestinal/ Hepatobilier Sistem Enfeksiyonları: Akut sistemik Brusellozlu hastaların %75'inde görülür. 2/3'ünde karaciğer tutulumu belirlenebilir. Bulantı, kusma, karın ağrısı, diyare veya konstipasyon gibi belirtiler görülebilir. Dalak ve karaciğer büyüklüğü genellikle birlikte bulunur. Uzun süren enfeksiyonlarda kolit, eneterokolit, spontan bakteriyel peritonit, pankreatit, kolesistit, hepatosplenik abseler, splenik infarktlar görülebilir. Özellikle *B. abortus* enfeksiyonlarında hücresel bağışık yanıt mekanizmalarının aktivasyonu sonucunda granümatöz hepatit gelişimine rastlanmaktadır. *B. melitensis*'de granümatöz hepatit görülmekle birlikte, granüloksuz diffüz hepatit de belirlenebilir; periportal mesafelerde mononükleer hücre infiltrasyonu ile safra akımının bozulması ve sarılık gelişimi sözkonusu olabilir. Karaciğer fonksiyon testleri yükselebilir (8, 9, 11, 12, 18).

2.11.5. Ürogenital Sistem Enfeksiyonları: Erkeklerde en sık rastlanan bulgu % 10 olguda gelişen ve çoklukla tek taraflı olan epididimo-orşittir. Uygun şekilde tedavi edildiğinde sekelsiz olarak iyileşir. Nadir olgularda da akut interstisyel nefrit veya piyelonefrit, prostatit, sistit ve renal apse görülebilir. Bruselloz hayvanlarda plasentanın

koryoallantoik membranlarını enfekte ederek yavru atılımına neden olurken insanlarda abortus görülmemektedir. Fakat mikroorganizmanın nadiren brusellozlu kadınların plasenta dokularında ve amniyotik sıvılarında izole edildiği bildirilmiştir.1998 yılında bir vakada insandan insana cinsel yolla bulaş olduğu bildirilmiştir (8, 9, 11, 12, 18).

2.11.6. Kardiyovasküler Sistem Enfeksiyonları: Brusellozda nadir (< %2) görülen, ancak en sık ölüm nedeni olan komplikasyon endokardittir. Çoklukla tanısı gecikmiş, 3 aydan eski olgularda görülür. Aort kapağı en sık etkilenir, mitral kapak tutulumu ikinci sıklıkta görülür. Ekokardiyografide vejetasyonlar ve emboli gelişimi gözlenmektedir. Ölüm nedeni, progresif konjestif kalp yetmezliğidir. Tek başına antibiyotik ile tedavinin başarı şansı zayıf olup, kapak replasmanı gerektirir. Ayrıca; aortit, miyokardit ve perikardit de görülebilen komplikasyonlardır (8, 9, 11, 12, 18) .

2.11.7. Hematolojik sistem: Bruselloz, primer olarak lenforetiküler yapıları, organları tutan bir hastalıktır. Hastalıkta dalak tutulumu gözlenebilir. Splenomegali, karaciğer ve dalak abseleri görülebilmektedir. *B. melitensis* olgularında diğer türlere göre daha fazla sıklıkta anemi, lökopeni, trombositopeni ve kemik iliğinin granümatöz tutulumu sonucunda pansitopeni görülebilmektedir. Hipoprotrombinemi ve DIC gelişimi de gösterilmiştir. Lokalize veya generalize lenfadenopati görülebilir (8, 9, 11, 12, 18).

2.11.8. Cilt Enfeksiyonları : Olguların % 5'inde nonspesifik cilt lezyonları; eritema nodozum, papül ve morbiliform, skarlatiniform, ekzematiform tarzda döküntüler görülebilir. Bazen düşük yapan hayvanların plasentasını çıkarmak için müdahale eden veteriner hekim, hayvan sağlık memurları veya hayvan bakıcılarının önkollarında bruselloza bağlı dermatit görülebilir (8, 9, 11, 12, 18).

2.11.9. Oküler Enfeksiyonlar: Çok nadir görülen belirtilerdir. Üveit, optik nörit, endoftalmit, lakrimal bezlerin enfeksiyonu görülebilir (12, 18).

2.12. Epidemiyoloji:

Bruselloz, *Brucella* bakterilerinin yol açtığı, ülkemizde ve tüm dünyada en sık görülen zoonotik hastalıklardan birisi olup, tüm olgularda doğrudan ya da dolaylı olarak hayvan teması söz konusudur. Ekonomik kayıplarının yanısıra insan sağlığını da

etkilemesi nedeniyle hem dünya ülkeleri hem de ülkemizde, salgın hayvan hastalıkları ile mücadelede ilk sıralarda yer almaktadır (3,12).

Bruselloz ülkemizde hem hayvanlarda hemde insanlarda ihbari mecburi bir hastalıktır. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün yayınladığı Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi'ne göre Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıklar dört gruba ayrılır. Bruselloz ‘‘Bildirimi Zorunlu Grup A Hastalıklar’’ arasında yer almaktadır (26)

Bruselloz Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir. Hastalık dünyanın her bölgesinde görülebilmekle birlikte Portekiz, İspanya, Güney Fransa, İtalya, Yunanistan, Türkiye ve Kuzey Afrika ülkelerinin yer aldığı Akdeniz havzası ile Arap Yarımadası, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney Amerika'da hiperendemiktir (3,12).

Tüm dünyada yıllık 500. 000 yeni bruselloz olgusu olduğu tahmin edilmektedir. İngiltere, Kuzey Avrupa ülkelerinin büyük çoğunluğu, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kanada'da bruselloz eradike edilmiştir Buna karşın bazı Güney Avrupa ülkelerinde, özellikle Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Hint Yarımadası, Afrika, Orta ve Güney Amerika'nın bir kısmında insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir (3, 12, 20).

Akdeniz ve Orta Doğu ülkelerinde insanlarda yıllık bruselloz insidansı her 100.000 kişide 1-78 vaka arasında değişir. Ancak hastalığın yaygın olduğu ve hayvanlarda kontrol programları uygulanmayan bölgelerde 550'nin üzerinde vaka bildirilmiştir. Hayvanlarda kontrol tedbirlerinin zorunlu olduğu bazı Güney Avrupa ülkelerinin bir kısım topluluklarında dahi 100.000 kişide 77 vaka bildirilmiştir. Dünya'da 100 ülkeden yılda 500.000'in üzerinde bruselloz vakası bildirilmektedir (3,24).

Türkiye'de hayvanlarda brusellozun prevalansını belirlemek amacıyla yapılan Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Araştırma Projesi ile 1998-1999 yıllarında 79 ilden tesadüfi örnekleme ile alınan toplam 34.958 adet sığır kan serumu ve 30.433 adet koyun

kan serumu incelenmiştir. Hastalığın prevalansı sığırlarda %1.43, koyunlarda ise % 1.97 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma bulguları daha önceki yıllarda olduğu gibi, hayvan hareketlerinin fazla olmadığı ve yavru atma vakalarının nadir olduğu Orta ve Doğu Karadeniz sahil şeridindeki iller dışında, ülke genelinde hastalığın yaygın olduğunu göstermektedir (3).

İnsan brusellozu birçok ülkede ihbarı mecburi bir hastalık olmasına rağmen, resmi rakamlar gerçek enfekte insan sayısını yansıtmamaktadır. Vakaların bildirilenden 10-25 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bunun başlıca nedeni vakaların çoğunlukla doğru teşhis edilememesidir (24).

Hastalığın ülkemizde eradikasyonunu sağlamak amacıyla, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı' nın 1984 yılında başlatılan ve 26 yıl sürmesi planlanan "Türkiye Bruselloz Mücadele Projesi" kapsamında her yıl aşılama programı uygulanmaktadır. Proje gereği 1998 yılında yaygın aşılama sona ermiş ancak saha taramaları ve yetiştirici ihbarları neticesi hastalıklı olduğu tespit edilen sürülerde mücadele amacı ile koruyucu aşılama gerçekleştirilmiş, ayrıca 3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu'nun ilgili hükümleri gereği karantina ve diğer mücadele tedbirleri uygulanmıştır (3) .

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1970 yılında 37 olarak bildirilen olgu sayısı, 2004 yılına gelindiğinde 18.408'e, 2005 yılında ise 14.644 ulaşmıştır (22,23) . Bu artışın hastalık prevalansındaki gerçek artıştan çok bildirim ve tanı koyma oranlarındaki artıştan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ülkemizde hastalık bildirimlerinin hala yeterli düzeyde olmadığı dikkate alınır, gerçek bruselloz prevalansının sanıldığından daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (12).

1997 yılında ülke çapında yapılan geniş kapsamlı bir sero-sürveyans çalışmasında; brusella seropozitifliği sığırlarda %1.43, koyunlarda %1.97 saptanırken bu oran sürülerde %11.4 ve %15 olarak rapor edilmiş, en yüksek seroprevalans Kars, Konya ve Yozgat yöresinde bulunmuştur (20).

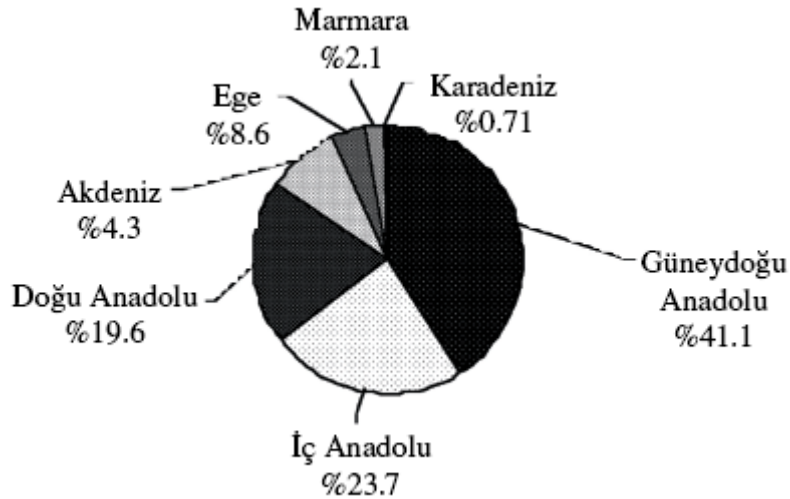
Brusella Vaka ve Ölüm Sayıları, Morbidite ve Mortalite Hızları, Türkiye, 1970-2005					
Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı -100.000	Ölüm Sayısı	Mortalite Hızı -1.000.000
1970	35.321.000	37	0,1	2	0,06
1971	36.215.000	70	0,19	0	0
1972	37.132.000	63	0,17	1	0,03
1973	38.072.000	84	0,22	0	0
1974	39.036.000	70	0,18	0	0
1975	40.078.000	69	0,17	0	0
1976	40.915.000	69	0,17	0	0
1977	41.768.000	62	0,15	0	0
1978	42.640.000	72	0,17	0	0
1979	43.530.000	157	0,36	0	0
1980	44.438.000	186	0,42	0	0
1981	45.540.000	438	0,96	1	0,02
1982	46.688.000	676	1,45	1	0,02
1983	47.864.000	618	1,29	1	0,02
1984	49.070.000	1.135	2,31	0	0
1985	50.306.000	1.177	2,34	0	0
1986	51.546.000	1.563	3,03	1	0,02
1987	52.845.000	1.809	3,42	1	0,02
1988	54.176.000	2.356	4,35	1	0,02
1989	57.426.316	3.145	5,48	0	0
1990	57.582.446	5.003	8,69	2	0,03
1991	57.736.288	4.658	8,07	4	0,07
1992	59.088.101	6.197	10,49	0	0
1993	60.384.474	6.795	11,25	2	0,03
1994	61.779.288	8.383	13,57	0	0
1995	63.206.510	8.506	13,46	9	0,14
1996	62.727.000	9.480	15,11	0	0
1997	63.745.000	11.812	18,53	1	0,02
1998	64.786.000	12.330	19,03	0	0
1999	65.819.000	11.462	17,41	3	0,05
2000	67.844.903	10.742	15,83	6	0,09
2001	69.081.716	15.510	22,45	2	0,03
2002	70.415.064	17.765	25,23	1	0,01
2003	71.772.711	14.572	20,3	0	0
2004	71.152.000	18.264	25,67	2	0,03
2005	72.065.000	14.644	20,32	1	0,01

Vaka ve ölüm sayıları rutin bildirim sisteminden elde edilmiştir.Hızların hesaplanmasında kullanılan nüfuslar Türkiye İstatistik Kurumu 2000 yılı nüfus sayımına göre yapılan projeksiyonlardır.

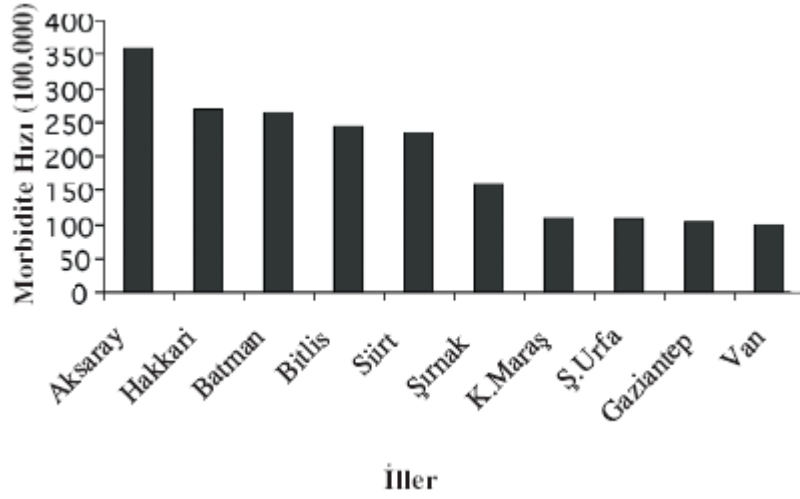
Çizelge 2.2. Brucella Vaka ve Ölüm Sayıları, Morbidite ve Mortalite Hızları, Türkiye, 1970-2005 (23).

Türkiye’de bruselloz epidemiyolojisi konusunda en kapsamlı çalışma Çetin ve arkadaşları tarafından 1984-1987 yıllarında yapılmıştır. TÜBİTAK destekli olan bu çok merkezli çalışmada 70.009 serum örneğinin incelendiği, normal popülasyonda %1.8, riskli gruplarda % 6.0 oranında seropozitiflik saptandığı bildirilmiş, ayrıca *Brucella* bakterileri ile karşılaşan kişi sayısının 1.750.000 olarak hesaplandığı belirtilmiştir. Türkiye’de Doğu Akdeniz, Güneydoğu Anadolu bölgesi ve Doğu Anadolu bölgesinde Mersin, Hatay, Kahramanmaraş, Erzurum, Malatya, Diyarbakır ve Şanlıurfa illerini kapsayan illerde Bruselloz seropozitifliğini saptamak amacıyla yapılan bir çalışmada toplam 7458 serum örneği toplanmış ve seropozitiflik %1,28 olarak bildirilmiştir. Bu verilere göre bruselloz olgu sayısı gerçekte Sağlık Bakanlığı’na bildirilenden daha yüksek olduğu görülmektedir (21,27).

Türkiye’de brusellozun bölgelere göre dağılımı 2004 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre **Şekil 2.1 de** gösterilmiştir (22) . Hastalık en sık Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde görülürken bildirilen olguların sadece %0.67’si Karadeniz Bölgesi’ndendir. Hastalığın en sık görüldüğü 10 ilimizdeki morbidite hızları **Şekil 2.2.’de** gösterilmiştir (22).

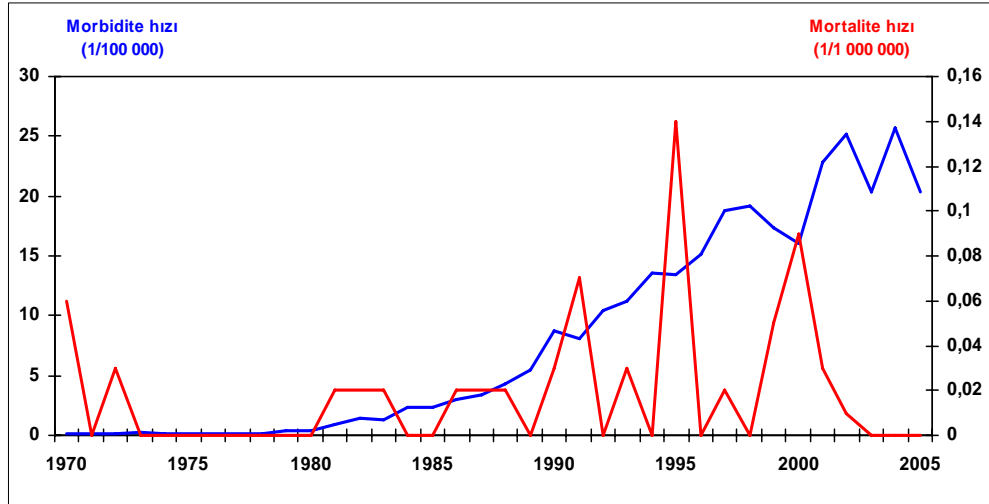


Şekil 2.1. Türkiye’de Bruselloz olgularının bölgelere göre dağılımı- 2004 (22)



Şekil 2.2. Bruselloz morbidite hızının en yüksek olduğu il -2004 (22)

İlere göre bruselloz insidansı, Sağlık Bakanlığı'na yapılan olgu bildirimlerinin il nüfusuna oranlanması ile hesaplanmıştır. 2004 yılı verilerine göre hastalık insidansı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde en yüksek iken, Akdeniz Bölgesi'nde en düşüktür (22). Bu dağılım, hastalığın hayvanlardaki prevalans dağılımı ile uyumlu olduğu görülmektedir. Türkiye'de brusellozun yıllık mortalite hızı milyonda 0.01'dir (22).



Çizelge 2.4. Brucella Morbidite ve Mortalite Hızları, Türkiye, 1975-2005

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Ve Kontrol Genel Müdürlüğü Hayvan Hastalıkları İle Mücadele Genelgesi'ne Göre Tespit Edilen 2004 yılında İl Bazında Sığır Ve Koyun Brusellozu Prevelansları **Çizelge 2.5.** ve **Çizelge 2.6'** da gösterilmektedir (24). Bu çizelgelere göre sığır bruselloz prevelansının en yüksek olduğu illerin Kars, Erzurum, Ardahan, Eskişehir, Ağrı iken koyun brusellozunun en yüksek olduğu illerin ise Kars, Yozgat, Kayseri, Nevşehir ve Kırşehir olduğu görülmektedir .

ABD gibi gelişmiş ülkelerde evcil hayvan stoğunda bruselloz nedeniyle gerçekleşen ekonomik kayıplar aşılama çalışmalarının arttırılmasıyla büyük ölçüde azalmıştır. Süt ürünlerinin pastörizasyonu işlemi ve bruselloz eradikasyon programları başlamadan önce CDC yılda yaklaşık 5.000 insan vakası bildirirken 1981 yılında insan brusellozu vaka sayısının 185'e kadar düştüğü gözlenmiştir. Günümüzde ise vaka sayısı 200 kadardır (11).

Bruselloz insidansının en yüksek olduğu ülkeler ; Suudi Arabistan, İran, Suriye, Filistin, Ürdün ve Umman' dır. Yakın Doğu bölgesinde *Bruselloz* en çok koyun, keçi, sığır, domuz, deve, at ve bufalo gibi bir çok hayvanda görülmektedir. *B. melitensis* biovar 3; Mısır, İsrail, Tunus, Türkiye ve Ürdün'de, *B. melitensis* biovar 2 ; Suudi Arabistan, Türkiye'de, *B. melitensis* biovar 1 ise Libya, Umman, İsrail' de yaygındır . *B. abortus* biovar 1, 2, 3, 6, Mısır, Türkiye, İran, Sudan' da yaygındır. Bu bölgelerde insan brusellozunda en fazla *B. melitensis* biovar 3 sorumludur (11).

