

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BRUSELLOZ TANISI KONULMUŞ HASTALARDAN İZOLE  
EDİLEN *BRUCELLA* SUŞLARININ PZR YÖNTEMİ İLE  
SINIFLANDIRILMASI**

**Ayşegül İLBAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI**

**Danışman  
Doç. Dr. Birol ÖZKALP**

**KONYA - 2016**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BRUSELLOZ TANISI KONULMUŞ HASTALARDAN İZOLE  
EDİLEN *BRUCELLA* SUŞLARININ PZR YÖNTEMİ İLE  
SINIFLANDIRILMASI**

**Ayşegül İLBAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MİKROBİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Birol ÖZKALP**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202007  
proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA - 2016**

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Ayşegül İLBAN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: ..... İmza  
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Birol ÖZKALP İmza  
Selçuk Üniversitesi

Üye: ..... İmza  
Selçuk Üniversitesi

Üye: ..... İmza  
Selçuk Üniversitesi

Üye: ..... İmza  
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Enstitü Müdürü Adı Soyadı.....

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Brusellozis dünyada çok yaygın olarak görülen ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan önemli bir zoonotik hastalıktır. Enfeksiyon insanlarda ciddi iş gücü kayıpları ve uzun tedavi dönemlerine neden olmaktadır. Gıda kontaminasyonu ile bulaşma görülmesinden dolayı brusellozis önemli bir halk sağlığı problemi olarak insan ve hayvan sağlığını tehdit etmektedir.

Bu çalışmada 2007-2014 tarihleri arasında Konya Eğitim Araştırma Hastanesinde Bruselloz tanısı konulmuş hastalardan izole edilen *Brucella* suşlarının CO<sub>2</sub> li ortamda üreme, üreaz üretimi, H<sub>2</sub>S üretimi, Tiyonin ve fuksin varlığında üreme, Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon ve PZR sonuçları değerlendirilerek tür ve biyotip değerlendirmelerinin yapılması hedeflenmiştir.

Yükseklisans tez çalışmam sırasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Birol ÖZKALP'e, S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Osman ERGANİŞ, Prof. Dr. U.Sait UÇAN, Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ, Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN ve Arş. Gör. Aslı SAKMANOĞLU'na örnek ve izolatların sağlanmasındaki yardımlarından dolayı Konya Eğitim Araştırma Hastanesi'ne, tez çalışmama maddi katkılarından dolayı S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne ve çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen eşim Ömür İLBAN ve kızlarıma teşekkür ederim.

**Ayşegül İLBAN**

**Konya, 2015**

## İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Tanım .....	1
1.2. Tarihçe.....	4
1.3. Etiyoloji.....	5
1.3.1. Morfoloji .....	5
1.3.2. Kültür ve Üreme Özellikleri .....	6
1.3.3. Biyokimyasal Özellikleri .....	7
1.3.4. Antijenik Özellikleri .....	9
1.3.5. Faj Duyarlılığı .....	12
1.3.6. Antibiyotik Duyarlılığı.....	14
1.3.7. Tür ve Biyotipleri.....	14
1.4. Epidemiyoloji .....	16
1.5. Bulaşma .....	21
1.5.1. İnsanlarda Bulaşma .....	21
1.5.2. Hayvanlarda Bulaşma .....	23
1.6. Patogenez .....	25
1.6.1. Enfeksiyonun Safhaları .....	25
1.6.2. İmmün Cevap.....	26
1.7. Klinik Bulgular.....	27
1.7.1. İnsanlarda Klinik Bulgular .....	27
1.7.2. Hayvanlarda Klinik Bulgular .....	28
1.8. Teşhis .....	29
1.8.1. İndirekt Tanı Yöntemleri .....	30
1.8.2. Direkt Tanı Yöntemleri.....	35
1.9. Tedavi.....	41
1.10. Brusellozda Korunma.....	43
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>45</b>
2.1. Gereç .....	45
2.1.1. <i>Brucella</i> suşlarının temini .....	45
2.1.2. Standart <i>Brucella</i> Suşları.....	45
2.1.3. Besiyerleri .....	46
2.1.5. Katalaz Ayırıcı .....	47
2.1.6. Kurşun - Asetat Ayırıcı .....	47
2.1.7. Üreaz Testi (Christensen's Metodu) .....	47

2.1.8. Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu).....	47
2.1.9. Kristal Violet Solüsyonu.....	47
2.1.10. <i>Brucella</i> Antiserumları.....	48
2.1.11. Akriflavin Solüsyonu.....	48
2.1.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Testi.....	48
2.2. Yöntem.....	50
2.2.1. Etken İzolasyonu.....	50
2.2.2. Suşların İdentifikasyonu.....	50
2.2.3. Tür ve Biyotip Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	51
2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Metotları.....	53
2.2.5. İstatistik.....	54
2.2.6. Etik Kurul Kararı.....	54
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>55</b>
3.1. <i>Brucella</i> Suşlarının İzolasyonu.....	55
3.2. <i>Brucella</i> İzolatlarının Tür ve Biyotip Test Sonuçları.....	56
3.2.1. CO <sub>2</sub> Gereksinimi ve H <sub>2</sub> S Üretimi.....	56
3.2.2. Koloni Morfolojilerinin Değerlendirilmesi.....	57
3.2.3. Tiyonin İçeren Besi Yerinde Üreme.....	57
3.2.4. Fuksin İçeren Besi Yerinde Üreme.....	58
3.2.5. Üreaz Test Sonuçları.....	59
3.2.6. Streptomycin Duyarlılığı.....	60
3.2.7. A ve M Monospesifik Antiserumlar.....	60
3.2.8. PZR sonuçları.....	60
3.2.9. Biyotiplendirme.....	61
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>69</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>75</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>86</b>
EK A: Etik Kurul Kararı.....	86
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>87</b>

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1: Araştırmaya dahil edilen suşların yıllara göre dağılımı.....	45
Çizelge 3.1: CO <sub>2</sub> 'li ortamda üreme sonuçları.....	56
Çizelge 3.2: H <sub>2</sub> S üretimi sonuçları.....	56
Çizelge 3.3: Tiyonin içeren besi yerinde üreme verileri.....	58
Çizelge 3.4: Üreaz aktivitesi.....	59
Çizelge 3.5: Yıllara göre dağılım ve yüzdeleri.....	61
Çizelge 3.6: <i>Brucella</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.....	63
Çizelge 3.7: <i>Brucella</i> izolatlarının tür test sonuçları.....	66

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: Selektif <i>Brucella</i> Agarda üreme. ....	55
Şekil 3.2: Hareket muayenesi.....	55
Şekil 3.3: SDA'da üreme ve H <sub>2</sub> S üretimi.....	57
Şekil 3.4: Koloni morfolojisi incelenmesi. ....	57
Şekil 3.5: Tiyonin içeren besi yerinde üreme.....	58
Şekil 3.6: Fuksin'li besiyerinde üreme. ....	59
Şekil 3.7: Üreaz test sonuçları.....	59
Şekil 3.8: Antibiyogram üreme. ....	60
Şekil 3.9: Agoroz jel elektroforezi görüntüleri. ....	62



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Bp</b>	: Baz pair
<b>BHGB</b>	: Brain Heart Infusion Broth
<b>cELISA</b>	: Competatif enzyme linked immunosorbent assay
<b>C-NMR</b>	: Nuclear magnetic resonance
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>FPA</b>	: Floresans polarizasyon assay
<b>FTS</b>	: Fizyolojik Tuzlu Su
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Hidrojen sülfid
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>Ig</b>	: İmmünglobulin
<b>Iz</b>	: İzatnagar faji
<b>iELISA</b>	: İndirekt enzyme linked immunosorbent assay
<b>Kdo</b>	: 3-deoxy-D-manno-2-octulosonate
<b>KFT</b>	: Komplement Fikzasyon Testleri
<b>mSAT</b>	: Mikro serum aglütinasyon testi
<b>MT</b>	: Merkaptotanol Test
<b>NH</b>	: Native haptin
<b>NJ</b>	: Neighbor Joining
<b>OD</b>	: Optik dansiteleri
<b>OM</b>	: Dış membran (Outer Membrane)
<b>PAT</b>	: Plate Aglütinasyon Testi
<b>PFGE</b>	: Pulsed field gel electrophoresis
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>R</b>	: Rough
<b>RBPT</b>	: Rose bengal plate test

