

**T.C.**  
**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**KOMPLİKASYONLU VE KOMPLİKASYONSUZ BRUSELLOZ  
OLGULARININ SİTOKİN PROFİLLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. KEMAL AVŞAR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Yrd.Doç.Dr. ONUR KAYA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1385 proje  
numarası ile desteklenmiştir.**

**2008-İSPARTA**

**T.C.**  
**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**KOMPLİKASYONLU VE KOMPLİKASYONSUZ BRUSELLOZ  
OLGULARININ SİTOKİN PROFİLLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. KEMAL AVŞAR**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Yrd.Doç.Dr.ONUR KAYA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1385 proje  
numarası ile desteklenmiştir.**

**2008-İSPARTA**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emeği olan başta Prof. Dr. Güler Yaylı olmak üzere sonsuz sabrı, emeği ve yetişmemdeki katkısı nedeniyle Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akçam'a, tez çalışmam sırasında bana maddi, manevi desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Onur Kaya'ya, bölümümüzdeki tüm asistan arkadaşlarıma, laboratuvar çalışması sırasında desteğini ve yardımını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Recep Sütçü'ye, Biyokimya Anabilim Dalı asistanlarından Medine Cüre'ye, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı teknisyenlerinden Hakan Doğangönül'e, istatistik konusunda yardımlarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı asistanlarından Tufan Nayır'a, desteklerini esirgemeyen bölümümüzdeki tüm hemşire arkadaşlarıma, personele ve desteğinden dolayı kız kardeşim Nilüfer Negiz'e teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

Önsöz	II
İçindekiler	III-IV
Kısaltmalar	V
Tablo listesi	VI
Grafikler-şekiller	VII
Özet	VIII
Summary	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Bruselloz	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Etken	2
2.1.2.1. Kültür özellikleri	3
2.1.2.2. Antijenik yapı	3
2.1.2.3. Dirençlilik	4
2.1.3. Patogenez	4
2.1.4. Epidemiyoloji	5
2.1.5. Klinik	6
2.1.6. Komplikasyonlar	6
2.1.7. Tanı	10
2.1.7.1. Etkenin izolasyonu	10
2.1.7.2. Serolojik tanı	11
2.1.7.2.1. Standart Tüp Aglütinasyonu	11
2.1.7.2.2. Coombs serumu testi	11
2.1.7.2.3. Lam aglütinasyon testi(Rose Bengal testi)	12
2.1.7.2.4. ELISA	12
2.1.7.2.5. PZR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	12
2.1.8. Tedavi	12
2.1.9. Prognoz	14
2.1.10. Korunma	15
2.2. İmmunite	15
2.2.1. Doğal immunité	15
2.2.2. Edinsel immunité	16
2.2.3. İmmun sistemin hücreleri	16
2.2.4. Kompleman sistemi	18
2.2.5. İmmunglobulinler	19
2.2.6. Sitokinler	19
2.2.7. Bruselloz ve immunité	21

<b>3. MATERYAL</b>	25
3.1. İstatistik	27
<b>4. METOD</b>	28
4.1. Standart tüp aglütinasyonu ve coombs testinin uygulanması	28
4.1.1. Standart tüp aglütinasyonunun uygulanması	28
4.1.2. Coombs testinin uygulanması	28
4.2. Hasta ve kontrol grubu serumlarının ayrılması ve saklanması	28
4.3. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 düzeylerinin belirlenmesi	29
4.3.1. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile IFN- $\gamma$ düzeyinin belirlenmesi	29
4.3.2. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile IL-2 düzeyinin belirlenmesi	30
4.3.3. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile IL-6 düzeyinin belirlenmesi	31
4.3.4. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$ düzeyinin belirlenmesi	32
4.3.5. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile IL-10 düzeyinin belirlenmesi	33
<b>5. BULGULAR</b>	34
<b>6. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	42
<b>KAYNAKLAR</b>	47

## KISALTMALAR

Th	: T helper
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF- $\beta$	: Tümör Nekroz Faktör Beta
IFN- $\gamma$	: İnterferon-gama
IL	: İnterlökin
LPS	: Lipopolisakkarit
DMP	: Dış Membran Proteini
KB	: Kompleman Birleşmesi
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
STA	: Standart Tüp Aglütinasyonu
ELISA	: Enzyme Linked İmmunosorbent Assay
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
RNA	: Ribonükleik asit
TMP-SMZ	: Trimetoprim-Sulfametoksazol
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Faktör-Beta
CD	: Cluster of Differentiation
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
ml	: Mililitre
$\mu$ lt	: Mikrolitre
Ig	: İmmunglobulin
APC	: Antijen Presenting Cell
Fc	: Fragment Crystallizable
Fab	: Fragment Antijen Binding
MIK	: Minimum İnhibitor Konsantrasyon
PAF	: Platelet Aktive edici Faktör
GM-CSF	: Granülosit Monosit Koloni Stimüle edici Faktör
CRP	: C-Reaktif Protein
CR	: Kompleman Reseptörü
NK	: Naturel Killer
Liyofilize	: Yüksek vakumda kurutulmuş

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. İnsanda enfeksiyon yapan <i>Brucella</i> suşlarını ayıran özellikler	3
Tablo 2. IFN- $\gamma$ seri dilüsyonlarının hazırlanması	29
Tablo 3. IL-2 seri dilüsyonlarının hazırlanması	30
Tablo 4. IL-6 seri dilüsyonlarının hazırlanması	31
Tablo 5. TNF- $\alpha$ seri dilüsyonlarının hazırlanması	32
Tablo 6. IL-10 seri dilüsyonlarının hazırlanması	33
Tablo 7. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaş ortalamalarına göre dağılımı	34
Tablo 8. Hasta ve kontrol grubunun meslek özelliklerine göre dağılımı	34
Tablo 9. Hasta grubunun semptomların başlama zamanına göre dağılımı	34
Tablo 10. Hasta grubunun predispoze edici faktörlere göre dağılımı	34
Tablo 11. Organ tutulumu gösteren komplikasyonlu hasta grubu	35
Tablo 12. Komplikeasyonlu hasta grubunun laboratuvar parametreleri	35
Tablo 13. Komplikeasyonsuz hasta grubunun laboratuvar parametreleri	36
Tablo 14. Komplikeasyonlu hasta grubunda sitokin düzeyleri	36
Tablo 15. Komplikeasyonsuz hasta grubunda serum sitokin düzeyleri	37
Tablo 16. Kontrol grubunun serum sitokin düzeyleri	38
Tablo 17. Hasta ve kontrol grubunun serum sitokin düzeyleri ortalamaları	39
Tablo 18. Komplikeasyonlu ve komplikeasyonsuz hasta grubunda sitokin düzeyleri ortalamaları	40
Tablo 19. Komplikeasyonlu ve komplikeasyonsuz hasta grubunda serum CRP, sedimentasyon değerlerinin ortalamaları	41
Tablo 20. Komplikeasyonlu ve komplikeasyonsuz hasta grubunda STA değerlerinin sıklığı	41

## GRAFİKLER- ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. Kompleman sistemi	18
Grafik 1. Hasta ve kontrol gruplarının sitokin düzeylerinin karşılaştırılması	39
Grafik 2. Komplikeyonlu ve komplikeyonsuz hasta gruplarının sitokin düzeylerinin karşılaştırılması	40



## ÖZET

### **Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz bruselloz olgularının sitokin profilleri**

Bruselloz çeşitli yollarla insana bulaşabilen, etkeni *Brucella spp* olup, dünyada ve ülkemizde yaygın görülen zoonotik bir hastalıktır. Yöremizde endemik olarak bulunmaktadır. Fakültatif hücre içi bakteridir. Bu nedenle tedavisi uzun sürmekte ve hastalık relaps ve reenfeksiyonlarla karşımıza çıkabilmektedir. Tüm sistemleri etkileyebilen hastalık nadir de olsa kalıcı sekellere ve hatta ölümlere yol açabilmektedir.

Bu çalışmada bruselloz olgularının tedavi öncesi serumlarında IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  düzeylerini ELISA yöntemi ile belirlenmiş olup, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı tedavi öncesi sitokin düzeylerinin tespiti ile komplikasyonlu hastalarda gözlenebilecek yeni immun parametreler bulmaktır.

Bu çalışma 40 bruselloz hastası, 40 gönüllü içermektedir. Çalışma sonucunda hasta grubunda serum IFN- $\gamma$  düzeylerinin daha yüksek olduğu ve anlamlı olduğu saptanırken ( $p<0,05$ ), diğer sitokinler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Komplikasyonlu grup ile komplikasyonsuz grup karşılaştırıldığında ise komplikasyonlu hasta grubunda serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Serum CRP düzeyleri komplikasyonlu hasta grubunda daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sonuç olarak Bruselloz tipl hücresel immunitenin daha ön planda olduğu bir hastalıktır. Komplikasyonlu hastalarda olgu sayıları artırılarak yeni çalışmalar yapılmasını öneriyoruz.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, immunité, sitokinler

## SUMMARY

### **Cytokine profiles in patients with complicated and noncomplicated Brucellosis**

Brucellosis that occurred by *Brucella spp* is an important zoonotic disease which can be contagious to people with several ways and seen widespread in Turkey and in the world. It exists as an endemic in our region. It is a fakultative intracelluler bacteria. So the treatment of the disease takes a long time and disease may occur with relapse and reinfections. Disease which can affect all the systems, rarely can cause permanent sequelas and moreover deaths.

In this study, the levels of IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  have been determined by ELISA method in brucellosis cases pre-treatment serums and compared with a control group. The aim of this study is to find new immun parameters that can be observed in patients with complication by determination of pre-treatment cytokin levels.

This study includes 40 brucellosis patients and 40 volunteers. According to the findings of the study, it is found that levels of serum IFN- $\gamma$  is higher and significant in patient group ( $p<0.05$ ). Other cytokins are not found significant as statistical. ( $p>0.05$ ). In the comparison of with and without complicated groups, it is found that the levels of serum TNF- $\alpha$  is higher and significant as statistical in patient group with complicated ( $p<0.05$ ). The levels of serum CRP is found significant in patient group with complicated ( $p<0.05$ ). As a result, Brucellosis is a disease which type 1 cellular immunity stands in the forefront. We suggest that new studies should be done for the complicated patients by raising the number of the cases

Key words: Brucellosis, immunity, cytokins

## 1. GİRİŞ

Bruselloz temelde bir hayvan hastalığı olup enfekte hayvanların; etleri, sütleri, idrar, vücut sıvıları, gebelik materyali, enfekte süt ile hazırlanan bazı süt ürünleri aracılığı ile insanlara bulaşan zoonotik bir hastalıktır (1).

Gelişmiş ülkelerde tamamen ortadan kaldırılmakla birlikte, hayvancılığın yoğun, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketiminin yaygın olduğu ülkemizde içinde bulunduğu gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (2).

Bruselloz vücudun herhangi bir sistemini veya organını tutabilen sistemik bir hastalıktır. Komplikasyonla seyreden bruselloz olgularının %20-60'ında da osteoartiküler tutulum gözlenirken, gastrointestinal sistem, santral sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, genitouriner sistem, hematolojik sistem ve deri tutulumu daha nadir gözlenmektedir (3).

Brusella konağın fagositik hücreleri içinde yaşayabilen fakültatif intrasellüler bir bakteridir. Bakterileri öldürme mekanizmalarına direnç göstermektedir (4).

T helper (Th1/Th2) dengesi bruselloza direnç veya duyarlılığın oluşmasında, sitokinler ise brusellozun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadırlar (5).

Farelerde yapılan çalışmalarda, brusellozun Tip 1 (Th1) hücrel immun yanıtı uyardığı gösterilmiştir. Tip 1 hücrel yanıt hastalığın başlangıcında üretilen tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-12'nin kontrolü altında gelişmektedir (6).

Son zamanlarda insanlarda yapılan çalışmalarda da hastalığın başlangıcında Th 1 hücrel immun yanıtın dominant olduğu gösterilmiştir (7).

Bruselloz çeşitli klinik görünümde ortaya çıkabilen, komplikasyonlarla seyredabilen, nüks ve relapsların olabildiği bir hastalıktır. Bu nedenle brusellozda immunitenin araştırılması önemlidir. Çalışmamızda komplikasyonlu ve komplikasyonsuz bruselloz olgularında, kontrol grubu ile karşılaştırmak suretiyle IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sitokin düzeylerini araştırdık. Böylece brusellozun takibinde immun değişiklikler açısından yeni kriterler elde etmeyi hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bruselloz:

Bruselloz brusella cinsi bakterilerin oluşturduğu koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanların etleri, süt, idrar gibi vücut sıvıları, enfekte süt ile hazırlanan süt ürünleri, enfekte hayvanın gebelik materyali aracılığı ile bulaşması sonucunda, kliniğinde titreme ile yükselen ateş, kas ve büyük eklem ağrılarının görüldüğü ve farklı klinik tabloları taklit edebilen bir hastalıktır (8).

#### 2.1.1. Tarihçe:

Sir David Bruce 1887 yılında Malta adasında, Malta humması adı verilen hastalıktan ölmüş İngiliz askerlerinin dalağından ilk defa *Brucella melitensis*'i izole etmiştir. *B. abortus* ise 1897 yılında Bang tarafından, Danimarka'da, doğum yapan sığırların uterus duvarı salgısından izole edilmiş, Traum 1914'te ABD'nin İndiana eyaletinde prematüre doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden *B. suis*'i saptamıştır. Bunları, Avustralya ve Yeni Zelanda'da epididimitli koçlardan *B. ovis*, ABD'nin Utah eyaletinde orman kenesinden *B. neotomae*, Rusya ve Alaska'da ren geyiğinden *B. rangiferi tarandi*, deniz memelilerinden *B. maris'in* izole edilmesi takip etmiştir. Av köpeklerinde salgınlar yapan *B. canis* ise ilk kez 1977'lerde, bir kadın hastadan, saptanmıştır (1).

Ülkemizde ilk defa 1915 yılında Hüsamettin Kural ve Mahmut S. Akalın tarafından, Kuleli hastanesinde bir askerde *B. melitensis* saptanmıştır. 1931'de Zühtü Berke sığırlardan; 1943'de Golem, 1944'de ise Köylüoğlu ve Aktan koyun ve keçilerden, brusella cinsi bakterileri izole etmişlerdir (1,9).

#### 2.1.2. Etken:

Brusella cinsi bakteriler; küçük, hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz olup, 0,5-0,7 mm eninde, 0,6-1,5 mm boyunda Gram negatif, kokobasil şeklindedir (10).

Brusella bakterileri; H<sub>2</sub>S üretmeleri, üreyi hidroliz etmeleri, tiyonin ve bazik fuksine dirençli olmalarına göre türlere ayrılırlar. İnsanlar için enfektif olabilen dört tür: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis* ve *B. suis*'tir. *B. neotomae* ve *B. ovis*'in insanlarda hastalık etkeni olabileceği ispatlanmamıştır (10).

Brusella bakterilerinin ortak biyoşimik özellikleri; katalaz ve çoğu kez oksidaz olumlu olmaları, İndol ve asetil metil karbinol (Voges Proskauer) oluşturmamaları ve metil kırmızısı testinin olumsuz olmasıdır (3).

Brusella türlerinin ayırımında bazı boyalar önemli rol oynamaktadır. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* ayırımı için sözkonusu olan özellikler tablo 1'de verilmiştir (3).

Tablo 1. İnsanda enfeksiyon yapan *brucella* suşlarını ayıran özellikler

Test	<i>B.abortus</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.suis</i>	<i>B.canis</i>
Bazik fuksin	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı
Tiyonin	Duyarlı	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Üre hidrolizi	>90 dk	>90 dk	<90 dk	<90 dk
H <sub>2</sub> S oluşumu	2-5 gün	yok	1-6 gün	Yok
Tb fajı ile lizis	+	-	-	-
CO <sub>2</sub> gereksinimi	+/-	-	-	-

Brusella türleri arasında yapılan DNA hibridizasyon ve homoloji deneylerinde tüm türlerin aynı tür sayılabilecek kadar yakın benzerlikler gösterdiği bulunmuştur. Ancak gösterdikleri biyokimyasal ve konak ayrılıkları nedeniyle ayrı türler olarak kabul edilmeleri uygun görülmüştür. Her bir brusella türünün biyokimyasal ve fizyolojik özellikleriyle birbirinden ayrılabilen çeşitli biyotipleri vardır. *B. melitensis*'te üç, *B. abortus*'ta dokuz ve *B. suis*'te dört biovar ayırt edilmiştir (11).

#### 2.1.2.1. Kültür özellikleri:

Brusella türleri hücre içi yaşadıklarından, beslenme ihtiyaçları özellikle ilk izolasyonda kompleks besiyerlerinin kullanılmasını gerektirir. Et özeti, triptoz gibi kompleks peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler. Bazı türler için tiamin, niasin, nikotinik asit, vitaminler ve biotin, bazen serum gerekebilir. Jelozdaki kolonileri küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, şebnem tanesine benzeyen, kaygan, S (smooth) şeklindedir (1).

Optimal üreme ısısı 37 °C olup, 10-40 °C'de de üreyebilirler. Optimal pH : 6,7-7,4'tür. Zengin besiyerlerinde düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak koloniler oluştururlar. Kolonileri hemoliz yapmaz ve pigmentsizdirler. *B.melitensis* ve *B.abortus*'un bazı türlerinin kolonileri, eski kültürlerde esmer renkte görülebilir. *B.ovis* ve *B.canis* kolonileri normal olarak pürüzlü R (rough) koloni şeklindedir (1,11).

#### 2.1.2.2. Antijenik yapı:

Gram negatif bakterilerde olduğu gibi, brusella cinsi mikroorganizmaların yüzey katmanları en içte stoplazma membranı, bunu çevreleyen lipopolisakkarid (LPS), DMP (dış membran proteini) ve fosfolipid içeren hücre duvarı şeklindedir. Birçok çalışmada brusella antijenlerinin tüm suşlarda ortak olduğu, somatik LPS antijenlerinin 'S' tipinde olan ve olmayan suşlarda farklılıklar gösterdiği; DMP'nin ise değişik türlerde değişik yapıda olduğu gösterilmiştir. Brusella bakterilerinin 'S' tipi koloni oluşturan suşlarında aglütinasyon reaksiyonlarından sorumlu A ve M antijenlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *B.melitensis*'te daha çok M ve daha az miktarda A antijeni bulunmasına karşılık, *B. abortus* ve *B. suis*'te daha çok A ve daha az M antijenleri yer alır (11,12). Bunun yanında brusella bakterilerinin *Salmonella* cinsi bakterilerde bulunan Vi antijenlerine benzer L antijenleri vardır. Bu antijen genelde *B. abortus* suşlarında olup yeni izole edilen bakterilerde vardır ve immün serumlarla aglütinasyona engel olmaktadır (13).

Bu antijenlerden S tipi kolonilerdeki suşların lipopolisakkarid antijenleri (S-LPS) aglütinasyon, kompleman birleşmesi (KB) ve Rose-Bengal (RB) testlerinde rol oynayan en önemli antijenlerdir (12).

### **2.1.2.3. Dirençlilik:**

Brusella bakterileri ısı ve dezenfektanlara karşı dayanıksızdırlar. Nemli toprakta iki ay, suda 15 gün, kültürlerde ve soğukta üç ay, tereyağında dört ay kadar canlı kalabilirler. 60 °C'de on dakika, % 0,1 fenolde 15 dakikada tahrip olurlar. Normal mide asit pH'sı mikroorganizmayı öldürmeye yeterlidir. Hayvanların barındığı ahırlarda altı hafta canlılığını sürdürebilir. Pastörizasyon esnasında çabuk ölmelerinin epidemiyolojik bir değeri vardır. Bunlar dışında % 10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, % 17 tuz içeren salamura peynirde ise bir ay yaşayabilirler (8,11).

### **2.1.3. Patogenez:**

Brusella bakterileri gastrointestinal sistem, deri, nadiren de solunum yolu veya diğer mukoza yüzeylerinden alındıktan sonra, nötrofiller ve doku makrofajları tarafından alınarak bölgesel lenf bezlerine transfer edilirler. İlk üremesini bölgesel lenf bezlerinde yaparlar ve kan yolu ile tüm vücuda özellikle retikuloendotelial sistem (RES) organlarına (karaciğer, dalak, kemik iliği vb.) dağılırlar. Bakteriler yerleştikleri organlarda epitel hücreleri, nötrofiller, lenfositler ve dev hücrelerden oluşan granülom formasyonlarına yol açarlar. Zaman zaman polimorfonükleer hücreleri lizise uğratarak dolaşıma salınırlar ve endotoksinleri sayesinde hastalığın semptom ve belirtilerini meydana getirirler (8,14,15).

İnkübasyon süresi 2-3 hafta olup, *B. melitensis* ve *B. suis*, *B. abortus* ile *B. canis*'ten daha virülandır. Konağın nutrisyonel ve immun durumu, inokulum miktarı ve bulaşma yolu hastalığın belirleyici faktörleridir (14).

Brusella fakültatif hücre içi bakterisidir. Smooth lipopolisakkarit (LPS)'e sahip brusella bakterileri olan *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* rough tipi LPS'e sahip olan *B. canis*'e göre polimorfonükleer ve mononükleer lökositler içerisinde daha kolay canlılığını sürdürür. Bakterinin hücre içinde canlılığını sürdürmesinde, Cu-Zn superoksit dismutaz eritroz fosfat dehidrogenaz içermesi ve stresle indüklenebilir proteinleri salgılamasının rolü olabileceği düşünülmektedir. En önemli virulans faktörü ise nötrofillerde myeloperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemini baskılayan, TNF üretimini inhibe eden, makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunun engelleyen ve oksidatif hasara karşı koruyan adenin ve guanin monofosfat gibi bazı maddeleri sentezlemesidir (3,14).

Büyükbaş hayvanların plasenta ve amniyotik sıvılarında brusella bakterileri için karbonhidrat kaynağı olan eritritol yapısında bir madde izole edilmiş olup, gebe hayvanların brusella bakterisine duyarlı olmaları buna bağlanmaktadır (16). İnsan plasentasında ise eritritol bulunmaz. Brusella bakterileri sığır, keçi, domuz gibi hayvanların genital organlarına yerleşerek abortus ve steriliteye sebep olurlar. İnsanlarda ise eritritol bulunmaması sebebiyle, bruselloza bağlı düşük riski diğer bakteriyel enfeksiyonların seyrinde görülebilecek düşük riskinden fazla değildir (8,11).