Bruselloz laboratuvar çalışanları için ciddi risk oluşturmaktadır. 2000 yılında Yagupsky ve ark. Güney İsrail'de bir hastanede laboratuvar kazaları sonucu gelişen 7 *B. melitensis* vakası bildirmiştir. Bu vakalarda *B. melitensis*' in 3 farklı biyovarı izole edilmiştir. Bu vakalar 3 ay içerisinde meydana gelmiş ve bu süre içerisinde laboratuvarda pozitif kan kültürlerinden %10'unda *Brucella* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Laboratuvarda yapılan incelemeler sonunda yeterli güvenlik önlemlerinin alınmadığı anlaşılmıştır. Suudi Arabistan'da Riyad şehrinde bir hastanede yapılan 9 yıllık bir araştırmada 7 laboratuvar teknisyenine bruselloz tanısı konmuştur (11).

İtalya'da yayınlanan bir raporda; içerisinde *Brucella* bakterileri bulunan santrifüj tüpünün yere düşüp kırılması sonucu 12 laboratuvar teknisyeninin enfekte olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bütün laboratuvarların biyogüvenlik protokollerine mutlaka uymaları gerekmektedir. Riyad'da meydana gelen kaza sonucunda Biyogüvenlik Seviye 3 protokolü geliştirilmiştir (11).

İL BAZINDA SIĞIR BRUSELLOZ PREVALANSI			
İLLER	SIĞIR %	İLLER	SIĞIR %
Adana	0	Osmaniye	0,2
Afyon	0	Burdur	0,4
Antalya	0	Diyarbakır	0,4
Artvin	0	Rize	0,4
Aydın	0	Trabzon	0,4
Balıkesir	0	Kırıkkale	0,4
Bingöl	0	Çorum	0,6
Çankırı	0	Elazığ	0,6
Denizli	0	Şanlıurfa	0,7
Gaziantep	0	Zonguldak	0,7
Giresun	0	Bursa	0,9
Gümüşhane	0	Konya	0,9
Hakkari	0	Yozgat	0,9
Hatay	0	Kilis	0,9
İzmir	0	Ankara	1,1
Kocaeli	0	Kırşehir	1,1
Kütahya	0	Malatya	1,1
Kahramanmaraş	0	Manisa	1,1
Mardin	0	Uşak	1,1
Muğla	0	Bilecik	1,2
Muş	0	Aksaray	1,3
Ordu	0	Sakarya	1,4
Samsun	0	Kayseri	2,1
Sinop	0	Isparta	2,2
Tekirdağ	0	Edirne	2,8
Tunceli	0	Bitlis	3,1
Van	0	Niğde	3,5
Bayburt	0	Tokat	4,2
Karaman	0	Sivas	5,1
Batman	0	Siiirt	5,2
Bartın	0	Amasya	6,7
Iğdır	0	Ağrı	7,3
Karabük	0	Eskişehir	7,6
Adıyaman	0,2	Ardahan	7,9
Bolu	0,2	Erzurum	11,6
Çanakkale	0,2	Kars	20,8
Erzincan	0,2	Şırnak	-
Mersin	0,2	Düzce	-
İstanbul	0,2		
Kastamonu	0,2		
Kırklareli	0,2		
Nevşehir	0,2		
Yalova	0,2		

Çizelge 2.5. İl Bazında Sığır Bruselloz Prevalansı (24)

İL BAZINDA KOYUN BRUSELLOZ PREVALANSI			
İLLER	Koyun %	İLLER	Koyun %
Adana	0	Adıyaman	1
Afyon	0	Bursa	1
Ağrı	0	Erzurum	1
Amasya	0	Ardahan	1
Artvin	0	Denizli	1,2
Çanakkale	0	İzmir	1,2
Çorum	0	Uşak	1,2
Gaziantep	0	Zonguldak	1,2
Giresun	0	Muğla	1,3
Hakkari	0	Batman	1,3
İstanbul	0	Sakarya	1,5
Kastamonu	0	Kocaeli	1,7
Muş	0	Tekirdağ	1,7
Ordu	0	Mardin	1,8
Rize	0	Aksaray	2
Samsun	0	Yalova	2
Sinop	0	Konya	2,2
Trabzon	0	Diyarbakır	2,7
Tunceli	0	Sivas	2,7
Van	0	Kilis	2,8
Bayburt	0	Aydın	3,7
Bartın	0	Niğde	4,4
Iğdır	0	Eskişehir	4,7
Karabük	0	Çankırı	5,1
Osmaniye	0	Antalya	5,4
Gümüşhane	0,2	Burdur	5,8
Hatay	0,2	Manisa	5,9
Kütahya	0,2	Ankara	6
Malatya	0,2	Isparta	6,2
Karaman	0,2	Erzincan	6,5
Bilecik	0,3	Kırıkkale	7,4
Bingöl	0,3	Kırşehir	8
Siirt	0,3	Nevşehir	8,2
Balıkesir	0,5	Kayseri	8,3
Bitlis	0,5	Yozgat	13,2
Tokat	0,5	Kars	15
Şanlıurfa	0,5	Şırnak	-
Bolu	0,6	Düzce	-
Elazığ	0,6		
Edirne	0,7		
Kahramanmaraş	0,7		
Mersin	0,8		
Kırklareli	0,8		

Çizelge 2.6. İl Bazında Koyun Bruselloz Prevalansı (24)

2.13. Koruma ve Kontrol:

İnsanlarda brusellozun önlenmesi, özellikle koyun-keçi, sığır gibi evcil hayvanlarda hastalığın kontrolü ve eradikasyonuna bağlıdır. Ülkemizde bruselloza karşı kullanılan aşılarda Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde üretilmektedir. Koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev.1, sığırlarda *B. abortus* S19 aşısı kullanılmaktadır. İnsanlar için henüz bir aşı geliştirilmemiştir (3,20).

Özellikle kırsal kesimde yaşayan halkın bilinçlendirilmesi, tüketilen süt ve süt ürünlerinin kaynatılarak veya pastörize edilerek hazırlanması sağlanmalıdır. Risk altındaki meslek gruplarının (mezbaşa işçileri, et paketleyicileri, veterinerler, hayvancılıkla uğraşanlar, laboratuvar çalışanları v.b.) eldiven ve tüm kollarını örten giysiler giymeleri, gözlük takmaları alınacak önlemlerdir. Laboratuvar kaynaklı brusellozdan korunmak için ise brucella ile ilgili işlemler bakteriyolojik güvenlik kabininde yapılmalıdır (20).

Bruselloz olgularının mutlaka Sağlık Bakanlığı'na ihbarı yapılarak, o bölgenin bruselloz yönünden geniş incelenmesinin yapılması sağlanmalıdır (20).

Pastörize olmamış veya iyice kaynatılmamış süt ve böyle sütlerden yapılan peynir, krema, dondurma gibi süt ürünleri tüketilmemelidir. Pastörize edilip edilmediği bilinmeyen süt ve süt ürünleri tüketilmemelidir (3).

Hayvan yetiştiricileri yavru atan hayvanların tüm atıkları çıplak el ile dokunmadan imha etmelidir. Atıklar çevreye atılmamalı, özellikle kedi ve köpeklere verilmemelidir. Ahır ve ağıllarda dezenfeksiyon yapılmalıdır. Atık görüldüğünde hemen bir veteriner hekime haber verilmeli ve hastalığın teşhisi konulduktan sonra hayvanlar mutlaka aşılanmalıdır (3).

2.14. Brusellozun Laboratuvar Tanısı

2.14.1. Bakteriyolojik Tanı

Brusellozun tanısı kültür ile yapılır. Örnekler toplandıktan hemen sonra kültüre alınmalı, hemen işleme alınmayacaksa buzdolabında + 4 °C' de bekletilmelidir (10).

Brucella bakterileri retiküloendotelyal sistemde intrasellüler olarak yaşayan mikroorganizmalardır. Bu nedenle kültür işlemi için kemik iliği veya kan örnekleri

kullanılmalıdır. Yapılan bir çalışmada bruzelloz tanısı konulmuş 50 hastadan alınan kan ve kemik iliği örneklerinden kültür yapılmış, kan kültürlerinin %70'i pozitif bulunurken kemik iliği örneklerinden %92'si pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak kemik iliği örneklerinden bakteri izolasyon şansının daha yüksek olduğu görülmüştür. Komplike hastalıklara sahip bireylerden kültür işlemi için doku, biyopsi materyali, beyin omurilik sıvısı gibi örnekler de alınabilir (10, 11, 28).

Brucella izolasyonu için besiyerlerine çift ekim yapılmalı, besiyerlerinden birisi normal atmosfer koşullarında diğeri %5- 10 CO₂'li atmosferde üretilmelidir. Kan ve BOS gibi örnekler için sıvı besiyerleri kullanılması izolasyon şansını artırır. Kontamine materyallerin kültüründe selektif agar besiyerleri kullanılmalıdır. Selektif besiyerleri Bacitracin, Polymyxin B, Cycloheximid gibi maddeler ilave edilerek diğeri bakterilerin üremesini engelleyen besiyerleridir (8,9).

Brucella bakterilerinin izolasyonunda intrasellüler yaşadıklarından beslenme ihtiyaçları komplekstir. İlk izolasyonlarında pepton, glikoz ve tuz içeren besiyerleri kullanılmalıdır. Bazı türler için tiamin, niasin, nikotinic asit, vitaminler, biotin ve bazen serum gerekebilir. Gliserozlu Dektstroz agar, Patates Agar, Trypticase Soy Agar, Albimi Agar, *Brucella* Agar, Farrell Agar, Çikolata Agar, Kanlı Agar, %5 bovin serum içeren Tryptose Agar , Serum Dextrose Agar ve %5 Koyun Kanlı Agar, Thayer-Martin Agar, Skirrow Agar veya *Brucella spp.* üremesini destekleyebilecek diğeri spesifik bir besiyeri kullanılabilir (8, 9, 28, 29).

Genellikle akut dönemde *Brucella* bakterilerinin izole edilme olasılığı daha fazladır. Bu nedenle örnekler bu dönemlerde ve antibiyotik kullanımından önce alınmalıdır. İnsanlarda *Brucella* en çok akut dönemde kan kültürüyle izole edilir. Kan kültürü için sıvı besiyerleri kullanılır (8, 9, 10, 11).

Brucella bakterilerinin izolasyonu için kemik iliği ve ya kan örnekleri aerob ve anaerob kültür şişelerine inoküle edilir. Mikroorganizma yavaş ürer. Bu nedenle kültür şişeleri 35°C'de 4-6 hafta inkübe edilmelidir. Belirli aralıklarla kanlı agar ve çikolata agara pasajlar yapılmalıdır. Radyometrik veya radyometrik olmayan otomatize kan kültür sistemleri ile 5-7 günlük inkübasyon periyodu sonucunda *Brucella* bakterileri izole edilebilir (8, 9, 10, 11).

Kan, kemik iliği gibi organizmanın izole edilebileceği klinik materyalden Gram boyama yapılır. Kemik iliği veya kan kültürlerinden yavaş üreyen, zayıf boyanan,

küçük kokobasiller görülüyorsa *Brucella* bakterileri açısından şüphelenilir (8, 9, 10, 11, 16, 28, 29) .

Brucella bakterileri laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilmektedir. biyogüvenlik seviye 3 mikroorganizmalar arasında yer alır. Bu nedenle çalışma esnasında mutlaka biyogüvenlik kurallarına uyulmalıdır (11).

Kan kültürlerinde *Brucella* bakterilerinin saptanması için klasik izolasyon prosedürleri, lizis santrifügasyon sistemleri ve otomatize kan kültür sistemleri kullanılabilir (8, 9, 10, 11, 16).

Klinik örneklerden *Brucella* cinsi bakterilerin izole edilmesi brusellozun en iyi kanıtıdır. Fakat mikroorganizmanın yavaş üremesi izolasyonu güçleştirmektedir. İzolasyon şansını arttırmak için kan kültürleri en az 30 gün inkübe edilmeli, düzenli olarak subkültürler yapılarak üreme değerlendirilmelidir. Katı besiyerlerine sürekli subkültür yapılmasını gerektirmeyen bifazik besiyerleri geliştirilmiştir. Hem katı hem de sıvı besiyeri içeren Castaneda besiyerleri kullanılabilir (8, 9, 10, 11, 30).

1993 yılında “Lizis Santrifügasyon” yöntemine dayalı bir yöntem olan Isolatör Kan Kültür Sistemi (Wampole Laboratories, Cranbury, N.J.) geliştirilmiştir. Bu yöntem otomatize olmayan bir yöntemdir. *Brucella*, mikobakteriler ve mantarlar gibi intrasellüler yaşam eğilimli mikroorganizmaların kan kültürlerinde klasik yöntemlere göre daha kısa sürede izole edebilen lizise dayalı bir yöntemdir. *Brucella* bakterilerini 2- 5 gün gibi bir sürede izole edebilmektedir. Fakat bu yöntemin kontaminasyon riskinin yüksek olması, otomatizasyon açısından uygun olmaması, maliyetinin yüksek olması ve uygulanması zor bir yöntem olması gibi dezavantajları vardır (30).

Son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında otomatize kan kültür sistemlerinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Mikroorganizmanın ürettiği CO₂'in saptanması temeline dayanan bu yöntemler sayesinde klinik materyallerden 7 günlük bir inkübasyon sonucu *Brucella* cinsi bakterilerin izole edilebilmektedir (30).

İsrail’de ateşli çocuklardan alınan kan örnekleri BACTEC Peds Plus/F kan kültür şişelerine ekilmiş ve BACTEC 9240 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Towson, Md.) cihazı ile üreme değerlendirilmiştir. Dört hafta boyunca negatif kan kültür şişelerinden haftada 1 kez subkültür yapılarak üreme kontrol edilmiştir. Toplam

2.579 kan kültüründen subkültürler yapılmış, 42'si (%1.6) *B. melitensis* açısından pozitif olarak bulunmuştur. 42 pozitif kan örneğinden 41'i (% 97,6) BACTEC 9240 cihazı ile 2-6 gün içinde pozitif olarak bulunmuştur. 1 kan kültürü ise cihaz tarafından kaçırılmış ve yapılan subkültürde 7. günde pozitif olarak değerlendirilmiştir (30).

Suudi Arabistan'da ateşli çocuklarda ve normal erişkinlerle yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar alınmıştır. Erişkinler için BACTEC aerobic/F, çocuklar için de BACTEC Peds Plus şişeleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada BACTEC 9240 cihazının *Brucella* izolatlarının %97'sini 5 gün içerisinde saptayabildiği görülmüştür (30).

İspanya'da 17 Brusellozlu hastanın dahil edildiği bir çalışmada Hemoline performance diphasic medium (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), BACTEC Plus Aerobic/F and Vital Aer (bioMerieux) olmak üzere 3 farklı kan kültür sisteminin performansları karşılaştırılmıştır. Beş günlük bir protokol izlenmiş ve bu üç sistem brusellozlu hastaların sırasıyla %52.9, %82.4 ve %11.8'ini pozitif olarak saptayabilmiştir. İnkübasyon protokolü 7 güne çıkartıldığında hastaların sistemler sırasıyla %76.5, %94.1, and %47'sini pozitif olarak saptayabilmiştir. Sonuç olarak BACTEC sisteminin diğer sistemlere kıyasla daha hızlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir (30).

Bu çalışmalardan BACTEC 9240 kan kültür sistemi ile *Brucella* bakterilerinin saptanması için rutin laboratuvarlarda 7 günlük bir periyodun yeterli olduğunu daha uzun süreli inkübasyonlara gerek olmadığı anlaşılmaktadır (30).

BACTEC 9240 ve Isolator kan kültür sistemlerinin duyarlılıklarını ve *Brucella* türlerini saptama sürelerini kıyaslamak amacıyla yapılan bir çalışmada 122 bruselloz şüpheli çocuk hastadan 2'ser adet kan örneği alınmıştır. Kanlardan birisi BACTEC Peds plus şişesine diğeri ise Isolator 1.5 Microbial Tube şişesine inoküle edilmiştir. Kan kültürlerinden 28'i (%23) en az bir sistem ile pozitif olarak değerlendirilmiştir. BACTEC 9240 sistemi 25 kültürlerin 25'ini (Duyarlılık:%100), Isolator sistemi ise 22'sini(Duyarlılık : %78.6) pozitif olarak saptamıştır. Her iki sistemle de pozitif olarak değerlendirilen 22 pozitif kan kültüründen 21 (%95) 'ini BACTEC sistemi, 15(%68.2)' ini ise Isolator sistemi 3 gün içerisinde saptmıştır. 8 (%36.4)'i BACTEC sistemiyle en az bir gün daha erken pozitif olarak saptanmıştır. Kalan 14 pozitif kan kültürü ise her iki sistemle aynı günde pozitif olarak saptanmıştır. Sonuç olarak BACTEC 9240 kan kültür

sisteminin Isolator sisteminden daha duyarlı olduğu ve mikroorganizmayı daha erken saptadığı görülmüştür (30).

Suudi Arabistan'da yapılan geniş çaplı bir çalışmada 97 *Brucella* pozitif hastanın kan kültürlerinden %92,7'si BACTEC 9240 sistemi ile 5 gün içerisinde pozitif olarak saptanmıştır. Yine yapılan bir başka pediatrik çalışmada BACTEC 9240 sistemine ait PedsPlus hemokültür şişeleri ile Isolator 1.5 mikrobiyal hemokültür şişelerinin performansları değerlendirilmiş, BACTEC 9240 sistemi 28 pozitif kan örneğinin hepsini pozitif olarak saptarken Isolator sistem sadece 22 örneği pozitif olarak saptamıştır (10).

Bir çalışmada BACTEC NR sistemi Isolator sisteme kıyasla pozitifliği daha uzun sürede saptamıştır. BacT/alert sistemi ise sürekli subkültür gerektiren bir yöntemdir. ESP sistemi bir başka sistemdir fakat klinik materyaller kullanılarak bu yöntemle diğer yöntemleri karşılaştıran çalışmalar yapılmamıştır. Kan kültür şişlerine *B. melitensis* inoküle edilerek BACTEC 660 sistemi ve ESP sistemleri karşılaştırılmış, ESP sisteminin *B. melitensis*'i daha hızlı sürede saptadığı bulunmuştur. Deneysel çalışmalarda ESP sistemi *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*'i 96 ve daha az sürede saptayabilmiştir (10).

Bir çalışmada kemik iliği aspiratları kan kültürlerine kıyasla *Brucella* izolasyonunda daha başarılı bulunmuştur. Castaneda yöntemi ile *Brucella* pozitif 10 hastadan alınan kemik iliği örneklerinin 9'u, kan kültür örneklerinin ise 4'ü pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca kemik iliği aspiratlarından kan kültürlerine kıyasla daha kısa sürede *Brucella* saptanmıştır (10).

2.14.2. Hayvan Deneyi:

Brucella enfeksiyonlarının tanısında hayvan deneyleri de kullanılabilir. Kobaylar *Brucella* bakterilerine karşı duyarlıdır. Enfekte olduklarında 2-4 hafta sonra hastalık belirtisi verirler. Hasta kanı kobayların peritonu içerisine verilir, 2-4 hafta sonra ateş ve sepsis belirtileri ile hastaların kobayların gangliyon, kan ve dalaklarından yapılan kültürlerde *Brucella* bakterileri izole etmek olasıdır. Periton içi inokülasyondan sonra erkek kobaylarda orşit gelişir, gebe dişi kobaylar ise düşük yaparlar. Ayrıca hayvanların serumlarında *brucella* titresinin artışı da saptanabilir (8, 9).