<b>RE</b>	: Restriksiyon endonükleazlar
<b>RT</b>	: Rivanol aglütinasyon testi
<b>RTD</b>	: Rutin test dilüsyonunda
<b>S</b>	: Smooth
<b>SAT</b>	: Serum aglütinasyon testi
<b>SDA</b>	: Serum dekstroz agar
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SGM</b>	: Sülfid-Gndol-Motilite Agar
<b>S-LPS</b>	: Smooth-Lipopolisakkarit
<b>Tb</b>	: Tbilisi fajı
<b>TKB</b>	: Tarım ve Köyişleri Bakanlığı
<b>TSA</b>	: Triptone Soya Agar
<b>Wb</b>	: Weybridge fajı

## ÖZET

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### **Bruselloz Tanısı Konulmuş Hastalardan İzole Edilen *Brucella* Suşlarının PZR Yöntemi İle Sınıflandırılması**

**Ayşegül İLBAN**  
**Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalı**

#### **YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015**

Bu çalışmaya Konya Eğitim Araştırma Hastanesine 2007-2014 tarihleri arasında yüksek ateş, lenfadenopati, halsizlik ve bel ağrısı gibi şikayetler nedeni ile başvuran hastalardan izole edilen 113 adet *Brucella spp.* suşu dahil edilmiştir. İzolatların kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmasında kullanılan testlerin spesifite ve sensitivite düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Suşların doğrulamasında üreme özellikleri, koloni morfolojileri, hemoliz, gram boyama sonuçları, pozitif serum ile lam aglütinasyon, katalaz, oksidaz, hareket, indol ve üreaz aktiviteleri değerlendirildi. *Brucella spp.* olarak değerlendirilen 113 izolatın CO<sub>2</sub>'li ortamda üreme, üreaz üretimi, H<sub>2</sub>S üretimi, Tiyonin ve fuksin varlığında üreme, Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon testleri türlerin belirlenmesinde kullanıldı. Sonuçlar PZR sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Biyotip düzeyindeki sınıflandırma amacı ile biyokimyasal test sonuçları ve PZR sonuçları ortak olarak değerlendirildi. *B. abortus* olarak değerlendirilen 19 adet suşdan 3 adet suş biyotip 3; 4 adet suş biyotip 2; diğer 12 suş ise biyotip 1 olarak değerlendirildi. *B. melitensis* olarak değerlendirilen 94 adet suşdan 12 adet suş biyotip 1 diğer 82 adet suş ise biyotip 3 olarak değerlendirildi.

Klasik sınıflandırma yöntemlerinin spesifite ve sensitivite değerleri boya varlığında üreme sensitivite % 100, spesifite % 84,21; CO<sub>2</sub>'li ortamda üreme sensitivite % 96,809 spesifite % 100; H<sub>2</sub>S üretimi sensitivite % 100 spesifite % 100; Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon sensitivite %98,936 spesifite % 92,98 olarak değerlendirildi. Bütün çalışmalar ilk izolasyon ürünleri ile yapıldı. Sonuçlar PZR sonuçları ile uyumlu olarak bulundu. Ancak genel değerlendirme için PZR sonuçları ile eş zamanlı değerlendirme yapılması önerildi.

**Anahtar Sözcükler:** Bruselloz; *B. abortus*; *B. melitensis*; PZR

## SUMMARY

REBUPLIC of TURKEY  
SELCUK UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

### Classification Of *Brucella* Strains Isolated From Patients With Brucellosis By PCR

Ayşegül İLBAN  
Department Of Microbiology (VET)

#### MASTER THESIS / KONYA-2015

This study included that 113 *Brucella spp.* strains isolated from patients presenting with symptoms like high fever, lymphadenopathy, fatigue and back pain at Konya Education and Research Hospital between 2007-2014. Aimed to determine the level of spesificity and sensitivity of the tests used to classify the isolates according to the chemical properties. Reproductive characteristics, colony morphology, hemolysis, Gram stain results, the rapid slide aglütination with positive serum, catalase, oxidase, motion, indole and urease activity were evaluated the verification of the strains. *Brucella ssp.* as assessed 113 strains of CO<sub>2</sub> environment in growth, urease production, H<sub>2</sub>S production, Thionine and fuchsin growth in the presence of anti-A and anti-M aglütinasyo the serum and PCR results were evaluated species and biotypes reviews. The results were evaluated by comparing the results with PCR.

Biochemical test results and PCR results were evaluated together with the aim of biotypes classification level. Of the 19 *B. abortus* isolates; 3 were identified as biotype 3, 4 were identified biotype 2 and 12 were idetified biotype 1. *B. melitensis* strain which evaluated 94 isolates 12 were identified as biotype 1and 82 were identified biotype 3.

Reproduction in spesificity and sensitivity values for the presence of classical classification method paint sensitivity 100%, spesificity of 84.21%; CO<sub>2</sub> environment on reproductive sensitivity 96.809% and spesificity 100%; H<sub>2</sub>S production sensitivity 100% and spesificity 100%; with Anti-A and Anti-M aglütination serum sensitivity 98.936% and spesificity 92.98% was considered. All studies were performed with the first isolation products. The results were consistent with the results of PCR. However, the PCR results for the overall evaluation were suggested simultaneous evaluation.

**Key Words:** Brucellosis; *B. abortus*; *B. melitensis*; PCR

# 1. GİRİŞ

## 1.1.Tanım

Brusellozis başlıca Akdeniz ülkeleri olmak üzere dünyanın her bölgesinde yaygın olarak görülebilen zoonotik bir hastalık olup, başlıca Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, Batı Asya, Afrika ve Güney Amerika'da insanlar ve hayvanlar arasında endemiktir (Godfroid ve ark 2001, Çelebi 2003, Young 2006). Hayvanlar arasındaki enfeksiyon dağılımı, insanlarda görülen enfeksiyon dağılımını şekillendirmektedir. Türkiye de yapılan birçok araştırma, geçim kaynağı hayvancılık olan kırsal kesimlerde hastalığın kentlerde yaşayan nüfusa göre daha sık ortaya çıktığını, hastalığın ülkemiz için sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir (Çelebi 2003). Brusellozis, ağırlıklı olarak hayvancılığın yaygın olduğu Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgelerinde görülmekle birlikte, Türkiye hemen her bölgede vaka bildirimi olmaktadır. Türkiye de Sağlık Bakanlığı Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirimi Sisteminde brusellozis A Grubu Bildirimi Zorunlu Hastalıklar Listesinde bulunmaktadır. Ülkemizde yaygın olarak görülen brusellozis için, Sağlık Bakanlığı verilerinde 2009 yılında 9385, 2010 yılında 7703, 2011 yılında 7177, 2012 yılında 6759, 2013 yılında 7225 vaka bildirimi yapılmıştır (Türkiye Sağlık Bakanlığı 2014).

*Brucella*'ların neden olduğu Brucellozis; sığır, koyun, keçi, koç, köpek, domuz, gibi memmeli hayvan türlerinde genital organlara yerleşerek gebe hayvanlarda atıklara ya da infertiliteye neden olur. Hastalık kronik seyirlidir, oldukça bulaşıcıdır, nekrotik ve yangısal enfeksiyonlar oluşturabilir (Buxton ve Fraser 1977, Garin-Bastuji ve ark 2005). Hastalık evcil hayvanlarda üremeyi önlemesi ile önemli ekonomik kayıplara neden olurken, ayrıca enfekte hayvanların süt ve süt ürünleri ile insanlara bulaşması da halk sağlığı açısından önemli problemler oluşturmaktadır (Arda ve ark 1997, Garin-Bastuji ve ark 2005).

Enfekte hayvan materyalleri ile temas riski olan veteriner hekimler, çobanlar, hayvan bakıcıları, suni tohumlama teknisyenleri, mezbaha çalışanları, gıda sektöründe görev alan personel ve laboratuvar çalışanları brusellozis açısından riskli grubu oluşturmaktadır. Bu meslek gruplarında çalışan insanlar için hastalık meslek hastalığı olarak ortaya çıkmaktadır (Aydın 2006, Irmak 2010).