Brusellozda karakteristik histopatolojik görünüm; dalak, kemik iliğinde epitelioid hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerle çevrili granülomlardır. Deney hayvanlarının dokularında, *B. abortus*'un granülomlar, *B. melitensis* ile *B. suis*'in ise abse oluşturduğu gösterilmiştir (3,8).

Sonuç olarak bakteri hücre içi ortamda üremesine devam eder ve RES dokularında hücre proliferasyonuna bağlı organomegali meydana gelir. Enfeksiyonun daha sonraki dönemlerinde immünite gelişir ve makrofajlar aktive olur. Mikroorganizma öldürülür ve böylece endotoksinler açığa çıkar. Vücudun endotoksinlere cevap vermesiyle tipik klinik belirtiler ortaya çıkar (14).

#### **2.1.4. Epidemiyoloji:**

Bruselloz brusella bakterilerinin yol açtığı, en sık görülen zoonotik hastalıklardan birisi olup, tüm olgularda doğrudan veya dolaylı olarak enfekte bir hayvan ile temas söz konusudur. 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. Tüm dünyada yıllık 500 000 yeni bruselloz olgusunun görüldüğü tahmin edilmektedir (17).

Ülkemizde hayvanlar arasında oldukça yaygın bir hastalıktır. Özellikle Ankara ovasında, Konya yöresinde, Güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır ve Urfa yörelerinde hayvanlarda yaygınlık daha fazladır. Kırsal kesimde daha çok *B. melitensis* enfeksiyonu görülürken, büyük şehirlerde daha çok *B. abortus* enfeksiyonuna rastlanır (8). Bruselloz seroepidemiolojisi konusunda 1987 yılında yapılan çalışma sonunda ülkemizde normal popülasyonda bulunmuş olan seropozitiflik % 1,8 olarak saptanırken, risk gruplarında % 6 olarak bulunmuştur. En yüksek pozitifliğin ise Diyarbakır, Konya ve Antalya yörelerinde olduğu belirlenmiştir (18).

*B. melitensis* koyun, keçi ve deve, *B. abortus* sığırlarda, *B. suis* domuzda ve *B. canis* köpeklerde hastalık yapmaktadır. Hayvanlarda düşük nedeni olabilmektedirler. Hastalığın insanlara geçişi; kontamine süt ve süt ürünleri, çiğ et gibi hayvan ürünlerinin tüketilmesi sonucu oral yolla olur. Nadiren de cilt kesisi olanlarda direk temas, kontamine materyalin konjonktivaya sıçraması, havadan inhalasyon, plasental yol, emzirme ve seksüel yolla da bulaşabilir. Seksüel yol ile geçiş gösteren olgularda sperm örneklerinden brusella bakterisi izole edilmiştir (3,14,19,20).

Ülkemizde hastalık her yaş ve cinsten görülmeyle birlikte, 15-35 yaş grubunda yüksektir. Bazı meslek grupları; hayvan yetiştiriciler, veteriner hekim ve sağlık memurları, mezbahe işçileri, et sanayinde çalışanlar, veteriner araştırma laboratuvarında çalışanlar riskli gruplardır (8).

### **2.1.5. Klinik:**

Bruselloz klasik olarak titreme ile yükselen ateş, bol terleme, halsizlik, başağrısı, kilo kaybı, bel ağrısı ve yaygın vücut ağrıları ile kendini gösterir (8,15). Bruselloz vakalarında en sık rastlanan bulgular: ateş, hepatomegali, splenomegali, lenfadenomegali ve artritir. Klinik olarak akut, subakut, kronik ve nüks enfeksiyon şeklinde seyir gösterir (14,21). Hastalığın inkübasyon süresi genellikle 2-3 hafta olup, birkaç aya uzayabilir (8).

Akut bruselloz hafiften ağır seyirli tabloya kadar değişen bir spektrum gösterebilir. Ağır seyirli tabloda üşüme, titreme ile yükselen ateş, terleme, yaygın vücut ve eklem ağrıları görülürken, hafif ve orta seyirli vakalarda influenzaya benzer nonspesifik belirtiler mevcuttur. Akut ve subakut brusellozda sık rastlanan fizik muayene bulguları splenomegali (%20-30), hepatomegali (%20), servikal ve aksiller bölgede hafif lenfadenopatidir (%12-21) (14,22-24).

Akut bruselloz olgularının tedavi edilmeyen bir kısmı subakut döneme geçebilir. Başlangıç süresi iki ay ile bir yıl arasında değişen olgulardır. Bu hastalarda en sık belirtiler yorgunluk, sinirlilik, baş ve bel ağrıları olup, sıklıkla hepatomegali vardır. Artrit, epididimoorşit, hematolojik tutulum ve göz tutulumuna akut formdan daha sık rastlanır. Tedavi edilen bruselloz vakalarının birkaç ay içinde yeniden ortaya çıkması durumunda nüks ya da reenfeksiyon sözkonusudur (21-23,25).

Subakut brusellozda semptomlar olmadığı ya da klinik bulgular tam ortaya çıkmadığı halde serolojik bulgular pozitif olabilir. Bu seyir özellikle enfekte hayvanlarla yakın teması olan mezbaaha çalışanları, veteriner hekimler ve hayvancılıkla uğraşanlarda görülür (14,22-24).

Hastalığın bir yıldan uzun sürdüğü durumlarda kronikleştiği kabul edilir. Bu durum çocuklarda nadir görülmekle birlikte 40 yaş üstü erişkinlerde siktir. Kronik brusellozlu vakaların bir bölümünde ilk atağın uygun olmayan tedavisine bağlı olarak hastalık devam edebilir ya da kemik, karaciğer veya dalakta fokal süpüratif lezyonlar ile birlikte dir. Kronik brusellozda halsizlik, yorgunluk, sinirlilik, uykusuzluk, emosyonel labilite, baş ağrısı ve depresyon ön plandadır. Fizik muayene bulguları; arasında ateş, hepatomegali, splenomegali, lenfadenopati görülebileceği gibi etkilenen sistemlere ait bulgulara da rastlanabilir (14,22-25).

Tedavi sonrasında yeniden ortaya çıkan brusella enfeksiyonları nükse veya reenfeksiyona bağlıdır (3).

### **2.1.6. Komplikasyonlar:**

Bruselloz hemen her sistemi tutabilen bir zoonozdur. En sık tutulan sistemler; kas iskelet sistemi ve gastrointestinal sistem olup, merkezi sinir sistemi, ürogenital sistem, hematolojik sistem, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, deri ve oküler sistemler ise daha az tutulurlar (22).



### *Kas iskelet sistem tutulumu:*

Brusellozda kas iskelet sistem tutulumu hastaların % 20-85'inde görülebilmektedir. Artralji, myalji, artrit, sakroileit, bursit, tendinit, spondilit, osteit, osteomyelit gibi klinik şekillerde görülebilir. Artralji en çok diz, ayak bileği ve omuz eklemlerinde ortaya çıkar (14,22). Bruselloz tüm eklemleri tutabilmekle birlikte daha çok sakroiliak, kalça, omuz, diz, el ve ayak bilekleri tutulur. Spondilit brusellozlu hastaların % 10-65'inde görülür (8). Enfeksiyon sırasında periferik artrit de görülebilmektedir. Vakaların 2/3'ünde eklem tutulumu monoartrit, 1/3'ünde oligoartrit şeklinde olup, monoartrit; kalça, diz, ayak bileğinde en siktir (22,25). Periferik artrit tablosu sinovyal sıvı analizi ile bile septik artrit ayırt edilemeyen enfeksiyöz artrit şeklinde veya eklem sıvısında mikroorganizmanın bulunmadığı reaktif artrit şeklinde olabilir (25).

Spondilit saptanan olgularda radyolojik olarak vertebralar arası mesafede daralma, ileri dönemlerde vertebralarda füzyon meydana gelebilir. Yine radyolojik olarak vertebra korpusunun ön üst köşesinde güve yeniği manzarası şeklinde osteoporoz (Pedro-pons arazi), osteofit ve sindesmofitler oluşabilir. Bazen subperiosteal ve subkondral abseler teşekkül edebilir (8,26).

Brusellozda bursit, tendinit, fibrozit şeklinde tutulum da görülebilmektedir. En çok tutulan bursa, prepatellar bursa olup, genellikle kronik gidişlidir ve antibiyoterapi ile düzelmektedir (22,25). Kas iskelet tutulumu gösteren bruselloz olguları ile ilgili Gilgil ve arkadaşının (27) yaptığı çalışmada; 43 hasta çalışma kapsamına alınmış olup, 25 hastada spondilit, 21 hastada periferik artrit, 10 hastada sakroileit ve 1'er hastada osteomyelit, bursit ve tendinit saptandığı bildirilmiştir.

### *Hematolojik tutulum:*

Bruselloza bağlı hematolojik sistem tutulumu daha çok anemi, lökopeni, trombositopeni şeklinde görülürken, pansitopeni daha nadir görülmektedir (28). Akdeniz ve arkadaşlarının (29), bruselloz tanısı konulan 233 hastadaki hematolojik bulguları araştırdıkları çalışmalarında, 128 (%55) hastada anemi, 49 (%21) hastada lökopeni, 59 (%26) hastada trombositopeni, 18 (%8) hastada ise pansitopeni tespit edildiği bildirilmiştir. Pansitopeni nadir görülmekle birlikte, kemik iliğinde granülom oluşumu, hemofagositoz ve hipersplenizm ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (13,22,25).

Bruselloz olgularında hematolojik tutulum özellikleri açısından pansitopeni tablosu en sık *B. melitensis* enfeksiyonlarında görülmektedir (13). Trombositopeni steroid tedavisi veya splenektomi gerektirecek kadar ciddi düzeyde olabilmektedir. İdiopatik trombositopenik purpura tanısıyla takip edilen bir çok olgunun brusella enfeksiyonuna bağlı olduğu anlaşılmıştır (30).

### *Gastrointestinal sistem tutulumu:*

Bruselloz sistemik semptomların ön planda olduğu bir zoonozdur ancak, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi dolayısıyla gastrointestinal

sistemde; iştahsızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma, kabızlık, ishal gibi semptomlara yol açabilir (31).

Peyer plaklarının inflamasyonu sonucu barsak mukozasında hiperemi olduğu bildirilmiştir. *B. melitensis* ile meydana kolit tanısı konulan hastalarda ileum inflamasyonu radyolojik ve histolojik olarak gösterilmiş olup, literatürde brusella enfeksiyonuna sekonder ileit tanısı ile tedavi edilmiş olan olgular mevcuttur (14,32).

Karaciğer tutulumu brusellozda sıklıkla görülmekle birlikte karaciğer fonksiyonlarında genellikle hafif derecede bir artış olmaktadır. Brusella hepatitinin en sık görülen şekli granümatöz hepatittir. *B.abortus* ve *B.canis* vakalarında granümatöz hepatit daha sık tanımlanmıştır (25). *B. melitensis* enfeksiyonlarında portal alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonları mevcuttur. *Brucella suis* enfeksiyonları ise karaciğer ve dalakta süpüratif abselere yol açabilmektedir (14). Bruselloz olgularında splenomegali özellikle akut vakalarda sık görülmektedir (22,25). Bunların dışında brusella nadiren akut kolesistit, pankreatit, spontan bakteriyel peritonit nedeni de olabilmektedir (33).

#### *Kardiyovasküler sistem tutulumu:*

Brusellozda kardiyak komplikasyonlar; endokardit, miyokardit, perikardit, aort kökü absesi olarak sıralanabilir. Brusella endokarditi en sık görülen kardiyak tutulum şekli olup, tüm vakaların % 2'sinden azında görülebilmektedir (14,22). Bruselloz ile ilişkin ölüm sebepleri arasında endokardit önemli bir yer tutmaktadır. En sık aort kapağı daha sonra ise mitral kapak tutulmaktadır. Bu tür vakalarda genellikle antimikrobiyal tedavi ile birlikte, cerrahi girişim gerekmektedir (8,22).

#### *Solunum sistemi tutulumu:*

Bakteri inhalasyon veya bakteriyemi yoluyla akciğerlere ulaşarak solunum sistemi bulgularına yol açmaktadır. Solunum sistemi semptomları; öksürük, balgam, dispne şeklindedir. Radyolojik olarak; parankimal nodüller, lobar pnömoni, paratrakeal lenfadenopati, plevral effüzyon saptanabilir (8,34).

Kliniğimizde takip edilen hemoptizi ve ateş etyolojisinin araştırıldığı bir olgunun üç kan kültüründe ve bronşial lavaj sıvısının kan kültür pasajında *B.melitensis* üretilmiş olup, rifampisin, doksisisiklin, siprofloksasin tedavisi ile olgu tamamen düzelmiştir (35).

#### *Ürogenital sistem tutulumu:*

Ürogenital sistem tutulumu vakaların %2-14'ünde görülmektedir. Tek taraflı epididimoorşit en sık görülen ürogenital sistem tutulumu olup, interstisyel nefrit, piyelonefrit, glomerulonefrit görülebileceği gibi nadiren de testiküler abse, seminal vezikülit, prostatit görülebilir (14,36,37).

Hayvanların plasentasında bulunan eritritol adlı madde bakterinin genital traktusa yerleşmesini kolaylaştırmakta ve klinik tablo abortus ile sonuçlanmaktadır. Kadınlarda da bruselloz abortusa yol açabilmekle birlikte, diğer enfeksiyon hastalıklarından daha sık abortus yaptığına dair iddialar

tartışmalıdır. Khan ve arkadaşlarının (38), yaptığı bir çalışmada bruselloz tanısı konmuş olan hamile kadınlarda birinci ve ikinci trimesterdeki düşük sıklığının % 43, üçüncü trimesterdeki fetal ölüm sıklığının ise % 2 olduğu bildirilmiştir.

#### *Santral sinir sistemi tutulumu:*

Brusellozda nörolojik klinik tablo; menenjit, ensefalit, meningovasküler komplikasyonlar, parankimatöz disfonksiyonlar, periferik nöropati/radikülopati ve psikoz şeklindedir. Santral sinir sistemi tutulumu olguların % 5'inden azında görülür ve sıklıkla akut veya kronik menenjit şeklindedir (3). Akut brusella menenjitinde; ateş, baş ağrısı, ense sertliği, şuur değişiklikleri vardır. Beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları; basınç artışı, lenfosit ağırlıklı hücre sayısı artışı, protein artışı, glukoz seviyesinin normal veya düşük olması ile birlikte (3,14,22,25).

Nörobrusellozun, Guillain-Barre sendromuna yol açtığını bildiren yayınlar mevcuttur. Kronik brusellozda depresyon, kronik yorgunluk, hafıza bozukluklarına yol açan psikiyatrik yakınmalar görülebilmektedir (39). Kliniğimizde takip edilen ateş, bilinç bulanıklığı, kusma şikayeti ile başvuran bir olguda; BOS glukozunun 11 mg/dl (eş zamanlı kan glukoz 104 mg/dl), BOS proteininin ise 271 mg/dl olduğu saptanmış olup, BOS'tan yapılan Standart Tüp Aglutinasyonu (STA) ve Coombs testleri 1/10 olarak sonuçlanmış ve BOS kültüründe *Brucella spp* üretilmiştir (40).

#### *Oküler tutulum:*

Brusellozla ilişkili göz tutulumları; üveit, optik nevrit, papil ödemi, korneal tutulum, kronik iridosiklit, ve koroidit olarak bildirilmiştir. Üveit dolaşan immunkomplekslerin varlığı ile açıklanır, nonenfeksiyözdür ve topikal ve sistemik kortikosteroid tedavisine yanıt vermektedir (14,39).

Güngör ve arkadaşlarının (41) 147 bruselloz tanısı konulan hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 38 (% 26,0) hastada oküler komplikasyonlara rastlanmış olup, 26 (% 17,7) hastada konjonktivit, altı (% 4,1) hastada anterior üveit, bir (% 0,7) hastada posterior üveit, iki (% 1,4) hastada dakriyoadenit ve üç (% 2,1) hastada episklerit tanısı koymuşlardır.

#### *Cilt tutulumu:*

Hastalığın yüksek ateşle seyrettiği toksik dönemde nadir olgularda makülopapüler veya eritematöz deri döküntüleri görülebilir. Deri lezyonları; eritem, papül, ürtiker, peteşi, impetigo, ekzema benzeri raş, eritema nodosum, derialtı abseleri, kütanöz vaskülit şeklinde olabilir. Düşük yapan hayvanların plasentasını çıkartmak için müdahale eden veteriner hekim, hayvan sağlık memurları veya hayvan bakıcılarının temas yerlerinde, özellikle ön kollarında görülebilir (8,14,22).

### 2.1.7. Tanı:

Brusellozda belirti ve bulgular özgün olmadığı için kapsamlı bir öykü almak gerekir. Mesleki riskler, hayvan teması, endemik bölgeye yolculuk, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi sorgulanmalıdır (39). Lökosit sayısı normal veya düşük olabilir. Sedimentasyon hızı değişken olup, transaminazlar birkaç kat yükselmiş bulunabilir. Anemi, trombositopeni, lökopeni görülebilir (14,39). Brusellozda nadir görülen böbrek tutulumunun olmadığı durumda idrar tetkiki normaldir. Yüksek ateşli dönemde febril albuminüri bulunabilir. Böbrek tutulumu olduğu zaman; idrar dansitesi düşebilir, proteinüri belirginleşir, idrar sedimentinde eritrosit, lökosit ve silendir görülebilir (8).

#### 2.1.7.1. Etkenin izolasyonu:

Brusellozda kesin tanı etkenin sıklıkla kan ve kemik iliğinden, nadiren BOS, plevra sıvısı, periton sıvısı ve idrar gibi örneklerden kültür yoluyla izolasyonu ile konur. Kan kültürlerinde üreme şansı % 15-70 arasında değişirken, kemik iliği kültüründen üreme şansı % 90 oranındadır. Gotuzzo ve arkadaşlarının (25) yaptıkları çalışmalarında, kemik iliği kültürlerinde % 92, kan kültürlerinde % 70 oranında üreme saptamışlardır. Kan kültürlerinde daha az oranda üremenin saptanması hücre içi bir bakteri olmasından ve öncesinde antibiyotik kullanım öyküsünden kaynaklandığı bildirilmiştir. Brusella izolasyonu için kullanılan başlıca besiyerleri katı ve sıvı besiyerleri şeklindedir. Sıvı besiyerleri daha çok kan ve BOS gibi materyallerin ekiminde kullanılır. Besiyerleri olarak; serumlu dekstrozu agar, gliserozlu dekstrozu agar, patates agar, triptaz agar, triptikaz soy agar, brusella K vitaminli agar, brusella agar kullanılır. Ekimler çift yapılarak birisi normal atmosfer koşullarında diğeri % 5-10 CO<sub>2</sub> li atmosferde enkübe edilmelidir (1).

Brusellozun inkübasyon süresi 2-3 hafta olduğundan, kan kültür şişelerinin dört haftaya kadar inkübasyonu tamamlanmadan üreme olmadığı bildirilmemelidir. Bu süre günümüzde otomatize kan kültür sistemleri olan BACTEC (NR 660, 9240), BacT/Alert kullanılmasıyla beş-yedi güne düşmüşse de brusella bakterisi hücre içi ve zor üreyen bir bakteri olduğundan, inkübasyon süresinin uzatılması ve subkültürlerin yapılması önerilmektedir (42,43). Baysallar ve arkadaşlarının (43) 33039 kan kültür örneğinde BACTEC 9240 ve BacT/Alert otomatize kan kültür sistemlerini kullanarak, brusella bakterisinin üreme zamanını tespit etmeye yönelik olarak yaptıkları çalışmalarında, 17 tanesi her iki sistemde, 13 tanesi sadece Bact/Alert sisteminde olmak üzere, 30 brusella bakterisinin ürediği saptanmıştır. Bact/Alert otomatize sistemde ortalama 2,5 gün BACTEC 9240 sisteminde ise ortalama 2,8 günde brusella bakterisinin ürediği tespit edilmiştir. Özkurt ve arkadaşlarının (44) BacT/Alert otomatize sistemi ve Brucella Broth kültür yöntemiyle *B. melitensis* bakterisini saptamaya yönelik olarak yaptıkları çalışmada, Bact/Alert otomatize sistemde kan kültürlerinde *B. melitensis* bakterisi ortalama 4,5 günde saptanırken, *Brucella* Broth kültüründe 5 günde saptanmıştır. Bu çalışmada her iki yöntem arasında bakterinin üreme zamanı açısından anlamlı bir fark bulunmamış olup, *Brucella* Broth kültür yöntemi daha duyarlı bulunmuştur (44).

### 2.1.7.2. Serolojik tanı:

Brusellozda bakterinin kültürde üremesi için uzun süre gerektiğinden ve bu süre içinde hasta kanında mikroorganizmanın antijenlerine karşı antikorlar oluştuğundan, serolojik reaksiyonlarla hastalığa tanı konulabilir (1).

#### 2.1.7.2.1. Standart Tüp Aglütinasyonu:

*Brucella abortus* S99 kökeninin kolonilerinden alınan bakterilerin ısı ile öldürülmesi ve fenol ile süspanse edilmesi ile elde edilen antijen, hasta serumunun ardışık dilüsyonları ile karşılaştırılır.

STA testinde salmonella, tularemi, kolera enfeksiyonu ve kolera aşısı yapıldıktan sonra, Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), myeloma, *Yersinia enterocolitica* serotip O:9 enfeksiyonları, lenfoma ve tüberküloz vakalarında yanlış pozitiflikler olabilmekle birlikte titre genellikle 1/160'ın altındadır (13). Mert ve arkadaşlarının STA testinin duyarlılığını araştırdıkları çalışmalarında, bruselloz tanısı almış ve klinik olarak brusellozu taklit eden, miliyer tüberküloz, malarya, tifo, erişkin başlangıçlı stil hastalığı, SLE, romatid artrit, sarkoidoz, aktif lenfoma tanıları olan toplam 310 hastaya STA testi uygulanmış olup, çalışmaya alınan 30 bruselloz hastasının tamamında 1/160 ve daha üzeri titrede pozitiflikler saptanmış, diğer 280 hastadan sadece malarya ve lenfoma tanısı olan iki hastada 1/40, tifo tanısı olan bir hastada 1/20 pozitiflik saptanmıştır (45).