2.14.3. Serolojik Tanı:

Serolojik tanı için ilk ateşlenme döneminde akut faz serum alınmalıdır. 14-21 gün sonra ise konvalesan faz serum örneği alınmalıdır (10, 28).

Brusellozun serolojik tanısında Wright Aglütinasyon Testi, Rose Bengal Testi, Coombs Testi, 2 –mercaptoethanol Testi, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testleri kullanılabilir (8,9,10,11,31).

En yaygın kullanılan ve brusellozun tanısında kolaylık sağlayan yöntem Wright testidir. Seri tüp dilüsyonu yapılarak aglütinojenlerle IgA ve IgM antikorları araştırılır Standart tüp aglütinasyon yöntemiyle hasta kanında *Brucella* spesifik antikorları araştırmak bruselloz tanısında önemli bir yer tutar (8,9,31).

Brucella bakterileri hızlı antijen yapısı değiştirdiklerinden deneyde antijen olarak standart, iyi aglütinasyon veren suşları S tipi kolonilerinde üretilmiş, ısı ile öldürülmüş, fenollü bakteri süspansiyonları kullanılır. Bu gün en çok kullanılan standart suşlar *B. abortus* S99 ve *B. abortus* 1119 suşlarıdır. *Brucella* antijenlerinin hazırlanmasının zorluğu nedeniyle yapılan çalışmalarda bu antijenleri standart olarak hazırlayan merkezlerden elde edilen antijenlerin kullanılması önerilmektedir. Ülkemizde Pendik Veteriner Kontrol araştırma Enstitüsü ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi kuruluşlarından “Standart *Brucella* Antijeni” elde edilebilmektedir (8, 9, 31).

Brucella enfeksiyonlarında aglütininler IgM ve IgG yapısında olup hastaların kanında 2. haftadan sonra ortaya çıkarlar. IgM antikorları hastalığın ilk haftası içinde ortaya çıkar, 3 ayda en yüksek düzeye ulaşır, sonra yavaşça azalır kaybolurlar. Bazen uzun süre kanda bulunabilirler. IgG antikorları hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra yükselerek 6-8 haftada en yüksek düzeye çıkarlar. Kronik enfeksiyon süresince anlamlı düzeyde kanda bulunurlar. Normal olarak bazı kimselerin serumlarında ve özellikle veteriner, çoban, çiftçi, kasap gibi mesleklerle uğraşan kişilerde 1/80-1/100 titresinde *Brucella* aglütininleri bulunabilir. Serum ½ saat 56 °C’de inaktive edilirse bu antikorların etkileri ortadan kaldırılabilir (8, 9, 10, 11, 31).

1/160 ve daha yüksek titrede aglütinin saptanan ve 10-15 gün sonra titresi yükselen serumlara sahip hastalar bruselloz olarak kabul edilebilir. Daha önce bruselloz geçirenlerde, kolera aşısı olanlarda veya *Brucella* allerji testi yapılmış kimselerde yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilir (8, 9, 10, 11, 31).

Klinik olarak bruselloz bulguları gösterdiği halde olumsuz serolojik test veren kimselerin serumları, brusellozda sık görülen aglütinasyon blokağı bakımından araştırılmalıdır. Bu olay özellikle subakut klinik olgularda daha çok oluşur. Bu olayda antikorlar antijenlere bağlandıkları halde aglütinasyon reaksiyonu oluşturmasını engeleyen blokan antikorlardan kaynaklanmaktadır. Bu antikorları saptamak için Coombs testi kullanılır. Bu test ile blokan antikorlar ortadan kaldırılır ve görünür bir aglütinasyon reaksiyonunun oluşması sağlanır (9, 31).

Brusellozun akut evresinde önce IgM sonra IgG antikorları oluşur. Kronik dönemde IgM gittikçe azalarak ortadan kalkar. Kronik dönemde IgM gittikçe azalarak ortadan kalkar. Kronik bir enfeksiyonun akut alevlenmesinden şüphe ediliyorsa reaktivasyonun belirleyicisi olarak kabul edilen IgG'nin aglütinasyon titresinin gösterilmesi gerekir. Yüksek titrede IgG saptanması ile alevlenme tanısı konulabilir. Bu amaçla total titrenin IgM' e ait kısmı **2- merkaptotanol** ve ya **rivanol** ile IgM' nin parçalanması ile yok edilir. Bu maddeler IgM antikorlarının bisülfid köprülerini kırar ve antikorları depolimerize ederler. Bu maddelerle işlem görmüş serumlarla yapılan aglütinasyon deneyleri sonucunda aglütinasyon görülmesi IgG antikorlarına bağlı olup hastalığın kronikleştiğı anlamını taşır. Aglütinasyon testi pozitifken bu testler ile aglütinasyonun görülmemesi başlangıçtaki Wright testindeki pozitifliğin IgM antikorlarına bağlı olduğu anlamını taşır (8, 9, 10, 11, 31).

Brusellozun tansısında lam aglütinasyon deneyleri de kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanı Rose Bengal testidir. *B. abortus* S 99 standart suşundan hazırlanan ve özel teknikle Rose Bengal boyası ile boyanan, tamponlu tuzlu sudaki yoğun *Brucella* antijeni kullanılarak yapılan bir deneydir. Temiz bir plastik veya cam bir plak üzerinde 0.003 ml antijen üzerine aynı miktarda hasta serumu damlatılıp dairesel hareketlerle çevrilerek 4dakika içerisinde iri tancikli çökeltiler görülmesi durumunda test pozitif olarak değerlendirilir. Aglütinasyon görülüyorsa test negatiftir. Ülkemizde Pendik Veteriner Kontrol araştırma Enstitüsü ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi kuruluşlarından elde edilebilir. Epidemiyolojik çalışmalarda ve kimi laboratuvarlarda tarama testi olarak kullanılır. Rose bengal testi pozitif olan serumlara Wright testi uygulanır (9,31).

Tam kan kullanılarak yapılan lam aglütinasyon testi (Spot Test) özellikle kitle taramalarında yoğun brucella bakteri süspansiyonundan hazırlanmış antijenin bir damlası üzerine parmak ucundan alınan bir damla kan damlatıldığında aglütinasyonun görülmesi prensibine dayanır (38).

Brusellozlu hastaların serum örneklerinde brucella spesifik IgM'in saptanması için kullanılan dipstick testi ve son zamanlarda geliştirilen immunocapture-agglutination testi (Brucellacapt) de diğer serolojik testlerdendir (9,18).

Kompleman Birleşmesi Deneyi de brusellozun serolojik tanısında önemli bir deneydir. IgG antikorlarını saptadığından Coombs deneyi ile aynı değerde sonuçlar alınır (9).

Brusellozun serolojik tansında ELISA yöntemi de kullanılabilir. ELISA yöntemiyle *Brucella* bakterilerine karşı oluşturulan IgG, IgM, IgA düzeyleri saptanabilir. Bu testlerde antijen olarak *B. abortus* hücreleri, *B. abortus* S-tipi LPS'leri, *B. abortus* protein ekstraktları, *B. melitensis* S-tipi LPS'leri kullanılır. Klasik tüp agglütinasyon testi ile ELISA yönteminin karşılaştırıldığı çalışmalarda her iki yöntemin de benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Arıza ve ark'ları 75 hastadan elde ettikleri 762 serum örneğinde *Brucella* spesifik IgA, IgG, IgM düzeylerini saptamak üzere ELISA ve SAT yöntemlerini kıyaslayan bir çalışma yapmışlardır. Sonuç olarak ELISA yönteminin daha duyarlı ve özgül olduklarını bulmuşlardır (11).

Kliniklere erken başvuran hastalarda IgM titresini yüksek bulunurken daha geç başvuran hastalarda IgG titresinin yüksek olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal tedavi alan hastalarda ise IgG titrelerinde 3-6 ay içerisinde 4-8 kat düşüş görülmüştür. Bakteriemi periyodunda IgM ve IgG titrelerinde yükselme görülebilmektedir (11).

1993 yılında Goldblaum ve ark.'larının Arjantin'de yaptıkları bir çalışmada tüm *Brucella* türlerinde 18kDa sitoplazmik protein varlığını bulmuşlar ve bu hasta serumlarında antijene karşı oluşturulan antikorların aranması amacıyla ELISA temeline dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Aktif olarak Bruselloz enfeksiyonu geçirmeyen veya hiç bruselloz geçirmemiş kişiler bu antijen açısından negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem ayrıca aşılanmış veya aşılanmamış sığırların birbirinden ayırımından da

kullanılabilen bir yöntem olmuştur. Bu antijen rekominat DNA teknolojisi kullanılarak üretilmiştir (11).

Al Shamany ve Wright monoklonal antikorlar kullanılarak hasta serumlarında *Brucella* LPS antijenlerini saptayan yeni bir ELISA yöntemi bulmuşlardır. 1607 adet kan donöründen elde edilen serumlara, brusellozlu 146 hastanın serum örneğine , bruselloz riskli 20 hastadan alınan serum örneğine ve bruselloz dışı enfeksiyona sahip 264 serum örneğine bu yöntem uygulanmış ve pozitif kan kültürlerine kıyasla duyarlılık %100 olarak bulunmuştur. Özgüllük kan donörleri arasında %99.5, hastalar arasında ise %99.2 olarak bulunmuştur. Bu veriler bu yöntemin brusellozun tanısında alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir (11).

2.14.4. Moleküler Tanı:

2.14.4.1. Bruselloz tanısında PZR Yöntemi :

Klinik materyalden mikroorganizmanın kültür ile izolasyonu günümüzde hala altın standart olarak nitelendirilmektedir. Fakat bu işlem yaklaşık 2 hafta almaktadır. Ayrıca brusellozun bakteriyolojik olarak tanısı deneyimli ekipman gerektirmekte, laboratuvar bulaş riski yüksek olması nedeniyle gereken güvenlik önlemleri mutlaka alınmalıdır. Bu dezavantajlar brusellozun laboratuvar tansında moleküler yöntemlere başvurulması gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Brusellozun hızlı tanısında gelecek vaad eden bir yöntem olan PZR hızlı, kolay, spesifik ve düşük maliyetli bir yöntemdir. 1987 yılında ilk kez Mullis ve Faloona tarafından keşfedilen PZR yöntemi *Brucella* tanısında büyük ilerlemeler kaydedilmesine yol açmıştır (32).

1987 yılından bu yana *Brucella*'nın PZR' a dayalı tanısında birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden ilki *Brucella* cinsine ait bütün türlerde korunan genetik bir lokusu (BCSP13 veya 16S rRNA genleri) saptayan yöntem olmuştur. Bu yöntem ile *Brucella* cins bazında saptanabilmekte tür veya biyovar ayrımı yapılamamaktadır (32) .

Brucella türlerini ve biyovollarının ayrımını yapabilen PZR yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu yöntemler tür bazında tiplendirmenin yapılmasının önemli olduğu epidemiyolojik çalışmalarda oldukça yararlı yöntemlerdir (32).

Kültürde üretilen bakterilere PZR işlemi uygulanması gerçekleştirilebilmektedir fakat doku, kan, semen, süt gibi materyallerden PZR ile direkt olarak nükleik asit

saptaması oldukça güç olmaktadır. Laboratuvarlar bu konularda kendi protokollerini geliştirmektedir (32).

2.14.4.1.1. Brucella'nın PZR ile cins spesifik identifikasyonu:

Brucella'nın identifikasyonunda kullanılan PZR'ye dayalı ilk yöntemler cins spesifik tanı yöntemleri olmuştur. Bu konuda bildirilen ilk çalışma Fekete ve arkadaşları (1990) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *B. abortus* S19 suşunun 43kDa'luk dış membran proteinini kodlayan 635 baz çiftlik gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmıştır. Bu bölgenin Brucella cinsine özgü olduğu ve bütün türlerde ve biyovarlarda mevcut olduğu bildirilmiştir. Fakat hedef bölgenin primer dizisinin açıklanmaması ve patentlenmesi nedeniyle birçok laboratuvar bu yöntemi uygulayamamıştır (35).

1992 yılında Herman ve Ridder *Brucella* cinsine özgü bir 16S rRNA hedef dizisini bulmuşlardır. Bu bölgenin özgüllüğünü saptamak amacıyla Brucella ile akraba olan 17 farklı bakteri üzerinde de denemeler yapılmış sadece *Ochrobacterium anthropi* adı verilen bir türü Brucella ile aynı 16SrRNA hedef dizisine sahip olduğu görülmüştür (36).

Brucella tanısında rRNA operon bölgesi ile ilgili birçok spesifik test geliştirilmeye devam edilmiş Romero ve arkadaşları 9 farklı primer kombinasyonunu denemişlerdir. Kullanılan primerler kullanılan bütün Brucella suşlarını saptayabilmiş, diğer bakteriler de ise Herman ve Ridder'in yaptığı çalışmada olduğu gibi sadece *Ochrobacterium anthropi* hariç kullanılan primerlere özgü hedef dizi bulunmamıştır. *Ochrobacterium anthropi* çapraz reaksiyon vermiştir (37).

1996 yılında Rijpens ve arkadaşları 16S-23S gen bölgesini üzerinde çalışmalar yapmışlar , PZR yönteminde *Ochrobacterium anthropi* suşlarının çapraz reaksiyon verdiğini bulmuşlardır. *Ochrobacterium* türleri immun süprese hastalarda oportünistik enfeksiyonlar yapmaları ve oldukça az rastlanmaları nedeniyle *Brucella*'dan ayrılabilmeleri çapraz reaksiyonun önemli bir sorun yaratamayacağını göstermektedir (38).

1992 yılında Baily ve ark. BCSP31 gen bölgesine dayalı bir yeni bir PZR yöntemi geliştirmişlerdir. BCSP31 geni *Brucella* cinsi bakterilerin fonksiyonu bilinmeyen antijenik ve periplazmik bir proteinini kodlamaktadır. Bu gen bölgesi *B. bovis* hariç bütün *Brucella* türleri ve biyovarlarında korunmaktadır. Bu yöntemde 223

baz çiftlik bir oligonükleotid primeri kullanılmıştır. Yöntem *B. abortus* ve *B. melitensis* için spesifik olarak değerlendirilmiş fakat çalışmada diğer *Brucella* türleri ve *Ochrobacterium anthropi* türü denenmemiştir. Aynı primer diziler kullanılarak Da Costa ve arkadaşları yeni bir protkol geliştirmişlerdir. Çalışmaya bütün *Brucella* türleri ve biyovarları ayrıca *Brucella* dışında 98 farklı bakteri de dahil edilmiştir. Sonuç olarak *Ochrobacterium anthropi*, *Brucella* dışındaki bütün türler negatif olarak değerlendirilmiştir. Oldukça duyarlı ve özgül olan bu yöntem birçok laboratuvar tarafından adapte edilerek kullanıma girmiştir (39).

2.14.4.1.2. *Brucella* türlerinin ve biyovarlarının PZR ile ayrımı:

Brucella türlerinin tür bazında ayrımı birçok çalışmada önemli olmayabilir fakat Brusellozun eradikasyonunu amaçlayan epidemiyolojik çalışmalarda tür ayrımı yapılması önemli olmaktadır. Bu amaçla çeşitli PZR yöntemleri geliştirilmiştir (32).

Multipleks suş-spesifik hedef dizilerini veya hipervariable DNA dizilerini tanıyan özgüllüğü yüksek olan primerler kullanılarak yapılan çalışmalar *Brucella* türlerinin ayrımını yapabilmekte, ayrıca yanlış pozitiflik riskini azaltmaktadır. Bu konuda ilk kez 1994 yılında Bricker ve Halling, *Brucella* türlerinin hepsinde korunan inserstiyon sekans bölgelerinden biri olan IS711 (IS6501 olarak da bilinir) tekrarlanan gen bölgesini saptayan bir yöntem geliştirmişlerdir. IS elementlerinin bulunduğu bölge ve sayısı bütün *Brucella* türlerinde korunmaktadır. Her türün IS elementini bulundurduğu kromozomal bölge türe özgüdür. Araştırmacılar *Brucella abortus* biyovar 1.2,4; *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* biovar 1'in ayrımını yapabilen yöntem *Brucella* türlerinin “Abortus, Melitensis, Ovis, Suis” kelimelerinin baş harflerinden oluşan AMOS-PCR adını verdikleri yöntemde IS elementine bağlanan genel bir primer ve IS dizisinde türe özgü bölgeye tutunan tür-spesifik bir primer kullanmışlardır. Aynı araştırmacılar eradikasyon programlarında aşılanmış hayvanlarla aşılanmamış hayvanların ayrımını sağlayabilen suş-spesifik primerler kullanılarak uygulanan PZR yöntemleri de geliştirmişlerdir. Bu primerler S19 ve RB51 aşı suşlarının da ayrımını yapabilmektedir. Bu yöntem ABD’de Tarım Bakanlığı Ulusal Veteriner Araştırma laboratuvarlarında referans yöntem olarak kullanılmış, şüpheli örneklerde *Brucella* saptanması amacıyla kullanılmıştır (32,40).

Omp2 lokusuna özgü PZR yöntemleri de geliştirilmiştir. İlk kez Ficht ve arkadaşları tarafından tanımlanan Omp' lokusunda omp2A ve omp2B olmak üzere iki gen bölgesi bulunmaktadır. Bu iki gen bölgesi de 36 kDa'luk dış membran proteinlerini kodlamaktadır. Bu gen bölgeleri çoğu zaman bütün *Brucella* türlerinde korunsada kimi zaman delesyonlar meydana gelmekte, oluşan polimorfizimleri saptayan PZR yöntemleri *Brucella* türlerinin ve biyovaryantlarının ayırımında kullanılabilir (41).

Leal-Klevezas ve arkadaşları 1995 yılında *B. abortus*'u diğer *Brucella* türlerinden ayıran bir yöntem geliştirmişlerdir (42). Bu konuda Cloeckert ve arkadaşları Omp2 bölgesine restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak geliştirdikleri bir PZR-RFLP yöntemi ile suşların ve yeni türlerin ayırımını yapmışlardır. Ayrıca yarı spesifik primerler kullanılarak yada rastgele primerler kullanılarak modifiye edilmiş PZR yöntemleri de geliştirilmiştir (43).

2.14.4.1.3. Örneklerinden Direk Olarak *Brucella* İdentifikasyonu için geliştirilen PZR yöntemleri:

Brucella ile ilgili geliştirilen PZR yöntemleri genelde kültürde üreyen kolonilerden DNA saflaştırılması ve amplifiye edilmesi esasına dayanır. Mikroorganizmanın kültürde üretilmesinin güç olması nedeniyle kan, doku, süt ve süt ürünleri gibi çeşitli örneklerden direkt *Brucella* DNA'sı saptayabilen PZR yöntemleri geliştirilmiştir. Kontamine örneklerde PZR inhibitörlerinin bulunması, örnekteki mikroorganizma sayısının az olması gibi nedenler işlemleri güçleştirebilmektedir. Bu nedenle her örneğe özgü çeşitli PZR protokolleri geliştirilmiş ve denenmiştir (32).