Enfekte hayvanlara ait pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin sindirim sistemi kanalı ile alınması insanlar arasındaki bulaşmanın en temel yoludur (Aydın 2006, Young 2006). Enfekte hayvana ait her türlü materyal ile direkt temasta bulunan hasarlı veya yumuşamış deri ya da enfeksiyon etkeninin solunum yoluyla alınması da bulaşmada önemli rol oynar. Laboratuvar çalışanları açısından çalışmalar esnasında oluşabilecek kazalar ya da *Brucella abortus* (*B. abortus*) S19 ve *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) Rev 1 canlı aşularının çiftliklerde uygulanmaları esnasında meydana gelen kazalar konjunktiva yolu ile de etkenin sağlıklı bireyler tarafından alınmasına neden olmaktadır (Meyer 1990, Corbel 1997, Aydın 2006). Cinsel temas ya da emzirme gibi sebeplerle nadirde olsa etkenin insandan insana bulaşabileceği ancak bu tarz bulaşmanın oldukça nadir olduğu bildirilmektedir (Young 2005).

Bulaşmada en yaygın neden kontamine doğum akıntıları ve abort materyali olduğundan, hasta hayvanların sürüden izolasyonu ve atık materyallerinin uygun şekilde imhası enfeksiyonun sürüdeki diğer hayvanlara, komşu çiftliklere ve dolayısı ile insan topluluklarına bulaşmasını önlemek için uygun bir yöntemdir. Hastalığın görüldüğü çiftliklerdeki alet ve ekipman bulaşmanın ve yayılmanın önlenmesi için dikkatli ve uygun bir şekilde dezenfekte edilmelidir (Deyoe ve ark 1979). Bulaşmanın önlenmesinde sahada çalışanların koruyucu giysi kullanmaları ve kullanılan malzemelerin uygun bir şekilde dezenfekte etmeleri gibi basit ve temel önlemler almaları enfeksiyonun pasif olarak yayılımını önlemek açısından kolay yöntemlerdir (Uysal ve Erdenliğ 2001).

Brusellozisin en kolay enfekte olunabilecek enfeksiyonlardan birisi olması nedeni ile laboratuvar çalışanları hastalık için risk faktörü yüksek grubu oluşturur. Her türlü laboratuvar çalışması sırasında ve sonrasında enfekte materyaller ve bakteriyel kültür ortamları uygun şekilde imha edilmeli ve çalışmalarda yeterli biogüvenlik önlemleri alınmalıdır. Kültür için laboratuvara getirilen her türlü materyal, eğitimli personel tarafından güvenlik kabinleri içerisinde yapılmalıdır. Bu tarz önlemler mezbaha çalışanları için de oldukça önem arz eder. Fakat serum örnekleri ile yapılan serolojik testler neredeyse hiç risk taşımazlar (Nicoletti 1977).

Enfeksiyona maruz kalma riski yüksek olan meslek gruplarında düzenli aralıklarla serolojik testlerin uygulanması gerekmektedir. Tedavideki en önemli ve kolay yöntem bulaşmanın önlenmesidir. Hastalığın insanlara bulaşmasının

önlenmesinde en önemli faktörün hasta hayvanların kontrolü olduğu geniş ölçüde kabul edilen bir fikir birliğidir. Enfeksiyonun kontrolünde hayvan sürülerinin aşılması önemli bir rol oynar. Çünkü henüz insanlar için ciddi yan etkilerin oluşmadığı etkin bir aşı geliştirilememiştir (Uysal ve Erdenliğ 2001).

İnkübasyon süresi bireyler ve canlılar arasında farklılıklar göstermektedir. Hastalık belirtileri bireylerde birçok sistemde ortaya çıkabilir. Akut safhada bakteriyemiye neden olan mikroorganizmalar başta retiküloendotelial sistem olmak üzere çeşitli organ ve sistemlerde belirtiler ortaya koyar. Hastalığın ilk belirtileri arasında geceleri artan dalgalı ateş, titreme, terleme, yorgunluk, iştahsızlık, baş ağrısı, halsizlik, miyalji, ve sırt ağrısı gibi genel enfeksiyon belirtileri bulunmaktadır (Corbel 1989, Godfroid ve ark 2001). Hastaların bir kısmında lenfadenopati, hepatomegali ve splenomegali ortaya çıkabilir (Hoover ve ark 1997, Young 2006). Genel belirtiler açısından bakıldığında hastalık birçok enfeksiyon hastalığı ile ortak belirtiler göstermektedir. Tedaviden sonra etken hasta vücudunda mononükleer fagositik hücrelerde saklanmakta ve uygun şartlarda tekrarlayan enfeksiyonlar göstermektedir. Hasta bireyler arasında ölüm oranı %1'den az iken, başlıca sebepler arasında endokardit ve nörobrusellozis yer almaktadır (Godfroid ve ark 1998, Young 2006).

İnsanlarda burusellozis tanısında altın tanı yöntemi bakteriyolojik kültürdür. Fakat alınan numunelerde bakterinin üretilmesi için numunenin uygun zamanda alınmış olması gerekmektedir. Kültür metodu özellikle kronik vakalarda daima kesin sonuç vermez. Bu nedenlerden dolayı insanlarda tanı amacı ile serolojik yöntemler sıkça kullanılır. Laboratuarlarda özellikle yaygın olarak tüp ve lam aglütinasyon, merkaptotanol/rivanol presipitasyon testi, anti-insan globülininin kullanıldığı aglütinasyon testi (Coombs reaktifi ile tüp aglütinasyon), indirekt hemaglütinasyon testi, FAT ve ELISA testleri kullanılmaktadır (Corbel 1997, Young 2006). Bu testlere ek olarak bakteri DNA'sının araştırıldığı PZR gibi moleküler yöntemler de hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Aktaş 2003, Young 2006).

Brusellozisin insidansı ve hastalığın kontrolü hayvan vakalar ile doğru orantılıdır (Young 2006). Hastalığın günümüzde insanlarda kullanılabilen bir aşısı mevcut değildir. Bu nedenden dolayı korunmada primer yol hayvan konakçılarının kontrolüdür. Hasta hayvanlar ile temas ihtimali olan bütün insanlarda temas

önlemlerinin alınması, gıda kontrolünde et ve et ürünlerinin pişirilerek tüketilmesi ve süt ve süt ürünlerinin pastörize edilerek tüketime sunulması, toplumun konu ile ilgili bilinçlendirilmesi ve hastalığın görüldüğü çiftliklerde bildirimlerin yapılması bulaşmanın önlenmesi açısından önemli faktörlerdir (Hoover ve ark 1997, Young 2006).

## 1.2. Tarihçe

Bruselloz M.Ö. 450 yılında Hipokrat'tan bu yana ateşle karakterize olan bir hastalık olarak bilinmektedir. İnsan brusellozuna ait ilk tanımlama ise 1860 yılında Marston tarafından yapılmıştır (Marston 1861). Hastalık etkeni ise ilk olarak, 1887 yılında İskoçyalı bir hekim olan Sir David Bruce tarafından "Malta Humması" nedeniyle ölen İngiliz askerlerinin dalak ve karaciğerlerinden izole edilmiş ve *Micrococcus melitensis* (*M. melitensis*) olarak isimlendirilmiştir (Bruce 1887). Daha sonraları David Bruce'ü onurlandırmak için hastalığın cins adı *Brucella* olarak değiştirilmiştir (Meyer ve Shaw 1920).

İnsan ve hayvan serumlarından aglütinasyon testinde *B. melitensis*'e ait spesifik antikorlar tesbit edilerek hastalığın zoonoz bir hastalık olduğu açıklanmıştır (Wright ve Smith 1897). *B. melitensis* keçi sütü ve idrarından izole edilmiş ve *B. melitensis*'in konakçısının keçi olduğunu ve insanlara çiğ süt ve süt ürünlerinden geçtiği açıklanmıştır (Zammit 1905). O yıllarda Malta halkının kültüründe kapıdan direk keçiden süt dağıtımı ve çiğ süt tüketimi yer almaktadır. İnsanlara hastalığın çiğ keçi sütünden geçtiği belirlenince kapıdan süt satışı yasaklanmış olup 1938 yılında da pastörizasyon işlemi zorunlu hale getirilmiştir (Nicoletti 2002). Bang ve Stribold (1895) tarafından atık yapan sığırlardan *B. abortus*'u izole etmişlerdir (Hughes 1897). Daha sonra *B. suis* 1914 yılında Traum tarafından atık yapmış olan domuzlardan izole edilmiştir (Özsan 1990). Amerikalı bir bakteriyolog olan Alive Evans (1918) keçilerde, sığırlarda ve domuzlarda rastlanan bu üç etkenin kültürel, morfolojik ve biokimyasal farklılıklarının olmadığını yalnızca antijenik farklılıklarının olduğunu açıklamıştır (Özsan 1990, Al Dahouk ve ark 2003a, Young 2005).