STA testinde bazen antikor fazlalığına bağlı olarak aglütinasyonun engellenmesi yani prezon olayı olabilmektedir. Bu durumun önüne geçmek için serumun sulandırımının artırılması gerekmektedir. Ayrıca sulandırım için fizyolojik tuzlu su yerine % 5'lik NaCl'li su kullanılması da bu olayı engelleyebilir (11). Tüp sayısının artırılmadığı durumlarda, şüpheli olgulara ait dilüsyon tüplerine birer damla coombs serumu damlatılarak prezon önlenir (12).

#### 2.1.7.2.2. Coombslu brusella testi:

Standart tüp aglütinasyon testinin negatif olduğu ancak klinik olarak bruselloz şüphesi devam eden hasta serumlarında aglütinasyon blokajının olup olmadığını araştırmak amacıyla Coombslu brusella testi uygulanır. Bu testte standart aglütinasyon testinde aglütinasyon vermeyen tüpler tuzlu su ile üç kez yıkanır, yeniden süspansiyon haline getirildikten sonra her tüpe bir damla antihuman globulini (Coombs serumu) eklenir. Etüve kaldırılır ve 24 saat sonra aglütinasyonun olup olmamasına göre değerlendirilir (8,11).

Blokaj antikorlarının varlığında antijen antikor reaksiyonu olsa da aglütinasyon meydana gelmemektedir. Ortama eklenen Coombs serumu antikorlar arası köprü vazifesi yaparak aglütinasyonun görünür hale gelmesini sağlamaktadır (12).

#### 2.1.7.2.3. Lam aglütinasyon testi (Rose Bengal):

Rose Bengal boyası ile boyanmış *B.abortus* S99 süspansiyonunun hasta serumu ile lam üzerinde karşılaştırılması sonucu aglütinasyonun olup olmadığının belirlenmesine dayanan bir testtir (11,12). Aglütinasyon varlığında test pozitif olarak değerlendirilir. Çalışması kolay ve hızlı sonuç veren düşük oranda yanlış pozitifliği olan bir tarama testidir (25).

#### 2.1.7.2.4. Enzym Linked İmmunosorbent Assay yöntemi (ELISA):

Bu testte antijenle kaplanmış plaklara hasta serumu konularak antijene karşı oluşan IgG, IgM, IgA antikorlarının varlığı araştırılır. Kronik bruselloz tanısında ELISA IgG, IgA sonuçları anlamlıdır (46). Fadeel ve arkadaşlarının (47) hızlı ELISA yöntemi ile klasik teknikleri karşılaştırdıkları çalışmalarında brusella enfeksiyonuna karşı gelişen total antikorları saptama bakımından ELISA yönteminin sensitivite ve spesifitelerinin  $\geq\%96$ , standart tüp aglütinasyonun ise  $\%87$  olduğu bildirilmiştir. Yaşar ve arkadaşlarının (48) altı nörobruselloz hastasını retrospektif olarak inceledikleri çalışmalarında iki hastada BOS ve kan kültürü negatif olmasına rağmen, BOS'ta brusella IgM, IgG antikorlarının ELISA yöntemi ile gösterilmesi sonucu tanı konulabilmiştir. ELISA testi: hızlı, yüksek duyarlılık ve spesifiktir. Brusella spesifik IgG, IgM, IgA antikorlarını kan ve BOS'ta tanımlamaktadır. SAT'dan farklı olarak immunglobulinlerin farklı sınıflarını ve titrelerini tayin etmek mümkündür (49).

#### 2.1.7.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):

Tam kan, serum, vücut sıvıları, beyin omurilik sıvısı ve dokulardan Brusella Deoksiribonükleik asit (DNA)'sının saptanması esasına dayanan yöntemdir. DNA izolasyonu, amplifikasyon, pürifikasyon ve sekanslama gibi işlemleri içerir. Tüm brusella suşlarında bulunan 31 kDa ağırlığındaki membran proteinini kodlayan DNA bölgesini saptar (50). PZR yöntemine dayalı testler geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve daha duyarlıdır. Bununla birlikte laboratuvarlar arasında sensitivite ve spesifite bakımından farklılıklar olabilmektedir. Hedef genler ve saptama yöntemi konusunda bir standardizasyon oluşmamıştır (51).

#### 2.1.8. Tedavi:

Brusellozda tedavi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün önerdiği şekilde ikili tedavi şeklinde olup 6 hafta sürmektedir. Bazı durumlarda ise üçlü kombine antibiyotik uygulanması kullanılmaktadır. Tek antibiyotik kullanımının tedavi başarısızlığına yol açma nedenleri; hızlı direnç gelişimi ve bakterinin hücre içi olarak çoğalabilmesi nedeniyle tek ilacın yetersiz kalarak relapsa yol açmasıdır (8).

Bruselloz tedavisinde seçilecek antimikrobiklerin in vitro çalışmalarda etkinliklerinin saptanmasının yanı sıra, bakterinin bulunduğu makrofaj içinde yeterli ilaç düzeyine ulaşabilmesi ve düşük pH değerlerinde etkinliklerini sürdürebilmesi gerekir. Hücre içine yüksek oranda girme kabiliyetinde olan antimikrobikler arasında, tetrasiklinler, kinolonlar, makrolidler, streptomisin,

rifampin ve trimetoprim-sulfometoksazol sayılabilir. Bruselloz tedavisinde aminoglikozid grubu antibiyotikler de kullanılmaktadır (39).

Tetrasiklinler: Bakterilerin ribozomal 30S subünitine geri dönüşümlü olarak bağlanarak, protein sentezini engellerler. Terapötik konsantrasyonlarda bakteriyostatiktirler (52). Tetrasiklinler içinde özellikle doksisisiklinlerin bruselloz tedavisinde en etkin antibiyotikler olduğu bilinmektedir. Ancak tek başına kullanıldığında % 14-29 oranında nüks görülebilmektedir (39). Doksisisiklin yağda eriyebilirliği, kan beyin bariyerini en iyi geçen tetrasiklin olması ve lökositler içine daha iyi penetre olması nedeniyle tercih edilmektedir (14,25).

Rifampisin: Rifampisin B'nin semisentetik türevidir. DNA'ya bağımlı RNA (Ribonükleikasit) polimerazı inhibe ederek etkisini gösterir. Oral uygulandıktan sonra vücut dokularına iyi dağılır. Serebrospinal sıvıya serumun % 10-40'ı oranında geçer. Nörobruselloz tedavisinde kombinasyon rejimi içinde yer alır (39,53,54). Gebelikte bruselloz tedavisinde güvenle kullanılabilir bir ajandır (14).

Aminoglikozidler: Aminoglikozidler *Streptomyces* ve *micromonospora* cinsi toprak bakterilerinden (Actinomycetes) elde edilen doğal ya da semisentetik antibiyotiklerdir. Bakterilerdeki protein sentezini bozarlar. Duyarlı bakteri hücrelerine hızlı bakterisidal etki gösterirler (57).

Streptomisin bruselloz tedavisinde tetrasiklinlerle kombinasyon halinde kullanılır. Doksisisiklinin 200 mg/gün altı hafta, streptomisin 1gr/gün 2-3 hafta birlikte kullanılması brusellozda en efektif tedaviyi oluşturmaktadır. Gentamisin streptomisin tedavisinin yerini alabilecek gibi görünse de doz ve tedavi süresinin belirlenmesine ihtiyaç vardır (14).

Arıza ve arkadaşlarının (58) yaptığı bir çalışmada 45 günlük doksisisiklin-rifampisin kombinasyonunun doksisisiklin+streptomisin kombinasyonuna benzer etkinlikte olduğu ancak spondilitli olgularda doksisisiklin+streptomisin kombinasyonunun daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Sekiz yaşın üzerindeki çocuklarda üç hafta süre ile doksisisiklin (5mg/kg/gün) veya oksitetrasikline (30mg/kg/gün) ek olarak ilk beş gün gentamisin (5mg/kg/gün) önerilmektedir. Sekiz yaşından küçük hastalarda ise aynı şekilde doksisisiklin veya oksitetrasiklin yerine kotrimoksazol konularak tedavi edilebilir (3).

Trimetoprim-Sulfometoksazol (TMP-SMZ): TMP-SMZ bakterilerde nükleik asit sentezi için gerekli folik asit sentezini aynı yolda iki ayrı basamakta inhibe eder. Bakterisidal bir antibiyotiktir (59). Sekiz yaşından küçük çocuklarda tetrasiklinlerin yan etkilerinden dolayı onların yerine kullanılabilir. Gebelerde, emziren annelerde ve tetrasiklin türevlerine intoleran hastalarda tek başına veya rifampisin ile kombine olarak kullanılabilir (3).

Kotrimoksazol ile rifampisin kombinasyonunun, kotrimoksazol ile doksisisiklin kombinasyonu ile karşılaştırıldığı bir çalışmada rifampisin+kotrimoksazol kombinasyonunda % 10 oranında relaps görülmekre iken, doksisisiklin+kotrimoksazol kombinasyonunda % 8,6 oranında relaps gözlenmiştir (55). Solero ve arkadaşlarının (56) yaptığı diğer bir çalışmada, doksisisiklin ve rifampisin kombinasyonunda % 16 oranında relaps gözlenirken, doksisisiklin+streptomisin kombinasyonunda % 5 oranında relaps gözlenmiştir.

Kinolonlar: Duyarlı bakteride bakterisidal etki gösterirler. Bu etkileri konsantrasyona bağımlıdır. Bakterisidal etkilerini DNA sentezini hızlı bir şekilde inhibe ederek gösterirler (60). Kinolonlar in vitro etkinliklerine rağmen, tek başına kullanıldığında nüks oranı yüksektir (% 16-66)(39). Yamazhan ve arkadaşlarının (61) yaptığı çalışmada, siprofloksasin ve levofloksasinin *B. melitensis* bakterisine karşı in vitro etkinliği benzer bulunmuş olup Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri; MİK50:0,5µgr/ml, MİK90:2µgr/ml olup, moksifloksasinin etkinliği ise daha düşük bulunmuştur. MİK50:1 µgr/ml, MİK90:8 µgr/ml

Akova ve arkadaşlarının (62) yaptığı klinik çalışmada, ofloksasin 400 mg/gün ve rifampin 600 mg/gün kombinasyonu rifampin+doksisiklin kombinasyonu karşılaştırılmış olup, her iki kombinasyonun benzer etkinlikte olduğu (% 95 kür, % 3 relaps) ilk kombinasyonda istenmeyen yan etki (gastrik intolerans) oranının % 6,5 ikinci kombinasyonda % 43 olduğu bildirilmiştir.

Yeni antibiyotiklerden olan tigesiklininde *Brucella sp.* suşlarına karşı etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, 82 *Brusella* suşu çalışma kapsamına alınmış olup doksisiklinin MİK90 değerlerinin en düşük (0,047µgr/ml), rifampisin ise en yüksek (1,50µgr/ml) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada tüm suşlar tigesikline duyarlı olarak bulunmasına karşın in vitro aktivitesi doksisiklinden daha düşük bulunmuştur (63).

Menenjit ve endokardit gibi komplikasyonların tedavisinde ideal olan bir tedavi şeması ne yazıkki gösterilememiştir. Nörobruselloz tedavisinde doksisiklin+rifampisin ya da doksisiklin+kotrimoksazol kombinasyonu tercih edilir. BOS'a iyi geçebilen üçüncü kuşak sefalosporinler tedaviye eklenebilir. Tedavi süresi hastadan hastaya değişmekle birlikte hasta iyileşene veya BOS glukoz seviyesi normale dönene kadar sürdürülmelidir (3). *Brusella* endokarditinde doksisiklin+rifampisin veya doksisiklin+kotrimoksazol kombinasyonu ile birlikte genellikle kapak replasmanı gerekmektedir. Protetik kapak varlığında replasman şarttır. Replasman sonrası tedavinin ne kadar süreceği tartışmalıdır. Süre klinik gözleme göre her olgu için ayrı olarak belirlenmelidir (3).

Ozsoyler ve arkadaşlarının (64) *brusella* endokarditinde medikal tedavi sonrası cerrahi zamanlama ve postoperatif tedavi süresi konusunda beş vakayı içeren yayınlarında, hastalardaki preoperatif medikal tedavi süresinin 5,2 hafta olduğu, üç hastaya aort kapak, iki hastaya da hem aort hem de mitral kapak replasmanı yapılmış olduğu, operasyon sonrası ortalama 3,6 ay medikal tedavinin devam ettirildiği, postoperatif 15,8 aylık takipte problem yaşanmadığı bildirilmiştir.

Brusellozun komplikasyonlarının tedavisinde, vertebral fragmantasyon veya granüloma bağlı medüller veya kök basısı olduğu durumlarda, paravertebral veya epidural abse varlığında, testiküler abse veya nekroz gelişirse, karaciğer ve dalakta büyük abse varlığında ve kalp kapak tutulumunda medikal tedavi ile birlikte cerrahi tedavi gerekmektedir (65).

### **2.1.9. Prognoz:**

Bruselloz genellikle prognozu iyi olan bir zoonozdur. Osteoartiküler tutulum, meningeal ve kardiyovasküler tutulum morbidite ve mortalite nedeni



olabilmektedir. Özellikle kardiyovasküler ve santral sinir sistemi tutulumlarında tedavi güç ve uzun süreli olmaktadır (66).

### **2.1.10. Korunma:**

İnsanların brusellozdan korunması; doğrudan doğruya özellikle koyun, keçi, sığır ve domuz gibi evcil hayvanların kontrolü ve eradikasyonuna bağlıdır. Brusella bakterisi ile enfekte olmamış süt danaları *B. abortus* 19 suşu, süt kuzuları *B.melitensis* Rev 1 suşu aşısı ile aşılanmalıdır (1,8).

Brusellozdan korunmak için alınması gerekli önlemler; risk altındaki personelin (mezbaha işçileri, et paketleyicileri, laborantlar, veterinerler ve hayvan bakıcıları) eldiven ve tüm kollarını örten giysiler giymeleri ve gözlük takmaları gerekmektedir. Kırsal kesimdeki halk bilinçlendirilmeli ve çiğ süttten peynir ve yağ yapımı önlenmelidir. İnsanlarda kullanılabilir etkin ve güvenilir bir aşı henüz yoktur (1,8,14, 67 ).

### **2.2. İmmunite:**

İmmunite antijene özgü bir yanıtıdır ve genellikle oluşumu belli bir süre gerektirir. Doğal immunitate antijene özgü değildir ve uyarı sonrasında bellek oluşturmaz, kısa süreli bir yanıt sistemi niteliği taşımaktadır. Bu yanıtta nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, doğal öldürücü (NK) hücreleri, monosit ve makrofajlar rol oynarlar (68). İmmuniteyi oluşturan diğer sistemler humoral ve hücreli immunitedir. Hücreli immün yanıtın temel efektör hücreleri timus kökenli (T) lenfositleri, humoral immunitenin ise kemik iliği ya da bursa kökenli (B) lenfositleridir (68).

#### **2.2.1. Doğal immunitate:**

Canlıların yapısal (anatomik, fizyolojik, fiziksel, kimyasal vs) ve kalıtsal karakterleri ile ilişkili olarak, dışardan giren patojen, patojen olmayan etkenlere ve diğer maddelere yönelik olarak genel savunma mekanizması yardımı ile karşı koyması ve kendini koruması doğal immunitate kapsamı içinde yer almaktadır (69).

Doğal immunitate kapsamı içinde vücut ısısı, yaş durumu, hormonal faaliyetler, sağlam deri, mukozalar ve salgıları (lizozim, salgısal IgA, mikrobiyal flora, fibronektin vs.) patojenlere karşı engel oluşturmaktadır. Bu savunma hattını aşan mikroorganizmalar spesifik olmayan humoral ve hücreli komponentlerden oluşan ikinci bir savunma hattı ile karşılaşılırlar. Humoral komponentler kanda, dokularda, mukoid salgılar ve vücut sıvılarında bulunan antimikrobiyal sıvısal faktörlerdir (lizozim, properdin, interferon, doğal antikorlar ve kompleman sistemi). Hücreli faktörler B ve T hücrelerinin aktivasyonunu ve mikroorganizmalara karşı daha spesifik savunma oluşmasını sağlar. Makrofajların uyarılması ve antijen işleyerek bunları Th hücrelerine sunması Th hücrelerinin lenfokin (IL-2, IFN- $\gamma$  vs) salgılamasını artırdığı gibi, B hücrelerini de uyararak spesifik antikorların sentezlenip salgılanmasını sağlar. Makrofajlar tarafından sentezlenen IL-1 hem B hem T hücrelerinin stimülasyonunda önemli fonksiyona sahiptir (69).

### 2.2.2. Edinsel immunité:

Antijen ile karşılaşıldığında uyarılan ve sadece o antijene özgu olarak gelişen, ikinci karşılaşmada daha güçlü bir yanıt verilmesini sağlayan sistemdir. Spesifik immunitenin başlıca elemanları T ve B lenfositler, antikorlar ve bazı lenfokinlerdir. Edinsel immun yanıt doğal immunitéyi takip eder, aktif ya da pasif olarak oluşturulabilir. Organizmanın yabancı antijene maruz kalıp aktif bir şekilde immun yanıt oluşturması aktif immunité, spesifik olarak immunize olmuş bir bireyden serum ya da hücrelerin immun olmayan bir bireye nakliyle geliştirilen immunitéye pasif immunité denilir (69,70).

### 2.2.3. İmmun sistemin hücreleri:

T Hücreleri: Normal periferik lenfositlerin %70-80'ini oluştururlar. Yüzey immunglobulin reseptörü taşımazlar. Hücresel immunitenin kaynağı olarak direkt hücresel temas ve sitokinler yolu ile diğer T ve B hücreleri ile monosit fonksiyonlarını düzenlerler. T hücrelerinin immun uyarı sonrası çeşitli sitokinler salgılayarak diğer T ve B hücreleri ile monosit-makrofajların uyarılma ve olgunlaşmalarını sağlayan alt grubu yardımcı T hücreleri (Th) olarak adlandırılırlar. Bu grup yüzeyinde CD4 ve THR $\alpha\beta$  taşır. Periferik T lenfositlerinin % 60- 65'ini oluştururlar. Yardımcı hücre grubu salgıladıkları sitokinlere göre iki alt gruba ayrılabilir. B hücre özelleşmesi, inflamasyon ve otoimmunitéde yer alan Th1 lenfositler IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  (Tümör Nekroz Faktör Beta) salgılamaken, IL-4 ve IL-5 salgılamaz. Th2 lenfositler ise IFN- $\gamma$  ve TNF-  $\beta$  salgılamazken; IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 salgılar. Diğer bir T hücre grubu ise yabancı antijenleri HLA sınıf 1 molekülleri yardımıyla tanıyıp bu hücreleri yıkıma uğratan sitotoksik T hücreleridir (Ts). Bu hücreler CD8 ve THR $\alpha\beta$  molekülleri taşırlar. CD8+ grup periferik lenfositlerin % 30-35'ini oluştururlar (68).

B Hücreleri: Kan lenfosit havuzunun % 5-15'ini oluştururlar. İnsanda önce fetal karaciğerde, sonra kemik iliğinde gelişirler ve yüzeylerinde antijen reseptörü olarak da görev yapan immunglobulin moleküllerini taşırlar. Antijenik uyarı sonrası, T hücrelerinden salınan sitokinlerin de katkısıyla (IL-2, IL-6) B hücreleri plazma hücrelerine dönüşerek gelişimlerini tamamlarlar ve ikincil lenfoid organlara (lenf bezi follükülleri ve dalak) yerleşirler. Plazma hücreleri ise antikor olarak adlandırılan çözünür formdaki immunglobulinleri sentezlerler. Plazma hücrelerine farklılaşmayan bir grup B hücresi spesifik antijenik uyarıyı tanıyıp saklayan bellek (memory) hücreleri olurlar. Bunlar istirahat halinde kalırlar ve aynı antijenle yeniden karşılaştıklarında süratle çoğalarak immun cevabın daha hızlı ve etkin bir biçimde oluşmasını sağlarlar (68,71).

Büyük granüllü lenfositler: Periferik kanda mononükleer hücrelerin %5-10'unu oluştururlar. Yüzeylerinde T veya B hücresi işareti taşımazlar. Bu hücrelerin yüzeylerinde IgG Fc kısmına karşı reseptör bulunur. Büyük sitoplazmik granülleri olan, ancak fagositoz yapma ve yapışma özellikleri olmayan bu hücreler büyük granüllü lenfositler olarak adlandırılır. Bu hücreler antikora bağlı hücresel öldürme ya da doğal öldürücü hücre (natural killer) aktivitesi gösterirler. Antikora bağlı hücresel öldürme Fc reseptörü olan

lenfositin antikor ile kaplı (opsonize) hücreye Fc yolu ile bağlanıp onu öldürmesidir. Doğal öldürücü hücre aktivitesi ise daha önceden hedef ile karşılaşmamış lenfositin antikor varlığı gerektirmeyen öldürücü aktivitesidir. Malign ya da virus ile enfekte hücreler ve transplante edilmiş yabancı hücrelerin yok edilmesinde rol alır. Lenfokin ile aktive (LAK) öldürücü hücreler ise IL-2 adlı sitokin ile uyarılarak tümör öldürücü yetenekleri arttırılmış olan hücrelerdir (68,71).

Granülositler (Nötrofil, Eozinofil, Bazofil): Doğal ve özgün immun yanıtların efektör hücreleridirler. Kan lökositlerinin % 60-70'ini oluştururlar. Nötrofillerin dolaşımdaki yarılanma süreleri yaklaşık yedi saati bulmaktadır. Nötrofiller güçlü fagositik aktiviteleri ile, enflamasyonun majör hücreleridir. Sitoplazmalarında iki tip granül taşırlar. Azurofilik (nonspesifik) granüllerde fagositik aktivite için gerekli enzimler (peroksidaz, asit fosfataz, aril sulfataz,  $\beta$  galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz, 5-nükleotidaz, elastaz, kollajenaz, katepsin, lizozim, katyonik antibakteriyel proteinler) bulunduğu gösterilmiştir. Nötrofilik (spesifik) granüllerinde ise başlıca laktoferrin, alkalin fosfataz, kollojenaz ve lizozim vardır (71). Nötrofiller, makrofajlarda olduğu gibi spesifik antijenleri tanımak için özel antijen reseptörlerine sahip değildirler. İmmunojenler yalnız veya opsonize olduktan sonra (IgG ve C3b ile) hücre yüzeyindeki FcR (Fc reseptör) ve CRI (Kompleman reseptörü) ile bağlantı kurabilirler. Böyle birleşmeler hem nötrofillerde iyi bir uyarım meydana getirir ve hem de fagositozu ve öldürme işlevini etkinleştirir (72). Periferik kanda % 2-5 oranında bulunan eozinofiller IgG için Fc reseptörü (CD32) taşırlar ve özellikle parazitik organizmalar için sitotoksik etki gösterirler. Periferik kanda % 0,1-0,2 gibi düşük oranlarda bulunan bazofilin ve doku mast hücrelerinin görevi tam anlaşılammıştır. Bazofillerin alerjide ve gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol aldığı düşünülmektedir (68).