Cortez ve ark. (44), Çetinkaya ve ark.(45) , Gallien ve ark (46), Fekete ve ark . (33) düşük yapmış hayvanların dokularından ve fetüsten; Guarino ve ark. (47) , Matar ve ark. (48), Queipo-Ornuto(49), Zerva ve ark (50) kandan; Tantillo ve ark.(51), Leal Klevezas ve ark.(52,53), Romero ve Lopez Goni (54) , Romero ve ark.(55) , Rijpens ve ark(56)., süttten; Serpe ve ark(57), Tantillo ve ark.(51) peynirlerden, Sreevatsan ve ark.(58) nazal sekresyonlardan; Amin ve ark.(59) semen örneklerinden PZR ile direkt *Brucella* DNA'sı saptayan PZR yöntemleri geliştirmişlerdir.

2.15. Tedavi:

Tedavide hastanın istirahatının sağlanması, intraselüler etkili kombine antibiyotik tedavisi ve ağrıların giderilmesi gereklidir. Antibiyotikler relapsları önlemek için uzun süreli verilmelidir. Tetrasiklin bakteriyostatik olarak bruselloz tedavisinde etkilidir. Tek başına kullanılırsa relaps önemli bir problemdir ve çocuklarda etkisi azdır. Merkezi sinir sistemine penetrasyon zayıftır. Streptomisin ototoksositeye neden olması en önemli dezavantajdır. Kloramfenikol, ampisilin, sülfonamidlere düşük yanıt vardır ve relaps yüksektir. Yüksek dozda kotrimaksazol+tetrasiklin+ streptomisin tedavisi relapsları önlemede etkilidir. Rifampisin fagositlere ve Merkezi Sinir Sistemi'ne iyi penetre olur. Rifampisin; kotrimaksazol veya tetrasiklinle kombine edilerek 4-6 hafta verilebilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO- The World Health Organisation) 6 haftalık streptomisin veya rifampin ile kombine doksisisiklin tedavisini uygun görmektedir (11,12).

Antimikrobiyal tedavide ayrıca 6 hafta süreyle streptomisin veya gentamisin ile kombine oral tetrasiklin uygulanır. Florokinolonlar *Brucella* bakterilerine in vitro etkili olurken sefalosporinler etkisidir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ofloksasin-rifampisin kombinasyonunun daha önce başarısı kanıtlanmış doksisisiklin-rifampisin kombinasyonu kadar etkili olduğu bulunmuştur. Florokinolonlar ve yeni üretilen sefalosporinler diğer antibiyotiklerle kombine kullanıldıklarında tedavide daha etkili olabilirler. Nörobruselloz ve endokardit olgularında kombinasyon tedavisi gereklidir. Nörobrusellozda doksisisiklin, rifampin ve trimethoprim- sulfamethoxazole gibi üçlü ya da ikili kombinasyon kullanılabilir (11, 12).

Osteoartiküler komplikasyonların varlığında doksisisiklin ile streptomisin kombinasyonunun daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Bilinen, genel kabul görmüş bu kombinasyonlara rağmen brusellozda sağaltım başarısızlıkları ve relapslara istenmeyen oranlarda karşılaşılmaktadır. Olguların %5-10'unda relaps görülmektedir. Ülkemizde de bildirilen olgu serilerinde relaps oranları bu düzeydedir. Anacak denenmiş olan kimi tekli rejimlerde sağaltım başarısızlıkları ve relaps oranları %25-28,5 oranlarında bildirilmiştir. Bu çalışmalar, brusellozda tekli antibiyotik kullanımının yeterli olmadığını bir kez daha göstermiştir. Klasik sağaltım rejimleri ile yaşanan relapslar ve gözlenen yan etkiler nedeniyle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bruselloz tedavisinde yeni antibiyotik arayışları sürmektedir. Özellikle kinolonlar, sınırlı sayıdaki

olgu grupları ile yapılan çalışmalarda ümit vaat eden, kombine sağaltımda yer almaya aday ajanlar olarak dikkati çekmektedir. Türkiye’de bruselloz tedavisinde uygun seçeneklerin belirlenmesi amacıyla yapılmış geniş olgu serilerinin sağlandığı çok merkezli, kontrollü çalışmalar bulunmaktadır (12, 60, 61).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması :

Bu çalışmada Nisan 2006 - Mayıs 2007 tarihleri arasında 240'ı çiğ inek sütü, 122'si çiğ koyun sütü, 95'i çiğ keçi sütü, 105'i dondurma, 102'si pastörize edilmemiş çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynir örneği olmak üzere toplam 664 adet örnek *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırıldı.

Koyun, keçi ve inek sütleri Mersin ili merkeze bağlı 10 farklı köyden toplandı.

Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3. çiğ süt örneklerinin toplandığı köylerin isimlerini ve aylara göre toplanan çiğ süt örneği sayısını göstermektedir.

Çiğ İnek Sütü Örneklerinin Toplandığı Köylerin İsimleri	Aylara Göre Toplanan Çiğ İnek Sütü Örneği Sayısı				
	2006			2007	
	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	MART	NİSAN
Buluklu Köyü	15 adet	-	-	-	-
Araplar Köyü	-	10 adet	-	-	-
Çavak Köyü	-	17 adet	-	-	-
Arpaç köyü	-	-	21 adet	-	-
Elvanlı Köyü	-	-	-	91 adet	-
Emirler Köyü	-	-	-	-	10 adet
Kargıcak köyü	-	-	-	-	8 adet
Camili köyü	-	-	-	-	26 adet
Tömük Yeşildere Köyü	-	-	-	-	42 adet
TOPLAM :	240 ADET				

Çizelge 3.1. Çiğ inek sütü örneklerinin toplandığı köylerin isimleri ve aylara göre toplanan çiğ inek sütü örneği sayısı

Çiğ Koyun Sütü Örneklerinin Toplandığı Köylerin İsimleri	Aylara Göre Toplanan Çiğ Koyun Sütü Örneği Sayısı				
	2006			2007	
	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	MART	NİSAN
Buluklu Köyü	16 adet	-	-	-	-
Çavak Köyü	-	30 adet	-	-	-
Arpaç köyü	-	-	9 adet	-	-
Camili köyü	-	-	-	30 adet	37 adet
TOPLAM	122 adet				

Çizelge 3.2 : Çiğ koyun sütü örneklerinin toplandığı köylerin isimleri ve aylara göre toplanan çiğ koyun sütü örneği sayısı

Çiğ Keçi Sütü Örneklerinin Toplandığı Köylerin İsimleri	Aylara Göre Toplanan Çiğ Keçi Sütü Örneği Sayısı				
	2006			2007	
	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	MART	NİSAN
Çavuşlu Köyü	-	7 adet	-	-	-
Araplar Köyü	-	11 adet	-	-	-
Arpaç köyü	-	-	13 adet	-	-
Camili köyü	-	-	-	30 adet	34 adet
TOPLAM					95 adet

Çizelge 3.3. Çiğ keçi sütü örneklerinin toplandığı köylerin isimleri ve aylara göre toplanan çiğ keçi sütü örneği sayısı

2007 yılı Nisan ayında Mersin il merkezinde klasik yöntemlerle kendi imalatlarını yapan 40 farklı pastaneden 75'i kaymaklı, 20'si kakaolu ve 10'u meyve aromalı olmak üzere toplam 105 adet dondurma örneği toplandı.

Dondurma Örneği	Sayı
Kakaolu	20
Kaymaklı	75
Meyveli	10
Toplam	105

Çizelge 3.4. Aroma çeşidine göre dondurma örneği sayıları

2006 yılı Mayıs ayında ve 2007 yılı Nisan ayında Mersin il merkezinde kurulan semt pazarlarından ve şarküterilerden 45'i inek sütünden, 57'si keçi sütünden yapılmış toplam 102 adet taze beyaz peynir örneği toplandı.

Taze Peynir Örneği	Sayı
Keçi Peyniri	75
İnek Peyniri	57
Toplam	102

Çizelge 3.5. Yapıldığı süt cinsine göre peynir örneği sayıları

Süt örneklerinden 100'er ml, peynir ve dondurma örneklerinden ise yaklaşık 100 gram örnek steril ağzı kapalı plastik kaplara alındı. Süt örnekleri alınırken süt sağımı

işlemeden önce eldiven giyilerek steril gazlı bez ve alkollü pamukla hayvanların memeleri silindikten sonra hayvanın her bir memesinden alınacak şekilde Steril kap içerisine süt sağımı yapıldı ve kapların ağzı hemen kapatıldı. Bütün örnekler aseptik koşullarda steril kaplara alındı. Örnekler buz çantalarında soğuk zincir korunarak aynı gün içerisinde mikrobiyolojik kültür işlemleri uygulanmak üzere Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na getirildi. PZR işlemleri için örneklerin bir kısmı steril ependorf tüplere alındı ve işlemler gerçekleştirilene kadar – 20° C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı steril kaplar

3.2.Kullanılan Araç ve Gereçler:

3.2.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler :

- Mikroskop(Olympus)
- PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich- Universal 32 R)
- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500)

- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Pastör Fırını(Memmert)
- Otoklav (Nüve- OT 020)
- Hassas Terazî (Scaltec)
- Buz Dolabı (Indesit)
- Vortex (NM- 110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson- PİPETMAN- P 10-P100-F1000)
- Öze
- Petri kapları
- Desikatör
- Lam
- Lamel
- Steril kap
- Steril havan
- GenBox- Microaerer (Biomeriêu)
- Mikropipet Uçları
- Pipet ucu
- Balon joje
- Ependorf tüpler
- Cam şişe
- Deney tüpleri
- Boya seti

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.2.1. Moleküler Tam İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler:

- Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema- 302430300, cat nr 30354)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck- L51736210)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck- K29935665 204)
- Ethidium bromide (Sigma 054K3681)
- Brom fenol mavisı (SCP Science-B7722)
- Sükroz (Merck–1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221)
- Sıvı Fenol (Sigma- 125K0707)
- İsoamil Alkol (Merck K33640278510)
- Kloroform (Merck- K28735331 107)
- Amonyum Asetat (Merck 101116)
- Triton-X (Merck K32674203 403)
- Agaroz (Sigma- A–9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Sigma)
- 10X Taq Buffer with (NH_4)₂SO₄ (Fermentas)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10 mM dNTP Mix (Sigma-Deoxynucleotide set DNTP–100)
- Proteinaz K (Sigma- P 2308)
- Gene Ruler 100 bp DNA Step Ladder Plus Marker(Fermentas- SM0321)
- Distile Su
- DNase, RNase Free Su
- *Brucella melitensis* spesifik primer
- *Brucella abortus* spesifik primer
- IS711 spesifik primer

3.2.2.2.1. DNA Saflaştırılması (ekstraksiyonu) İçin Kullanılan Solüsyonlar

-Lysis Buffer (100 ml için);

- %2 Triton X-100	2ml
- %1 Sodium dodecyl sulphate	1 gr
- 100 mM NaCl	0.6 gr
- 10 mM Tris –HCl [pH: 8]	0. 158 gr

Tartılan kimyasal maddeler 50 ml distile su ile eritildi. pH'sı 8.0'a ayarlandı.100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Oda ısısında muhafaza edildi.

- Sıvı Fenol (Sigma- 125K0707) :

%0.1'lik 8- hydroxiquinoline içeren sıvı fenol 100mM Tris HCl [pH:8] ve %0.2'lik 2-mercaptoethanol ile satüre edildi.

- Proteinaz-K (10mg/ml)

Hazır olarak alınan liyofilize 10 mg Proteinaz-K (Sigma) 1 ml steril distile su ile çözülerek 10 mg/ml'lik konsantrasyona getirildi. 50 µl'lik porsiyonlara ayrıldı. - 20°C'de saklandı.

- 7,5M Amonyum asetat (20 ml için)

11,5 gr amonyum asetat tartıldı, 20 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve oda ısısında muhafaza edildi.

- TE tampon çözeltisi (50 ml için)

- 10 mM Tris-HCl [pH:8] 0.08 gr
- 1mM disodium EDTA 0.019 gr

Tartılan kimyasal maddeler 50 ml distile su içinde çözdürüldü.

- 24:1 Kloroform-İzoamil Alkol Çözeltisi (100ml için)

96 ml kloroform içerisine 4 ml izoamil alkol ilave edildi ve karıştırıldı.Karışım ekstraksiyon işleminin gerçekleştirileceği gün hazırlandı.

- %70'lik etil alkol (100 ml için)

70 ml absolu etil alkol 30 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.

- %95'lik etil alkol (100 ml için)

95 ml absolu etil alkol 5 ml distile su ile karıştırıldı ve +4 °C'de saklandı.

3.2.2.1.2 Elektroforez için Kullanılan Solüsyonlar

- 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu (pH 8.8)

- Tris Base.....108 gr.
- Borik Asit.....55 gr.
- EDTA.....8.3 gr.

Distile su ile eritildi ve pH'sı 8.8'e ayarlandı. Distile su ile 1 litre'ye tamamlanarak çözüldü. Oda ısısında muhafaza edildi.

- Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)

10X TBE Buffer stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konularak kullanıldı.

- Yükleme Tamponu (20 ml için)

- Sükroz.....4 gr.
- Brom fenol mavisi.....0.05 gr.

Tartılan kimyasallar 20 ml 1XTBE tamponunda eritildi. Oda ısısında saklandı.

- % 1.5'luk Agaroz jel solüsyonu

0.6 g agaroz tartılır ve 40 ml 1X TBE Buffer içerisinde çözdürülür. Mikrodalga fırında eritilir.

3.2.2.2. Bakteriyolojik Tanı İçin Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

- Farrell Broth:

Brucella Broth besiyerine glukoz, inaktive at serumu ve Brucella selektif supplement ilavesi ile hazırlanır (62,63).

- Brucella Broth 28 g/l
- Glukoz 10 g/l
- İnaktive At Serumu %5
- Brucella Selektif Supplement 1 vial/500ml

- **Brucella Broth:** (BBL, Becton Dickinson Company, Microbiology Systems, Cockeysville, USA)

<u>İçindekiler</u>	<u>g/l</u>
--------------------	------------

- **Brucella Selective Supplement** (Oxoid SR0083)

<u>İçindekiler</u>	
--------------------	--

1 şişe içerisine 5 ml steril distile su ve 5 ml methanol ilave edilir. 35°C' de 10-15 dakika inkübe edilir. Her şişe 500 ml besiyeri için kullanılır.

-Farrel Broth Besiyerinin Hazırlanışı:

1 litre distile su içerisinde 28 gr dehidrate Brucella Broth tartılır ve çözülür. 10 g/l glukoz (Merck1.083461000) eklenir. Otoklavda 121°C’ de 15 dakika steril edilir. Besiyeri 50 °C’ ye kadar soğutulur. % 5 oranında 56C’de 30 dak. inaktive edilmiş at serumu (Oxoid SR0035) ve 1 şişe/500ml Brucella Selective Supplement (Oxoid SR0083) eklenir. İyi karıştırılır. pH: 7.0±0.2 olmalıdır. Kullanılmaya kadar buzdolabında + 4 °C’de muhafaza edilir.

Kalite Kontrol :

Pozitif Kontrol:

- *B. abortus* 544
- *B. melitensis* 16M

Beklenen Sonuç

İyi üreme

İyi üreme



Şekil 3.2. Farrell Broth Besiyeri

- Farrell Agar :

Brucella Medium Base besiyerine, glukoz, inaktive at serumu ve Brucella selektif supplement ilavesi ile hazırlanır (62,63).

- **Brucella Medium Agar Base** (Oxoid CM0169, Hampshire, UK)

<u>İçindekiler:</u>	<u>g/l</u>
• Peptone	10.0
• Lab-Lemco powder	5.0
• Glucose	10.0
• Sodium chloride	5.0
• Agar	15.0

- Farrell Agar Besiyerinin Hazırlanışı:

Dehydrate Brucella Medium Base'den 45gr tartılır ve 1 litre distile suda çözdürülür. 10 g/l glukoz (Merck1.083461000) eklenir. Otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edilir. Besiyeri 50 °C' ye kadar soğutulur. Farrell Broth besiyeri hazırlanırken olduğu gibi % 5 oranında 56C°de 30 dak. inaktive edilmiş at serumu (Oxoid SR0035) ve 1 şişe/500ml Brucella Selective Supplement (Oxoid SR0083) eklenir. İyice karıştırılır. pH: 7.0±0.2 olmalıdır. Petri kaplarına 4mm kalınlığında dağıtılır. Soğuduktan sonra buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edilir.

Kalite Kontrol:

Pozitif Kontrol:

- *B. abortus* 544
- *B. melitensis* 16M

Beklenen Sonuç

- İyi üreme
- İyi üreme



Şekil 3.3. Farrell Agar Besiyeri

- Christensen's Üre Agar (Merck 108492):

Brucella bakterilerinin üreaz aktivitelerini saptamak amacıyla kullanılır.

<u>İçeriği</u>	<u>g/l</u>
• Peptone	1
• D(+) Glucose	1
• Sodium Chloride	5
• Potassium dihydrogen phosphate	2.0
• Phenol Rred	0.012
• Agar- agar	12.0

- Hazırlanışı (1000 ml için) :

21 gr besiyeri tartılarak üzerine 1000 ml distile su eklendi ve kaynayan su banyosunda eriyinceye kadar bekletildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50°C' ye kadar soğutulduktan sonra bek alevi yanında içerisine 5 ml % 40'luk filtre ile süzülerek steril edilmiş üre solusyonu eklendi ve tüplere dağıtılarak yatık durumda katılaştırıldı. Besiyerleri kullanılacakları zamana kadar buzdolabında saklandı.

- Oksidaz Ayırıcı (GBL İdantirosa 534100)

Brucella izolatlarının oksidaz aktivitelerini saptamak amacıyla ticari olarak temin edilen oksidaz ayırıcı kullanıldı.

- Katalaz Ayırıcı (GBL İdantirosa 0532)

Brucella izolatlarının katalaz aktivitesini saptamak amacıyla ticari olarak temin edilen katalaz ayırıcı kullanıldı.

- Gram Boya Seti:

Brucella kolonilerinden hazırlanan preparatların Grama Boyama yöntemi ile mikroskopik olarak incelenmesi için kullanıldı.

Brucella şüpheli izolatlar ileri identifikasyon ve tiplendirme amacıyla Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne gönderildi. Enstitü laboratuvarında izolatlar şu testler uygulandı;

- CO₂ gereksinimi
- H₂S aktivitesi
- Thioninli(20µg/ml) besiyerinde üreme özellikleri
- Bazik Fuksinli (20µg/ml) besiyerinde üreme özellikleri
- A antiserumu ile aglütinasyon
- M antiserumu ile aglütinasyon
- Tbilisi fajında lizis
- Penislinli (5IU) besiyerinde üreme
- Streptomisinli (2i5mg/ml) besiyerinde üreme
- Safraninli(100µg/ml) besiyerinde üreme
- İ-eritritol (1mg/ml) besiyerinde üreme

Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü laboratuvarında yapılan testlerde kullanılan besiyeri ve ayıraçlar şu şekilde hazırlanmıştır.

- Serum Dekstroz Agar

İçindekiler

Tryptic soy Agar	40 g.
Distile su	900 cc.
Steril at serumu	50 cc
Steril dekstroz solusyonu	50 cc
pH	7,2±0.2

Besiyeri distile su içerisine ilave edilerek sıcak su banyosunda 100 °C'de eritilir, pH ayarlanır. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildikten sonra 56 °C'ye soğutulur. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril at serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde % 20'lik stok dekstroz çözeltisinden ilave edilir. Petrilere ve vida kapaklı tüplere dağıtıldıktan sonra +4 °C 'de saklanır.