*B. ovis* Buddle (1956) tarafından Yeni Zellanda'da koyunlardan izole edilmiştir. *B. canis* ise Carmichael ve Bruner (1968) tarafından av köpeklerinden izole edilmiştir. *B. neotomae*, Amerika'da Utah eyaletinde Stoenner ve Jackman



(1957) tarafından çöl ratlarından izole edilmiştir. Son yıllarda deniz memelilerinden iki yeni *Brucella* türü izole edilmiş ve *B.ceti* ve *B. pinnipediae* olarak adlandırmıştır (Foster ve ark 2007). En son olarak tarla farelerinden *B. microti* izole edilmiştir (Scholz ve ark 2008).

*Brucella spp.* Türkiye’de ilk defa Dr. Hüsametdin Kural ve Mahmut Sabit Akalın (1915) tarafından Kuleli Askeri Hastanesi’nde yatmakta olan bir hastadan izole edilmiştir. *B.melitensis* Aktan ve Köylüoğlu (1944) tarafından ilk olarak Bandırma merinos çiftliğinde bir koyundan izole edilmiştir. (Tarım Bakanlığı Brusellosis ve Tüberkülozis Şubesi, Ankara, 1965). Büyükbaş hayvanlarda hastalık Türkiye’de ilk Berke (1931) tarafından tanılanmıştır. *B. canis*’in ilk teşhisi Serdar Diker ve ark tarafından serolojik yöntemler kullanılarak yapılmıştır (Diker ve ark 1984). Brusellozis vakaları çoğunlukla sürü halinde yaşayan evcil hayvanlarda artmaktadır. En yaygın tür olan *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* farklı konakçı türleri gösterebilir değişik hayvan gruplarında enfeksiyon ortaya çıkabilir. Bu üç türe oranla *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae* primer konakçıların dışına çok fazla çıkmazlar (Hagan 1973, Meyer 1990). Dünya nüfusuna bakıldığında en yaygın türün *B. melitensis* olduğu görülsede diğer türlerle enfekte vakalar da bulunmaktadır (Gotuzzo ve Carrillo 1998).

### **1.3. Etiyoloji**

#### **1.3.1. Morfoloji**

*Brucella spp.* bakterileri gram boyama yöntemi ile hızlı boyanır, gram negatiftir, ilk pasajdan sonraki kültürlerde düzensiz boyandığı gözlenir. Kapsül yoktur ve endospor oluşturmaz (Renner ve Hausler 1980, Arda ve ark 1997, Baysal 1999, Bilgehan 2000, Chu ve Weyant 2003).

*Brucella spp.* 0.5 - 0.7 µm genişliğinde, 0.6 - 1.5 µm uzunluğunda kokobasildir. Çoğunlukla uçuca ekli diplokok şeklinde gözlenir. Sıvı besiyerinde üretildiği takdirde bakteri 3-5 zincir şeklinde üreme gösterebilir. Boyanma yöntem ve görünüşlerine göre *Brucella spp.* türlerini birbirinden ayırt etmek mümkün değildir (Yıldırıncı 1993, Baysal 1999, Sümerkan 2002).

*Brucella spp.* bakterileri oldukça küçük ve hareketsizdir ancak küçük olmalarından dolayı moleküler harekete bağlı titreşim hareketi (Brownian hareket) yaparlar. Bakteri ilk pasajda smooth koloni oluşturur ve boyamada bakteri çevresinde ince kapsül gözlenir ancak daha sonraki pasajlarda koloni morfolojisi rough koloni şeklini alırken boyamada kapsül kaybolur (Yıldırıncı 1993, Baysal 1999, Sümerkan 2002, Chu ve Weyant 2003).

*Brucella spp.* türlerinde plazmit oluşumu gözlenmez. Bakteride pilus olmadığı için konjugasyon yöntemi ile gen aktarımı yapamaz. Ancak transdüksiyon yöntemi ile gen aktarımı yapabildikleri antibiyotik direnç gelişiminden dolayı düşünülmektedir. Etken normal şartlar altında minimum seviyede transformasyona uğrar (Corbel 1989). Polimorf nüveli lökositler içerisinde uzun süre canlı kalabilir ve burada bağışıklık sistemine yakalanmadan üreme gösterebilir (Ugalde 1999).

### **1.3.2. Kültür ve Üreme Özellikleri**

*Brucella* türleri konakçı organizması dışında çoğalma göstermez. Ancak uygun ortam şartları sağlandığında (ısı, nem ve asidite) uzun süre canlılığını korur. Uygun şartlardaki dayanıklılığına rağmen bakteri pastörizasyon, güneş ışığı, kuru hava ve dezenfektanlara karşı oldukça duyarlıdır. *Brucella spp.* 10-15 dakikalık kaynatmaya oldukça dayanıksızdır, 60°C'de 10 dakika içinde, 100°C'de ise hemen ölür. Ancak nemli ve karanlık ortamda 50-70 gün, su içerisinde 15 gün, sütte 1-2 gün, difrizde 3-5 ay, süt kaynatılmadan yapılan dondurmada 1 ay canlılığını korur (Arslan 2002). Konakçı idrarında 30 gün, hayvan atıklarında 75 gün ve vajinal akıntıda 200 gün canlılığını korur. Gübre içerisindeki bakteri 56-61°C'de 4-5 saat içerisinde yok olur. Kaynatmadan kullanılan süt ile üretilen tuzsuz krema da 142 gün, % 10 tuzlu salamura peynirde 45 gün canlılığını korur. Et içerisindeki bakteri kesim sonrası normal dinlendirme süresi içerisinde ette oluşan pH değişikliği (asitlik) nedeni ile hızlıca tahrip olur. Yüzey dezenfeksiyonunda kullanılan % 2'lik formol veya % 1'lik lizol içerisinde 15 dakikada tahrip olur (Arda ve ark 1997, Taşçı 2004).

*Brucella spp.* organizmadan yeni ayrıldığında genel kullanım besiyerlerinde üremesi güçlük gösterir ve yavaş ürer (Bilgehan 2000). Özellikle serum, gliserin ve glikozlu besiyerlerinde üremeyi tercih eder (Gürler 1990, Bilgehan 2000). Selektif besiyeri kullanımı ilk izolasyon için gerekli olabilir. Pepton, et özü, triptoz, glikoz ve

tuz gibi kompleks bileşenler içeren besiyeri ortamlarında güzel ürer (Gürler 1990). *Brucella spp.* türleri kimyasal bileşenleri besin olarak kullandıkları için birçok tür bileşik içerikli besiyerlerine ihtiyaç duyar. Aminoasitlerden nikotik asit, niyasin, tiyamin, vitaminler ve magnezyum bakteri üremesinde gereklidir (Gürler 1990, Moyer ve ark 1991, Mayc ve Weyant 2003). Besiyerinde kan ve serum varlığı üremeyi oldukça artırır. *Brucella* türlerinde enerji üretimi için oksidatif metabolizma kullanılır (Holt ve ark 1994). Kalsiyum pentenat ve mezoeritritol üremelerini artırır (Gürler 1990, Moyer ve ark 1991). *Brucella* agar, Çikolata agar, serum dekstroz agar gibi kan ile zenginleştirilmiş besiyeri ortamları, trypticase soy agar (defibrine koyun kanı ilaveli %5 veya ilavesiz), brain-heart infüzyon broth ve agar kültürde yaygın olarak kullanılan besiyeri ortamlarıdır (Gürler 1990, Mayc ve Weyant 2003). Bakterinin ilk izolasyon sonrası pasajlarında ise üremesi oldukça kolaylık gösterir, hatta buyyon ve jeloz gibi standart ortamlarda bile kolayca üreme gösterir (Bilgehan 2000). İlk izolasyonda *B. abortus* üreyebilmek için %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama ihtiyaç duyar (Sümerkan 2002). *B. abortus* uygun atmosfer şartlarında dahi oldukça yavaş ürer (Gürler 1990). Ancak *B. abortus* sonraki pasajlarda normal atmosfer şartlarında üreme gösterir. *B. melitensis* ve *B. suis* ilk izolasyonda dahi %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosfer ortamına ihtiyaç duymazlar ve zorunlu anaerop atmosfer koşullarında üreme göstermezler (Gürler 1990). Üreme için uygun ortam ısısı 37°C olsada 20-40°C aralığındaki her türlü ısıda üreyebilir. Uygun ortam pH'sı 6,6-7,4 aralığında olmalıdır (Holt ve ark 1994, Mayc ve Weyant 2003). Ekimi takiben 48-72 saat içerisinde besiyeri yüzeyinde yüzeyden kabarık, konveks, su damlası şeklinde, parlak yüzeyli smooth koloni oluşur (Holt ve ark 1994). Ancak *B. canis* ve *B. ovis*'de routh koloni oluşumu ilk izolasyonda dahi gözlenebilir. Kolonilerin gözle görünür hale gelmesi 48-72 saat alırken koloni büyüklüğü 4-5 gün sonunda 2-3 mm çapına ulaşır (Gürler 1990, Moyer ve ark 1991). Koloniler hemolizsiz ve pigmentsizdir (Moyer ve ark 1991). Birçok pasajdan sonra koloni morfolojisi bozulur *B. melitensis* ve *B. abortus*'un bazı türlerinde esmer-kahverenkli koloniler gözlenebilir (Gürler 1990).