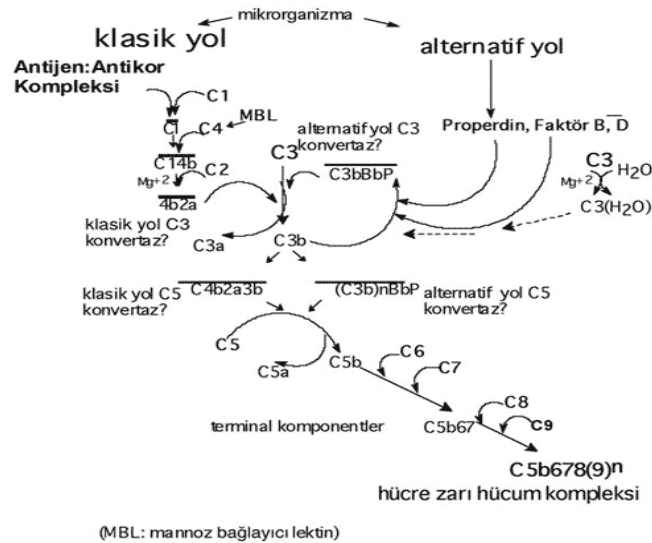
Monositler ve makrofajlar: Kandaki lökositlerin % 5-8 kadarını monositler oluşturur. Kandan dokulara geçen monositler doku makrofajlarını (konnektif doku histiyositleri, karaciğerin kupffer hücreleri, plevra, periton, sinovya, alveol, dalak ve lenf nodülleri makrofajları, kemik iliğinin osteoklastları, sinir sisteminin mikrogliaları) oluştururlar. Makrofajlar da monositler gibi lizozomal granüllere ve bakterisidal maddelere sahiptirler. Monosit ve makrofajlar yüzeylerinde başlıca IgG (özellikle IgG<sub>1</sub> ve IgG<sub>3</sub>'ün Fc parçası), C<sub>3</sub>b ve çeşitli lenfokinler için reseptörler, kemotaktik reseptörler ve diğer molekülleri bağlayan reseptörler ile Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) sınıf-II moleküllerini taşır. Makrofajların çeşitli stimulanlarla (enfeksiyöz etkenler, endotoksin, sitokinler) aktive oldukları zaman; IL-1, IL-6, araşidonik asit metabolitleri, koloni stimüle edici faktör (CSF), kompleman komponentleri, Tümör Nekrozis Faktör (TNF), reaktif oksijen metabolitleri, nitrik oksit metabolitleri, plazminojen aktivatörü, trombosit aktive edici faktör (PAF) ile lizozim, elastaz, kollojenaz, asit hidrolazlar gibi çeşitli aktif madde ve enzim sentezledikleri gösterilmiştir (71). Monositler ve makrofajlar bu özellikleriyle bakteri parazit ve fungusları, suda erimeyen immun kompleksleri, yabancı partikülleri fagosit ederler ve tümör hücrelerini öldürürler (sitotoksik etki). İmmün regülasyonda antijenik uyarıyı, antijen sunan hücre (APC) olarak T hücrelerine sunmak suretiyle immun cevabın oluşmasına katkıda bulunurlar.

Aktive makrofajlar IL-1 ve IL-6 sentezleyip salgılamak suretiyle akut faz cevabının oluşmasına ve ateş yükselmesine neden olabilir. IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, ve GM-CSF (Granülosit Monosit Koloni Stimüle edici Faktör) gibi sitokinler bu hücrelerde makrofaj aktive edici faktör olarak etki gösterirler. IL-10, IL-4 ve TGF- $\beta$  makrofajların sitotoksik aktivitesini sinerjik olarak inhibe edebilir (71).

#### 2.2.4. Kompleman sistemi:

Kompleman sistemi, proteolitik enzimlerden, regülatör proteinlerden ve bunların yan ürünlerinden oluşan ve vücudun nonspesifik ve spesifik savunmasında önemli rol oynayan bir sistemdir. Zincirleme reaksiyon sistemleri olarak bilinen koagülasyon, fibrinolitik ve kinin sistemleri ile aynı plazma protein grubu içinde yer alırlar (73). Kompleman sisteminin asıl görevi immun ve enflamatuvar reaksiyonlara katılmak ve bu reaksiyonları güçlendirmektir. Kompleman sistemi iki yoldan aktive olur. Klasik yoldan kompleman aktivasyonuna C<sub>1</sub> ile C<sub>9</sub> arasında yer alan dokuz komponenti katılır. İmmünglobülinler içinde IgM, IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>) ve çok az olarak IgG<sub>2</sub> ile oluşmuş immün kompleksler ve ayrıca polinükleotidler, C-Reaktif Protein (CRP), bazı viruslar ve plazmin komplemanı klasik yoldan aktive edebilirler. C<sub>1</sub> komponenti C<sub>1q</sub>, C<sub>1r</sub>, C<sub>1s</sub> olmak üzere üç alt birimden oluşan komplekstir. C<sub>1</sub> den itibaren C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> komponentlerinin sırasıyla aktivasyonu sonucu C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub> membran atak kompleksinin etkisiyle bakteri, parazit veya konak hücresi sitolize uğrar. Alternatif yoldan kompleman sisteminin aktivasyonu C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub> kompleksinin by-pass edilerek doğrudan C<sub>3</sub>'ün aktivasyonu ile başlamaktadır. Alternatif yolun mutad aktivatörleri mikrobiyal polisakkaritler ve lipopolisakkaritlerdir. Aktivasyon için immünglobulin gerektirmediği için spesifik immün cevabın oluşmadığı dönemde antimikrobik savunmada önem taşımaktadır (73,74).

Şekil 1.



### **2.2.5. İmmunglobulinler:**

Antijenik uyarımlar sonu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenle birleşerek spesifik bir reaksiyon verebilen glikoprotein karakterinde moleküllerdir. Protein elektroforezinde  $\gamma$  (gamma) globulin fraksiyonundadırlar. Fiziksel, kimyasal, biyolojik ve antijenik özellikleri üzerindeki çalışmalarda insanlarda beş ayrı sınıfa ayrılabilceği saptanmış olup bunlar IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE olarak kodlanmıştır. Sağlam bir immunglobülin molekülü proteolitik bir enzim olan papain ile sindirime maruz tutulduğunda, enzim, antikor kavşak bölgesinden üç parçaya ayırır (75). Bunlardan ikisi, hem hafif ve hem de ağır zinciri birlikte içeren, birbirinin aynısı olan, tüm molekülün yaklaşık 2/3'ünü oluşturan ve iki benzer parçadan meydana gelmiş olan Fab (fragment antijen binding) kısmı ile diğeri sadece ağır zincirden meydana gelmiş kristalize olabilen Fc (fragment crystallizable) bölümüdür. Molekülün Fab kısmı homolog antijenle birleşme yeteneğine sahip olmasına karşın Fc bölümünün böyle bir etkinliği yoktur. Ancak bu kısım komplemanı bağlama, plasentadan geçebilme, makrofajlara ve deriye yapışabilme, mast hücrelerinde degranülasyon, katabolizmada görev alma, protein A'ya bağlanma vb. gibi diğerk çok önemli biyolojik sekonder aktiviteye sahiptir (75).

### **2.2.6. Sitokinler:**

Spesifik ve doğal immun sistemin hücrelerince salgılanan immun sistem fonksiyonları üzerine hayati öneme sahip regülatör proteinlerdir. Sadece immun ve inflamatuvar yanıtları etkilemekle kalmazlar aynı zamanda hematopoez ve yara iyileşmesi gibi bir çok biyolojik olayları da regüle ederler. Antijen spesifik değıllerdir ancak yapımları ve salgılanmaları antijen uyarısına bağlıdır (76). Farklı lökosit toplulukları arasında iletişim sinyalleri olarak iş görmeleri nedeniyle bir grup sitokinler interlökinler (IL) olarak isimlendirilmişlerdir. İnflamasyonda lokal sistemik olarak oynadıkları önemli rolleri nedeniyle IL-1, IL-6, TNF ve kemokinler pro-inflamatuvar sitokinler olarak, lenfositlerin aktivasyonunda ve farklılaşmasındaki önemli rolleri nedeni ile IL-2, IL-4 immunoregülatör sitokinler olarak bilinir. IL-10 ve TGF-  $\beta$ 'nın antiinflamatuvar özellikleri ön plandadır. IL-3, GM-CSF daha çok immatür lökositlerin büyüme ve farklılaşmasında rol oynarlar (76).

İnterlökin-1 (IL-1): Sitokinler içinde ilk tanımlanan aracı moleküldür. Lenfositler üzerine etkisi nedeniyle lenfosit aktive edici faktör (LAF) olarak isimlendirilmiştir. Monositler, doku makrofajları, lenfositler (Th, B hücre, NK hücreleri) başlıca hücre kaynaklarıdır. IL-1 NK hücrelerinde sitotoksik aktiviteyi, polimorfonükleer lökositlerde fagositik aktiviteyi artırır (77).

İnterlökin-2 (IL-2): IL-2 kaynağı Th hücreleridir. İzole edilmiş T-lenfosit ve timosit alt populasyonları ile yapılan çalışmalarda antijen ile aktive edilen CD4 T yardımcı hücrelerde IL-2 sentezlendiği saptanmıştır. Bununla birlikte güçlü poliklonal mitojenler ve sınıf II MHC antijenlerinin CD4 T lenfositleri uyardıkları ve IL-2 sentezini indükledikleri bilinmektedir. IL-2 duyarlı hücre yüzeylerinde IL-2 reseptörleri bulunur. IL-2 reseptörleri yalnız antijen ile uyarılmış T hücrelerinde ve B hücrelerinde sentezlenir ve sergilenirler.

Th hücrelerinde sentezlenen ve salınan IL-2 otokrin olarak kendini ve parakrin olarak B hücre, monosit ve NK hücreleri etkiler. T hücrelerinde motilite ve sitotoksik aktiviteyi artırır. Doğal öldürücü T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırır (77).

İnterlökin-3 (IL-3): IL-3 lenfosit CD4 alt populasyonunda oluşan T lenfosit ürünü bir sitokindir. Kan hücreleri için büyüme ve değişim faktörü olduğu ve olgun mast hücrelerini de etkilediği bildirilmiştir. Mast hücrelerinde histamin sentezini ve makrofajlarda fagositoz aktivitesini artırdığı ortaya konulmuştur (77).

İnterlökin-4 (IL-4): Aktive edilmiş T lenfositlerinde oluşur. Murine T hücreleri (CD4) üzerine yapılan çalışmalarda alt grup Th1 hücrelerde IL-2, IFN-gamma ve lenfotoksin sentezlenmesine karşın Th2 hücrelerinde IL-4 ve IL-5 sentezlenip salgılandıkları ortaya konulmuştur. İlk saptandığında B hücre büyüme faktörü (BCGF-1) olarak tanıtılmış ve antijenlerle uyarılmış B hücreleri aktive ettiği belirlenmiştir (77).

İnterlökin-5 (IL-5): IL-5 aktive edilmiş B hücrelerinin büyümesini hızlandırdığı, bu hücrelerde antikor sınıflarının IgA izotiplere dönüştürülmesinde rol aldığı saptanmış olup mukozal immunitede rol oynamaktadır. T hücreleri üzerine mitojenik etkisi çok azdır. Th hücrelerinde IL-4, IL-5 oluşması IgE ve IgA antikorlarının oluşmasına yol açarken aynı zamanda mast hücre ve eozinofillerin büyüme ve değişmelerini de gerçekleştirir (77).

İnterlökin-6 (IL-6): Başlıca aktive edilmiş makrofajlarda sentezlenir. İn vivo olarak verilen IL-6 nötrofil sayısını artırır. Ayrıca öncü kan hücrelerinin değişimine ve koloni oluşturmalarına neden olur. Hücrelerde IL-2 yapımını ve IL-2 reseptör sergilenmesini artırır (77). B hücrelerinin büyüme ve farklılaşmalarına yardım ederek antikor sentezleyen hücrelere dönüşmelerine yol açar. Hepatositlerden akut faz proteinlerinin salınımını artırır (77).

İnterlökin-7 (IL-7): T ve B lenfosit öncülleri üzerinde gelişme faktörü olarak etki göstermektedir. Aplastik anemi gibi hastalıklarda terapötik etkiye sahip olabilir (78).

İnterlökin-10 (IL-10): T hücreleri alt gruplarında (Th2) sentezlenen bir sitokin olarak tanıtılmıştır. Th2 dışında B hücreleri, makrofaj ve keratinositlerde de sentezlendiği bildirilmiştir. IL-10 T hücrelerinde sitokin sentezlenmesini inhibe eder. IL-10 etkisi ile inhibe edilen sitokinler IFN-gamma ve IL-3 olarak saptanmıştır. Buna karşın GM-CSF lenfotoksin ve TNF-alfa düzeylerinde değişme görülmemiştir (77,78).

İnterlökin-11 (IL-11): Kan hücreleri ve lenfoid hücrelerin büyüme ve değişimlerini etkileyen bir sitokin olarak tanıtılmıştır. Kemik iliğinin stromal hücrelerinde sentezlendiği sanılmaktadır. Direkt olarak megakaryositleri uyarır ve megakaryopoezde önemli rol oynar (77,78).

TNF: İnterlökinlerle aktive edilen monosit ve makrofajlarda sentezlenip, salınan efektör sitokinlerden birisidir. Hayvan vücudunda makrofaj ve sitotoksik T hücrelerinin tümorosidal aktivitelerinin çoğunda TNF etkili olmaktadır. TNF etkisi ile tümörlerin nekrozu, doğrudan tümör hücrelerini etkileme ile değil, muhtemelen tümör içeren dokuların damarlanmasını zedeleyerek etki eder ve nekroz oluşturur (77).

İnterferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ): T yardımcı hücre alt sınıfı olan Th1'lerde sentezlenir. Ayrıca uyarılan NK hücrelerinde de IFN-  $\gamma$  sentezlendiği belirlenmiştir. Makrofaj aktivasyonu, B ve T lenfositlerinin aktivasyonu ve regülasyonunu sağlar. NK hücrelerinin aktivitesini artırır (77).

TH1/TH2 Polarizasyonu: Sitokinlerin immun yanıtın regülasyonunda oynadıkları önemli rollerin bir göstergesi, Th lenfositlerin salgıladıkları sitokinlere göre Th1 ve Th2 olarak alt gruplara ayrılmasıdır. Th1 lenfositler IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  (lenfokin) salgılamak, IL-4 ve IL-5 salgılamaz. Th2 lenfositleri ise IFN- $\gamma$  ve TNF-  $\beta$  salgılamaz. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 salgılar. Th1 ve Th2 hücreler birbirlerinin fonksiyonlarını karşılıklı olarak regüle ederler. Th2 hücrelerde yapılan IL-4 ve IL-10, Th1 hücrelerini inhibe ederken, Th1 hücrelerde salgılanan IFN- $\gamma$ , Th2 hücrelerini inhibe eder. İnflamatuar ve immun yanıtlar Th1 hücrelerince oluşturulurken, humoral immun yanıtlar ve allerjik yanıt Th2 hücrelerince oluşturulur (76). Th1 sitokin ailesi içinde bulunan IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  ve IL-2 IgG2a, komplemanı fikse edici antikorların üretimini artırır, makrofaj aktivasyonuna yol açar ve antikor bağımlı hücrel immünite ile gecikmiş hipersensitiviteden sorumludur. Th2 ailesi içindeki sitokinler ise humoral immun cevaplardan, mukozal immüniteden sorumlu olup, mast hücrelerinin ve eozinofillerin gelişimini uyarır. Ayrıca IgA sentezine yol açar. Sonuç olarak Th1 hücreleri hücrel aracılı immun cevaplardan sorumlu iken Th2 hücreleri antikor cevabı ve allerjik yanıtlardan sorumludur (79).

### 2.2.7. Bruselloz ve immünite:

Brusella genusunda insan ve çeşitli hayvan türlerinde enfeksiyon meydana getiren hücre içi mikroorganizmalar bulunmaktadır. *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae* katı besi yerinde S (smooth) formlu koloniler oluştururlar ve bu bakteriler A (abortus) ve M (melitensis) olmak üzere iki değişik yapı ve oranda hücre duvarı antijenlerine sahiptirler. Brusella etkenleri ile enfekte konakçı bakteri hücre duvar antijenlerine bağlı olarak IgA, IgE, IgM, IgG antikorları oluştururlar ve meydana gelen bu antikorlar bakterisidinler, aglütininler, presipitinler, opsoninler, komplemanı fikse edici ve inkomplet antikorlar olarak tanımlanırlar. Brusella enfeksiyonunda, humoral immün yanıtı ek olarak konakçıda organizmaya ve bakterinin bazı komponentlerine karşı gecikmiş tipte aşırı duyarlılık oluşur (80).

*Brusella* türleri konakçının fagositleri içinde bulunma ve çoğalma özelliği taşıdıklarından humoral antikorlardan korunabilmektedirler. Genel olarak brusella enfeksiyonundan korunmada hücrel bağışıklık rol oynamaktadır. Etkenin fagositik hücreler tarafından alınması sonucunda öldürülerek vücudun nonspesifik savunma mekanizmalarından birisi oluşmaktadır. Fagosit edilmiş mikroorganizmaların, fagozomlar içinde öldürülme işi süperoksit-myeloperoksidaz sisteminin kombine çalışması ile başarılır. Ancak her hücre tarafından yutulan bakteriler fagositozu takiben öldürülemez. Bu durum vücuda giren etkenin virulansı ile ilişkilidir. Örneğin attenüe ve virulan *B. abortus* ve *B. melitensis* suşları PMN (Polimorf nüveli lökositler) tarafından elimine edildikleri halde, virulan *B. melitensis* suşları fagositoza dirençli olmakta ve hücre içinde ölüm meydana gelmemektedir. Buna karşın virulan *B. abortus* suşlarının PMN hücrelerinde

canlı kaldıkları bildirilmiştir. *B. abortus*'un düşük moleküller ağırlıklı maddeleri spesifik olarak bakterisidal sistemin myeloperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemini inhibe etmektedir (80,81).

Hücre içi bakterilere karşı asıl koruyucu immun cevap, hücresel immunitedir. Hücresel bağışıklıkta T hücre kökenli sitokinler, özellikle IFN- $\gamma$  yolu ile makrofaj aktivasyonunun sonucu olarak fagosite edilmiş mikroorganizmaların öldürülmesi gerçekleşir. Diğer önemli yol ise CD8+ sitolitik T lenfositleri tarafından enfekte hücrelerin lizisidir. Hücre içi bakterilerin protein antijenleri hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerini uyarır ve CD4+ yardımcı T hücrelerinin Th1 fenotipine farklılaşmasında potent uyarıcı rol oynarlar. Ayrıca NK hücreleri tarafından IFN-  $\gamma$  ve makrofajlar tarafından IL-2 üretimini uyarırlar. Th1 hücreleri, makrofajların fagosite edilmiş patojenin öldürülmesini sağlayacak reaktif oksijen radikalleri ve enzimler üretmesini aktive edecek olan IFN- $\gamma$  sitokinini salgırlar. IFN- $\gamma$ , ayrıca komplemanı aktive eden ve fagositoz için bakterileri opsonize eden, böylece makrofajların efektör fonksiyonlarına yardımcı olan antikor izotiplerinin üretimini uyarır. Th1 hücreleri lokal enflamasyonu indükleyen TNF- $\alpha$  sitokini de salgırlar. Her iki sitokininde intrasellüler bakterilere karşı bağışıklıktaki önemi deneysel modellerde gösterilmiştir (82).

*B. abortus*'a karşı gelişen immunité antijen-spesifik T hücre aktivasyonu, CD4+ ve CD8+ T hücreleri ile humoral immuniteden oluşmaktadır. *B.abortus* enfeksiyonuna karşı korunmada primer olarak Th1 tip hücresel immunitenin aracılık ettiği düşünülmektedir. *B.abortus* antijen sunan hücreleri tetikleyerek IL-12 salınımını arttırmaktadır bu ise Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını sağlayarak IFN- $\gamma$  salınımına yol açmakta böylece makrofajın öldürme mekanizması aktive olmaktadır. Ayrıca CD8+ sitotoksik T lenfositleri de IFN- $\gamma$  sekrete edebildiği için *B.abortus* ile enfekte makrofajları öldürme kapasitesine sahiptir (83).

NK hücreleri patojenlere karşı ilk defans mekanizmasını oluşturmaktadır. *B. abortus* antijen sunan hücreleri uyararak IL-12 salınımına yol açar. IL-12 NK hücrelerinin öldürücü hücre haline gelmesine, IFN- $\gamma$  sekrete etmesine yol açar. NK hücreleri bu yolla enfekte makrofajları öldürme yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte fare modelinde in vitro ortamda NK hücrelerinin ortamdaki uzaklaştırılması *B. abortus* bakterisine karşı gelişen immunitéde değişiklik yaratmamıştır. Bu durum NK hücreleri olmasa bile diğer immun mekanizmaların *B. abortus* enfeksiyonunu kontrol etmede yeterli olabileceğini göstermektedir (84). Paranavitana ve arkadaşlarının (85) yaptığı bir çalışmada, zayıflatılmış *B. melitensis* suşu ile oral olarak immunize edilen farelerden elde edilen dalak hücreleri kültür yolu ile çoğaltıldıktan sonra bu hücreler, *B. melitensis* suşu ile stimüle edilmişlerdir. Bir çok sitokin ve kemokinin gen salınım ürünleri gerçek zamanlı PZR yöntemiyle, sekrete edilen proteinler de ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçta IL-2, IL-18, IFN- $\gamma$  düzeylerinin ve IL-12 ve IL-23 ile ilgili gen ürünlerinin arttığı saptanmıştır.