- Thionin besiyeri :

İçindekiler:

- Tryptic soy Agar 40 g.
- Thionin StokBoya Solüsyonu (%0,1'lik) 20 ml.
- Distile su 880 cc.
- Steril at serumu 50 cc
- Steril dekstroz solusyonu 50 cc
- pH 7,2±0.2

Besiyeri distile su içerisine ilave edilir ve sıcak su banyosunda 100°C'de eritilir, pH ayarlanır. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildikten sonra 56 °C' ye soğutulur. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril at serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde % 20'lik stok dekstroz çözeltisinden ilave edilir. %0,1 lik steril thionin stok solüsyonundan 20 ml. ilave etmek suretiyle 1/50.000 (20 µg/ml.) oranında thionin içeren besiyeri hazırlanmış olur. Petrilere dağıtıldıktan sonra +4 °C 'de saklanır.

- Bazik Fuksin besiyeri:

İçindekiler:

- Tryptic soy Agar (Gibco-04960 M) 40 g.
- Bazik Fuksin Stok Boya Solüsyonu (%0,1'lik) 20 ml.
- Distile su 880 cc.
- Steril at serumu 50 cc
- Steril dekstroz solusyonu 50 cc
- pH 7,2±0.2

Besiyeri distile su içerisine ilave edilir ve sıcak su banyosunda 100°C'de eritilir, pH ayarlanır. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildikten sonra 56 °C' ye soğutulur. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril at serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde % 20'lik stok dekstroz çözeltisinden ilave edilir. %0,1 lik steril bazik fuksin stok solüsyonundan 20 ml. ilave etmek suretiyle 1/50.000

(20 µg/ml.) oranında bazik fuksin içeren besiyeri hazırlanmış olur. Petrilere dağıtıldıktan sonra +4 °C 'de saklanır.

- Safranin besiyeri

İçindekiler:

- Tryptic soy Agar (Gibco-04960 M) 40 g.
- Safranin Stok Boya Solüsyonu (%0,5'lik) 20 ml.
- Distile su 880 cc.
- Steril at serumu 50 cc
- Steril dekstroz solusyonu 50 cc
- pH 7,2±0.2

Besiyeri distile su içerisine ilave edilir ve sıcak su banyosunda 100C°'de eritilir, pH ayarlanır. Otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildikten sonra 56 °C' ye soğutulur. İçerisine son konsantrasyonu %5-10 olacak şekilde steril at serumu ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde dekstroz ilave edilir. %0,5 lik steril Safranin stok solüsyonundan 20 ml. ilave etmek suretiyle 1/10.000 (100 µg/ml.) oranında Safranin içeren besiyeri hazırlanmış olur. Petrilere dağıtıldıktan sonra +4 °C 'de saklanır.

- Streptomisin besiyeri:

Streptomisin, SDA besiyeri bileşimine son konsantrasyonu 2.5µg/ml olacak şekilde ilave edilerek hazırlanır.

-Penisilin besiyeri:

Penisilin, SDA besiyeri bileşimine son konsantrasyonu 5 IU/ml olacak şekilde ilave edilerek hazırlanır .

- İ-eritritol besiyeri :

İ-eritritol SDA besiyeri bileşimine son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde katılarak hazırlanır.

-Pepton salin solusyonu

Pepton	10 gr
Sodyum klorid (NaCl)	5 gr
Distile su	1 litre, pH 7.0-7.2

- Akriflavin solusyonu

Akriflavin	5 mg.
Distile su	5 ml.

5 mg.akriflavin tartılarak küçük vialler içerisine konur. Gerektiğinde 1/1000 oranında (5 ml. distile suyla) sulandırılarak taze olarak hazırlanır ve kullanılır.

- Kristal viyole stok solusyonu

- A Solüsyonu

Kristal viyole	2 g.
Absülü etanol	20 ml.

Bir porselen havan içerisine 2 g. kristal viyole tartılarak konulur, üzerine 20 ml. absülü etanol ilave edilerek iyice ezilip eritilir.

- B Solüsyonu

Amonyum okzalat	0,8 g.
Distile su	80 ml.

Bir beher içerisine 0,8g amonyum okzalat tartılarak konulur, üzerine 80 ml. distile su ilave edilerek iyice eritilir.

- Stok Kristal Viyole Solüsyonu

Yukarıda hazırlanışı anlatılan A ve B solüsyonları tamamen erimelerinden sonra uygun bir kap içerisinde karıştırılarak koyu renkli ve sıkıca kapanabilen bir şişeye konulup etiketlendikten sonra stok solüsyon olarak 3 ay süreyle kullanılabilir.

- 1/40' lık Kristal Viyole Solüsyonu

Stok Kristal Viyole Solüsyonu	1 ml.
Distile su	39 ml.

1 ml. Kristal viyole solüsyonu 39 ml. distile suyla karıştırılarak taze olarak hazırlanır ve kullanılır.

- Kurşun Asetat Kağıdı (Merck 9511):

Brucella bakterilerinin H₂S aktivitelerini saptamak amacıyla ticari firmalardan elde edilen kurşun asetatlı kağıtlar kullanılır.

- Brucella fajları :

- Tbilisi Fajı (RTD ve 10.000XRTD)
- R/C fajı

-Brucella antiserumları:

- A ve M Brucella poliserum
- Brucella monospesifik A ve M antiserumları
- Brucella Rough (R) antiserum

3.3. Örneklerden *Brucella* İzolasyonu ve İdentifikasyonu:

3.3.1. Bakteriyolojik Yöntem ;

Süt örneğinin 10 ml'si, peynir ve dondurma örneklerinin ise 10 gr'ı 90 ml Farrell Broth besiyerinde homojenize edildi. Peynir örnekleri steril havanlarda Farrell broth içerisinde iyice homojenize edildi. Zenginleştirme amacıyla her karışımın 1'er ml'inden içerisinde 9 ml Farrell Broth bulunan iki adet test tüpüne inoküle edilerek vortekslendi. Tüplerden birisi aerobik ortamda diğeri ise %10'luk CO₂'li ortamda 37 °C'de 7 gün süreyle inkübe edildi. Tüpler her gün vortekslendi. Aerobik ve %10'luk CO₂'li ortamda inkübe edilmiş homojenatlardan Farrell Agar besiyerine ekim yapıldı. %10'luk CO₂'li ortamda inkübe edilmiş tüplerden Farrell Agar'a yapılan pasajlar yine %10'luk CO₂'li ortamda, aerob ortamda inkübe edilmiş tüplerden yapılan pasajlar da aerob ortamda 37 °C'de 5-7 gün inkübe edildi.



Şekil 3.4. %5-10'luk CO₂ li ortam sağlayan desikatör içerisinde inkübe olmuş kültürler.

İnkübasyondan sonra etüvden çıkarılan besiyerleri Seviye II Biyogüvenlik kabininde maske ve eldiven kullanılarak incelendi ve bazı besiyerlerinde *Brucella* cinsi bakterilerin koloni morfolojilerine benzer kolonilerin olduğu gözlemlendi. Besiyerleri üzerinde oluşan şüpheli kolonilerden Gram boyama yapmak üzere preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelendi. Gram negatif küçük kokobasiller görülen preparatlara ait izolatlara oksidaz, katalaz deneyleri yapıldı.

Şüpheli kolonilerden Christensen's Üre Agar besiyerlerinin yüzeylerine ve dip kısımlarına iğne öze ile her izolattan ikişerli ekim yapıldı. Ekim yapılmış üre agarlardan biri aerob ortamda inkübe edilirken diğeri %5-10'luk CO₂ 'li desikatör içerisinde 37 °C'de inkübe edildi.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brucella* Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen *B. abortus* 544 ve *B. melitensis* 16M standart suşları çalışmaların her aşamasında kontrol mikroorganizmalar olarak kullanıldı. Bu suşlar ile hazırlanan besiyerleri ve ayıraçlar denendi.

Şüpheli suşlar Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brucella* Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim laboratuvarına gönderildi. Enstitü laboratuvarında şu işlemler yapıldı;

-Brucella anti-A+M poliserumu ile lam aglutinasyon testi:

Şüpheli kolonilerden bir öze dolusu kültür ile smooth brusellalara karşı hazırlanmış adsorbe olmamış poliserumdan bir öze dolusu alınarak karıştırılır ve aglutinasyonun varlığı araştırılır. Aglutinasyonun görülmesi izolatın *Brucella* cinsine ait bir mikroorganizma olabileceğini göstermektedir.

-Smooth ve rough kolonilerin ayırımı

Brucella türlerinin tip tayinlerinde kültürün koloni morfolojisi önemli olduğundan, koloniler 45°C'lik oblik ışıktaki stereoskopik mikroskopla incelenir ve ardından aynı amaçla akriflavin solüsyonu ile kolonilerin aglutinasyon özellikleri incelenir. Bunun için taze olarak hazırlanmış akriflavinden bir damla bir lam üzerine konular ve bir öze yardımı ile birkaç koloni alınarak bu damla içinde süspansiyon edilir. Rough koloniler akriflavin solüsyonu ile hemen aglütine oldukları halde smooth koloniler homojen bir süspansiyon gösterirler. Mukoid kolonilerde ise ipliğimsi bir uzama oluşur. Her test için *B. ovis* 63/290 suşu rough koloni yapısının tanısı için kontrol olarak kullanılır. Rough ve smooth kolonilerin ayırımında ayrıca kristal viyole solüsyonu kullanılır. Stok boya solüsyonu 1:40 oranında sulandırıldıktan sonra petrinin yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde petrilere dökülür ve 15-20 saniye beklenir. Bu sürenin sonunda petrinin yüzeyinde kalan sıvı bir pastör pipetinin yardımı ile içinde dezenfektan bulunan bir kaba dikkatlice boşaltılır ve hemen ardından koloniler stereoskopik mikroskopta incelenir. Smooth koloniler boya almazlarken, rough koloniler kırmızı ve morun değişik nüansları ile boyanırlar ve kolonilerin yüzeyinde radyal çatlaklar görünür .

-Faj testleri

-Fajların rutin test dilüsyonunun (RTD) saptanması: Tbilisi fajı için *B. abortus* 544, R/C fajı için *B. canis* RM 6/66 konakçı suşları olarak kullanılır. Yatık serum dekstroz agar (SDA) tüplerine ekilen konakçı suşları, 37°C'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılır ve bu sürenin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanır ve Mac Farland no: 4'e göre ml'sinde yaklaşık 1×10^9 bakteri bulunacak şekilde süspansiyon hazırlanır. Steril bir eküvyonlu çubuk bakteri süspansiyonlarına daldırılarak SDA petrilерinin bütün yüzeyine homojen bir şekilde yayılarak ekim yapılır. Petrilерin yüzeylerinin kuruması beklenirken, bu arada fajların pepton salinde 10^{-1} 'den 10^{-8} 'e kadar on katlı dilüsyonları yapılır. Her bir dilüsyon için ayrı pipet kullanılır. Yüzeyleri kuruyan SDA petrilерinin alt yüzeylerine bir cam kalemi ile fajların dilüsyonları yazılır. Fajların her bir dilüsyonundan SDA petrilерindeki ilgili bölüme steril ve ayrı pipet uçları kullanılarak 20'şer µl damlatılır. Petrilер % 5-10 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Petrilерin yüzeyi kuruduktan sonra 37° C'de, 24 saat

inkübasyona bırakılır. Damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek dilüsyon, fajın RTD'ü olarak saptanır.

- **Tbilisi fajı ve R/C fajı ile lizis:** Yatık serum dekstroz agar (SDA) tüplerine referans suşlar ve testi yapılacak izolatların kültürlerinden ekilip 37°C'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılır ve bu sürenin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanır ve Mac Farland no: 4'e göre ml'sinde yaklaşık 1×10^9 bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlanır. Her bir bakteri suspansiyonuna daldırılan steril bir eküvyonlu çubukla agar yüzeyine birbirine paralel olarak 5 şerit halinde ekim yapılır. Şeritlerin sol tarafına Tbilisi fajının RTD'undan, ortasına 10 000x RTD'undan ve sağına R/C fajından 20 µl damlatılır. Petriler kurduktan sonra % 5-10 CO₂ içeren ortamda, 37°C'de, 24 saat inkübe edilirler. Sonuçlar lizis durumuna göre değerlendirilir.

-Karbondioksit (CO₂) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H₂S) üretimi:

İnkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda selektif Brusella besiyerlerinde üreyen her bir Brusella izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak ikişer adet yatık SDA tüplerine pasajları yapılır. Kurşun asetatlı kağıt şerit, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirilir. Birinci tüpler % 5-10 CO₂ içeren etüvde, diğerleri ise aerob koşullarda 37°C'de, 4 gün süreyle inkübe edilirler. Kurşun asetatlı kağıtlar inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirilir. İnkübasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kağıtlarda oluşan renk değişikliğine göre değerlendirilir. Testlerde kontrol suşları olarak, CO₂'e gerek duyan ve H₂S pozitif olan *B. abortus* 544 ile her iki karakter yönünden negatif olan *B. melitensis* 16M kullanılır.

- Tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme:

İnkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda selektif Brusella besiyerlerinde üreyen her bir Brusella izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak bir adet yatık SDA tüpüne pasajları yapılır Tüm Brusella suşları CO₂'li ortamda üreyebileceklerinden tüm referans suşlar ve test izolatları CO₂'li etüvde 37°C'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılır ve inkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden

yıkılarak toplanır ve Mac Farland no: 4'e göre ml'sinde yaklaşık 1×10^9 bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlanır. Her bir bakteri suspansiyonuna daldırılan steril bir eküvyonlu çubukla test ve kontrol suşlarının tiyonin ve bazik fuksinin 1/50.000 konsantrasyonunu içeren SDA'lara ekimleri yapılır. Ekimler agar yüzeyine birbirine paralel olarak 5 şerit halinde yapılır. Petriler kurduktan sonra % 5-10 CO₂ içeren ortamda, 37°C'de, 4-5 gün inkübe edilirler. Testte kontrol olarak tiyoninli ve bazik fuksinli SDA petrilerden herbirine *B. melitensis* Rev1 (biyotip 1), *B. melitensis* 16M (biyotip 1), *B. abortus* 544 (biyotip 1), *B. abortus* 86/8/59 (biyotip 2) ve *B. suis* 1330 (biyotip 1) referans suşlarının ekimi yapılır. Sonuçlar, inkubasyon periyodunun sonunda üreme durumlarına göre değerlendirilir.

- **A ve M monospesifik anti-serumlar ile aglutinasyon:** Testi yapılacak her bir izolatin bir öze dolusu yoğun kültürü 0.25 ml fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edilir. Bir lam üzerine A ve M monospesifik anti-serumlardan birer damla konulur ve üzerlerine yine birer damla incelenecek izolatin suspansiyonundan eklenerek ağaç bir kürdanla karıştırılır. Reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglutinasyon durumuna göre okunarak kaydedilir. Testte kontrol olarak, sadece M anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 16M (biyotip 1), sadece A anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 63/9 (biyotip 2), her iki anti-serumla aglütine olan *B. melitensis* Ether (biyotip 3) ve hiç biri ile aglütine olmayan rough *B. ovis* 63/290 standart suşları kullanılır.

- **Safranin O içeren besiyerinde üreme:** SDA'a 100 µg/ml (1/10 000) konsantrasyonunda katılarak hazırlanan safranin O'lu besiyerinde *B. suis* ve *B. abortus* biyotip 2 suşları üreyememektedirler. Bu amaçla, diğer boyalı besiyerlerine ekimlerde belirtilen yöntemle tüm test izolatlarının safranin O'lu besiyerine ekimleri yapılır ve 3-4 günlük inkubasyon sonrasında sonuçlar, izolatların üreme durumlarına göre değerlendirilir. Testte kontrol olarak safranin O'lu besiyerinde üremeyen *B. suis* 1330 ve *B. abortus* 86/8/59 suşları kullanılır.

3.3.2 Moleküler Yöntem:

3.3.2.1.Süt örneklerinden PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle *Brucella* DNA'sının Saptanması:

3.3.2.1.1. Süt Örneklerinden DNA ekstraksiyonu :

Leal Klevezas ve ark. (52)'nin tanımladığı prosedüre göre uygulanmıştır;

- PZR işlemi için -20°C'de ependorf tüpler içerisinde saklanan koyun, keçi ve inek sütleri oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi.
- 8000xg' de 5 dk. santrifüj edildi. Şeffaf kısım atıldı. Sütün kaymak tabakası ve dip kısım ayrı bir ependorf tüpüne alındı.
- Bu örneğin 400 µl' sine lizis solusyonu (%2 Triton X-100,%1 Sodium dodecyl sulphate,100 mM NaCl,10 mM Tris –HCl [pH: 8]) ve 10µL(10mg/ml) Proteinaz K eklendi.
- Hazırlanan içerikler karıştırıldı, 50 °C'de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
- 400µl sıvı fenol eklendi ve karıştırıldı.
- 8000 x g 'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Supernatant (üstteki berrak kısım) yeni steril bir tüpe alındı.
- Eşit miktarda kloroform-isoamil alkol [24:1] eklendi ve karıştırıldı.
- 8000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Supernatant yeni steril bir tüpe alındı.
- 200 µL 7.5 M amonyum asetat eklendi ve karıştırıldı.
- Tüp 10 dakika buz üzerinde bekletildi.
- 8000 x g' de 5 dakika santrifüj edildi.
- Supernatant yeni steril bir tüpe alındı.
- Supernatantın iki katı hacimde soğuk absolüt etanol eklendi, karıştırıldı ve - 20 °C'de gece boyunca bekletildi.
- Ertesi gün 8000 x g' de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısım pellet kısmına zarar vermeden üst kısım yavaşça döküldü.
- Pellet kısmına 1mL %70'lik soğuk etanol eklendi.
- 8000 x g' de 5 dakika santrifüj edildi.

- Pellet kısmına zarar vermeden üst kısım yavaşca döküldü ve tüpler kağıt havlu üzerine ters çevirilerek bekletildi ve kurutuldu.
- Pellet üzerine 20 µL TE tampon (10 mM Tris-HCl [pH:8] ,1mM disodium EDTA) eklendi ve DNA ekstraktı pipetaj işlemi ile süspanse edildi.
- DNA ekstraktı, işlem yapılncaya kadar -20 °C’ de bekletildi.

Pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kültür Koleksiyonundan temin edilen *B. abortus* 544 ve *B. melitensis* 16M standart suşları ile enfekte edilmiş steril sütler negatif kontrol olarak ise Brucella cinsi bakteri içermeyen steril sütler kullanıldı. Pozitif kontrol için katı besiyeri üzerinde üremiş standart Brucella suşu kolonilerinden 3-5 tanesi 1 ml steril süt içerisinde süspanse edildi ve iyice vortekslendi . Standart Brucella suşlarıyla kontamine edilen sütlerden DNA ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen DNA ekstraktları amplifikasyon işleminin denetlenmesi amacıyla -20 °C’ de bekletildi.

3.3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İşlemi:

Reaksiyon karışımlarının dış ortam kaynaklı DNA molekülleri ile kantaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılan sarf malzemelerin ve çözeltilerin steril olmasına dikkat edildi. Reaksiyon bileşenleri ekstraksiyon işleminin yapıldığı biyogüvenlik kabininden ayrı bir temiz bir kabinde hazırlandı. PZR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 µL’lik PZR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için de thermal cycler cihazı ile 0.5–10 µL, 10–100 µL ve 50–200 µL’lik otomatik pipetler kullanıldı.