### 1.3.3. Biyokimyasal Özellikleri

*Brucella* grubu mikroorganizmalar, fermentatif metabolizma yerine oksidatif metabolizmaya sahip olduklarından, klasik karbonhidrat fermentasyonu testleri ile asit veya gaz oluşturma yeteneğine sahip değildirler (Alton ve ark 1988, Garrido-Abellan

ve ark 2001). Katalaz, oksidaz ve üreaz pozitifler ve nitratı nitrite indirgerler. Voges-Proskauer, Metil Red, İndol ve Sitrat gibi kimyasal testler negatiftir. Kükürt içeren aminoasitlerden H<sub>2</sub>S üretimleri değişken olmasına karşın *B. melitensis*'ler H<sub>2</sub>S negatiftir. Jelatini eritmezler (Buxton ve Fraser 1977, Alton ve ark 1988, Koneman ve ark 1992, Arda ve ark 1997, Quinn ve ark 2002) (Çizelge:1.1). Oksidatif metabolizma testleri referans laboratuvarlarınca yapılmaktadır. *B. melitensis*, L-alanin, D-glikoz, meso-erythritol, D-alanin, L-asparagin ve L-lutamik asiti okside ederken L-arabinoz veya L-lizini oksidatif metabolizmada kullanmaz (Alton ve ark 1988).

**Çizelge 1.1:** *Brucella* cinsi bakterilerin ortak biyoşimik özellikleri.

	Katalaz	Oksidaz	Üreaz	Nitratları İndirgeme	Sitrat	Metil Kırmızısı	V. Proskauer	Jelatinaz	ONP G
<i>Brucella</i>	+	+	Değ.	+	-	-	-	-	-
		(Çoğu tür)							

Tabloda. *B. ovis* ve *B. neonatame* hariç *B. melitensis* biyotip 1, *B. abortus* biyotip 1 ve *B. suis* biyotip 1'in ortak özellikleri görülmektedir (Koneman ve ark 1992).

Serolojik testlerde *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli* O:116, O:157, *Vibrio cholera* *Salmonella* grup N (0:30) ve *Yersinia enterocolitica* O:9 gibi bakterilerde bulunan SLPS antijeni *Brucella spp.* ile çapraz reaksiyon gösterir. Bu da testlerde yanlış pozitifliğe neden olur (Timoney ve ark 1988, Quinn ve ark 2000).

*B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* H<sub>2</sub>S'ü kükürtlü organik bileşikleri parçalama sonucunda oluşturur. H<sub>2</sub>S oluşturma sürelerine bakıldığında *B. suis*'in 3-5 gün ile en uzun sürede ve en fazla ürettiği, *B. abortus*'un 2 günde oluşturmaya başladığı, *B. melitensis*'in ise bir gün içerisinde eser miktarda H<sub>2</sub>S üretir (Bilgehan 2000).

*Brucella spp* tiplendirmesinde; %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosfere ihtiyacı olup olmaması, H<sub>2</sub>S ve üreaz üretilmemeleri, bazik fuksin ve tiyonin boya varlığında üremeleri değerlendirilmelidir. Çeşitli oranlarda boya varlığında üreme biyovar ayırımını belirler. *B. melitensis* üremesi besiyerine belirli miktarda eklenen kristal viyole, pironin, thionin (1/25.000, 1/50.000, 1/100.000) ve bazik fuksin (1/50.000, 1/100.000) varlığında baskılanmaz. *B. abortus* üremesi ise thionin eklenen besiyerlerinde baskılanır. *B. suis*'in üremesi ise thionin varlığında devam ederken diğer boyaların besiyerine eklenmesi durumunda baskılanır. Ancak biyovarlar arasında farklılıklar gözlenmektedir (Çizelge:1.2). Karbonhidrat metabolizmasına bakıldığında trehaloz,

inozitol, ramnoz ve mannoz fermantasyonu bakımından türler arasında farklılıklar gözlenmektedir (Bilgehan 2000).

**Çizelge 1.2:** *Brucella* türlerinin ayırt edici özellikleri (Dubos 1965)

Tür	biyovar	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	ürezaz	Boyalarda Üreme				
					Thionin			Fuksin	
					a	b	c	b	c
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	D	-	-	+	+	+
	2	-	-	D	-	-	+	+	+
	3	-	-	D	-	-	+	+	+
<i>B. abortus</i>	1	+,-	+	1-2 h	-	-	-	+	+
	2	+	+	1-2 h	-	-	-	-	-
	3	+,-	+	1-2 h	+	+	+	+	+
	4	+,-	+	1-2 h	-	-	-	+	+
	5	-	-	1-2 h	-	+	+	+	+
	6	-	+,-	1-2 h	-	+	+	+	+
	7	-	+,-	1-2 h	-	+	+	+	+
	8	+	-	1-2 h	-	+	+	+	+
	9	+,-	+	1-2 h	-	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	1	-	++	0-30 dk	+	+	+	-	-
	2	-	-	0-30 dk	+	+	+	-	-
	3	-	-	0-30 dk	+	+	+	+	+
	4	-	-	0-30 dk	+	+	+	+	+
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	0-30 dk	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	1	+	-	0	+	+	+	+	+
<i>B. canis</i>	1	-	-	0-30 dk	+	+	+	-	+,-

Not: a: 1/25.000 b:1/50.000 c:1/100.000 Besiyeri olarak TSA veya TA kullanılmıştır.

#### 1.3.4. Antijenik Özellikleri

*Brucella spp.*'nin hücre duvarına bakıldığında pilus ve fimbria gözlenmez, kapsül ise ilk kültür de varken sonraki pasajlarda yoktur (Corbel 1997). Bakteri hücre duvarına bakıldığında burada yer alan dış membran proteinleri (OMP) ve lipopolisakkarit (LPS) tabaka virülansiteyi belirler (Bundle ve ark 1989, Corbel 1997, Paquet ve ark 2001). *Brucella spp.* suşlarında birçok ortak antijen bulunurken, smooth ve rough koloniler arasında LPS antijeni farklıdır ve OMP'ler türler arasında farklı yapılar içerisinde yer alır (Kocabeyoğlu ve ark 1994, Bowden ve ark 1995, Paquet ve ark 2001). OMP hücresel bağışıklıkta LPS antijenleri ise humoral bağışıklıkta rol almaktadır. (Paquet ve ark 2001).

*Brucella* hücreleri, ultrasonikasyon veya dondurup çözme gibi yöntemlerle parçalanırsa immunelektroforezde hiperimmunserumlara karşı 20 eriyebilir antijen elde edilebilir (Aydın ve ark 1988). S-tipi *Brucella* türlerinde immün yanıtı oluşturan immunodominant moleküller, dış membran (OM), S-lipopolisakkarit (S-LPS), native hapten (NH) polisakkarit ve polisakkarit B'dir (Diaz ve ark 1979, Palmer ve Douglas 1989, Marquis ve Ficht 1993, Aragon ve ark 1996, Moriyon ve Lopez-Goni 1998).