Antijen sunan hücreler (APC); makrofaj, dendritik hücrelerden oluşurlar ve NK hücreleri ile birlikte invaze olan mikroorganizmalara karşı aktive olan en erken hücrelerdir. Cilt altında ve mukozal bölgelerde yerleşirler. Bakteri hücre duvarı ve lipopolisakarit yapı, APC hücrelerinin toll like reseptörlerinin yardımıyla tanınır ve bakteri hücre içine alınır. Fagositoz APC hücrelerinden



TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımına yol açarak APC hücrelerinin aktivasyonunu artırır. Fagositozu takiben MHC molekülleri sentezlenir ve bazı bakteriyel peptidlerle birlikte hücre yüzeyinde belirginleşir. Daha sonra deri ve mukozal bölgelerden lenfoid organlara göç ederler ve yüzeylerinde bulunan MHC molekülleri ve bakteriyel peptidler yolu ile T hücrelerini aktive ederek antijen spesifik immunitenin oluşmasına aracılık ederler. APC hücrelerinin aktivasyonu sonucu IL-12 salınımı, NK hücreleri, T ve B hücrelerinin antijen spesifik hücrelere dönüşümüne yol açar. T hücrelerinden IFN- $\gamma$  salınımı enfekte hücrenin öldürülmesine aracılık eder (84). Hem in vitro hem de in vivo ortamda Th1 sitokini olan IFN- $\gamma$ 'nın makrofaj aktivasyonuna yol açma ve brusella enfeksiyonunu sınırlamada önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bunun aksine Th2 sitokini olan IL-10 makrofaj fonksiyonlarının baskılanmasına yol açarak enfeksiyona eğilimi artırmaktadır. Fare modelinde Th1 immunitesi baskın farelerde enfeksiyona direnç daha fazla iken Th2 immunitesi baskın olanlarda enfeksiyona duyarlılık daha fazladır (84).

T hücreleri CD4+ T helper hücreleri (Th) ile CD8+ sitotoksik T (Ts) hücrelerinden oluşmaktadır. APC hücrelerinin aktivasyonu bu hücrelerin sitokinlerin değişik paternlerini sentezleyebilen efektör ve hafıza hücrelerine dönüşümüne yol açar. Th1 ve Ts hücreler primer olarak IFN- $\gamma$  ve  $\beta$  kemokinleri sentez ederken, Th2 hücreleri temel olarak IL-4 ve IL-5 sekrete ederler. Th hücreleri B hücrelerinden antikor salınımına da yol açarlar. Th1 hücreleri IgG2a'nın baskın olduğu antikor sentezine yol açarken, Th2 hücreleri IgG1 ve IgE'nin baskın olduğu antikor sentezine yol açarlar. Sonuç olarak yüzeylerinde MHC-1 peptid ve bakteriyel peptid taşıyan *B. abortus*'u fagosite etmiş hedef APC hücreleri sitotoksik T hücreleri tarafından tanınarak yok edilirler (84).

B hücreleri antijen ile aktive edilmiş T hücreleri tarafından salınan sitokinler yolu ile aktive olarak plasma hücrelerine ve bellek hücrelerine dönüşürler. Ayrıca B hücreleri antijen işleyen ve sunan hücre olarak da görev yapar. İçlerine aldıkları immunojenleri MHC II moleküllerinin yardımıyla Th hücrelerine sunarlar. Brusella bakterilerine bağlı enfekte konakçıda IgA, IgE, IgM, IgG antikorları sentezlenir. Bruselloza dirençte antikor titresi ile hastalığa direnç arasında bir korelasyon bulunmamaktadır. Antikorlardan özellikle Th hücrelerin aktive ettiği B hücrelerinden salınan IgG subgrupları olan IgG1 ve IgG2 kompleman aracılığı ile bakterinin lizisine yol açmaktadır (75,84). Brusella bakterilerinin lipopolisakkarit ve proteinlerine karşı antikorlar oluşmakta ve bu antikorlar serolojik testler ile saptanabilmektedir. *B. canis* ve *B. ovis* buruşuk (R) tip koloni morfolojisi gösterdiğinden dolayı serolojik testler dış membran proteini gibi protein antijenlerine bağlı gelişen antikorları göstermektedir. Dış membran proteinine karşı IgA, IgM, IgG tipi antikorlar gelişmektedir. Arıza ve arkadaşları ile - Aray ve arkadaşlarının (86,87) yaptıkları çalışmalarda, relaps gösteren hastalarda IgA ve IgG'nin ikinci bir pik yaptığı gösterilmiştir. Yüksek IgG düzeylerinin brusellozlu hastalarda direncin bir göstergesi olabileceği, ancak relapsın göstergesi olmadığı, birlikte IgA artışının da olması gerektiği kanıtlanmıştır.

Kompleman aracılığı ile yüzeyi düz (smooth) olan brusella bakterilerinin öldürülmesinde antikorlar gerekmektedir. Klasik kompleman yolu LPS'e spesifik olan IgM, IgG antikorlarının düşük seviyeleri ile başlatılabilmektedir.

Klasik kompleman yolunun sonunda bakterinin lizisi gerçekleşmektedir. Yüksek antikor düzeyi içeren serumlarda kompleman aracılığı ile bakterinin öldürülmesi zorlaşmaktadır. Bu durum antikor düzeyi ile hastalığa direnç arasında pozitif bir korelasyon olmadığını göstermektedir. Avirulan yüzeyi buruşuk bakteriler invazyondan kısa süre sonra kompleman yolu ile öldürülebilirken, yüzeyi düz (smooth) formlar serum faktörlerine dirençli olup fagositik hücrelerde hayatta kalmaya devam ederler. Yüksek serum antikor düzeyi kompleman aracılı bakteri öldürülmesini zorlaştırırken, opsonizasyonu kolaylaştırarak fagositozu artırır. Bundan sonraki aşamada hastalığa karşı direnç hücrel immunite yolu ile sağlanır (88).

PMNL'ler enfeksiyona karşı savunmada ilk rol oynayan hücrelerdendir. Fagositoz sonrası oksijene bağımlı ve oksijene bağımsız yollarla hücre içi mikroorganizmaları öldürürler. Oksijenden bağımsız olan mekanizmalarda, lizozim, laktoferrin (demir bağlayan protein), katyonik proteinler vs. rol alırken, oksijene bağımlı mekanizmada NADPH oksidaz enziminin katalitik etkisi ile moleküler oksijenin süper oksit radikallerine ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumuna yol açması rol oynar. Oksijene bağımlı mekanizma ile oluşan süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit mikroorganizmalar için toksiktir. Ayrıca myeloperoksidaz ile ilişkili reaksiyonlarda meydana gelen halojenli bileşikler mikroorganizmalar üzerine öldürücü etki gösterirler (72). İnsanlarda ve sıgırlardaki polimorfonükleer hücre granül salgıları ile yapılan bir çalışma sonucu, *Salmonella typhimurium* bakterisinin yüzeyi buruşuk türünün oksijen bağımsız yol ile %100 oranında öldürülebildiği buna karşın yüzeyi düz ve buruşuk olan *B. abortus* türlerinin öldürülemediği saptanmıştır. Oksijen bağımlı mekanizmanın *B. abortus* bakterisini öldürmede etkili olduğu, yüzeyi düz olan suşların, buruşuk olanlara göre bu öldürmeye daha dirençli olduğu bildirilmiştir (89).

Brusella bakterilerinin fagositik hücrelerin öldürme mekanizmalarından korunmak ve hayatlarını devam ettirebilmek amacıyla geliştirdikleri savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bakterinin hücre içinde canlılığını sürdürmesinde Cu-Zn superoxide dismutaz, eritroz fosfat dehidrogenaz içermesi ve stresle indüklenebilir proteinleri salgılamasının rolü olabileceği düşünülmektedir. En önemli virulans faktörü ise nötrofillerde myeloperoksidaz- $H_2O_2$  sistemini baskılayan, TNF üretimini inhibe eden, makrofajlarda fagozom-lizozom füzyonunun engelleyen ve oksidatif hasara karşı koruyan adenin ve guanin monofosfat gibi bazı maddeleri sentezlemesidir (3,14). *B. suis* bakterisinin konak içinde yaşamını devam ettirebilmek amacıyla içinde bulunduğu monosit ve makrofajların apoptozisini engellediği gösterilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada, *B. suis* ile enfekte makrofajların IL-1, IL-6, IL-10, IL-8 sekrete ettiği halde TNF- $\alpha$  sekrete etmediği gösterilmiştir. Bu inhibisyonun bakterinin Omp25 antijeninin TNF- $\alpha$  salınımı üzerindeki etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bakteri böylece ilk olarak makrofajın otokrin aktivasyonunu, ikincisi IL-12 üretimini ve Th1 tip hücrel immun yanıtı bozarak antimikrobiyal savunma mekanizmalarından kaçmaktadır (6).

### 3. MATERYAL

Çalışma kapsamına 21.08.2006-10.09.2007 tarihlerinde Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji servisinde bruselloz tanısı ile takip edilen 40 kişiden oluşan hasta grubu ile meslek, yaş ve cinsiyet açısından benzerlik gösteren; herhangi bir akut ya da kronik hastalığı olmayan ve yapılan değerlendirmelerde herhangi bir semptomu ve patolojik fizik muayene bulgusu olmayan 40 kişiden oluşan kontrol grubu alınmıştır. Hastalardan alınan tedavi öncesi serumları ve kontrol grubundan alınan serum örnekleri, çalışılacağı güne kadar -80 °C'de saklanmıştır. Çalışma günü olan 17-22.09.2007 tarihinde bu serumlarda ELISA yöntemi ile IL-10, IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  düzeyleri belirlenmiştir.

Bruselloz tanısı; kliniği brusellozu düşündüren STA  $\geq$  1/160 veya Coombslu brusella testi  $\geq$  1/160 pozitif olan ve/veya kan ya da kemik iliğinde, diğer vücut sıvılarında *Brucella spp.* üretilmesi ile konulmuştur.

Çalışma prospektif olarak planlanmış olup, hasta grubu komplikasyonlu ve komplikasyonsuz olarak ikiye ayrılmıştır. Komplike grup hematolojik, gastrointestinal, osteoartiküler, kardiyovasküler, ürogenital sistem, solunum sistemi tutulumu olan vakalar olarak belirlendi. Öncesinde hematolojik bir sorunu olmayan olguların hematolojik tutulum gösterenlerinde; anemi (Hb değerinin bayanlarda <12 g/dl erkeklerde <14 gr/dl olması), lökopeni (kan lökosit düzeyinin <4000/ mm<sup>3</sup> olması), lökositoz (kan lökosit düzeyinin >12000 mm<sup>3</sup> olması), trombositopeni (trombosit düzeyinin <150000/ mm<sup>3</sup> olması), trombositoz (trombosit düzeyinin >450000/ mm<sup>3</sup>) olanlar komplikasyonlu gruba dahil edildi. Gastrointestinal tutulum gösteren olgularda serum ALT seviyesinin normalin 1,5 katından fazla olanlar ile, hepatomegali, splenomegali saptananlar komplikasyonlu gruba dahil edildi. Osteoartiküler tutulumu olan olgular görüntüleme yöntemleri ile sakroileit, periferik artrit, spondilit, osteomyelit tespit edilen vakalar olarak belirlendi. Kardiyovasküler sistem tutulumunun ekokardiyografik bulgularla kanıtlandığı olgular, genitoüriner sistem tutulumu gösteren olgularda epididimoorsit saptanan hastalar, solunum sistemi tutulan olgularda plevral effüzyon saptanan bir olgu komplikasyonlu gruba dahil edildi. Kontrol grubu ise hasta grubu ile yaş, cinsiyet, meslek açısından benzerlikleri olan bruselloz açısından brusella tüp aglütinasyonu ve Coombslu brusella testlerinin negatif olduğu saptanan sağlıklı gönüllülerden oluşturuldu.

Çalışma için SDÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 25.07.08 tarih ve 06/03 sayılı kararla onay alınmıştır.

Bu çalışmada aşağıda bulunan malzemeler kullanılmıştır.

- Hasta serumları
- Kontrol serumları
- 10 ml'lik steril enjektörler
- 8 ml'lik standart biyokimya tüpleri
- Santrifüj cihazı (NF615- Nüve sanayi malzemeleri)
- Brucella Tüp Aglutinasyonu Test Antijeni 200ml (*Brucella abortus* S19- Pendik Veteriner Enstitüsü)
- % 5'lik konsantre fenollü tuzlu su (Seromed laboratuvarı)
- % 0,5 Fenol içeren serum fizyolojik 500 ml
- 300 µl pipetör (Hamilton)
- 100 µl pipetör (Hamilton)
- 16x100ml test tüpleri
- Eppendorf tüpleri 2 ml
- Antihuman Globulin 10 ml (Tulip Diagnostik LTD)
- 300 µl multi kanallı pipetör (Hamilton)
- Distile su
- Ultramicroplate Reader (ELX808 iu)
- Auto Strip Washer (ELX50)
- Multimode Printer (Panasonic K-X P1110)

**- Human TNF- $\alpha$  ELISA- Beckman Coulter-Kit içeriği**

- 2x10 ng/vial(küçük şişe)-Liyofilize standart
- 1x12 ml Konjugat solüsyonu
- 1x12 ml Streptavidin-peroksidaz solüsyonu
- 1x12x8 96 kuyucuk içeren monoklonal anti TNF- $\alpha$  antikorları ile kaplı plak
- 1x12 ml Substrat Solüsyonu
- 1x15 ml Dilüsyon solüsyonu
- 1x50 ml Yıkama solüsyonu konsantre, 1 şişe 50 ml
- 3 adet folyo

**- Human IL-10 ELISA IM 1987-Beckman Coulter- Kit içeriği**

- 96 kuyucuk içeren monoklonal anti IL-10 antikorları ile kaplı plak
- Liyofilize standart, 1 küçük şişe
- Biotinile monoklonal antikor 1 küçük şişe, 6 ml
- Dilüsyon sıvısı 1 şişe 25 ml
- Streptavidin peroksidaz konjugat solüsyonu 1 şişe, 12 ml
- Yıkama solüsyonu konsantre, 1 şişe 50 ml
- Substrat solüsyonu 1 şişe 12 ml
- Stop solüsyonu (sulfurik asit) 1 şişe 6 ml

**- Human IFN- $\gamma$  KHC4021:1 plate Biosource- Kit içeriği**

- 96 kuyucuk içeren monoklonal anti IFN- $\gamma$  antikorları ile kaplı plak
- Human IFN $\gamma$  standart, recombinant Human IFN $\gamma$ , 2 küçük şişe
- Standart dilüsyon tampon solüsyonu, 25 ml 1 şişe
- İnkübasyon tampon solüsyonu, 12 ml 1 şişe
- Hu IFN $\gamma$  biotin konjugat solüsyonu, 6 ml 1 şişe
- Streptavidin-Peroksidaz konsantre solüsyonu, 0.125 ml 1 küçük şişe

- Streptavidin-Peroksidaz dilüsyon sıvısı 2 5ml 1 şişe
  - Yıkama solüsyonu konsantre, 100 ml 1şişe
  - Stop solüsyonu, 25 ml 1şişe
  - Folyo
- **Human IL-6 ELISA IM 1120- Beckman Coulter- Kit içeriği**
  - 96 kuyucuk içeren monoklonal anti IL-6 antikorları ile kaplı plak
  - Liyofilize standart, 1 küçük şişe
  - IL-6 liyofilize konjugat, 1 küçük şişe
  - Dilüsyon sıvısı 1 şişe, 25 ml
  - IL-6 dilüsyon sıvısı 2 liyofilize
  - IL-6 Liyofilize kontrol serumu, 1 şişe
  - Yıkama solüsyonu konsantre, 1 şişe, 50 ml
  - Liyofilize substrat solüsyonu, 1 küçük şişe
  - Stop solüsyonu ( tacrine) 1 şişe, 6 ml
- **Human IL-2 Biosource 96 testlik kit içeriği**
  - Human IL-2 standart 2 şişe
  - Standart dilüsyon tampon solüsyonu 1şişe (25 ml)
  - 96 kuyucuk içeren monoklonal anti IL-2 antikorları ile kaplı plak
  - İnkübasyon tampon solüsyonu 1 şişe (25 ml)
  - Human IL-2 biotin konjugat solüsyonu 1 şişe (6 ml)
  - Streptavidin-Peroksidaz konsantre solüsyonu 1 küçük şişe (0.125 ml)
  - Streptavidin-Peroksidaz dilüsyon sıvısı 1 şişe (25 ml)
  - Yıkama solüsyonu konsantre 1şişe (100 ml)
  - Stabilize kromojen solüsyonu 1 şişe (25 ml)
  - Folyo 3 adet

### 3.1. İstatistik

Hasta ve kontrol gruplarının IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  serum düzeylerinin karşılaştırılmaları SPSS 11.0 paket programında student's t testi kullanılarak yapılmıştır. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz hasta gruplarının IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  serum düzeyleri Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz hasta gruplarındaki serum CRP, sedimantasyon değeri Mann Whitney U testi kullanılarak, STA dağılımı ise çok gözlü düzende ki-kare testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, meslek özelliklerinin dağılımını gösteren tablolar için ise SPSS 11.0 paket programı kullanılmıştır. Testler sonucu elde edilen p değeri < 0,05 ise anlamlı kabul edildi.

## 4. METOD

### 4.1. Standart tüp aglütinasyonu ve Coombslu brusella testinin uygulanması:

#### 4.1.1. Standart tüp aglütinasyonunun uygulanması:

Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde *brucella abortus S* (smooth) kolonilerinden hazırlanan standardize edilmiş antijen kullanılarak tüp aglütinasyon testi uygulandı. Bu teste göre, en az 10 adet 10x100 ml steril tüp kullanılarak, 1.tüpe 0,8 cc diğer tüplere 0,5 cc %0,5 fenollü tuzlu su konuldu. % 0,5'lik fenollü tuzlu su % 5'lik 40 ml konsantre fenollü tuzlu suya toplam 400 ml'ye tamamlanacak şekilde serum fizyolojik eklenerek elde edildi. 1. tüpe hamilton 300 mikrolitrelik pipetör kullanılarak 0,2 cc hasta serumu eklendi. Yeni bir pipetle 1. tüpten başlayarak 1. tüpten 0,5 cc 2. daha sonra 3. ve sondan bir önceki tüpe kadar aktarıldı. 9. tüpten sonra 0,5 cc dışarı atıldı. Daha sonra her tüpe 0,5 cc standart brusella antijeni konuldu. Böylece 1/10,1/20,1/40....şeklinde serumun çift sulandırılmaları elde edilmiş oldu. Tüpler 37°C'de 24 saat bekletildi. Sonuçların okunmasında önce antijen kontrol tüpünün aglütinasyon vermemiş olduğuna bakılarak, diğer tüplerde üstteki sıvının berraklığı ve oluşan çökeltiye göre titreleri ile birlikte değerlendirildi. Bu teste göre 1/160 ve üzerindeki aglütinasyon titreleri anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4.1.2. Coombslu brusella testinin uygulanması:

Brusella tüp aglütinasyon testinin negatif olduğu hasta ve kontrol grubu örneklerinde aglütinasyon blokajının olup olmadığını saptamak için Coombslu brusella testi uygulandı. Aglütinasyon vermeyen tüpler 2000 rpm de 20 dk santrifüj edilerek antijen çöktürüldükten sonra üstteki sıvı döküldü. Her tüpe yeniden 0,5 cc tuzlu su konulduktan sonra, tüp çalkalanarak veya vorteksenerek süspansiyonun karışması sağlandı. Tekrar santrifüj edilerek 3 defa bu işlem tekrarlandıktan sonra her tüpe 0,05 ml insan antiglobulin (Coombs) serumu eklendi. 37°C'de 24 saat bekletildikten sonra aglütinasyon okundu. Testin 1/160 titrasyonda pozitif aglütinasyon verdiği durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4.2. Hasta ve kontrol grubu serumlarının ayrılması ve saklanması:

Klinik olarak bruselloz düşünülen serolojik olarak standart tüp aglütinasyon testi veya Coombslu brusella testi 1/160 ve üzeri pozitif olan hasta grubundan 10 ml'lik steril enjektörlerle 8ml periferik venöz kan örneği alınarak steril biyokimya tüplerine aktarıldı. Aynı şekilde kontrol grubundan alınan periferik venöz kan örneklerinde brusella tüp aglütinasyonu ve Coombslu brusella testlerinin negatif olduğu görüldükten sonra, 10 ml'lik steril enjektörlerle 8 ml periferik venöz kan örneği alınarak steril biyokimya tüplerine aktarıldı. Biyokimya tüpleri içindeki kanın kendiliğinden pıhtılaşması beklendikten sonra 15 dakika boyunca 1000 devirde santrifüj edildi. Daha sonra şekilli elemanlardan ayrılmış üstteki serum kısmından 1,5 ml örnek alınarak 2 ml'lik eppendorf tüplerinin her birine 300 µl olacak şekilde 5

eppendorf tüpüne aktarıldı. Eppendorf tüpleri içindeki örnekler çalışılacağı güne kadar -80°C’de saklandı.

#### 4.3. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında ELISA yöntemi ile IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 düzeylerinin belirlenmesi:

##### 4.3.1. Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde ELISA yöntemi ile IFN- $\gamma$ düzeyinin belirlenmesi:

Kit içerisindeki maddeler kullanmadan önce oda ısısında 30 dakika bekletildi. Standart, standart dilüsyon sıvısı ile konsantrasyonuna hale getirildikten sonra 5000 pg/ml konsantrasyonunda standart solüsyonu hazırlandı. 100  $\mu$ lt konsantrasyon standart solüsyonu ile 400  $\mu$ lt standart dilüsyon sıvısı plastik tüp içinde karıştırılarak 1000 pg/ml konsantrasyonda Hu-IFN  $\gamma$  içeren solüsyon elde edilmiş oldu. Daha sonra altı adet plastik tüplere 150  $\mu$ lt standart dilüsyon sıvısı konuldu ve 1000 pg/ml konsantrasyon standart solüsyondan seri dilüsyonlarla tablo 2’de görüldüğü gibi 500, 250, 125, 62,5, 31,2 ve 15,6 pg/ml IFN  $\gamma$  içeren standartlar hazırlanmış oldu.