- Kullanılan oligonükleotid primerleri:

B. abortus ve *B. melitensis* DNA’sına özgü primer dizileri M.E.R Hamdy ve A.S. Amin araştırmacılarının yapmış olduğu çalışmalardan seçilmiştir (64) . Brucella DNA’sının tespiti için 498 baz çiftlik *B. abortus* spesifik primer, 731 baz çiftlik *B. melitensis* spesifik primer ve IS711 spesifik primerleri kullanılmıştır. Bu primerlerin baz dizilimi şu şekildedir;

5' GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC 3' (*B. abortus* -specific primer)
5' AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA 3' (*B. melitensis* -specific primer)
5' TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT 3' (IS711- specific primer)

3.3.2.1.3. *Brucella* DNA'sının amplifikasyonu:

PZR işlemi koşulları Bricker ve Halling'in tanımladığı posedüre göre sağlanmıştır. Amplifikasyondan önce DNA örnekleri 10 dakika su banyosunda kaynatılarak ve buzda bekletilerek DNA denatüre edildi. Toplam 50µl'lik PZR karışımı hazırlandı. PZR karışımının bileşenleri ve konsantrasyonları aşağıdaki gibi hazırlandı;

Reaksiyon bileşenleri	Tek bir örnek için kullanılacak miktar(µl)
- Steril distile su	33
- 1.5 mM Mg Cl ₂	5
- 15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	5
- 250 mM her bir dNTP 'den	1
- 0.2 mM B.abortus- spesifik primer	0.25
- 0.2 mM B.melitensis-spesifik primer	0.25
- 0.2 mM IS711-spesifik primer	0.25
- 1 U Taq polimeraz	0.25
- DNA ekstraktı	5
TOPLAM	50

B. abortus 544 ve *B. melitensis* 16M standart suşları ile enfekte edilmiş steril sütlerden hazırlanan DNA ekstraktları pozitif kontrol olarak, *Brucella* bakteri DNA'sı içermeyen steril süttten hazırlanmış ekstrakt ise negatif kontrol olarak kullanıldı. PZR karışımı amplifiye edilmek üzere thermal cycler cihazına yerleştirildi. Döngü koşulları şu şekilde ayarlandı;

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	5	1
Denatürasyon	95	1.15	35
Primer bağlanması (Annealing)	55.5	2	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	2	
Son uzama (Post elongasyon)	72	5	1
Muhafaza	4	∞	∞

Çizelge 3.6. Amplifikasyon reaksiyonu koşulları.

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

3.3.2.1.4. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi:

PZR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan %1.5'lük agaroz jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100–1000 bp) DNA fragmentleri ihtiva eden moleküler ağırlık standartı ile kıyaslanarak saptandı.

Tank tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde sulandırıldı ve hem elektroforez tankında hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

- Agaroz jelin hazırlanması

Bir balon jofede 0,04gr agaroz 40 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra etidiyum bromid'den 4 µl eklendi. Erimiş halde ve etidiyum bromid içeren agaroz jel, uygun sayıda bölmeye sahip tarağın yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca soğumaya bırakılan jel, soğuma esnasında etidiyum bromidin ısı etkilenmemesi ve aktivitesini yitirmemesi için gün ışığından korundu. Katılaşıncaya kadar (25–30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1XTBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 süktroz veya gliserol, % 0.25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30–40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip edilerek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transilüminatörde incelendi ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) kayıtları yapıldı.

3.3.2.1.5. Agaroz jelde *Brucella* DNA'sının varlığının tespiti:

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra, *B. abortus* için 400-500 bp'lik DNA moleküler ağırlık standardının arasında yer alan 498 baz çifti uzunluğunda bantların görülmesi durumunda *B. abortus* açısından, 700-900 bp'lik DNA moleküler ağırlık standardının arasında yer alan 731 baz çifti uzunluğunda bantların görülmesi durumunda ise *B. melitensis* açısından pozitif olarak kabul edildi.

- Çalışmada kullanılan moleküler ağırlık standartı ve özellikleri :

Bu çalışmada Gene Ruler 100 bp DNA Step Ladder Plus Marker(Fermentas- SM0321) moleküler ağırlık standartı kullanılmıştır. Agaroz jelde çift iplikli DNA fragmentlerinin uzunluklarını ölçmek için tasarlanmış fragmentlerdir. Bu marker kromatografik olarak saflaştırılmış 14 farklı DNA fragmentlerinden oluşmaktadır; 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

1000 ve 500 baz çiftlik iki adet referans bant içermektedir.

4. BULGULAR

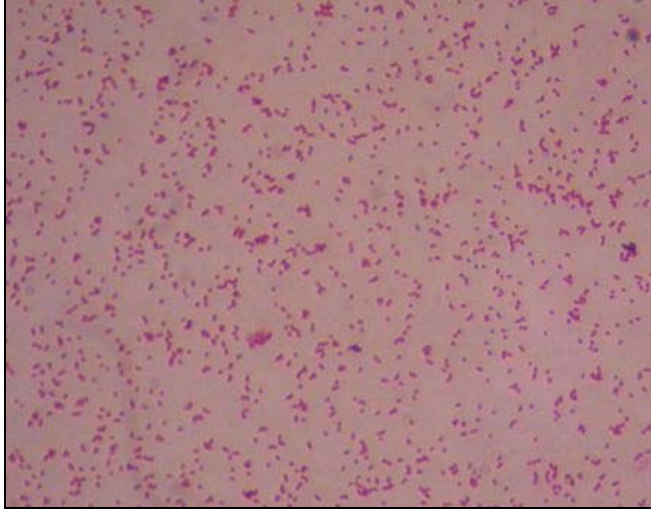
Bu çalışmada Nisan 2006 - Mayıs 2007 tarihleri arasında Mersin ili merkeze bağlı 10 farklı köyden 240 çiğ inek sütü, 122 çiğ koyun sütü, 95 çiğ keçi sütü örneği, Mersin merkezde bulunan 40 farklı pastaneden 105 dondurma örneği, Mersin merkezde kurulan semt pazarlarında ve şarküterilerde satışa sunulan 102 pastörize edilmemiş çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynir örneği olmak üzere toplam 664 adet örnek *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırıldı. Peynir örneklerinin toplanması sırasında satıcılardan alınan bilgilere göre 102 adet taze beyaz peynirin 45'inin inek sütünden, 57'sinin keçi sütünden yapıldığı saptandı. 105 dondurma örneğinden 75'i kaymaklı, 20'si kakaolu ve 10'u meyve aromalı dondurmalarıdır.

Çalışmaya dahil edilen bütün örnekler besiyerlerine ekildi ve inkübasyon sonucunda inek sütlerinden yapılan kültürlerden 119 nolu örnekte ve dondurma örneklerinden D-15 nolu örnekte *Brucella* cinsi bakterilerinin koloni morfolojisine uygun kolonilerin olduğu gözlemlendi. İnek sütünden ve dondurmadan izole edilen şüpheli suşların 2'sinin de aerobik ortamda inkübe edilen Farrell agar besiyerinde ürediği, %5-10'luk CO₂'li ortamda üremediği gözlemlendi.



Şekil 4.1. *Brucella* kolonilerinin Farrell Agar' da görünümü.

Şüpheli kolonilerden ve standart *Brucella* suşlarından hazırlanan preparatlara Gram boyama yapıldı. Şüpheli kolonilerin mikroskopik morfolojilerinin standart şulardan hazırlanan Gram boyalı preparatlarda olduğu gibi gram negatif küçük kokobasiller şeklinde olduğu gözlemlendi.

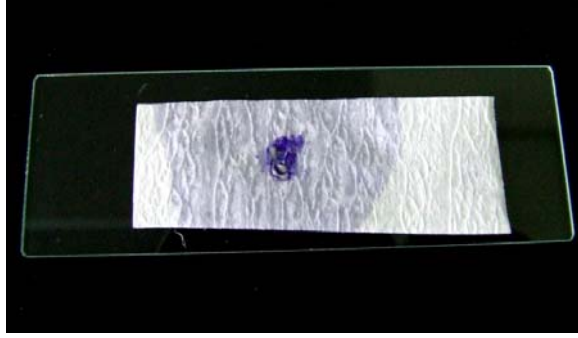


Şekil 4.2. İzole edilen *Brucella* bakterilerinin Gram boyalı preparatta mikroskopik morfolojisi (x100)

Şüpheli kolonilerden oksidaz, katalaz ve üreaz deneyleri yapıldı. Şüpheli izolatların ikisinin de oksidaz, üreaz ve katalaz deneyleri pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.3. İzole edilen *Brucella* bakterilerinin Christensen's üre agar besiyerinde pozitif üreaz aktivitesi.



Şekil 4.4. İzole edilen *Brucella* bakterilerinin pozitif oksidaz deneyi



Şekil 4.5. İzole edilen *Brucella* bakterilerinin pozitif katalaz deneyi

Şüpheli koloniler doğrulama ve tiplendirme amacıyla Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Brucella Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı'na gönderildi. Enstitü laboratuvarında şüpheli izolatlar şu testler uygulandı;

- CO₂ gereksinimi
- H₂S aktivitesi
- Thioninli(20µg/ml) besiyerinde üreme özellikleri
- Bazik Fuksinli (20µg/ml) besiyerinde üreme özellikleri
- A antiserumu ile aglütinasyon
- M antiserumu ile aglütinasyon
- Tbilisi fajında lizis
- Penislinli (5IU) besiyerinde üreme
- Streptomisinli (2i5mg/ml) besiyerinde üreme

- Safraninli(100µg/ml) besiyerinde üreme
- İ-eritritol (1mg/ml) besiyerinde üreme

Örneklerden izole edilen *Brucella* suşlarına yapılan test sonuçları **Çizelge 4.1'** de gösterilmektedir.

İzolat No	Oksidaz	Katalaz	H2S aktivitesi	Üreaz	CO2 ihtiyacı	Thionin (20 µg/ml)	Bazık Fuksin (20 µg/ml)	A antiserumu ile aglütinasyon	M Antiserumu ile aglütinasyon	Tb faji ile lizis	Penisilin(5IU)	Streptomisin (2,5 mg/ml)	Safranin (100 µg/ml)	i- eritritol (1mg/ml)	SONUÇ
119	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biovar 1
D-15	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	<i>B.melitensis</i> biovar 3

Çizelge 4.1. Örneklerden İzole edilen *Brucella* izolatlarının özellikleri

Bakteriyolojik değerlendirme sonucunda 119 nolu inek sütü örneğinden ve D-15 nolu dondurma örneğinden *Brucella* cinsi bakteri izole edildi. 119 nolu inek sütünden izole edilen suş *B. melitensis* biovar 1, dondurma örneklerinden izole edilen D-15 nolu suş ise *B. melitensis* biovar 3 olarak tiplendirildi.

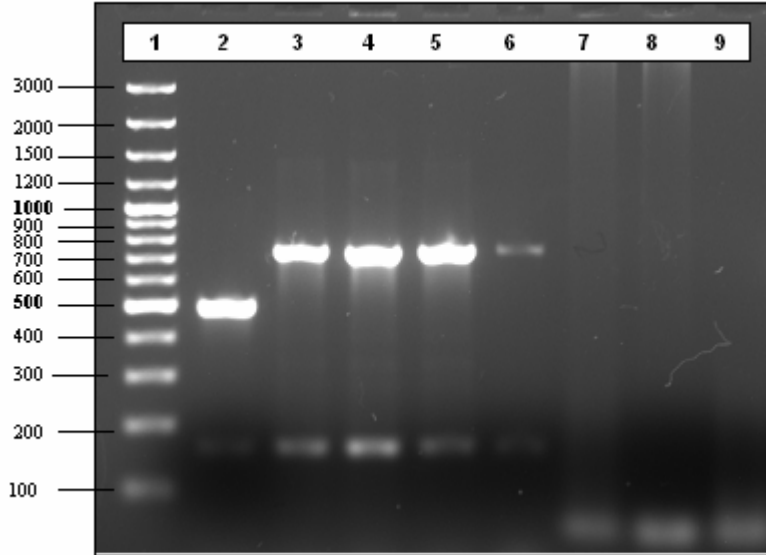
B. melitensis biyovarylarının genelde thioninli besiyerinde üremesi beklenirken 119 nolu süt örneğinden izole edilen *B. melitensis* biovar 1 izolatının thionin içeren besiyerinde üremediği görüldü. Bu çalışmada 119 nolu inek sütünden izole edilen *B. melitensis* biovar 1 suşunun atipik bir izolat olduğu sonucuna varıldı.

Süt örneklerinden PZR ile direkt olarak *Brucella* DNA'sı saptanması işlemi sadece süt örnekleri için gerçekleştirildi. Peynir ve dondurma örneklerine PZR işlemi uygulanmadı.

Bütün süt örneklerinden DNA ekstrakte edildi. DNA ekstraktlarına *B. abortus* spesifik primer, *B. melitensis* spesifik primer ve IS711 spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. PZR işlemi sonucunda amplifiye olmuş DNA'lar agaroz jelde yürütüldü.

Ayrıca bu çalışmada bakteriyolojik değerlendirme sonucunda izole edilen *Brucella* izolatlarına da PZR işlemi uygulandı. 119 nolu inek sütünden izole edilen *Brucella* kolonileri ve D-15 nolu dondurma örneğinden izole edilen *Brucella* kolonilerinden DNA ekstraksiyonu işlemi gerçekleştirildi, *B. abortus* spesifik primer, *B. melitensis* spesifik primer ve IS711 spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. PCR işlemi sonucunda amplifiye olmuş DNA'lar agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. .

Agaroz jelde oluşan DNA bantlarının *B. melitensis* spesifik primerle çoğaltılmış 731 baz çiftlik *B. melitensis* DNA'sı olduğu saptandı. Örneklerden ve izolatlardan PZR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının %1,5' luk agaroz jeldeki görüntüsü **Şekil 4.6'** daki gibidir.



Şekil 4.6. Örneklerden PZR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının %1,5'luk agaroz jelde görüntüsü.

1 nolu kolon;	100 bç'lik DNA step ladder (moleküler ağırlık standartı),
2 nolu kolon;	498 baz çiftlik <i>Brucella abortus</i> 544 standart suşu DNA'sı
3 nolu kolon;	731 baz çiftlik <i>Brucella melitensis</i> 16M standart suşu DNA'sı
4 ve 5 nolu kolon ;	119 nolu inek sütü izolatı
6 nolu kolon;	119 nolu inek sütü örneği
7 ve 8 nolu kolon;	D-15 nolu dondurma izolatı
9 nolu kolon	Negatif kontrol

Agaroz jelde elde edilen görüntüye göre 119 nolu süt örneğinden direkt olarak ekstrakte DNA'nın yüklendiği kuyucukta (6 nolu kolon) oluşan bandın *B. melitensis*

spesifik primerle çoğaltılmış 731 baz çiftlik *B. melitensis* DNA'sı olduğu saptandı. 119 nolu süt örneğinden yapılan kültür işlemi Farrell Agar besiyerinde üreyen *Brucella* kolonilerinden yapılan DNA ekstraksiyonu işlemi sonucunda elde edilen DNA ekstraktlarının yüklendiği kuyucuklarda (4 ve 5 nolu kolon) oluşan bantların da *B. melitensis* spesifik primerle çoğaltılmış 731 baz çiftlik *B. melitensis* DNA'sı olduğu saptandı. 119 nolu süt örneğinin hem PZR ile hem de bakteriyolojik değerlendirme ile *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır.

D-15 nolu dondurma örneğinden Farrell Agar'da üretilen *Brucella* kolonilerinden ekstrakte edilen DNA'nın yüklendiği 7 ve 8 nolu kolonda *Brucella* spesifik primerlerle çoğaltılmış herhangi bir DNA bandına rastlanmadı. Bakteriyolojik değerlendirmeyle *B. melitensis* biovar 3 olarak tanımlanmış izolatın PCR yöntemiyle *Brucella* cinsi mikroorganizma olmadığı saptandı.

Sonuç olarak 240 inek sütü örneğinden 1'inde %0,42 oranında, toplam 457 süt örneğinden ise 1'inde % 0,22 oranında hem kültür hem de PZR yöntemiyle *B. melitensis* biovar 1 izole edildi (**Çizelge 4.2**).

105 dondurma örneğinden 1'i (%0,95) oranında kültür yöntemiyle *B. melitensis* biovar 3 izole edilirken PZR işlemiyle *Brucella* DNA'sı saptanamadı. (**Çizelge 4.4**)

Kültür işlemi ile *Brucella* açısından negatif olarak saptanan bütün süt örneklerinin PZR işlemiyle de *Brucella* açısından negatif olduğu saptandı.

Peynir örneklerinden kültür işlemi ile *Brucella* cinsi mikroorganizma izole edilemedi (**Çizelge 4.3**).

Süt Örnekleri	Örnek Sayısı	Kültür Pozitif örnek sayısı	Yüzde (%)	PCR pozitif örnek sayısı	Yüzde(%)
İnek Sütü	240	1	%0,42	1	%0,42
Koyun Sütü	122	0	% 0.00	0	% 0.00
Keçi Sütü	95	0	% 0.00	0	% 0.00
Toplam	457	1	% 0,22	1	% 0,22

Çizelge 4.2. Süt örneklerinden *Brucella* izolasyon sonuçları

Taze Peynir Örneği	Örnek Sayısı	Kültür Pozitif Örnek Sayısı	Yüzde(%)
Keçi Peyniri	75	0	%0.00
İnek Peyniri	57	0	%0.00
Toplam	102	0	%0.00

Çizelge 4.3. Taze peynir örneklerinde *Brucella* izolasyon sonuçları

Dondurma Örneği	Örnek Sayısı	Kültür Pozitif Örnek Sayısı	Yüzde(%)
Kakaolu	20	0	%0.00
Kaymaklı	75	1	%1,33
Meyveli	10	0	%0.00
Toplam	105	1	%0.95

Çizelge 4.4. Dondurma örneklerinde *Brucella* izolasyon sonuçları

Bu çalışmada izole edilen *Brucella* suşları bahar aylarında izole edilmiştir. *B. melitensis* biovar 1 izole edilen 119 nolu pozitif inek sütü 2007 Mart ayında Mersin iline bağlı Elvanlı köyünden toplanan süt örneğidir. *B. melitensis* biovar 3 izole edilen D-15 nolu dondurma örneği 2007 Nisan ayında Mersin merkezde bir pastaneden alınmıştır (Çizelge 4.5).

Brucella Suşu İzole Edilen Örnekler	Aylara Göre Örneklerden İzole Edilen Brucella Suşu Sayısı				
	2006			2007	
	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	MART	NİSAN
İnek Sütü Örnekleri	0	0	0	1	0
Koyun Sütü Örnekleri	0	0	0	0	0
Keçi Sütü Örnekleri	0	0	0	0	0
Taze Peynir Örnekleri	0	0	0	0	0
Dondurma Örnekleri	0	0	0	0	1
TOPLAM	0	0	0	1	1

Çizelge 4.5. İzole edildiği örneklere ve aylara göre *Brucella* suşları sayısı

5. TARTIŞMA

Bruselloz, insan ve hayvanlarda, *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu bulaşıcı ve genellikle, subakut veya kronik seyirli bir zoonozdur. Sığır, koyun, keçi, domuz, koç gibi hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan bruselloz evcil hayvanlarda önemli kayıplara neden olur. İnsanlarda uzun süren bir hastalığa neden olan bruselloz fizik yetersizliği ve iş gücü kaybına neden olurken, tedavi ve hastane giderleri de önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır. Enfekte hayvanların süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile insanlara bulaştığı için halk sağlığı yönünden de önemlidir (1,2,3).