S-*Brucella* yüzeyinde bulunan endotoksik S-LPS varlığı, fenol-su ve eter-su ekstraktları ya da elektron mikroskopu ile ortaya konulabilir (Diaz ve ark 1979, Moriyon ve Lopez-Goni 1998). LPS, serolojik olarak dominant antijenik komponenttir. S-LPS yapısal olarak, O- polisakkarit zinciri, oligosakkarit kor bölgesi ve lipit A'dan oluşur (Moriyon ve Lopez-Goni 1998). *B. abortus*'un lipit A bölgesi glukozamin yerine diaminoglikoz kuyruğu içerir ve oligosakkarit kor bölgesine ester ve amid bağları yerine sadece amid bağlarıyla bağlanır. *Brucella*'ların bu klasik olmayan LPS yapıları enterik bakterilerin LPS yapısı ile kıyaslandığında daha az toksiktir. Bu düşük endotoksin aktivitesi hücre içi yaşama adapte olmak amacıyla gelişmiş olduğu düşünülmektedir (Lapaque ve ark 2005).

O- polisakkarit zincirinin, *nuclear magnetic resonance* (C-NMR) (Meikle ve ark 1989) ve *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) analizi ile yapılan incelemelerde A ve M olmak üzere 2 farklı tipte olduğu belirlenmiştir (Moriyon ve Lopez-Goni 1998). Her iki tip O-polisakkarit zinciri de N-formil-perosamin homopolimeridir. Fakat ayrımlarının zincir üzerinde bulunan  $\alpha$ -1,2 ve  $\alpha$ -1,3 bağlantı oranlarından kaynaklandığı belirlenmiştir. A antijeni,  $\alpha$ -1,2 bağlı N-formil-perosaminin lineer bir homopolimeridir. M antijeni, dördü  $\alpha$ -1,2 bağlı ve biri  $\alpha$ -1,3 bağlı olmak üzere toplam beş N-formil-perosaminin tekrar etmektedir (Diaz ve ark 1977, Meikle ve ark 1989, Marquis ve Ficht 1993, Aragon ve ark 1996, Moriyon ve Lopez-Goni 1998). C-NMR ile, *B. melitensis* biyotip 1-16M (M+), biyotip 2-63/7 (A+), biyotip 3-Ether (A+,M+) ve *B. abortus* biyotip 1 (A+) suşları analiz edilmiş ve taşıdıkları M antijen miktarı sırasıyla 2.08, 0.016, 0.38 ve 0.005 mg, A antijen miktarı 0.005, 2.62, 2.39 ve 1.38 mg olarak bulunmuştur (Meikle ve ark 1989)(Çizelge:1.3). *Brucella* türlerinin rough ya da smooth lipopolisakkarite (R-LPS ya da S-LPS) sahip olmalarını, O-polisakkarit zinciri taşıyıp taşıyamamaları

belirler. S-*Brucella* türlerinin patojeniteleri O-polisakkarit zinciri taşımalarına bağlı iken R-LPS'e bulunduran *B. canis* ve *B. ovis*, O-polisakkarit zinciri taşımadıkları halde köpek ve koçlar için patojendir (Caro-Hernandez ve ark 2007).

**Çizelge 1.3:** Bazı *Brucella* türlerinin A-M-L antijeni bulundurma oranı (Bilgehan 2000).

	A antijeni	M antijeni	L antijeni
<i>B.melitens</i>	az	çok	yok
<i>B.abortus</i>	çok	az	var
<i>B.suis</i>	çok	az	yok

*Y. enterocolitica* 0:9'un LPS'i ile aynı yapıda olan A serotipin O-polisakkariti,  $\alpha$ -1,2 bağlı 4,6-dideoksi-4-formamido-Dmannopiranosil (N-formil perosamin) çizgisel bir homopolimerdir. M serotipde ise O-polisakkarit, biri  $\alpha$ -1,2'ye ve dördü  $\alpha$ -1,3'e bağlı toplam beş N-formil perosamin'in tekrarlama ile oluşur (Bundle ve ark 1989, Corbel 1997). Monoklonal antikordardan A ve M antijenleri ile hazırlanarak uygulanan immunoblotting testlerinde ya A ya da M determinantına karşı reaksiyon görülmekte her ikisine birden tepkime görülmemektedir. Böylece, her iki antijeni bulunduran *B. melitensis* biyotip 3 ve *B. suis* biyotip 4'de A ve M antijenlerinin farklı moleküller olarak sentezlendiği görülmektedir (Meikle ve ark 1989). *Brucella* bakterilerinde A ve M antijen yapıları aynı miktarda bulunmaz. *B. abortus* ve *B. suis*'te A antijeni (A/B=20/1), *B. melitensis*'de ise M antijeni (A/M=1/20) daha fazla olarak görülür. Aglütinin absorpsiyon testi ve jel difüzyon yöntemi uygulandığında *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* serolojik yöntemlerle kolay ayırtebilirken, *B. abortus* ve *B. suis*'i ayırmak mümkün değildir (Young 2000, Sümerkan 2002). *Brucella spp.* suşları içerisinde S-LPS'ye sahip olanlar daha virulans ve polimorf nüveli lökositler tarafından intrasellüler yok edilmeye dirençli (Yuong 1995), R-LPS'e sahip olanlar ise virülans faktörler yönünden daha zayıftır (Detilleux ve ark 1990).

Smooth *Brucella* kolonilerinde NH polisakkarit, ilk kez Diaz ve ark (1968) tarafından S-*Brucella* etkenlerinde belirlenmiştir ve bu bölge O-polisakkarit zincirinin şeker içermeyen şeklidir. Diğer polisakkarit antijeni olan polisakkarit-B ise düşük moleküler ağırlıklı bir şekerdir. Bu iki antijen birbirleri ile ilişkilidir ve fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır (Aydın ve ark 1988, Moriyon ve Lopez-

Goni 1998). Polisakkarit-B'de bulunan cyclic glucan, Rhizobiaceae familyası üyelerinin periplasmik bölgesinde bulunanlarla benzeşmektedir (Aragon ve ark 1996). *B. abortus* ve *B. melitensis* enfekte hayvanların serumlarında NH ve polisakkarit-B'ye karşı antikor oluşumu immunopresipitasyon testi ile ortaya konulmuştur. Fakat aşılanmış hayvanların serumlarında aynı antikorlara rastlanmaması bu antijenlerin enfekte ve aşılı hayvanların ayırımında kullanılabileceği sonucunu gösterir (Aragon ve ark 1996).

Major dış membran proteinleri (Omp) ilk olarak 1980 yılında Dubray ve Bezard tarafından, SDS-PAGE kullanılarak moleküler büyüklüklerine göre grup 1 (94 ya da 88 kDa), grup 2 (36-38 kDa) ve grup 3 (31-34 ve 25-27 kDa) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Moriyon ve Lopez-Goni 1998, Cloeckert ve ark 2002b, Gupta ve ark 2007). Grup 2 proteinleri, porin proteinleri olarak da isimlendirilir (Douglas ve ark 1984). Bu proteinleri kodlayan genler (Omp2a ve Omp2b) ortaya konulmuştur (Marquis ve Ficht 1993). Grup 3 proteinleri, Omp25 ve Omp31 genleri tarafından kodlanmaktadır (Caro-Hernandez ve ark 2007). Minör Omp'ler ise Omp19, Omp16.5 ve Omp10 olarak belirlenmiştir (Moriyon ve Lopez-Goni 1998).

*S-Brucella* türleri ile Gram negatif bakterilerden *E. coli* O:116 ve O:157, *Salmonella* Kaufmann-White grup N(O:30), *Pseudomonas multophila*, *V. cholerae* ve özellikle *Y. enterocolitica* (O:9) arasında serolojik çapraz reaksiyon olduğu gösterilmiştir (Alton ve ark 1988, Aydın ve ark 1988). *Brucella spp.* ile *Ochrobactrum anthropi* (*O. anthropi*) arasında immunolojik çapraz reaksiyon (Velasco ve ark 1997) ve genetik yakınlık olduğu gösterilmiştir (Leal-Klevezas ve ark 2005). Ayrıca, *B. ovis* R-LPS ile *O. anthropi* R-LPS arasındaki çapraz reaksiyonda, doğal enfekte koç serumları iki antijenlede test edilerek sonuçlandırılmıştır (Velasco ve ark 1997). Ayrıca, keçilerde, *B. abortus* ve *B. melitensis*'e karşı hastalık geçirme veya aşılama sonucu oluşan antikorlar *O. anthropi* antijeni kullanılarak başarılı bir şekilde teşhis edilmiştir (Young 2000).