Kit içeriğinde belirtildiği gibi Streptavidin-peroksidaz konsantrasyonundan 120  $\mu$ lt ve streptavidin peroksidaz dilüsyon sıvısından 12 ml plastik bir tüp içinde dilüe edildi. Yıkama için kullanılacak solüsyon 950 ml distile su ile karıştırılarak, 1/20 oranında dilüe edildi.

Tablo 2. IFN- $\gamma$  seri dilüsyonlarının hazırlanması

Standart konsantrasyon	IFN- $\gamma$	Dilüsyon sıvısı
500pg/ml	150 $\mu$ lt 1000 pg/ml standart solüsyon	150 $\mu$ lt
250pg/ml	150 $\mu$ lt 500 pg/ml standart solüsyon	150 $\mu$ lt
125pg/ml	150 $\mu$ lt 250 pg/ml standart solüsyon	150 $\mu$ lt
62,5pg/ml	150 $\mu$ lt 125 pg/ml standart solüsyon	150 $\mu$ lt
31,2pg/ml	150 $\mu$ lt 62,5 pg/ml standart solüsyon	150 $\mu$ lt
15,6pg/ml	150 $\mu$ lt 31,2 pg/ml standart solüsyon	150 $\mu$ lt
0 pg/ml		150 $\mu$ lt

Kit içindeki yüksek vakumda kurutulmuş (liyofilize) komponentlerin çözünmesinden sonra 10 dakika beklendi. Yıkama için kullanılacak solüsyon 950 ml distile su ile karıştırılarak, 1/20 oranında dilüe edildi. Tüm kuyucuklara 50  $\mu$ lt inkübasyon tampon solüsyonundan konuldu. Daha sonra standart veya serum örneklerinden 50  $\mu$ lt tüm kuyucuklara konuldu. Folyo ile plağın üstü kapatılarak 1,5 saat oda ısısında bekletildi. Beklemeden sonra tüm kuyucuklar biyokimya laboratuvarında ELX50 Auto Strip Washer ile dört kez yıkandı. dördüncü yıkama sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyonun tamamen aspire edilmiş olduğuna dikkat edildi. Daha sonra her kuyucuğa streptavidin-peroksidaz solüsyonundan 100  $\mu$ lt eklendi. Plağın üstü yeni bir folyo ile kapatılarak 45 dakika oda ısısında bekletildi. Beklemeden sonra

kuyucuklar ikinci kez dört defa yıkandı Dördüncü yıkamadan sonra kuyucukların içindeki sıvının tamamen aspire edilmiş olduğuna dikkat edildi. İkinci yıkama sonrasında her bir kuyucuğa 100 µlt kromojen solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta bekletildi. Son olarak her kuyucuğa 100 µlt stop solüsyonundan eklendi kuyucukların içindeki solüsyonun mavi renkten sarı renge dönüştüğü görüldü. Her bir kuyucuk içindeki solüsyonun 450 nanometrede absorbans değerleri ELX808 iu Ultramicroplate Reader kullanılarak saptandı ve pg/ml olarak hesaplandı.

#### 4.3.2. Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde ELISA yöntemi ile IL-2 düzeyinin belirlenmesi:

Kit içerisindeki maddeler kullanmadan önce oda ısısında 30 dakika bekletildi. Kit içindeki liyofilize komponentlerin çözünmesinden sonra 10 dakika daha beklendi. Yıkama için kullanılacak solüsyon 2,4 litre distile su ile karıştırılarak, 1/25 oranında dilüe edildi. Liyofilize standart solüsyon şişe üzerindeki belirtilen distile su miktarı ile karıştırılarak, 10000 pg/ml konsantre standart solüsyonu elde edildi. Konsantre standart solüsyonundan 100 µlt ve standart dilüsyon solüsyonundan 900 µlt plastik bir tüp içinde karıştırıldı. Böylece 1000 pg/ml konsantrasyonunda standart solüsyon elde edilmiş oldu. Bu solüsyondan her birinin içerisinde 300 µlt olan plastik tüplere tablo 3'de görüldüğü gibi seri dilüsyonlar yapılarak 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 ve 0 pg/ml konsantrasyonlarda standart solüsyonlar elde edildi. Konsantre streptavidin-peroksidaz solüsyonundan 120 µlt ile streptavidin-peroksidaz dilüsyon sıvısından 12 ml plastik bir tüp içinde karıştırılarak dilüe streptavidin-peroksidaz solüsyonu elde edildi.

Tablo 3. IL-2 seri dilüsyonlarının hazırlanması

Standart konsantrasyon	IL-2	Dilüsyon sıvısı
1000pg/ml		
500pg/ml	300µlt 1000 pg/ml standart solüsyon	300µlt
250 pg/ml	300µlt 500 pg/ml standart solüsyon	300µlt
125 pg/ml	300µlt 250 pg/ml standart solüsyon	300µlt
62,5 pg/ml	300µlt 125 pg/ml standart solüsyon	300µlt
31,2	300µlt 62,5 pg/ml standart solüsyon	300µlt
15,6	300µlt 31,2 pg/ml standart solüsyon	300µlt
0 pg/ml		300µlt

96 kuyucuk içeren plak üzerinde her bir kuyucuğa 100 µlt standart solüsyondan veya serum örneklerinden konuldu. Daha sonra 50 µlt inkübasyon solüsyonu her kuyucuğa konuldu. 50 µlt biotin konjugat solüsyonu eklendikten sonra plak folyo ile kapatılarak 2 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra ELX50 Auto Strip Washer ile kuyucuklar dört kez yıkandı. Dördüncü yıkama sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyonun tamamen aspire edilmiş



olduğuna dikkat edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt streptavidin-peroksidaz solüsyonu eklendi. Plak tekrar folyo ile üstü kapatılarak oda ısında 30 dakika bekletildi. Bir sonraki aşamada kuyucuklar içindeki solüsyon tekrar dört kez yıkandı ve dördüncü yıkama sonrasında solüsyonun tamamen aspire edilmiş olduğu görüldü. Her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt kromojen solüsyonu eklendi ve kuyucuklar içindeki sıvının mavi bir renk aldığı gözlemlendi. Daha sonra plak oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Son olarak her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt stop solüsyonu eklendi ve ELX808 iu Ultramicroplate Reader ile, 450 nanometrede her bir kuyucuğun absorbans değerleri saptandı pg/ml olarak hesaplandı.

#### 4.3.3. Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde ELISA yöntemi ile IL-6 düzeyinin belirlenmesi:

Kit içerisindeki maddeler kullanmadan önce oda ısısında 30 dakika bekletildi. Kit içindeki liyofilize komponentlerin çözünmesinden sonra 10 dakika daha beklendi. Yıkama için kullanılacak solüsyon 950 ml distile su ile karıştırılarak, 1/20 oranında dilüe edildi. Liyofilize kontrol serum şişe üzerindeki distile su miktarı ile dilüe edildi. Liyofilize konjugat şişe üzerindeki distile su miktarı ile dilüe edildi. Substrat solüsyonu kullanmadan 10 dakika öncesinde şişe üzerindeki distile su ile dilüe edildi. Liyofilize standart solüsyon şişe üzerindeki belirtilen distile su miktarı ile karıştırılarak, 10 ng/ml standart solüsyon elde edildi. Tablo 4'de gösterildiği gibi standart solüsyondan ve dilüsyon sıvısından, uygun miktarlarda kullanılarak 1000 pg/ml, 333 pg/ml, 111 pg/ml, 37 pg/ml, 12,3 pg/ml dilüsyonlarında plastik tüplere seri dilüsyonları elde edildi.

Tablo 4. IL-6 seri dilüsyonlarının hazırlanması

Standart konsantrasyon	IL-6	Dilüsyon sıvısı
1000pg/ml	50 $\mu$ lt 10ng/ml standart solüsyon	450 $\mu$ lt
333pg/ml	150 $\mu$ lt 1000pg/ml standart solüsyon	300 $\mu$ lt
111pg/ml	150 $\mu$ lt 333pg/ml standart solüsyon	300 $\mu$ lt
37pg/ml	150 $\mu$ lt 111pg/ml standart solüsyon	300 $\mu$ lt
12,3pg/ml	150 $\mu$ lt 37pg/ml standart solüsyon	300 $\mu$ lt
0pg/ml		300 $\mu$ lt

96 kuyucuk içeren plak üzerinde her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt standart veya serum örneklerinden ve 100  $\mu$ lt konjugat konuldu. Plak 18-20 °C'de oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra ELX50 Auto Strip Washer ile kuyucuklar üç defa yıkandı. Üçüncü yıkama sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyonun tamamen aspire edilmiş olduğuna dikkat edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 200  $\mu$ lt substrat solüsyonu eklendi. Plak ikinci kez anlatıldığı şekilde oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Son olarak her bir kuyucuğa 50  $\mu$ lt stop solüsyonu konularak, ELX808 iu Ultramicroplate Reader ile, 405 nanometrede her bir kuyucuğun absorbans değerleri saptandı ve pg/ml olarak hesaplandı.

#### 4.3.4 Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$ düzeyinin belirlenmesi:

Yıkama için kullanılacak solüsyon 950 ml distile su ile karıştırılarak 1/20 oranında dilüe edildi. Liyofilize TNF- $\alpha$  1 ml dilüent buffer ile dilüe edildi. Böylece 10 ng/ml konsantrasyonunda stok standart solüsyon elde edilmiş oldu. Tablo 5’de gösterildiği gibi stok solüsyondan ve dilüsyon sıvısından, uygun miktarda kullanılarak 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 30 pg/ml, 15 pg/ml ve 0 pg/ml dilüsyonlarında plastik tüplere seri dilüsyonları elde edildi.

Tablo 5. TNF- $\alpha$  seri dilüsyonlarının hazırlanması

Standart konsantrasyon	TNF-- $\alpha$			Dilüsyon sıvısı
1000pg/ml	100 $\mu$ lt solüsyon	10ng/ml standart		900 $\mu$ lt
500pg/ml	250 $\mu$ lt solüsyon	1000pg/ml standart		250 $\mu$ lt
250pg/ml	250 $\mu$ lt solüsyon	500pg/ml standart		250 $\mu$ lt
125pg/ml	250 $\mu$ lt solüsyon	250pg/ml standart		250 $\mu$ lt
62,5 pg/ml	250 $\mu$ lt solüsyon	125pg/ml standart		250 $\mu$ lt
30pg/ml	250 $\mu$ lt solüsyon	62,5pg/ml standart		250 $\mu$ lt
15pg/ml	250 $\mu$ lt solüsyon	30pg/ml standart		250 $\mu$ lt
0pg/ml				250 $\mu$ lt

96 kuyucuk içeren plak üzerinde her bir kuyucuğa 50  $\mu$ lt dilüent buffer ve 50  $\mu$ lt serum örneği konuldu. Plağın üstü kit içerisinde bulunan folyo ile ışık görmeyecek şekilde kapatılarak 18-25°C’de 120 dakika inkübe edildi. Daha sonra ELX50 Auto Strip Washer ile kuyucuklar üç defa yıkandı. Üçüncü yıkama sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyonun tamamen aspire edilmiş olduğuna dikkat edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt konjugat eklenerek, plağın üstü ışık görmeyecek şekilde yeni bir folyo ile kapatıldıktan sonra 60 dakika 18-25°C’de inkübe edildi. Daha sonra plak içindeki kuyucuklar tekrar 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa kit içinde bulunan 100  $\mu$ lt streptavidin-peroksidaz solüsyonu konularak, plağın üstü ışıktan korunacak şekilde folyo ile tekrar kapatıldıktan sonra 30 dakika 18-25°C’de inkübe edildi. Daha sonra plağın içindeki kuyucuklar üçüncü kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt substrat solüsyonundan eklendi. Plak üzeri kapatılmadan karanlık bir ortamda 18-25°C’de 30 dakika inkübe edildi. Son olarak her bir kuyucuğa 100  $\mu$ lt stop solüsyonu eklendi ve 30 dakika sonra ELX808 iu Ultramicroplate reader kullanılarak 450 nanometredeki her bir kuyucuğun absorbans değeri saptandı ve pg/ml cinsinden hesaplandı.

4.3.5. Hasta ve kontrol grubu serum örneklerinde ELISA yöntemi ile IL-10 düzeyinin belirlenmesi:

Kit içerisindeki maddeler kullanmadan önce oda ısısında 30 dakika bekletildi. Kit içindeki liyofilize komponentlerin çözünmesinden sonra 10 dakika daha beklendi. Yıkama için kullanılacak solüsyon 950 ml distile su ile karıştırılarak, 1/20 oranında dilüe edildi. Standart solüsyon şişe üzerindeki belirtilen distile su miktarı ile karıştırılarak, 20 ng/ml stok standart solüsyon elde edildi. Stok standart solüsyondan ve/veya dilüsyon sıvısından uygun miktarda kullanılarak 2000 pg/ml, 400 pg/ml, 80 pg/ml, 16 pg/ml, 0 pg/ml dilüsyonlarında plastik tüplere seri dilüsyonları elde edildi.

Tablo 6. IL-10 seri dilüsyonlarının hazırlanması

Standart konsantrasyon	IL-10	Dilüsyon sıvısı
2000pg/ml	50µlt 20ng/ml standart solüsyon	450µlt
400pg/ml	100µlt 2000 pg/ml standart solüsyon	400µlt
80pg/ml	100µlt 400 pg/ml standart solüsyon	400µlt
16 pg/ml	100µlt 80 pg/ml standart solüsyon	400µlt
0pg/ml		400µlt

96 kuyucuk içeren plak üzerinde her bir kuyucuğa 50 µlt standart veya serum örneklerinden konuldu. Plak 18-20 °C’de oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra ELX50 Auto Strip Washer ile kuyucuklar üç kez yıkandı. Üçüncü yıkama sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyonun tamamen aspire edilmiş olduğuna dikkat edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan 50 µlt biotinile edilmiş antikör ve 100 µlt streptavidin-peroksidaz konjugat solüsyonundan eklendi ve plak tekrar 30 dakika 18-20°C’de bekletildi. Bir sonraki aşamada kuyucuklar tekrar üç kez yıkama işlemine tabi tutuldu ve her bir kuyucuğa 100 µlt substrat solüsyonundan eklendi. 15 dakika boyunca oda ısısında tekrar inkübasyon sağlandıktan sonra, her bir kuyucuğa 50 µlt stop solüsyonundan eklendi 450 nanometrede her kuyucuğun absorban değerleri pg/ml cinsinden hesaplandı.

## 5. BULGULAR

Hasta grubunun tedavi öncesi serumları ile kontrol grubunun serumlarında 17.09.2007-22.09.2007 tarihleri arasında Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvar desteği ile ELISA yöntemi kullanılarak; IL-10, IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  düzeyleri belirlendi.

Tablo 7. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaş ortalamasına göre dağılımı

	Sayı	
	Hasta grubu	Kontrol grubu
Erkek	21	21
Kadın	19	19
Yaş ortalaması	45,7	46,1

Tablo 8. Hasta ve kontrol grubunun meslek özelliklerine göre dağılımı

	Sayı	
	Hasta grubu	Kontrol grubu
Emekli	6	6
Çiftçi	8	8
Ev hanımı	18	18
Serbest	3	3
Öğrenci	4	4
İşçi	1	1

Tablo 9. Hasta grubunun semptomların başlama zamanına göre dağılımı

	Hasta grubu-sayı
Akut	28
Subakut	11
Kronik	1

Tablo 10. Hasta grubunun predispoze edici faktörlere göre dağılımı

Hayvancılık ile uğraşma	8
Çiğ süt içme, taze peynir yeme	11
Hayvancılık ve taze peynir yeme alışkanlığı	8
Nedeni belli değil	13

Tablo 11. Organ tutulumu gösteren komplikasyonlu hasta grubu

No	İsim	HM	SM	Diskit Epidural abse	Endokardit	PE	Sakroileit	Artrit	Orşit
1	M.Y.								+
2	A.Y.				+				
3	N.S								+
4	B.D.	+							
5	K.Ç.		+		+				
6	A.S	+							
7	N.K						+		
8	E.T							+	
9	M.YI.		+						
10	S.K			+					
11	A.AY	+	+						
12	T.D.	+	+			+			
13	H.K.			+				+	
14	K.A.	+							
15	C.A.	+							
16	M.A.	+							
17	Ş.Ö.	+	+						
18	A.AT								+

HM:Hepatomegali SM:Splenomegali PE:Plevraeffüzyon

Tablo 12. Komplikeyonlu hasta grubunun laboratuvar parametreleri

No	İsim	Sedim <sup>1</sup> (mm/saat)	CRP <sup>2</sup> (mg/dl)	Hb <sup>3</sup> (gr/dl)	Wbc <sup>4</sup> (mm <sup>3</sup> )	Plt <sup>5</sup> (mm <sup>3</sup> ) bin	ALT <sup>6</sup> U/L	STA	Coombs
1	MY	100	59	12,5	10100	283	41	1/80	1/160
2	A.Y.	44	85	11,1	15600	406	21	1/640	
3	N.S.	90	38	10,5	4410	64	63	1/640	
4	E.E.	30	57,6	9,9	3570	126	240	1/640	
5	B.D.	14	26,1	7,9	7480	246	75	1/1280	
6	K.Ç.	44	113	10,0	8850	243	15	1/320	
7	A.S.	58	9,07	14,3	8000	597	138	1/1280	
8	N.K.	33	143	12,8	9500	252	25	1/160	
9	M.Ö.	30	24,5	13,1	8600	286	70	1/640	
10	E.T.	24	70,8	15,9	13800	264	20	1/160	
11	M.Y.	30	44,4	11,9	8600	464	18	1/2560	
12	S.K.	25	16,2	11,8	5000	241	21	1/640	
13	A.AY.	18	47,3	13	4200	180	137	1/320	
14	T.D.	115	39,8	15,1	5500	212	29	1/1280	
15	K.K.	27	3,85	13,1	7300	264	64	1/320	
16	H.K.	60	158	10,9	8100	250	21	1/80	1/160
17	K.A.	30	16	10,1	3710	340	14	1/320	
18	C.A.	12	22	10,8	10900	80	79	1/2560	
19	A.K.	29	35	10,8	2800	135	51	1/2560	
20	M.A.	54	38	8,7	12700	489	5	1/80	1/160
21	Ş.Ö.	22	37,9	12,6	6600	212	30	1/320	
22	A.AT	21	57,6	12,7	11400	204	25	1/320	

<sup>1</sup> Sedimantasyon <sup>2</sup> C-reaktif protein <sup>3</sup> Hemoglobin <sup>4</sup> White blood cell(lökosit) <sup>5</sup> Platelet(trombosit) <sup>6</sup> Alanin aminotransferaz

Tablo 13. Komplikeşonsuz hasta grubunun laboratuvar parametreleri

No	İsim	Sedim <sup>1</sup> (mm/saat)	CRP <sup>2</sup> (mg/dl)	Hb <sup>3</sup> (gr/dl)	Wbc <sup>4</sup> (mm <sup>3</sup> )	Plt <sup>5</sup> (mm <sup>3</sup> ) bin	ALT <sup>6</sup> UL	STA	Coombs
1	MK.	4	3,40	12,4	4420	309	22	1/160	
2	Z.T.	10	33,5	12,2	10160	214	23	1/80	1/160
3	A.Ç.	52	46,5	12	7700	517	21	1/640	
4	A.A.	30	12	14	6030	298	24	1/160	
5	A.K.	16	1,28	14,7	7000	277	28	1/320	
6	S.C.	20	3,6	12,1	5500	236	12	1/640	
7	H.M.	26	36,0	14,1	4800	174	34	1/1280	
8	Y.C.	36	37	13	6400	410	20	1/160	
9	K.D.	32	1,87	12	4400	169	19	1/320	
10	F.Y.	33	41,6	12	7300	294	21	1/160	
11	B.K.	45	116	14	7800	298	56	1/320	
12	Ş.E.	14	2	14	5500	150	47	1/80	1/160
13	Ü.Y.	20	1,93	12,5	7200	416	17	1/320	
14	A.A.	26	9,6	16,3	12000	234	29	1/80	1/160
15	H.A.	89	81,7	12	6400	567	49	1/160	
16	İ.B.	2	14,3	17,3	9600	574	16	1/320	
17	R.U.	20	27,9	16,7	8130	325	36	1/320	
18	İ.BÜ.	28	24	14,3	7480	219	21	1/1280	

<sup>1</sup> Sedimantasyon <sup>2</sup> C-reaktif protein <sup>3</sup> Hemoglobin <sup>4</sup> White blood cell(lökosit)

<sup>5</sup> Platelet(trombosit) <sup>6</sup> Alanin aminotransferaz

Tablo 14. Komplikeşonlu hasta grubunda sitokin düzeyleri

	İsim	IL-10 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-2 pg/ml	TNF- $\alpha$ pg/ml	IFN- $\gamma$ pg/ml
1	MY	1,7	1,5	17,1	848,8	46,6
2	A.Y.	92,6	1196	23,7	186,5	51,4
3	N.S.	24,7	7,9	20,9	639,9	74,1
4	E.E.	9,4	0,1	20,1	173,9	30,2
5	B.D.	23,5	9,7	12,3	997	92,6
6	K.Ç.	1878	15,7	19,9	997	53,7
7	A.S.	10,2	45,5	25,2	467,2	97,9
8	N.K.	1,8	1,5	23,4	471,1	997
9	M.Ö.	9,5	8,7	24,7	88,9	46,3
10	E.T.	14,5	34,3	20,4	56	55,6
11	M.Y.	8,6	0,1	16,8	997	52,1
12	S.K.	7,7	0,1	20,9	347	266,2
13	A.AY.	26	3	20,6	60,7	75,4
14	T.D.	8	0,1	19,6	997	139,3
15	K.K.	1814	0,1	20,4	571,7	61,4
16	H.K.	7	0,1	23,4	130,9	43,7
17	K.A.	13,1	0,1	24,2	67,7	48,5
18	C.A.	53,6	0,1	15,1	768,4	121,3
19	A.K.	34	1,8	18,1	667	48,5
20	M.A.	56,2	15,2	21,2	424,2	35,6
21	Ş.Ö.	30,2	19,6	25	54,3	46,9
22	A.AT	159,2	192,1	29,3	79,3	53,4