Bruselloz, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir. Dünyada birçok ülkede bruselloz ile mücadele kampanyaları başlatılmış ve birkaç ülke sığır brusellozunu yok denecek kadar azaltmayı başarmış olmasına karşın, insan brusellozunda en önemli rolü oynayan koyun ve keçi brusellozu ise başta gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünyanın birçok yerinde halen yaygın bir şekilde devam etmektedir. Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ülkeleri, Avustralya ve Yeni Zellanda'da yıllar süren yoğun çabalarla bruselloz büyük ölçüde eradike edilmiştir. Buna karşın bazı Güney Avrupa ülkelerinde, özellikle Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Hint Yarımadası, Afrika, Orta ve Güney Amerika'nın bir kısmında insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir. Akdeniz ülkelerinde ise bu enfeksiyon bir çok hastalık arasında ön sırada yer almaktadır. Türkiye'de ise hayvan bruselloz prevalansı sığır popülasyonunda %1.43, koyun popülasyonunda %1.97 olarak tespit edilmiştir (1, 3, 4, 5, 6, 7)

Hastalık kontrol programları ile hayvanlarda hastalık oranının azaltılmadığı gelişmekte olan ülkelerde insanlarda bruselloz oldukça yaygın görülmektedir. Sütlere pastörizasyon gibi ısı işlemlerin uygulanmadığı, çiğ süt ve süt ürünlerini tüketme gibi beslenme alışkanlıkları ve kötü hijyenik şartlar insanlarda enfeksiyon riskini artırmaktadır. Gelişmiş ülkelerde hastalık, hayvanlarda kontrol altına alındığı halde, gelişmemiş ülkelerde ise bruselloz kontrol altına alınmadığı için halen süt ve süt ürünlerinin tüketimiyle bulaşmaktadır (3).

İnsanlara hastalığın bulaşması, enfekte hayvanlarla direkt temas, sekresyonların derideki çatlak ve çiziklerle teması, aerosollerin inhalasyonu ve pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin (taze peynir, krema vs.) tüketimi ile olur (1, 8, 9, 10, 11).

Dünya’da ve ülkemizde bruselloz için temel bulaş kaynağı pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimidir. Yurdumuzda oldukça fazla miktarda üretilen süt ve süt ürünlerinin büyük çoğunluğunun hijyenik olmayan şartlarda, ilkel yöntemlerle çiğ süttten üretilmekte ve hazırlanmaktadır. Akdeniz yöresinde bruselloz olgularının incelendiği araştırmalarda yöre halkının hastalığı ve bulaş yollarını bilmelerine karşın kaynatılmadan üretilen süt ürünlerinin tüketiminin önlenemediği bildirilmiş, bruselloz olgularının çoğunda ısıt işlemden geçirilmemiş sütlerden tereyağı ve peynirlerin gerek yapımının zor olması gerekse damak zevkine uygun olmaması nedeniyle bu alışkanlıklarını bırakmadan üretime ve tüketime devam ettikleri bildirilmiştir. Bu durumun önüne geçilmediği ve etkin önlemler alınmadığı sürece bruselloz ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak güncelliğini koruyacaktır (12).

Bu nedenle bu çalışmada süt ve süt ürünlerinin bruselloza yol açma riskinin saptanması amacıyla Mersin merkeze bağlı köylerden toplanan çiğ sütlerde, Mersin merkezde kurulan semt pazarlarından ve şarküterilerden toplanan çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynir örneklerinde ve Mersin il merkezinde çeşitli pastanelerden toplanan dondurma örneklerinde *Brucella* cinsi bakterilerin araştırılması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak 240 inek sütü örneğinden 1’inde (%0,42), toplam 457 süt örneğinden ise 1’inde (% 0,22) hem kültür hem de PZR yöntemiyle *B. melitensis* biovar 1 izole edildi. 105 dondurma örneğinden 1’inde (%0,95) kültür yöntemiyle *B. melitensis* biovar 3 izole edilirken besiyerinde üreyen kolonilere uygulanan PZR işlemiyle *Brucella* DNA’sı saptanamadı. Kültür işlemi ile *Brucella* açısından negatif olarak saptanan bütün süt örneklerinin PZR işlemiyle de *Brucella* DNA’sı açısından negatif olduğu saptandı. Peynir örneklerinden kültür işlemi ile *Brucella* izole edilemedi.

Bu çalışma Mersin ilinde süt ve süt ürünlerinde *Brucella* bakterilerinin bulunduğunu ve süt ve süt ürünlerinin Bruselloz bakımından risk oluşturabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada inek sütünden izole edilen *B. melitensis* suşu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından thioninli besiyerinde ürememesi nedeniyle “**atipik bir *B. melitensis* suşu**” olarak tanımlanmıştır. Uluslararası Sistemik

Bakteriyoloji Komitesi- *Brucella* Taksonomisi Subkomitesi, 1994 yılında yapılan toplantıda thionin besiyerinde üremeyen atipik *B. melitensis* suşları gibi çeşitli atipik *B. melitensis* izolatlarının dünyanın çeşitli yerlerinde izole edildiğini hatta kimi ülkelerde sığırlarda *B. melitensis* enfeksiyonlarının *B. abortus* enfeksiyonlarından daha fazla sayıda görüldüğünü bildirilmiştir. Komitede alınan kararda geçerli yöntemlerin atipik *Brucella* izolatlarının tiplendirilmesinde yetersiz kaldığını bu konuda daha fazla çalışma yapılması ve yeni moleküler yöntemler geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (65). Bu konuda Banai ve ark. (66), Corbel MJ. (67) yaptıkları çalışmalarda tüm özellikleri *B. melitensis* biovarlarına uyan fakat thioninli besiyerinde üremeyen atipik *B. melitensis* izolatları saptamışlardır.

B. melitensis'in primer olarak koyun ve keçileri enfekte ettiği bilinmesine karşın bu çalışmada inek sütünden izole edilen suş *B. melitensis* olarak tiplendirilmiştir. Kimi çalışmalarda enfekte keçi veya koyunlarla temas halinde olan ineklerin de *B. melitensis* ile enfekte olabileceği bildirilmiştir (11). Bu çalışmada *B. melitensis*'in izole edildiği inek sütü örneğinin alındığı hayvan sahibinin aynı zamanda keçi de beslediği bilinmektedir. Fakat bu çalışma için süt örnekleri toplandığı sırada keçilerin sağılmış olması nedeniyle süt örneği alınamamıştır. Bu durumda aynı evde beslenen keçilerin de enfekte olabileceği ve etkeni temas yoluyla ineklere bulaştırmış olabileceği düşünülebilir.

Bruselloz en çok bahar ve yaz aylarında görülen bir enfeksiyondur (8, 9, 10, 11). Bu çalışmada izole edilen *Brucella* suşları da bahar aylarında izole edilmiştir. *B. melitensis* biovar 1 izole edilen 119 nolu pozitif inek sütü 2007 Mart ayında Mersin iline bağlı Elvanlı köyünden toplanan süt örneğidir. *B. melitensis* biovar 3 izole edilen D-15 nolu dondurma örneği 2007 Nisan ayında Mersin merkezde bir pastaneden alınmıştır.

Ülkemizde ve dünyada hayvansal gıdalarda *Brucella* varlığının saptanmasına yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır;

Burdur yöresinde inek ve koyun sütlerinde *Brucella* etkenleri ve bu etkenlere karşı oluşan antikörlerin varlığı araştırılarak, enfeksiyonun bölgedeki durumunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, Burdur yöresinden toplanan 630 süt örneğinde *Brucella* türleri izole edilmediği ve bruselloz oranının ineklerde %1, koyunlarda % 3,5 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (68).

Tunçer ve Gökten, İzmir ili civarından toplanan çiğ sütlerde *Brucella* antikorunun bulunma sıklığını saptamak amacıyla süt toplama merkezlerinden toplanan 19 süt örneğine ring testi uygulamış, 7 süt örneğini *Brucella* açısından pozitif olarak değerlendirmişlerdir (69) .

Adıgüzel ve ark.'nın Erzurum ilinde ineklerde *B. abortus* seropidemiyolojisini saptamak amacıyla yaptığı bir çalışmada Erzurum'a bağlı bazı köylerden toplanan 560 süt örneğinden 96 (%17)'sı *B. abortus* antikorları açısından ELISA yöntemi ile pozitif olduğu bulunmuştur (70) .

Güllüce ve Leloğlu'un yaptığı çalışmada Kars merkez ve ilçelerine bağlı, enfeksiyon olduğu bilinen 22 yerleşim biriminden alınan 712 adet inek sütü örneğinde *Brucella* enfeksiyonlarına karşı oluşturulan atikorlar ELISA ve Milk Ring Test (MRT) ile araştırılmış, MRT ile 401(%56), ELISA ile 467(%65,59) pozitif sonuç saptanmıştır (71) .

Uraz ve Yücel, çiğ süt örneklerinde Ring Testi ile *Brucella* varlığının araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada çeşitli yörelerden toplanan 211 çiğ süt örneğinin 32'sinde (% 15.16) Ring testi ile *Brucella* varlığı tespit edilmiştir. Bu 32 örneğin 27'si işletmelere ait süt örneklerinde, 5'i de sokak sütü örneklerinde bulunmuştur. Sütlerde *Brucella* bulunma sıklığı mevsimlere göre incelendiğinde kışın % 28.12(9), ilkbaharda % 34.87(11) ve yazında % 37.50(12) oranında tespit edilmiştir. *Brucella* varlığı tespit edilen süt örnekleri yörelere göre gruplandırıldığında en yoğun 11 örnekle Burdur, 10 örnekle de Ankara ve çevresi bulunmuştur (72).

Samsun'da çiğ sütlerde *Brucella* antikorlarının saptanması amacıyla yapılan bir çalışmada, toplam 100 adet süt örneğinde aglütinasyon testi (Whey-AT) ve Milk Ring Test (MRT) ile *Brucella* antikorlarının varlığı araştırılmış, Milk Ring Test (MRT) sonuçlarına göre inek sütü örneklerinin 10'u (%20), keçi sütü örneklerinin de 6'sı (%12) *Brucella* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Serum aglütinasyon testinde (Whey-AT) saptanan antikor titrelerine göre inek sütü örneklerinin 4'ü pozitif (%8), 3'ü şüpheli (%6), 43'ü negatif (%86), keçi sütü örneklerinin ise 3'ü pozitif (%6), 2'si şüpheli (%4), 45'i de (%90) negatif olarak bulunmuştur (73).

Brezilya’da Langoni ve ark. yaptığı bir çalışmada serolojik yöntemlerle pozitif olarak nitelendirilen ineklerden alınan süt örneklerine bakteriyolojik kültür işlemleri yapılmış, sonuç olarak 49 süt örneğinden 15’inin (%30.61) *B. abortus* açısından pozitif olarak bulunmuştur (74) .

İran’da Zowghi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; çalışmaya dahil edilen 6,472 inekten 1,056’ sısı serolojik olarak pozitif, bu ineklerden alınan 6,472 süt örneğinden 1,632’ sısı ise MRT testi ile pozitif olarak bulunmuştur. Bütün süt örneklerine kültür işlemi uygulanmış, 397 adet *B. abortus* izolatu elde edilmiştir. İzolatların 119’u seronegatif ineklerden izole edilmiştir (75).

Kasimoğlu’ nun yaptığı bir çalışmada, Kırıkkale’de 35 çiğ süt örneği, 35 keçi peyniri ve 35 inek peyniri örneğine bakteriyolojik kültür yapılmış ve 35 koyun peynirinin 5’inde (% 14.2) *B. melitensis* izole edilmiştir. Çiğ süt ve inek peynirlerinde *Brucella* spp. saptanamamıştır (76) .

Kalender ve ark . Elazığ ,Tunceli ve Erzincan illerinden toplanan 78 taze tulum peyniri örneğinden 16’sından (%20.5) *Brucella* izole etmişler, izolatlardan 13’ü *B. melitensis*, 3’ü *B. abortus* olarak tanımlanmıştır (77) .

Alim ve Tomul, Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satılan taze peynirlerde *Brucella* cinsi bakterilerin araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada 2003 yılında toplanan 42 örneğin 3’ünde ve 2004 yılında toplanan 47 örneğin 4’ünde *Brucella* cinsi bakterilerin ürediği görülmüştür (78).

Patır ve Dinçoğlu Elazığ’da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde *Brucella* varlığı üzerine yaptıkları çalışmada toplam 85 adet peynir örneğinden 1’i beyaz peynir örneğinde, diğeri ise tulum peynirinde olmak üzere toplam 2 örnekte *Brucella* izole etmişlerdir. İzolatlardan birisi *B. abortus* , diğeri de *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır (79) .

Namin, İstanbul’da bazı semt pazarlarından topladığı 100 adet taze beyaz peynir ve Pehlivan köy mandırasından alınan 20 taze peynir örneğini incelemiş, 100 adet taze peynir örneğinin 8’inden *Brucella* izole ettiğini bildirmiştir. Mandıradan alınan örneklerden ise *Brucella* izole edilememiştir. İzolatlardan 5’i *B. abortus*, 3’ü ise *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır (80).

Buğdaycı tarafından Kayseri ilindeki ilçe ve semt pazarlarında satışa sunulan çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynirlerden 100 adet örnek alınmış ve yapılan araştırmalar sonucunda örneklerin 13'ü *Brucella* yönünden pozitif bulunmuştur. 13 izolattan 12'si *B. melitensis*, 1'i *B. abortus* olarak tanımlanmıştır (81).

Yıldırıncı tarafından İstanbul ilinde 50 değişik tulum peyniri toplanmış, örneklerin hiçbirinde *Brucella* bakterileri saptanamamıştır (82).

Tunçbilek, Ankara'da tüketime sunulan 100 adet beyaz peynir örneğinin 4'ünden (%4) *Brucella* etkenini izole etmiş, bu etkenlerden 3'ünün *B. melitensis*, 1'inin *B. abortus* olduğunu saptamıştır (83).

Sarısayın ve Eroğlu, Marmara ve Trakya bölgelerinden temin edilen 103 krema (kaymak), 52 tereyağı, 53 dondurma ve 52 kremalı pasta olmak üzere toplam 260 örneğin kültür ve hayvan inokulasyonu yöntemleri ile incelemişler, ancak örneklerin hiçbirisinden *Brucella* spp. izole edememişlerdir (84).

Barrow ve ark. 1161 krema örneğini bakteriyolojik yöntemlerle ve hayvan deneyi yaparak incelemişler ve 19 adet *B. abortus* izolatu saptamışlardır (85).

Taşçı, Ankara'da tüketime sunulan market, pazar ve pastanelerden alınan 35 mutfaklık tereyağı, 35 krema ve 35 kremşantili pasta örneklerinin *Brucella* bakterileri ile kontamine olmadığını bildirmiştir (86).

Küplülü ve Sarımeahmetoğlu, dondurma örneklerinde *Brucella* izolasyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada 214 dondurma örneğinden 5 tanesinde *B. abortus* izole ettiklerini bildirmişlerdir (87).

Mert tarafından 150 peynir örneğinin 29'unda (% 19.33) *Brucella* spp. izole edilmiş, bunlardan 26'sının *B. melitensis* (% 90), 3'ünün *B. abortus* (% 10) olduğu saptanmıştır. Pastörize edildiği bildirilen sütlerden yapılan peynirlerde *Brucella* izole edilemezken, peynir üretiminden 5 gün sonra alınan örneklerde %20'nin üstünde etkenin izole edildiği, bekleme gün sayısı 12 ve yukarısı olan peynirlerde izolasyon yapılmadığı belirtilmiştir (88).

Sancak ve ark. tarafından, 40 adet Van otlu peynir örneğinin 7'sinden (% 17.5) *Brucella* spp. izole edilmiş, bu etkenlerden 6'sı (% 85.7) *B. melitensis* ve 1'i (% 14.3) *B. abortus* olarak tanımlanmıştır (89) .

Ataş, Sivas il merkezinde satışa sunulan 135 adet taze beyaz peynir örneği ile market ve şarküterilerde satışa sunulan 120 adet salamura beyaz peynir olmak üzere toplam 155 peynir örneğinden taze beyaz peynirlerden 8'inde *Brucella* cinsi bakterilerin ürediğini bildirmiştir. İzolatlardan 4'ü *B. melitensis*, 4'ü ise *B. abortus* olarak tanımlanmıştır (90).

Sert . ve Kıvanç yaptığı çalışmada Erzurum piyasasında tüketime sunulan 24 adet civil ve 18 adet taze lor peyniri örneğinde *Brucella* izole edilmemiştir (91) .

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Nisan 2006 - Mayıs 2007 tarihleri arasında Mersin ili merkeze bağlı 10 farklı köyden 240 çiğ inek sütü, 122 çiğ koyun sütü, 95 çiğ keçi sütü örneği, Mersin merkezde bulunan 40 farklı pastaneden 105 dondurma örneği, Mersin merkezde kurulan semt pazarlarında ve şarküterilerde satışa sunulan 102 pastörize edilmemiş çiğ sütlerden yapılmış taze beyaz peynir örneği olmak üzere toplam 664 adet örnek *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırıldı. Peynir örneklerinin toplanması sırasında satıcılardan alınan bilgilere göre 102 adet taze beyaz peynirin 45'inin inek sütünden, 57'sinin keçi sütünden yapıldığı saptandı. 105 dondurma örneğinden 75'i kaymaklı, 20'si kakaolu ve 10'u meyve aromalı dondurmalarıdır.

Sonuç olarak 240 inek sütü örneğinden 1'inde (%0,42), toplam 457 süt örneğinden ise 1'inde (% 0,22) hem kültür hem de PZR yöntemiyle *B. melitensis* biovar I izole edildi.

105 dondurma örneğinden 1'inde (%0,95) kültür yöntemiyle *B. melitensis* biovar 3 izole edilirken Farrell Agar' da üreyen kolonilere uygulanan PZR işlemiyle *Brucella* DNA'sı saptanamadı.

Kültür işlemi ile *Brucella* açısından negatif olarak saptanan bütün süt örneklerinin PZR işlemiyle de *Brucella* DNA'sı açısından negatif olduğu saptandı. Peynir örneklerinden kültür işlemi ile *Brucella* izole edilmedi.

Bu çalışma Mersin ilinde süt ve süt ürünlerinde *Brucella* bakterilerinin bulunduğunu ve süt ve süt ürünlerinin bruselloz bakımından risk oluşturabileceğini göstermiştir.

Klinik materyalden mikroorganizmanın kültür ile izolasyonu günümüzde hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Bakteriyolojik kültür işlemi oldukça özgül bir yöntemdir fakat duyarlılığı örneğe, örnekte bulunan bakteri sayısına ve aynı hastadan ya da hayvandan alınan örnek sayısına göre değişmektedir. Geleneksel kültür yöntemleri ile brusellozun tanısı iki hafta gibi uzun bir süre almakta, ayrıca bakteri sayısının oldukça az olduğu örneklerde kimi zaman mikroorganizma izole edilememektedir. Brusellozun bakteriyolojik olarak tanısı deneyimli mikrobiyoloji uzmanları ve biyogüvenlik kurallarına uygun bir şekilde donatılmış laboratuvarlar gerektirmektedir. Bu dezavantajlar brusellozun laboratuvar tanısında moleküler yöntemlere başvurulması gereksinimini doğurmuştur. Brusellozun hızlı tanısında gelecek vaad eden bir yöntem

olan PZR hızlı, kolay, spesifik ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Uygun laboratuvar koşulları ve deneyimli eleman sağlandığında oldukça duyarlı ve özgül bir yöntem olabilmektedir. PZR örneklerdeki ölü bakterilerden, tek bir bakteri içeren örneklerden ya da başka mikroorganizmalarla yüksek miktarda kontamine olmuş örneklerden bile direkt olarak DNA'yı saptayabilmektedir. Bu konuda PZR'in duyarlılığını ve özgüllüğünü gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fakat klinik örneklerden, hayvansal örneklerden ya da süt ve süt ürünlerinden direkt olarak *Brucella* DNA'sını saptayan PZR yöntemleri oldukça az sayıdadır. Bruselloz tanısında bugüne kadar geleneksel kültür yönteminin yerini alabilecek duyarlılığa sahip standardize bir moleküler yöntem bulunmamaktadır.