### 1.3.5. Faj Duyarlılığı

Cins ve tür düzeyinde yapılacak sınıflandırmalarda *Brucella*'lara spesifik bakteriyofajların kullanılması oldukça uygundur. Günümüze kadar kullanılan bütün *Brucella* fajları DNA yapıda ve Pedoviridae ailesinde yer alan fajlardır. *Brucella*



fajları 6 (altı) grup altında incelenir. Grup 1: Tbilisi (Tb), Grup 2: Firenze (Fi), Grup 3: Weybridge (Wb), Grup 4: Berkley (BK0, BK1, BK2), Grup 5: R/O, Grup 6: R/Cfajları olarak sınıflandırılır. Grup 1 fajlardan Tbilis fajı rutin test dilüsyon (RTD) tekniğinde sadece smooth *B. abortus* kültürlerini lize eder. Yine bu faj 10.000xRTD’de *B. suis* ve *B. neotomae* ‘yı “lysis from without” denilen bir fenomenle eritmektedir. Bu fenomende çok fazla sayıda fajdan salgılanan enzimler bakteri hücrelerini parçalarken faj hücre içerisinde replike olmaz böylece fajın enfektivitesi mevzubahis değildir. Grup 2 fajlardan Firenze fajı ise *B. abortus*, *B. suis* biyotip 4 ve *B. neotomae*’ye karşı etkilidir. Grup 3 fajlarından Weybridge fajı ise *B. suis*, *B. abortus* ve *B. neotomae* ‘ye karşı etkilidir fakat *B. melitensis*’in birçok biyovarında etkili değildir. Grup 4 fajlardan Berkeley fajı Douglas ve Elberg (1976) tarafından bulunmuştur. Berkeley fajı smooth *Brucella* suşlarının tamamında etkilidir. Grup 5 fajlar R-*Brucella* suşlarında etkilidir. Bu faj grubunda yer alan R/O fajı stabil bir yapıda değildir. Ancak *B. canis* Mex 51’in pasajları ile temin edilen R/C fajı gayet stabil bir yapıdadır. Bu faj rough koloni sergileyen suşlar için referens olarak kabul edilir. Grup 6 da ise Hindistan’da izole edilmiş İzatnagar fajı bulunmaktadır. İzatnagar fajı bütün smooth *Brucella spp.* türleri ve aynı zamanda rough *B. melitensis* ve *B. suis* kolonilerinde etkilidir (Corbel 1989). Faj duyarlılığı tesbiti için çoğunlukla RTD metodu kullanılmaktadır (Mayc ve Weyant 2003) (Çizelge:1.4-Çizelge:1.5).

**Çizelge 1.4:** *Brucella spp.*’lerin fajlara karşı duyarlılıkları (Mayc ve Weyant 2003).

RTDde fajların lizisi	<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. neotomae</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. suis</i>			
						Biyotip 1	Biyotip 2	Biyotip 3	Biyotip 4
<b>Tb</b>	L	NL	NL	PL	NL	NL	NL	NL	NL
<b>Wb</b>	L	NL	NL	L	NL	L	L	L	L
<b>Fi</b>	L	NL	NL	L	NL	PL	PL	PL	L
<b>Bk2</b>	L	NL	L	L	NL	L	L	L	L
<b>R/O</b>	PL	NL	NL	NL	L	NL	NL	NL	NL
<b>R/C</b>	NL	L	NL	NL	L	NL	NL	NL	NL
<b>Konak</b>	Sığır	Köpek	Koyun Keçi	Desert wood rat	Koyun	Domuz	Domuz Tavşan	Domuz	Ren geyi ği

Not: NL; lizis oluşturmayan, PL;kısmi lizis, L;lizis oluşturan. RTD; rutin test dilüsyon.

**Çizelge 1.5:** Brucella türlerinin ayırıcı özellikleri (Mayc ve Weyant 2003).

Tür	Koloni Morfj.	Serum İhtiyacı	Fajlarla Lizis			Oksidaz	Üreaz
			Tb		R/C		
			RTD	104xRTD	RTD		
<i>B.melitensis</i>	smooth	-	-	-	-	+	+
<i>B.abortus</i>	smooth	-	+	+	-	+	+
<i>B.suis</i>	smooth	-	-	+	-	+	+
<i>B.neotomae</i>	smooth	-	-	+	-	-	+
<i>B.ovis</i>	rough	+	-	-	+	-	-
<i>B.canis</i>	rough	-	-	-	+	+	+

Sembol: RTD; rutin test dilüsyon

### 1.3.6. Antibiyotik Duyarlılığı

*B. abortus* S19 ile *B. melitensis* Rev-1 aşı suşları, penisiline (5 IU/ml) duyarlı iken aynı türlerin biovar 1'leri penisiline dirençlidir. *B. melitensis* Rev-1 streptomisine (2,5 µg/ml) dirençli iken diğer *B. melitensis*'ler duyarlıdır (Alton ve ark 1988). *B. melitensis* Rev-1 aşı suşunun streptomisine direncinin, rpsL gen bölgesinde bulunan 91. kodondaki (kodon 91: CCG yerine CTG) mutasyondan kaynaklandığı belirlenmiştir (Cloekaert ve ark 2002b). Penisilin ve streptomisin duyarlılık testleri aşı ve saha suşlarının ayırımında kullanılmaktadır (Alton ve ark 1988).

*Brucella* izolatlarının çoğu, gentamisin, tetrasiklin, rifampisin, ampicilin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, novobiosin, spektinomisin ve streptomisine duyarlı bulunmuştur (Garrido-Abellan ve ark 2001).

### 1.3.7. Tür ve Biyotipleri

*Brucellalar* *Proteobactereaceae* sınıfının alt grubunda yer alırlar. Sınıflandırma 16S rRNA sekans analizi sonucunda yapılmıştır. *Proteobactereaceae* grubunda *Brucellalar* dışında *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Bartonella* ve *Phyllobacterium* bakterileri yer almaktadır (De Lay ve ark 1987, Moreno ve ark 1990, Corbel ve Moriyon 1997a).

*Brucella spp.* bakterileri Meyer ve Shaw'ın yaptığı sınıflandırmaya göre 6 türe ayrılmıştır (Nicoletti 2002). *B. melitensis* (Meyer ve Shaw 1920), *B. abortus* (Meyer ve Shaw 1920), *B. suis* (Huddleson 1929), *B. ovis* (Buddle 1956), *B. neotomae* (Stonner ve Lackman 1957) ve *B. canis* (Charmihael ve Brunner 1968) (Verger ve ark 1985). Ayrıca bu sınıflandırmaya ek olarak *B. abortus* 9, *B. melitensis* 3, ve *B. suis* 5 biyotibe ayrılırken *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae* için böyle bir biyotip sınıflandırması mevcut değildir (Buxton ve Fraser 1977, Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997, Garin-Bastuji ve ark 1998, Plommet ve ark 1998, Quinn ve ark 2002). Günümüzde yapılan çalışmalarda bu sınıflandırmaya henüz eklenmemiş olsa dahi yeni *Brucella* türleri tesbit edilmiştir. Fok ve yunus balığından teşhis edilen iki yeni tür ilk *Brucella maris* (Jahans ve ark 1997) daha sonrasında ise *Brucella cetaceae* ve *Brucella pinnipediae* (Cloeckert ve ark 1999) olarak isimlendirilmiştir. Foster ve ark (2007), Avrupa'da deniz memelilerinden izole edilen 28 *Brucella* suşunu, oksidatif metabolizma testleri, faj duyarlılıkları, suşların konakçı tercihi ve L-arabinose, D-galactose ve D-xylose testlerine göre 2 gruba ayırmışlardır. Yunus balıklarından izole edilenleri, *Brucella ceti sp. nov.* ve foklardan izole edilenleri de *Brucella pinnipedialis sp. nov.* olarak isimlendirmişlerdir. Bunlara ek olarak farelerden *Microtus arvalis* ve topraktan *Brucella microti* izole edilen türlerdir (Scholz ve ark 2008a, Scholz ve ark 2008b).