Tablo 15. Komplıkasıonsuz hasta grubunda sitokin düzeyleri

No	İsim	IL-10 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-2 pg/ml	TNF- $\alpha$ pg/ml	IFN- $\gamma$ pg/ml
1	MK	20,5	0,1	21,9	406,6	46,9
2	Z.T.	1,2	11,3	20,9	22,7	36,3
3	A.Ç.	58,9	71,9	19,9	16,1	86,4
4	A.A.	17,6	16,5	19,6	466,7	66,9
5	A.K.	21,6	63,3	22,9	84	47,2
6	S.C.	16	11	18,9	40,1	36,6
7	H.M.	2,1	15,7	20,1	247,6	55,3
8	Y.C.	2	0,1	21,4	165,5	66,6
9	K.D.	1,7	10,5	26,8	87,1	103,3
10	F.Y.	1	20,9	22,7	192,3	80,2
11	B.K.	50	18,8	22,2	25,7	126,5
12	Ş.E.	1,6	0,1	11	860,1	143,5
13	.Y.	26	5,9	23,4	83	26,6
14	A.A.	33,4	6,4	20,9	118	198
15	H.A.	93	13,1	20,4	108,9	63,7
16	İ.B.	17,4	0,1	24,5	455,5	122,6
17	R.U.	63,2	16,7	21,4	63,7	39,2
18	İ.B.	65	16,7	21,4	57,4	85,4

Tablo 16. Kontrol grubunda sitokin düzeyleri

No	İsim	IL-10 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-2 pg/ml	TNF- $\alpha$ pg/ml	IFN- $\gamma$ pg/ml
1	S.T.	53	7,7	16,1	782,4	41,1
2	U.Ş.	57	2,1	22,4	313,2	21,5
3	Z.Ü.	46	33,5	23,7	351,2	41,4
4	S.D.	30,4	16,7	18,6	210,3	31,1
5	H.M.	22	12,1	22,9	62,3	33,7
6	C.D.	44,3	0,1	21,7	74,9	34,3
7	M.D.	37	24,4	22,7	54,9	38,5
8	H.S.	86,2	31,6	19,9	33,7	44,3
9	Y.S.	55,5	0,1	16,1	997	45,6
10	M.A.S.	15,9	0,1	24	503	25,3
11	R.Y.	22,3	8,4	20,1	230,2	21
12	A.Y.	13,6	0,1	22,7	285,3	30,8
13	V.Ş.	30,6	4,1	21,9	69,8	27,3
14	N.K.	50,8	64,8	24,2	40,3	17,6
15	Ş.S.	24,1	4,8	25,2	70	36,9
16	F.M.	104,2	49,1	20,4	174,5	21,2
17	A.K.	98,8	11,5	16,1	997	31,4
18	S.K.	30,1	24,4	23,4	997	70,5
19	G.Ö.	34,6	29,2	19,4	406,6	28,6
20	M.A.	3,9	4,8	22,9	129,2	33,7
21	A.K.	4,2	7,1	22,2	106,2	21,5
22	H.A.	64,9	8,2	21,2	244	80,5
23	E.A.	80,6	29,7	23,7	344	49,2
24	Ş.K.	170,8	63,3	21,9	471,6	27,9
25	A.Ş.	46,1	0,1	18,6	772,2	27,6
26	T.Y.	30,2	30,5	20,4	600,2	27,6
27	M.Y.	56,7	6,1	21,4	727,3	44
28	M.K.	53,6	4,8	18,9	308,2	32,4
29	A.A.	21,3	5,1	20,6	74,3	31,8
30	D.Y.	72	5,9	21,2	119,2	44,3
31	K.Y.	11,5	18,6	25,5	108,5	44,6
32	S.T.	82	5,6	21,7	478,6	49,8
33	H.D.	1955	103	15,1	997	34,3
34	N.D.	155	32,9	19,1	271,8	39,2
35	E.B.	26,5	19,4	21,2	652,6	46,9
36	C.A.	69,7	48,8	23,4	584,7	27,9
37	G.Ş.	80,2	10	21,9	278,5	20,5
38	A.H.	246,2	52,7	18,6	502,7	36,3
39	H.B.	83,2	99,7	51,6	431,2	31,3
40	O.S.	191,6	37	18,4	969,1	33,4



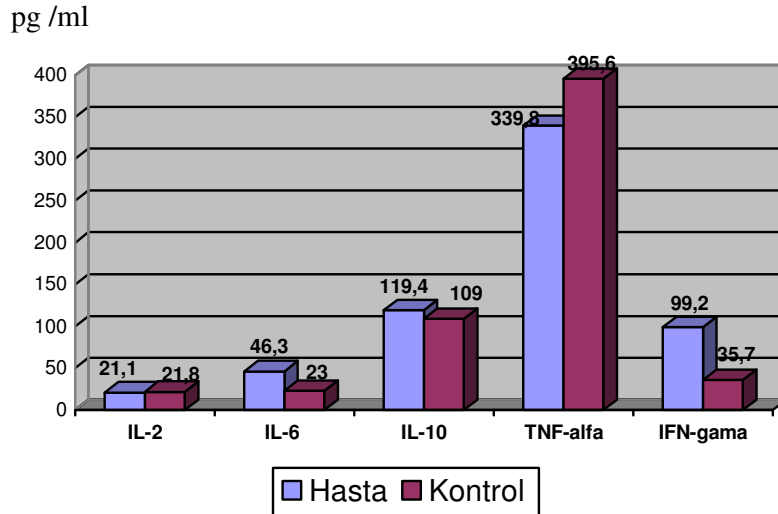
### İstatistiksel analizler:

1-) Hasta ve kontrol grubu arasında sitokin düzeylerinin ortalama değerleri student's t testi ile değerlendirildi. Test sonucuna göre hasta ve kontrol grupları arasında IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken; hasta grubundaki IFN- $\gamma$  düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,011). Hasta grubunda IL-6, IL-10 düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ( Tablo 15, grafik 1).

Tablo 17. Hasta ve kontrol gruplarının serum sitokin düzeyleri ortalamaları

		Sayı	Ortalama değer pg/ml	Standart sapma pg/ml	p değeri
IL-10	Hasta grubu	40	119,39	402,51	0,897
	Kontrol grubu	40	109,04	303,79	
IL-6	Hasta grubu	40	46,31	189,29	0,442
	Kontrol grubu	40	22,95	25,58	
IL-2	Hasta grubu	40	21,06	3,47	0,490
	Kontrol grubu	40	21,77	5,45	
TNF- $\alpha$	Hasta grubu	40	339,81	328,72	0,438
	Kontrol grubu	40	395,63	310,82	
IFN- $\gamma$	Hasta grubu	40	99,23	153,24	<b>0,011</b>
	Kontrol grubu	40	35,67	12,6	

Grafik 1. Hasta ve kontrol gruplarının sitokin düzeylerinin karşılaştırılması

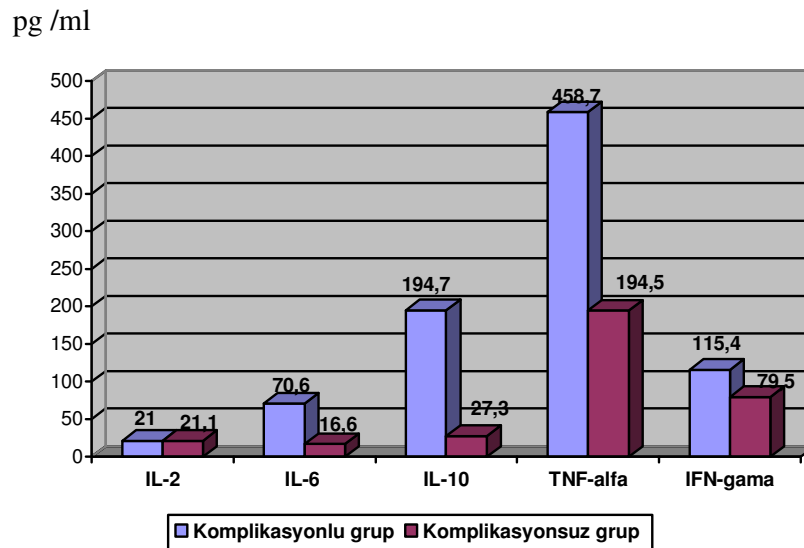


2-) Komplike ve komplike olmayan hasta grupları IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  düzeyleri açısından istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Her iki grup arasında IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Komplike gruptaki TNF- $\alpha$  düzeylerinin komplike olmayan grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. (p=0,013) Diğer taraftan komplike olmayan grupta IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  düzeylerinin daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 18, grafik 2).

Tablo 18. Komplike ve komplike olmayan hasta grubunda sitokin düzeyleri ortalamaları

		Sayı	Ortalama değer pg/ml	Standart sapma pg/ml	p değeri
IL-10	Komplike grup	22	194,70	535,78	0,568
	Komplikasyonsuz	18	27,34	27,59	
IL-6	Komplike grup	22	70,60	254,67	0,220
	Komplikasyonsuz	18	16,61	19,82	
IL-2	Komplike grup	22	21,01	3,79	0,754
	Komplikasyonsuz	18	21,12	3,15	
TNF- $\alpha$	Komplike grup	22	458,71	357,93	<b>0,013</b>
	Komplikasyonsuz	18	194,5	221,33	
IFN- $\gamma$	Komplike grup	22	115,35	203,40	0,634
	Komplikasyonsuz	18	79,53	44,93	

Grafik 2. Komplike ve komplike olmayan hasta gruplarının sitokin düzeylerinin karşılaştırılması



3-) Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz gruplarda sedimantasyon ve CRP değerleri bakımından fark olup olmadığı ve istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı araştırıldı. İki grup arasında istatistiksel karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Buna göre her iki grup arasında sedimantasyon değerleri açısından anlamlı fark olmadığı ancak komplikasyonlu hasta grubundaki CRP düzeylerinin daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. (p=0,011) (Tablo 19).

Tablo 19. Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz hasta grubunda serum CRP, sedimantasyon değerlerinin ortalamaları

		Sayı	Ortalama değer	Standart sapma	p değeri
CRP mg/dl	Komplikasyonlu grup	22	51,93	40,80	<b>0,011</b>
	Komplikasyonsuz grup	18	27,45	30,75	
Sedimantasyon mm/saat	Komplikasyonlu grup	22	41,36	28,01	0,09
	Komplikasyonsuz grup	18	27,94	20,01	

4-) Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz hasta grupları arasında standart tüp aglütinasyon değerleri açısından fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel yöntem olarak çok gözlü düzende ki-kare testi kullanıldı. Komplikasyonlu hasta grubunda yüksek titre değerlerinin daha fazla olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü. (p=0,077)( Tablo 20).

Tablo 20. Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz hasta grubunda STA değerlerinin sıklığı

STA	Gruplar- Sayı	
	Komplikasyonsuz	Komplikasyonlu
1/80	3	3
1/160	5	2
1/320	6	6
1/640	2	5
1/1280	2	3
1/2560		3

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Brusella enfeksiyonlarına karşı gelişen konak immün yanıtlarından antijen spesifik T hücre aktivasyonu, CD4+, CD8+ T hücreleri ve humoral immün cevap rol oynamaktadır (83). Bununla birlikte asıl koruyucu immün yanıt hücrel immünitedir. Hücrel bağışıklıkta temelde iki tip reaksiyon rol oynar. T hücre kökenli sitokinler, mikroorganizmaların öldürülmesine yol açarken, diğer taraftan CD8 sitolitik T lenfositleri yolu ile enfekte hücrelerin lizisi gerçekleşir (82).

*B. abortus* enfeksiyonlarında konak savunmasının primer olarak Th1 tip immün cevap yolu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. *B. abortus*, konak antijen sunan hücrelerinden IL-12 salınımını tetikleyerek Th0 hücrelerinin IFN- $\gamma$  salgılayan Th1 hücrelerine dönüşmesini sağlayarak makrofaj öldürme mekanizmalarını aktive etmektedir. Bununla birlikte IFN- $\gamma$  sentezleyen CD8+ sitotoksik T hücreleri de *B. abortus* ile enfekte makrofajları öldürebilir (83).

Hücre içi mikroorganizmaların öldürülmesinde rol alan edinsel bağışıklık sisteminde T lenfositler rol oynamaktadır. Hücre içi bakterilerin protein yapısındaki antijenleri ile naif T lenfositleri periferik lenfoid organlarda karşılaşır. Bu organlarda antijenler işlenerek antijen sunan hücreler üzerindeki MHC molekülleri tarafından sunulur. Aktive olan T lenfositleri mikrobiyal antijenleri tanıyabilen ve elimine edebilen farklılaşma sürecine girer. Naif CD4+ T hücresi, efektör ve bellek CD4+ T hücresine dönüşürken, naif CD8+ T hücresi aynı şekilde efektör ve bellek CD8+ T hücresine dönüşür. CD4+ T hücreleri makrofaj, B hücreleri ve diğer hücrelerin aktivasyonuna yol açarken, CD8+ T hücresi enfekte hedef hücrelerin ölümüne ve makrofaj aktivasyonuna yol açar (90).

CD4+ yardımcı T hücreleri, değişik sitokinleri üreterek farklı fonksiyonlara neden olan efektör hücre alt gruplarına farklılaşabilirler. Bu alt grupların en iyi tanımlananı Th1 hücreleri ve Th2 hücreleri (Tip 1 yardımcı T hücreleri ve Tip 2 yardımcı T hücreleri) olarak adlandırılmıştır. Th1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokin IFN- $\gamma$ 'dır. IFN- $\gamma$  makrofajların güçlü bir aktivatörüdür ve mikroorganizmaların fagositozunu uyaran antikor izotiplerinin üretimini de stimüle eder. Bu nedenle Th1 hücreleri fagosit aracılı sindirimi ve mikroorganizmaların öldürülmesini uyarır (90).

CD4+ T hücreleri tarafından aktivasyonu takiben 1-2 saat içinde salgılanan diğer bir sitokin IL-2'dir. IL-2'nin temel rolü T hücre büyümesinin uyarılmasıdır. Th1 hücreleri tarafından TNF $\beta$  ve IL-3 salınımı da gerçekleşmektedir. Diğer taraftan Th2 hücreleri, IgE antikor üretimini stimüle eden IL-4 ile eozinofilleri uyaran IL-5 üretir. Bu nedenle Th2 hücreleri özellikle helmantik parazitlere etkili eozinofil aracılı, fagosit bağımsız immunitiyi stimüle eder. IL-4, IL-10, IL-13 gibi Th2 hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin bazıları makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve Th1 aracılı immunitiyi baskılar. Bu nedenle hücre aracılı immün yanıtların etkisi Th1, Th2 hücrelerinin aktivasyonu arasındaki denge ile sağlanır. İmmüitenin Th1 veya Th2 yönünde farklılaşması mikrobiyal patojenin tanımlanmasına bağlıdır. Hücre içi bakteriler antijen sunan hücreler tarafından IL-12 üretimine neden olarak Th1 yönünde farklılaşmaya neden olurken, helmintlerde olduğu gibi IL-12 üretimine neden olmayan parazitler enfeksiyonlar Th2 alt grubuna farklılaşmayı indükler.

Th2 hücreleri tarafından diğer salınan sitokinler, IL-6, IL-9'dur. Bizim çalışmamızda yer alan diğer bir sitokin olan TNF- $\alpha$  ise hem Th1 hem de Th2 hücrelerinden salgılanır (90).

Çalışmamıza 21 erkek, 19 kadın olmak üzere 40 kişilik hasta grubu ve aynı şekilde 21 erkek 19 kadın olan 40 kişilik kontrol grubu dahil edildi. Çalışmamızda bruselloz olgularının 28 tanesinin akut, 11 tanesinin subakut, 1 tanesinin ise kronik bruselloz olduğu belirlendi. Hastalığın insanlara geçişi; kontamine süt ve süt ürünleri, çiğ et gibi hayvan ürünlerinin tüketilmesi sonucu oral yolla olmaktadır (3). Bizim çalışmamızda hasta grubunda 27 olguda taze peynir yeme, çiğ süt içme ve/veya hayvancılıkla uğraşma olduğu belirlenirken, 13 tanesinde hiçbir predispozan sebep öyküde yoktu. Meslek grupları arasında emekli veya ev hanımı olan ve hayvancılıkla ilgisi olmayan kişilere bulaşta farkında olmadıkları taze peynir yeme hikayesi olmuş olabilir.

Demirdağ ve arkadaşlarının (91) akut brusellozlu hastalardaki serum sitokin düzeylerini ve klasik enfeksiyon göstergeleri ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, akut bruselloz olgularında IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek ve anlamlı olduğunu, IL-4 düzeyinin ise anlamlı bir fark oluşturmadığını bildirmişlerdir. Klasik enfeksiyon göstergeleri olan sedimantasyon ve CRP düzeylerinin, sitokin düzeyleri ile paralel olarak akut brusellozlu hastalarda daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hasta ve kontrol grupları arasında serum IL-2, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  düzeyleri karşılaştırılmış olup serum IFN- $\gamma$  düzeyinin hasta grubunda daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p=0,011). Hasta grubunda IFN- $\gamma$ 'nın istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması brusellozda Tip1 immunitenin daha baskın olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında IL-2 düzeyi açısından bir fark gözlenmezken, hasta grubunda serum IL-10 ve IL-6 düzeyleri daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer taraftan serum TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol grubunda daha yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Kontrol grubunda TNF- $\alpha$  düzeyinin yüksek bulunması, bireylerin sistemik bir hastalık açısından laboratuvar parametreleri ile ayrıntılı incelenmemesine bağlı olabilir. Bununla birlikte Kamruddin ve arkadaşlarının (92) çalışmalarında akut brusellozlu hastalarda TNF- $\alpha$  düzeyinin tespit edilemeyecek kadar düşük olduğu bildirilmiş olup, *Brucella* suşlarının TNF- $\alpha$ 'yı indüklediği öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda hasta grubunda TNF- $\alpha$  düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında daha düşük bulunmuştur. Bu durum Kamruddin ve arkadaşlarının (92) yaptığı çalışmaya benzer şekilde bruselloz enfeksiyonu sırasında TNF- $\alpha$  sentezinin indüklenmediğini düşündürmektedir.

*Brucella abortus* enfeksiyonuna karşı konak immun yanıtının Th1 tip immun cevap yolu ile olduğu düşünülmektedir. Th1 hücrelerinden IFN- $\gamma$  dışında diğer salgılanan sitokin IL-2'dir (83,91). Kamruddin ve arkadaşlarının (92) yaptığı çalışmada da benzer şekilde hastalarda IL-2 düzeyinin tespit edilemeyecek derecede olduğu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Bu durum IL-2'nin yarı ömrünün kısa olmasına bağlı olabilir.

Makis ve arkadaşlarının (93) yaptığı bir çalışmada ise çocuklarda tedavi öncesi ve sonrasında serum IL-2 ve IL-2 reseptör alfa düzeyleri belirlenmiş olup,

tedavi öncesinde ve sonrasında kontrol grupları ile kıyaslandığında serum IL-2 düzeylerinin anlamlı bir fark oluşturmadığı bunun aksine serum IL-2 reseptör alfa düzeylerinin tedavi öncesinde kontrol grubundan anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak 17 çocukta tedavi ile birlikte IL-2 reseptör alfa düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı ve bu çocukların relaps göstermediği belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında IL-2 düzeyleri açısından literatürdeki yayınlara benzer şekilde bir fark bulunmamıştır. Bu nedenle brusellozlu hastalarda IL-2R saptanması daha değerlidir.

Refik ve arkadaşlarının (94) bruselloz hastalarındaki serum sitokin düzeylerini araştırdıkları çalışmalarında kontrol grubu ile kıyaslandığında; IL-6, IL-2R (reseptör) ve IL-8 düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu; TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  düzeyleri arasında ise farklılık görülmediği saptanmıştır. IL-2R, IL-8, IL-6 seviyelerinin hastalığın klinik paterni ve şiddeti ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada sitokin profili immülitte kemilüminesans enzim immünetrik yöntem kullanılarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ELISA yöntemi kullanılmış olup, hasta grubunda serum IL-6 düzeyinin daha yüksek bulunmasına karşın kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Bunun sebebinin hasta grubunda IL-6 düzeyleri açısından en küçük ve en yüksek değerlerinin arasındaki farkın büyük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Th1 ve Th2 hücreler birbirlerinin fonksiyonlarını karşılıklı olarak regüle ederler. Th2 hücrelerde yapılan IL-4 ve IL-10, Th1 hücrelerini inhibe ederken, Th1 hücrelerde yapılan IFN- $\gamma$ , Th2 hücrelerini inhibe eder. İnflamatuar ve immun yanıtlar Th1 hücrelerince oluşturulurken, humoral immun yanıtlar ve allerjik yanıt Th2 hücrelerince oluşturulur (76). Bizim çalışmamızda Th2 hücreleri tarafından salınan bir sitokin olan IL-10 hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda ortalama değeri daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu durum hasta grubunda en yüksek ve en düşük değerlerin arasındaki farkın yüksek olmasından veya Th1/Th2 hücreleri arasındaki etkileşimden kaynaklanıyor olabilir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre Tablo 14 ve Tablo 15'de görüldüğü gibi IFN- $\gamma$  düzeylerinin yüksek olduğu durumlarda serum IL-10 düzeyi düşük bulunmuştur. Aynı şekilde IL-10 düzeyinin yüksek olduğu durumlarda da serum IFN- $\gamma$  düzeyinin ortalamasının altında olduğu görülmektedir. Bu durum Th 1 ve Th2 dengesini göstermektedir.

Sitokinlerin *Brucella abortus* bakterisinin hücre içi ortamdaki gelişimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada deneysel olarak fare makrofajları kullanılmış olup, IL-1- $\alpha$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF sitokinlerinin *Brucella abortus* 19 suşunun hücre içi gelişimine bir etkisi olmadığı, buna karşın IL-2 veya IFN- $\gamma$  makrofaj kültür ortamına eklendiğinde bakteri sayısında anlamlı bir düşme olduğu gözlenmiştir (95). Farelerde elde edilen bu sonuçlar, Kamruddin ve arkadaşlarının insanlarda yaptıkları çalışma ile benzer olup insanlarda da Th1 aracılı immun yanıtın brusellozda dominant olduğunu göstermektedir (92). Bizim çalışmamızda da buna benzer şekilde Th1 kökenli sitokin olan IFN- $\gamma$  hasta grubunda anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur.