Son yirmi yıldır bruselloz enfeksiyonlarında oldukça belirgin bir artış görülmektedir. Hastalığın kontrol altına alınabilmesi için etkili, geçerli ve standardize bakteriyolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve bu konuda daha çok araştırma yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada süt örneklerinden direkt olarak *Brucella* izolasyonu ve identifikasyonu yapmak amacıyla hem bakteriyolojik kültür hem de moleküler tanı yöntemlerinden PZR işlemi kullanılmıştır. İnek sütü örneklerinden 1'nin hem PZR hem de kültür yöntemiyle pozitif olarak saptanması PZR yönteminin altın standart olan kültür yöntemiyle uyumlu olduğunu göstermiştir. Fakat kültür yöntemiyle *Brucella* açısından pozitif bulunan öneğin *Brucella* DNA'sı açısından negatif olarak identifiye edilmesi çalışmada kullanılan PZR yönteminin henüz standardize bir yöntem olmamasından kaynaklanabilmektedir. Dünya' da henüz süt ve süt ürünlerinden PZR ile direkt olarak *Brucella* DNA'sını saptayabilen tam olarak standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır.

Kültürde üretilen bakterilere PZR işlemi uygulanması kolayca gerçekleştirilebilmektedir fakat doku, kan, semen, süt gibi materyallerden PZR ile direkt olarak nükleik asit saptaması oldukça güç olmaktadır. Bu çalışmada PZR ile süttten direkt *Brucella* DNA'sı saptanması işlemi gerçekleştirilebilmiştir.

Brusellozun tanısı ve *Brucella* bakterilerinin doğru bir şekilde tiplendirilebilmesi her mikrobiyoloji laboratuvarında yapılamamakta bu nedenle; izole edilen suşların ülke genelindeki referans laboratuvarlarda tiplendirilmesi daha uygun olacaktır. Ülkemizde bu işlem Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde yapılmaktadır.

Bu çalışma Türkiye’de süt örneklerinden hem geleneksel kültür yöntemiyle hem de PZR ile direkt *Brucella* izolasyonu ve identifikasyonunun yapıldığı ilk çalışmadır. Uygulanan yöntemler ve kazanılan deneyimlerin bundan sonra bu konuda çalışmalar yapmak isteyen araştırmacılar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Ancak Bruselloz tanısında ve *Brucella* izolatlarının tiplendirilmesinde PZR’ın tek başına yeterli bir yöntem olmadığı, kültür ve klasik tiplendirme testleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Gelişmiş ülkelerde yoğun eradikasyon ve kontrol programları uygulanması, süt ve süt ürünlerinin pastörizasyon gibi işlemler uygulanarak tüketime sunulması gibi nedenlerle bruselloz büyük ölçüde eradike olmuştur , fakat 21. yüzyılda Türkiye için halen önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir.

Prevalans çalışmaları ve Sağlık Bakanlığı verileri karşılaştırıldığında hastalık bildirimlerinin tüm olguları kapsamadığı görülmektedir. Bildirim sistemi daha iyi sonuçlar verinceye kadar ülkenin gerçek verilerine ulaşmak amacıyla çok merkezli prevalans belirleme çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır.

Henüz insanlarda kullanılan etkin ve güvenilir bir aşısı olmadığından hastalığın kontrol ve eradikasyonu ancak hayvanlarda eradike edilmesiyle mümkün olacaktır ve gelişmiş ülkelerde eradikasyon bu yolla başarılmıştır. Halkın hastalık ve bulaş yolları konusunda bilinçlendirilmesi, hayvan kesim ve süt işleme merkezlerinin bruselloz yönünden düzenli aralıklarla taranması, süt ve süt ürünlerinin pastörize edilerek tüketiminin sağlanması bruselloz prevelansını önemli ölçüde azaltacak, böylelikle hastalığın kontrol altına alınması sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

1. **Corbel MJ.** Brucellosis: an Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonose. *Emerging Infectious Diseases*. **1997**;3(2)
Erişim : <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol3no2/corbel.htm> .
2. **Taşcı F.** Gıda Kaynaklı Brucellosis ve Önemi. *Uludağ Üniversitesi J. Fac. Vet. Med.* **2004**; 23(1-2-3):137-142.
3. **Anonim.** Brucellosis. T.C.Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü
Erişim: <http://www.tarim.gov.tr> .
4. **Anonim.** Brucellosis. CDC. Centres for Disease Control and Prevention.
Erişim: http://www.cdc.gov/ncidod/dmbd/diseaseinfo/brucellosis_g.htm .
5. **Mustafa AA , Nicoletti P.** FAO, WHO, OIE guidliness for a regional brucellosis control programme for the Middle East. **1995**, France. Erişim : <http://www.fao.org> .
6. **Anonim.** World Health Organisation. Report of the MZCP training course on the establishment of a human and animal Brucellosis national surveillance system, WHO,28-30 October **1993**. Heraklion, Greece. Erişim: <http://www.who.int> .
7. **İyisan AS, Akmaz Ö, Gökçen Düzgün S, Ersoy Y, Eskizmirliler S, Güler, Gündüz K, Işık N, İçyerioğlu AK, Kalender H, Karaman Z, Küçükayan U, Özcan C, Seyitoğlu Ş, Tuna İ, Tunca T, Üstünakın K, Yurtalan S.** Türkiye’de Sığır ve koyunlarda Brucellosis’in Seroepidemiolojisi. *Pendik Vet. Mikrobiyoloji Dergisi*. **2000**; 31(1):21 -75 .
8. **Baysal B.** *Brucella*. Ed: **Ustaçelebi Ş.** *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, **1999**; 571- 577 .
9. **Bilgehan H.** *Brucella*. *Klinik Mikrobiyoloji*. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 10. basım. İzmir. 2000 ; 199-214 .
10. **Shapiro DS, Wong JD.** *Brucella*. In: Murrey PR, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 7. Edition, American Society for Microbiology, **1999**; 625-629 .
11. **Koneman E , Winn W, Alen S, Janda W, Procop G. Schreckenberger P, Woods G.** *Koneman’s Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 8th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. **2006**; 482-490.
12. **YüceA, Çavuş SA.** Türkiye’de Bruselloz: Genel Bakış. *Klinik Dergisi* . **2006**; 19 (3) : 87-97 .
13. **Hoover D.L, Friedlander A.M.** Brucellosis. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare* 513-521. Erişim: http://www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/chemBio/Ch25.pdf .
14. **Davis R, Bickett-Weddle D, Holzbauer S, Gladon J.** Iowa State University Centre for Food Security And Public Health. Presentation: Brucellosis.
Erişim: <https://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ppt/Brucellosis.ppt> .
15. **Diker S, İstanbulluoğlu E, Ayhan H, Soysal G.** Bursa bölgesindeki insanlarda *Brucella canis* infeksiyonları üzerinde serolojik inceleme. *Mikrobiyol Bült* **1984**; 18 (4) : 203-207.
16. **J.A.Stack, A.P.MacMillan,** FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis . Brunet Publications. Erişim: <http://www.moag.gov.il/brunet/> .

17. **Anonim**. International Committee on Systematics of Prokaryotes- Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Erişim: <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm> .
18. **Dizer U**. Bruselloz Ders Notları.
Erişim: http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/infeksiyon/Ders_Notlari/BRUSELLOZ.htm - 142k –
19. **Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N**. Brucellosis in a mother and her young infant :probable transmission by breast milk.. *Int J Infect Dis*. **2000**;4(1):55-6 .
20. **Anonim**. Bruselloz. T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Ve Temel Sağlık Hizmetleri genel Müdürlüğü. *AER Aylık Epidemiyoloji Raporu*. **2004**;3(2) .
21. **Çetin ET, Çoral B, Bilgiç A**. Türkiye’de insanda bruselloz insidansının saptanması. *Doğa-Türk J Med Sci* **1990**; 14: 324-34 .
22. T.C. Sağlık Bakanlığı. İstatistikler / Temel Sağlık Hizmetleri Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yıllığı. Ankara. Sağlık Bakanlığı, **2004**. Erişim: <http://www.saglik.gov.tr> .
23. T.C. Sağlık Bakanlığı. İstatistikler / Temel Sağlık Hizmetleri Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yıllığı. Ankara. Sağlık Bakanlığı, **2005**. <http://www.saglik.gov.tr> .
24. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Ve Kontrol Genel Müdürlüğü Hayvan Hastalıkları İle Mücadele Genelgesi’ne Göre Tespit Edilen 2004 yılında İl Bazında Sığır ve Koyun Brusellozu Prevelansları. Erişim : <http://www.tarim.gov.tr> .
25. **Seimenis A, Morelli D, Mantovani A**. Zoonoses İn Mediteranean Region. *ASS IST Super sanita* **2006**;42(4): 437-445 .
26. **Anonim**. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü: Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Sistemi Yönergesi Erişim : <http://www.saglik.gov.tr> .
27. **Emekdaş G, Aslan G, Tezcan S, Ciragil P, Bayraktar MR, Onlen Y, Aktaş E, Bonsak V, Kanık A**. Brucella seropositivity in South and Southeast Trukeyy. *Saudi Med J*. **2006**; 27(8): 1273-1275.
28. **Anonim**. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı Ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans Ve Laboratuvar Rehberi Erişim : <http://www.saglik.gov.tr> .
29. **Anonim**. Basic Laboratory Protocols for the presumptive identification of Brucella species. Centers for disease Control and Prevention. **2001**.
30. **Yagupsky P**. Detection of Brucellae in blood Culture. Brunet Publications.
Erişim: www.moag.gov.il/brunet/ .
31. **Bilgehan H**. Brusellozun Serolojik tanısı. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış yayınları Fakülteler Kitabevi. İzmir. 4. Basım **2004** : 223- 228.
32. **Bricker.B.J**. PCR as a diagnositic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* **2002**; 90 (435-446).
33. **Fekete A, Bantle JA, Halling SM.** Detection of Brucella by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diag. Invest*. **1992**;4, 79-83.
36. **Herman L, De Ridder H**. Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction . *Appl. Environ. Microbiol*. **1992**; 58:2099-2101.
37. **Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I**. Specific detection of Brucella DNA by PCR . *J. Clin. Microbiol*. **1995**: 33,615-617.

- 38. Rijpens NP, Jannes G., Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM.,** Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ. Microbiol* **1996**; 62, 1683-1688.
- 39. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG.** Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* **1992** ; 95: 271-275.
- 40. Bricker BJ, Halling SM.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **1994**; 32:2660-2666.
- 41. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG.,** DNA sequence and expression of the 36 kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus* . *Infect. Immun.* **1989**; 57:3281-3291.
- 42. Leal-Klevezas DS, Lopez Merino A, Martinez –Soriano JP.** Molecular detection of *Brucella* spp. : rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Arch. Med. Res.* **1995**; 26:263-267.
- 43. Cloackaert A, Verger jm, Grayon M, Grepinet O.** Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25kDa ve 36kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology* **1995**; 141: 2111-2112.
- 44. Cortez A, Scarcelli E, Soares RM, Heinemann MB, Sakamoto SM, Genovez ME, Ferreira F, Richtzenhain LJ..** Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* **2001**; 79, 500-501.
- 45. Çetinkaya B. Ongor H, Muz A, Ertaş HB, Kalender H, Erdoğan HM..** Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet. Rec.* **1999**: 144:239-240.
- 46. Gallien P, Dorn C, Ablan G, Staak C, Protz D.,** Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* **1998**; 142: 512-514.
- 47. Guarino A, Serpe L, Fusco Scarmuzzo A, Gallo P.** Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene specific PCR. *Vet. Rec.* **2000**; 147: 634-636.
- 48. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM.** Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of target sequence on 31 kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* **1996**; 34: 477-478.
- 49. Queipo-Ornuto MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD.** Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35:2927-2930.
- 50. Zerva L, Bourantaz K, Mitka S, Konsouzidou A, Legakis NJ. 2001.** Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1661-1664.
- 51. Tantillo G, Di Pinto A, Vergara A, Bounavoglia C.** Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp in milk and cheese. *J. Food Prot.* 2001; 64: 164-167.
- 52. Leal Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP.** Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* **1995**; 33 : 3087-3090.
- 53. Leal Klevezas DS, Martinez –Vazquez IO, Garcia-Cantu J, Lopez –Merino A , Martinez-Soriano JP.** Use of Polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Vet Microbiol* **2000**; 75: 91-97.
- 54. Romero C, Lopez Goni I.** Improved method for purification of *Brucella* DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**; 65: 3735-3737.

55. **Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lopez Goni I.** Evaluation of PCR and indirect enzyme linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol*. **1995** ; 33: 3198-3200.
56. **Rijpens NP, Jannes G., Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM.** Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ. Microbiol*. **1996**; 62:1683-1688.
57. **Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzzo A, Fenizia D.** Single step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J. Dairy Research*. **1999**; 66: 313-317.
58. **Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S., Barathur RR.** A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and /or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J of Clin Microbiol* **2000**; 38; 2602-1610.
59. **Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK.** Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol*. **2001**; 83: 37-34.
60. **Roushan MRH, Mohraz M, Hajiahmadi M, Ramzani A, Valayati AA.** Efficacy of gentamicin plus doxycycline versus streptomycin plus doxycycline in the treatment of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* **2006**; 42 (8): 1075–80.
61. **McLean DR, Russell N, Khan MY).** Neurobrucellosis: Clinical and therapeutic features. *Clin Infect Dis* .**1992**; 15: 582–90.
62. **Farrell ID.** The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci*. **1974** ;16(3):280–286.
63. **Farrell ID, Robertson L.** A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of brucellae from milk. *J Appl Bacteriol*. **1972** ; 35(4):625–630.
64. **Hamdy M.E.R , Amin AS.** Detection of *Brucella* species in the milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *The Veterinary Journal*. **2002**; 163: 299-305.
65. **Corbel MJ.** Atypical *Brucella melitensis* strains. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. 1994. Prague. Czech Republic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2006**; 56: 1169-1170.
66. **Corbel MJ.** Identification of dye sensitive strains of *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29(5) : 1066-1068.
67. **Banai M, Mayer I, Cohen A.** Isolation, identification and characterization in Israel of *Brucella melitensis* Biovar I atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *J of Clin Microbiol*. **1990**; **28 (5): 1057-1059.**
68. **Türütoğlu H, Mutluer M ,Uysal Y.** Burdur Yöresinde Toplanan Sütlerin *Brucella* İnfeksiyonu Yönünden Araştırılması. *Türk J. Vet Anim Sci* **2003**; 27: 1003-1009.
69. **Tunçer G, Gökten D.** İzmir ili civarından toplanan çiğ sütlerde *Brucella* antikorunun bulunma sıklığı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti dergisi* **1994**; 24 (3-4) :174-175.
70. **Adıgüzel A, Güllüce M , Algur ÖF.** Erzurum'a bağlı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde *Brucella abortus* antikorlarının ELISA ile araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* **2004**; 18(2) :187-191.

- 71. Güllüce M, Leloğlu N.** Kars ve Çevresinde süt sığırlarında Brucella abortus! A karşı oluşan antikorların ELISA ve MRT ile saptanması, sonuçlarının karşılaştırılması. *Tr. J of Veterinary and animal Sciences* **1996** ; 20:251- 255.
- 72. Uraz G., Yücel N.** Çiğ Süt Örneklerinde Ring Testi İle Brucella Varlığının Araştırılması.Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. Ankara. **1998** ; 11(2).
- 73. Terzi G.** Samsun Bölgesinden Toplanan Sütlerde Milk Ring Test Ve Aglütinasyon Testi İle Brucella Antikorumunun Araştırılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **2006**: 5 (3):196-200.
- 74. Langom H, Ichihara SM, Silva AV.** Isolation of brucella spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci* , **2000** ; 37(6):0-0.
- 75. Zowghi E,Ebadi A, Mohseni B.** İsolation of Brucella organisms from the milk of seronegative cows. *Rev Sci Tech.* **1990**; Dec;9(4):1175-8.
- 76. Kasımoğlu A.** Determination of Brucella spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kırıkkale. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.***2002** ; 109: 324-326.
- 77. Kalender H., Özcan C. ,Aslan N.** Taze Tulum Peynirlerinden Brucella İzolasyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.* **2001**;31(3-4):184-186.
- 78. Alim A, Tomul ZD,** Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satılan taze peynirlerin Brucella yönünden araştırılması. *Mikrobiyoloji Bült* **2005**; 39 : 219-223.
- 79. Patır B., Dinçoğlu AH.** Elazığ’da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde *Brucella spp.* ‘nin varlığı üzerine araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Veteriner)* **2001**; 15 (1) : 15-22.
- 80. Namin SA.** İstanbul’ da bazı semt pazarlarından toplanan beyaz peynir örneklerinde Brucella bakterilerinin aranması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı.*Yüksek Lisans Tezi.* **1990.**
- 81. Buğdaycı K.** Kayseri ilinde çiğ sütlerden yapılan taze beyaz peynirlerde Brucella spp. aranması.İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı.İstanbul. *Doktora Tezi.* **2003.**
- 82. Yıldırıncı G.** İstanbul Piyasasında Satışa Sunulan Tulum Peynirlerinde Brucella etkenlerinin mevcudiyeti üzerine yapılan araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. *Doktora Tezi.* **1993.**
- 83. Tunçbilek M.** Ankara piyasasında satılan taze beyaz peynirlerin Brucellosis riski yönünden incelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. *Yüksek Lisans Tezi.* **1992.**
- 84. Sarısayın F, Eroğlu M.** Marmara ve Trakya Bölgesinde Üretilen Tereyağ, Krema (Kaymak) ile Bunlardan Yapılan Pasta ve Dondurmanın insanlardaki *Brucella* İnfeksiyonu Yönünden Rolü. *Pendik Vet Bak Ser Enst Derg* **1978**; 10(1): 22-29.
- 85. Barrow GI, Path MC; Miller DC, Johnson DL, Hinston CWJ.** Brucella abortus in Fresh cream and cream products. *British Med. J.* **1968**; 2: 596 - 601.
- 86. Taşçı F.** Ankara’da Tüketime Sunulan Mutfaklık Tereyağı, Krema ve Krem Şantili Pastaların *Brucella* spp. Yönünden İncelenmesi. Ankara Üniv Sağlık Bil Enst, Ankara. *Doktora Tezi.* **2003.**
- 87. Kuplulu O, Sarimehmetoğlu B.** Isolation and Identification of *Brucella spp.* in ice cream. *Food Control.* **2004**; 15(7) 511-514.

88. Mert A. Ankara yöresinde pazarlanan taze beyaz peynirlerde *Brucella*'ların varlığı üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. *Doktora Tezi*.**1984**.

89. Sancak YC , Boynukara B, Yardımcı H. Van Otlı Peynirlerinde *Brucella*'ların Varlığı ve Dayanma Süresi Üzerinde Bir Araştırma. *Veterinarium* . **1993**; 4(1):1-3.

90. Ataş M. Sivas il merkezinde satışa sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin *Brucella* bakterileri yönünden incelenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. *Yüksek Lisans Tezi*. **2006**.

91. Sert, S. ve Kıvanç, M. Erzurum piyasasında tüketimesunulan beyaz peynirlerin hijyenik kaliteleri üzerine bir araştırma. *Atatürk Üniv., Zir. Fak. Derg.*, **1984**; 15(3-4): 79-89.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Mersin ilinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 2000 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı ve 2004 yılında mezun oldu. 2004 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak atandı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenim görmekte ve Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.