Bruselloz vücudun herhangi bir sistemini veya organını tutabilen sistemik bir hastalıktır. Komplikasyonla seyreden bruselloz olgularının %20-60'ında da osteoartiküler tutulum gözlenirken, gastrointestinal sistem, santral sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, genitoüriner sistem, hematolojik sistem ve deri tutulumu daha nadir gözlenmektedir (3). Biz bu çalışmada komplikasyon gösteren ve komplikasyon göstermeyen bruselloz olgularında serum IL-10, IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  düzeyleri açısından anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek üzere hasta grubunu komplikasyonlu ve komplikasyonsuz olmak üzere iki gruba ayırdık ve ELISA yöntemi ile serum sitokin düzeylerini belirledik. Komplikasyonlu hasta grubunda serum IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  düzeylerinin, komplikasyonsuz hasta grubuna göre daha yüksek bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Serum IL-2 düzeyleri ise her iki grupta benzerdi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Komplikasyonlu grupta serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ise daha yüksek ve anlamlı bulundu ( $p=0,013$ ). Çalışmada komplikasyonlu hasta grubundaki serum sitokin düzeylerinin en alt ve en üst değerleri arasındaki farkın yüksek olması çalışmanın sonucunu etkilemiş olabilir. IL-6 ve IL10 antiinflamatuvar sitokinler olduğundan brusellozda yüksek olması beklenir. Bizim çalışmamızda da buna uygun bir şekilde hasta grubunda kontrol grubuna göre ve hasta grubu içerisinde komplikasyonlu grupta bu sitokinler daha yüksek bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ) Aynı şekilde IFN- $\gamma$  düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın ( $p>0,05$ ) komplikasyonlu grupta komplikasyonsuz grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Bu durum daha önce de belirttiğimiz gibi brusellozda Th1 immünitinin ön planda olduğunu göstermektedir.

Demirdağ ve arkadaşlarının (91) yaptıkları bir çalışmada, akut bruselloz olgularında serum CRP ve sedimantasyon değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmada da, komplike ve komplike olmayan bruselloz olgularında klasik enfeksiyon göstergeleri olan CRP ve sedimantasyon düzeylerini karşılaştırılmıştır. Komplike bruselloz olgularında CRP düzeyi, komplikasyon göstermeyen olgulara göre daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,011$ ). Her iki grup arasında sedimantasyon değerleri açısından ise anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,09$ ). Bu sonuçlara göre CRP değerleri yüksek olan brusellozlu olgular herhangi bir komplikasyon varlığı açısından değerlendirilmelidir.

Literatürde komplike ve komplike olmayan bruselloz olgularında sitokin düzeyleri ile ilgili benzer bir çalışma bulunamadı. Bu nedenle bizim çalışmamızda komplikasyonlu bruselloz olgularında TNF- $\alpha$  düzeyinin daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmasını destekleyecek bir veriye ulaşamadı. Bununla birlikte Kamruddin ve arkadaşlarının (92) yaptığı çalışmada brusellozlu hastalarda serum TNF- $\alpha$  seviyeleri tespit edilemeyecek kadar düşük bulunmuş olup, bu durum TNF- $\alpha$ 'nın yarı ömrünün kısalığından olabileceği bildirilmiştir. Aynı şekilde Refik ve arkadaşlarının (94) yaptıkları çalışmada da serum TNF- $\alpha$  düzeyi brusellozlu ve sağlıklı kontrol grupları arasında kıyaslanmış ve değişiklik saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda hasta grubundaki TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük ve anlamsız ( $p>0,05$ ) bulunmuş olup, hasta grubu içinde komplikasyonlu grupta,

komplikasyonsuz grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek ve anlamlı ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Diğer taraftan çalışmamızda oluşturulan kontrol grubunda TNF- $\alpha$  düzeylerinin yüksek olması sadece bruselloz açısından hasta olmayan bireylerden seçilmesi ve sistemik hastalıklar açısından ayrıntılı çalışma yapılmaması sonucu olmuş olabilir. Bununla birlikte literatürdeki verilere benzer bir şekilde hasta grubunda IFN- $\gamma$  düzeylerinin yüksek olması brusellozda Th1 tip hücrel immün yanıtın daha ön planda olduğunu desteklemektedir. Hasta grubu içerisinde komplikasyonlu bruselloz olgularının olduğu grupta TNF- $\alpha$  ortalama değerinin daha yüksek olması, etkilenen organ sistemlerindeki inflamasyonun şiddeti nedeniyle TNF- $\alpha$  sentezinin indüklenmesi sonucu oluşmuş olabilir. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara dayanarak TNF- $\alpha$  değerleri yüksek olan bruselloz olgularının komplikasyon varlığı açısından değerlendirilmesi gerektiği inancındayız.

Sonuç olarak komplikasyon gösteren olgularda, sistemik tutulum özelliklerine göre olgu serileri genişletilerek sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi için daha ileri araştırmalara gereksinim vardır. Brusellozda korunmada Th1 tip hücrel immünite önemli bir yer tutmaktadır. Diğer taraftan klasik enfeksiyon göstergesi olan CRP düzeyleri komplikasyon göstergesi olabilir. Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri yüksek olan bruselloz olguları komplikasyon varlığı açısından değerlendirilebilir. Hücre içi bakteri enfeksiyonlarında özellikle bruselloz olgularında relaps ve reenfeksiyonlardan dolayı tedavi zorluğu dikkate alınırsa komplikasyon gösteren olguların erken dönemde tespit edilebilmesi ve izlemde immün parametrelerin de kullanılması gerekliliği anlaşılır. İmmün sistem çok geniş ve çok sayıda parametresi olan bir konu olduğundan komplike bruselloz olgularının patogenezlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla sitokin kullanılarak araştırmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.



## KAYNAKLAR

- 1-Baysal B. *Brucella*. Ustaçelebi Ş(ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı Ankara: Öncü Basımevi, 571-577, 1999.
- 2-Çelebi S. Hacımustafaoğlu M. Brusellozis Güncel Pediatri 2:39-43, 2004.
- 3- Sümerkan B. Brusella türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2:1647-1652, 2002.
- 4-Young E.J, Borchert M, Kretzer F.L and Musher D.M. Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. J.Infect.Dis, 151(4): 682-690, 1985.
- 5- Galanakis E, Makis A, Bourantas K.L and Papadopoulou Z.L. Interleukin-3 and interleukin-4 in childhood brucellosis. Infection 30: 33-34, 2002.
- 6-Dornand J, Gross A, Lafont V, et al. The innate immune response against *Brucella* in humans. Vet. Mikrobiol 90, 383-394, 2002.
- 7-Rafiei A, Ardestani SK, Kariminia A, et al. Department of Immunology and Microbiology. Sari Medical School, Mazandaran University of Medical Sciences Sari, Iran. The Journal of infection (J Infect). 53(5): 315-24, 2006.
- 8-Sözen T.H. Bruselloz. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ( editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 1: 636-642, 2002.
- 9-Arda M. Türkiye’de hayvan brusellozu’nun durumu ve bruselloz mücadele projesi. 1. Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kongre Kitabı. İzmir: Bilgehan Basımevi 166-177, 1987.
- 10-Moyer N.P. and Holcomb L.A. *Brucella*. In: Murray P.R, Baron E.J, Pfaller M.A, Tenoer F.C, Tenover R.H.(Eds), Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM pres, 549-555, 1995.
- 11- Bilgehan H. *Brucella*. Klinik Mikrobiyoloji. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İZMİR 181-194, 1996.
- 12-Badur S. Brusellozda Serolojik Tanı ve seroepidemioloji. Klimik Derg 3(1), 17-20, 1990.
- 13-Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. Uzun Ö, Ünal S(editörler). Güncel Bilgiler Işığında Enfeksiyon Hastalıkları Cilt 2. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 1015-24, 2002.
- 14- Young EJ. *Brucella* species. In:Mandel GL, Bennet JE, Dolin R(eds). Principles and Practice of Infectious Disease. Sixth edition Pennsylvania: Churchill Livingstone, Vol 2, 2669-2673, 2005.
- 15-Smith LD, Ficht TA. Pathogenesis of *Brucella*. Crit. Rev. Mikrobiol. 17:209, 1990.
- 16-Baldwin C. Pathogenesis of Brusellozis. Intracellular Bacterial Infections. Pechere E.J(Ed.). First edit. Cambridge Med. Pub, 87-92, 1996.
- 17-Yüce A, Alp-Çavuş S. Türkiye’de Bruselloz. Genel Bakış. Klimik dergisi 19(3), 87-97, 2006.
- 18-Çetin ET, Çoral B, Bilgiç A, ve ark. Türkiye’de insanda bruselloz insidansının saptanması. Doğa-Tr J of Medical Sciences 14: 324, 1990.

- 19-Aygen B, Sümerkan B, Doğanay M, Sehmen E. Prostatitis and hepatitis due to *Brucella melitensis*: a case report. J Infect 36:111, 1998.
- 20-Thalhammer F, Eberl G and Kopetzki-Kogler U. Unusual Route of Transmission for *Brucella abortus* Clin. Infect. Dis. 26(3):764-765, 1998.
- 21-Çevik M.A. Bruselloz. Klinik Özellikler. Bruselloz Sempozyumu 3. Harran Enfeksiyon Günleri. Harran Üniversitesi Şanlıurfa 2005.
- 22-Dilmener M. Bruselloz'un klinik prezentasyonları. Klimik Derg 3:23-25, 1990.
- 23-Aygen B, Sümerkan B, Kardeş Y, Doğanay M, İnan M. Bruselloz: 183 olgunun değerlendirilmesi. Klimik derg 8:13-16, 1995.
- 24- Hall W.H. Brucellosis. Evans A.S, Brachman, P.S(eds). In:Bacterial infections of humans. New York and London. second edition, Plenum Publishing Corporation. 133-151, 1991.
- 25-Gotuzzo E, Carillo C. *Brucella*. Gorbach S.L., Bartlett J.G, Blacklow N.R(eds). Infectious Diseases. 2.ed. Pennsylvania:W.B. Saunders Company, 1837-45, 1998.
- 26-Sözen TH. Bruselloz. Tuna N(ed). In: Romatizmal hastalıklar Hacettepe Taş, Ankara 1993.
- 27-Gilgil E, Bütün B. Brusellozun osteoartiküler komplikasyonları. In: Romatizma. 17(2), 77-82, 2002.
- 28-Ertek M, Yazgı H, Kadanalı A, Özden K, Taşyaran M. Erişkinlerde brusella enfeksiyonlarının komplikasyonları: 18 Yıllık retrospektif değerlendirme. Turk J Med Sci 36(6): 377-81, 2006.
- 29-Akdeniz H, İrmak H, Seçkinli T, Buzgan T, Demiröz AP. Hematological manifestations in brucellosis cases in Turkey. Acta Med Okayama. 52(1), 63-5, 1998.
- 30-Akıncı E, Bodur H, Erbay Ç, ve ark. Ağır trombositopeni ile seyreden bruselloz olgusu. Turkish Journal of Haematology 20(1):43-45, 2003.
- 31- Al Aska AK. Gastrointestinal manifestations of brucellosis in Saudi Arabian patients. Trop Gastroenterol 10:217-19, 1989.
- 32-Petrella R, Young EJ. Akut *brucella* ileitis Am J Gastroenterol. 83(1):80-2, 1988.
- 33-Gürsoy Ş, Baskol M, Özbakır Ö, Güven K, Patıroğlu T. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Brucella* infection. Turk Gastroenterology 14:145-47, 2003.
- 34-Hatipoğlu CA, Bilgin G, Tulek N, Koşar U. Pulmonary involvement in brucellosis J.Infect. 51(2):116-9, 2005.
- 35-Öztürk Ö, Akçam FZ, Şahin Ü, Bircan A, Akkaya A, Yaylı G. Kronik öksürük sebebi olan bruselloz olgusu. Solunum dergisi. 7(Ek1): 46, 2005.
- 36-Alapont Alacreu JM, Gomez Lopez L, Delgado F, et al. Brucellar orchiepididymitis. Actas Urol Esp. 28(10):774-6, 2004.
- 37-Karahocagil M, Ceylan K, Bilici A, ve ark. Orşiektomiye giden Brusella orşiti: bir olgu sunumu Van Tıp Dergisi 14 (1):38-40, 2007.
- 38-Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant woman. Clin Infect Dis. 15:32(8): 1172-7, 2001.

- 39-Mamıkoğlu L. Bruselloz. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D(editöerler). Gram negatif bakteri enfeksiyonları. 1.baskı Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 327-343, 2004.
- 40-Kaya O, Akçam FZ, Avşar K, Tığlı A, Yaylı G. Bruselloz: 75 olgunun klinik ve laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 26:623-29, 2006.
- 41-Güngör K, Bekir NA, Namiduru M. Ocular complications associated with brucellosis in an endemic area. Eur Ophthalmol 12:232-7, 2002.
- 42-Kocagöz S. Brusellozis. İliçin G, Biberöğlu K, Süleymanlar G, Ünal S(editörler). İç hastalıkları. 2. baskı Ankara: Güneş kitabevi, 2:3202-3206, 2005.
- 43-Baysallar M, Aydoğan H, Kiliç A, Küçükkaraaslan A, Senses Z, Doğancı L. Evaluation of the BacT/ALERT and BACTEC 9240 automated blood culture systems for growth time of *Brucella* species in a Turkish tertiary hospital. Med Sci Monit. 12(7):235-8, 2006.
- 44-Özkurt Z, Erol S, Taşyaran MA, Kaya A. Detection of *Brucella melitensis* by the BacT/Alert automated system and *Brucella* broth culture. Clin Microbiol Infect. 8(11):749-52, 2002.
- 45-Mert A, Ozaras R, Tabak F ve ark. The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. Diagn. Microbiol Infect Dis. 46(4):241-3, 2003.
- 46- Çolak H. Mikrobiyol Bul 26(1): 56-6, 1992.
- 47-Fadeel MA, Wasfy MO, Pimentel G, et al. Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of human brucellosis in surveillance and clinical settings in Egypt. Saudi Med J. 27(7):975-81, 2006.
- 48-Yaşar K, Şengöz G, Yıldırım F, Nazlıcan Ö. Nörobruselloz Olgularının Değerlendirilmesi. Bakırköy Tıp Dergisi 3:57-60, 2007.
- 49-Yaylı G. Brusellozun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. Klimik Dergisi. 16: 211-213, 2003.
- 50-Ortuno MI, Ortuno Q, Morata P, et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. J Clin Mic 35(11): 2927-30, 1997.
- 51-Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. Expert Rev Mol Diagn 4: 115-23, 2004.
- 52-Çokça F. Tetrasiklinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 1:245-248, 2002.
- 53-Güenalp A. Antimikrobiyal ilaçların etki mekanizmaları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 1:167-174, 2002.
- 54-Ernest J, Özüner Z. (çeviri editörü). Antimikobakteryel droğlar. Temel ve klinik farmakoloji. 6.baskı. İstanbul:Barış Kitabevi, 2:942-954, 1995.
- 55-Roushan MR, Gangi SM, Ahmadi SA. Comparison of the efficacy of two months of treatment with co-trimoxazole plus doxycycline vs. co-trimoxazole plus rifampin in brucellosis. Swiss Med. Wkly. 134(37-38): 564-8, 2004.
- 56-Solero J, Rodriquez-Zapata M, Geijo P, et al. Doxycycline-rifampin versus doxycycline-Streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemother. 39(9):2061-7, 1995.

- 57-Topçu AW. Aminoglikozidler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri. 1:214-223, 2002.
- 58- Ariza J, Guidol F, Pallares R et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampicin or doxycycline plus streptomycin: a randomized, double blind study. Ann Intern Med. 1; 117(1):25-30, 1992.
- 59-Topçu AW. Sulfonamidler, Trimetoprim, Trimetoprim-Sulfametoksazol In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ( editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 1:248-252, 2002.
- 60-Topçu AW. Kinolonlar. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 1:234-244, 2002.
- 61-Yamazhan T, Aydemir S, Tünger A, ve ark. In vitro activities of various antimicrobials against *Brucella melitensis* strains in the Aegean region in Turkey. Med Princ Practice. 14(6):413-6, 2005.
- 62-Akova M, Uzun Ö, Akalın HE, et al. Quinolones in treatment of human brucellosis:Comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. Antimicrob Agents Chemother 37:1831-4, 1993.
- 63-Turan H, Arslan H, Uncu H, Azap Ö. Tigesiklin'in *Brucella* suşlarına in vitro etkinliğinin doksisiklin, siprofloksasin ve rifampisin etkinliği ile karşılaştırılması. Enfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection). 21(3): 147-151, 2007.
- 64-Ozsoyler I, Yilik L, Bozok S, et al. Brucella endocarditis: The importance of surgical timing after medical treatment(five cases). Prog Cardiovasc Dis. 47(4):226-9, 2005.
- 65-Bodur H. Brusellozda tedavi. Bruselloz Sempozyumu 3. Harran Enfeksiyon Günleri Harran üniversitesi Şanlıurfa 2005.
- 66- Kaya S. Bruselloz ve tedavi sorunu. Enfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 20 (3):227-230, 2006.
- 67-Kaya O, Yaylı G. Bruselloz. MN Dahili Tıp Bilimleri 1(3-4):222-227, 2006.
- 68-Direskeneli H. İmmun sistemin hücreleri. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S(editörler). In: İç hastalıkları. 2. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi 2:2562-2565, 2005.
- 69-Arda M. Bağışıklık(immunité). Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Diker S(editörler). İmmunoloji. 1. baskı Ankara: Medisan Yayınevi, 9-18, 1994.
- 70- Aydınтуğ O. İmmun sistemin genel özellikleri ve immün yanıt. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S(editörler). In:İç hastalıkları 2. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2:2555-2562, 2005.
- 71-Kılıçturgay K. Kan hücrelerinin gelişimi. In:İmmunolojiye giriş 3. baskı. İstanbul: GüneşNobel Tıp Kitabevleri, 8-24, 1994.
- 72-Arda M. İmmunolojik reaksiyonlarda fonksiyonları olan diğer hücreler. In: İmmunoloji. 1. baskı Ankara: Medisan Yayınevi, 165-176, 1994.
- 73-Diker M. Kompleman. In: İmmunoloji. 1. baskı. Ankara: Medisan Yayınevi 201-208, 1994.
- 74- Hergenç G. Kompleman sisteminin aterosklerozdaki rolü. Türk Kardioloji Derneği Arşivi. 32(1):28-37, 2004.

- 75-Arda M. Antikorlar. In:İmmunoloji. 1. baskı Ankara: Medisan Yayınevi, 47-52, 1994.
- 76-Kokuludağ A. Sitokinler. İliçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G, Ünal S(editörler). In: İç hastalıkları 2. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi 2:2586-2592, 2005.
- 77-Minbay A. Sitokinler ve interferonlar. Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Diker S(editörler). In: İmmunoloji. 1. baskı Ankara: Medisan Yayınevi, 179-192, 1994.
- 78-Baykal Y, Karaayvaz M, Kutlu M. İnterlökinler. T Klin J Med Sci: 18, 77-84, 1998.
- 79-Balkwill F. Cytokins and cytokine receptors. Roitt I, Brostoff J, Male D(eds). In: Immunology. Sixth edition. Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St lous, Sydney, Toronto. Published by Mosby. 119-129, 2001.
- 80-Akay Ö. Bakteryel enfeksiyonlarda immunité. Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Diker S(editörler). In: İmmunoloji. 1. baskı Ankara. Medisan Yayınevi. 316-326, 1994.
- 81-Kılıçturgay K. Enfeksiyonlara karşı savunma. İmmunolojiye giriş. 3. baskı İstanbul:GüneşNobel Tıp Kitabevleri. 127-143, 1994.
- 82-Yücel A. Bakteri, parazit ve funguslara karşı immün yanıt. Ustaçelebi Ş(ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı Ankara. Öncü basımevi. 267-289, 1999.
- 83-Oliveira SC, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. Veterinary Microbiology. 90(1-4):417- 424, 2002.
- 84-Golding B, Scott D.E, Scharf O, et al. İmmunity and protection against *Brucella abortus* Microbes and Infection. 3: 43-48, 2001.
- 85-Paranavitana C, Zelazowska E, Izadjoo M and Hoover D. Interferon- $\gamma$  associated cytokines and chemokines produced by spleen cells from *Brucella*-immune mice. Cytokine. 30:2, 86-92, 2005.
- 86- Araj GF, Kaufmann AF. Determination by Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay of İmmunglobulin G (IgG), IgM and IgA to *Brucella melitensis* Major Outer Membran Proteins and Whole-cell Heat-Killed Antigens in Sera of patients with Brucellosis. Journal of clinical microbiology. 1909-1912, 1989.
- 87-Ariza C, Pellicer T, Pallares R, et al. Spesific Antibody Profile in human brucellosis. Clin Infect Disease. 14(1):131-40, 1992.
- 88-Hoffmann EM, Houle JJ. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. Crit. Rev. Mikrobiol. 21(3):153-63, 1995.
- 89-Riley LK, Robertson DC. Brucellacidal activity of human and bovine polymorphonuclear leukocyte granule extracts against smooth and rough strains of *Brucella abortus*. Infect İmmun. 46(1):231-6, 1984.
- 90- Abbas KA, Lichtman AH. Hücre aracılı immün yanıtlar. Camcıoğlu Y, Deniz G(editörler). Temel İmmunoloji. 1. baskı. İstanbul: Elma basım. 83-103, 2007.
- 91-Demirdağ K, Ozden M, Kalkan A, et al. Serum cytokine levels in patients with akut brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers. In:FEMS Immunology and Medical Microbiology. 39:149-153, 2003.

- 92- Kamruddin A, Al-Matrouk KA, Martinez G, et al. Increased serum levels of interferon- $\gamma$  and interleukin-12 during human brucellosis. *Am J Trop Med Hyg.* 61(3):425-7, 1999.
- 93- Makis AC, Galanakis E, Hatzimichael EC, et al. Serum levels of soluble interleukin-2 receptor alpha (sIL-2Ralpha) as a predictor of outcome in brucellosis. *The Journal of Infection (J Infect).* 51(3): 206-10, 2005.
- 94- Refik M, Mehmet N, Durmaz R and Ersoy Y. Cytokine profile and nitric oxide levels in sera from patients with brucellosis. *Braz J Med Biol Res.* 37(11) :1659-1663, 2004.
- 95- Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infection and immunity (Infect Immun).* 61(1), 124-34, 1993.