Verger ve ark (1985), DNA-DNA hibridizasyon yöntemi ile tüm tür ve biyotipleri içeren 51 suş üzerinde yaptıkları çalışmada, *Brucella* türleri arasında % 90'ın üzerinde genetik benzerlik tespit etmişlerdir. Bu yüksek orandaki DNA homolojisi sebebiyle *B. melitensis*'in tek tür olarak kabul edilip, diğer türlerin biyotip (*B. melitensis* biovar melitensis 3, *B. melitensis* biovar abortus 2 gibi) olarak sınıflandırılmasını önermişler ancak pratik olmaması ve tam olarak kabul görmemesi sebebiyle eski isimlendirme tercih edilmektedir (Garin-Bastuji ve ark 1998). Daha sonra yapılan çalışmalarla, *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*'e ait genomların sekans analizleri tamamlanmış ve bu 3 türe ait genom dizilimleri tamamen belirlenmiş her üç türün de ikişer sirküler kromozoma sahip olduğu ve bu kromozomlardan büyük olanın (2.1 Mbp) küçük kromozomun (1.2 Mbp) iki katı büyüklüğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, üç türe ait genom sekansları arasında % 99'dan fazla benzerlik tespit edilmiştir (Halling 2003). *B. ovis*'in de genom

sekansı belirlenmiş ve diğer üç tür ile aralarında % 95'den fazla nükleotid uyumluluğu bildirilmiştir (Seshadri ve Paulsen 2003).

Bakterinin moleküler yöntemler kullanılarak tanılanması ve tiplendirilmesi ayrıca polimorfizmin belirlenebilmesi amacı ile PZR-RFLP veya Southern blot analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Garin-Bastuji ve ark 1998). *Brucella* türlerinin tiplendirilmesinde, Omp gen bölgelerinin çok miktarda polimorfizm içermesinden dolayı en çok kullanılan gen bölgesi olmuştur. *Brucella* türlerinin ayırımında, Omp2a, Omp2b, Omp25, Omp31, DnaK, Ery ve RpsL gen bölgeleri PZR-RFLP yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra çeşitli enzimler kullanılarak kesilmekte ve böylece bu gen bölgeleri çalışmalarda başarı ile kullanılmaktadır (Garin-Bastuji ve ark 1998, Al Dahouk ve ark 2005) (Çizelge:1.6).

**Çizelge 1.6:** *Brucella* türlerinin PZR-RFLP metodu ile ayırımı (Al Dahouk ve ark 2005).

<i>Brucella</i> türleri	Gen Bölgesi					
	Omp2	Omp25	Omp31	DnaK	Ery	RpsL
<i>B. abortus</i>	+	-	NA	-	B19	-
<i>B. melitensis</i>	+	+	-	16M	-	Rev-1
<i>B. suis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>	+	-	+	-	-	-
<i>B. ovis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>B. neotomae</i>	+	-	-	-	*	-
<i>B. maris</i>	+	*	*	*	*	-

Simgeler: NA: Amplifiye olmamış; \*: test edilmemiş; 16M: *B. melitensis* biyotip 1; B19:*B. abortus* aşısı suşu; Rev-1: *B. melitensis* aşısı suşu.

#### 1.4. Epidemiyoloji

Bruseloz, Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization), Gıda Tarım Örgütü (FAO: Food and Agriculture Organization) ve Dünya ve Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE: World Organisation for Animal Health) tarafından dünyada oldukça sık rastlanan zoonoz bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Hastalık Türkiye, Portekiz, İspanya, Yunanistan, Fransa'nın güney kesimleri, İtalya ve Kuzey Afrika ülkelerinin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası ile Arap yarımadası, Meksika, Hindistan, Amerika'nın orta ve güney kesimleri gibi ülkeler ile birlikte hemen hemen

dünyanın her bölgesinde gözlenmektedir (Yüce ve Çavuş 2006). İnsan Bruselloz'unun özellikle, insanların hayvanlar ile iç içe olarak, kırsal yaşam sürdüğü ülkelerde daha fazla görüldüğü bildirilmektedir. Hastalığın endemik olduğu bölgelerde, hastalığın insanlardaki insidansı 100 000'de 200 seviyelerindedir. İngiltere ve Avusturalya'da ağır kontrol ve hijyen tedbirleri sayesinde enfeksiyon eradike edilmiştir (Boschioli ve ark 2001). İnsan Bruselloz'unun insidansı, *B. melitensis* kaynaklı koyun ve keçi Bruselloz'unun meydana geldiği yerlerde daha yüksek oranlarda görülmektedir (Mantur ve ark 2007). Ek olarak çoğu bölgede insanlarda görülen *Brucella* enfeksiyonların temel kaynağı olarak sığırlar domuzlardan daha önemli yer tutmaktadır (Almuneef ve ark 2004). İtalya'da 1970-1990 yılları arasında Bruselloza yakalanmış insanların %99'unda *B. melitensis* identifiye edildiğini rapor edilmiş (Caporale ve ark 1992), 1990 ile 2002 yılları arasında ise Brusellozlu insan sayısının 100 000'de 2,7'den 1,4'e düştüğü bildirilmektedir (Massis ve ark 2002). Minas (2007), Yunanistan'da 2003-2005 yılları arasında insanlarda Bruselloz vaka sayısını 100 000'de 32,49 olduğunu bildirmiştir. (Hussain ve ark 2008)

ABD gibi gelişmiş ülkelerde evcil hayvan stoğunda Bruselloz nedeniyle gerçekleşen ekonomik kayıpların aşılama çalışmalarının arttırılmasıyla büyük ölçüde azaldığı bildirilmektedir (Moreno 2002). Brezilya'da en yaygın olarak *B. abortus* kaynaklı sığır Brusellozunun görüldüğü, bunu takiben *B. suis*'inde izole edildiği, *B. melitensis* ve *B. neotoma*'nın ise izole edilmediği ve sığır Brusellozunun ülke ekonomisine yıllık zararının 32 milyon doları bulduğu rapor edilmiştir (Poester ve ark 2002). Meksika'da Bruselloz'un halen en önemli ve ciddi bir bakteriyel enfeksiyon olduğu, sığırlarda görülen her bir abortun 1000-2000 dolar arasında zarara neden olduğu ve yıllık süt üretiminin bir önceki yıla nazaran yaklaşık % 12 azaldığı bildirilmiştir (Martinez ve Teran 2002). Hindistan'da, *Brucella* ile enfeksiyon oranının sığırlarda %5, mandalarda ise %3 seviyelerde olduğu ve bunun ülke ekonomisine oldukça yüksek seviyede zararlara yol açtığı bildirilmiştir (Renukaradhya ve ark 2002). Kenya'da *B. abortus* kaynaklı sığır Brusellozu prevalansının oldukça yüksek olduğu ve özellikle de ekstansif yetiştiricilik yapılan işletmelerde prevalansın % 5 ve üzerinde bir orana sahip olduğu rapor edilmiştir (Arimi ve ark 2005). İtalya'da yapılan eradikasyon çalışmaları sonucunda sığır kaynaklı Bruselloz vakaları önlenmiş olup, koyun ve keçi kaynaklı *B. melitensis*

enfeksiyonları ancak belirli seviyelerde sınırlandırılabilmiştir (Corbel 1997a). Sığır ve koyunların birlikte bulunduğu Ortadoğu bölgesi hayvancılığında *B. melitensis*'e bağlı enfeksiyonlar daha fazla görülmektedir. Böyle bölgelerde sığırlara *B. melitensis* Rev-1 aşısı uygulanmaktadır. Sığırlarda da bulunabilen *B. melitensis* Avrupa Ülkeleri, İsrail, Kuveyt ve Suudi Arabistan gibi ülkelerde önemli olmakta ve *B. melitensis* enfeksiyonlarının oldukça sorunlu ve karmaşık durumda olduğu değerlendirilmektedir. Bunun nedeni uygulanan *B. abortus* S19 aşılarının *B. melitensis* enfeksiyonlarına karşı koruyucu etkili olmaması ve *B. melitensis* Rev-1 aşılarının da sığırlarda kullanımının sonuçlarının ve değerlendirilmesinin tam anlamıyla bilinmemesi olduğu bildirilmektedir. Rev-1 aşısı ile yapılan aşı uygulamalarına rağmen, dünya çapında insanlarda görülen Bruselloz'unun en önemli kaynağı *B. melitensis*'tir (Çizelge:1.7). Bazı Güney Amerika ülkelerinde, özellikle Brezilya ve Kolombiya'da *B. suis* biyotip 1 sığırlarda gözlenebilmektedir (Lopez-Merino 1998).

**Çizelge 1.7:** İnsan brusellozisinde türler ve konakçılar (Gotuzzo ve Carrillo 1998).

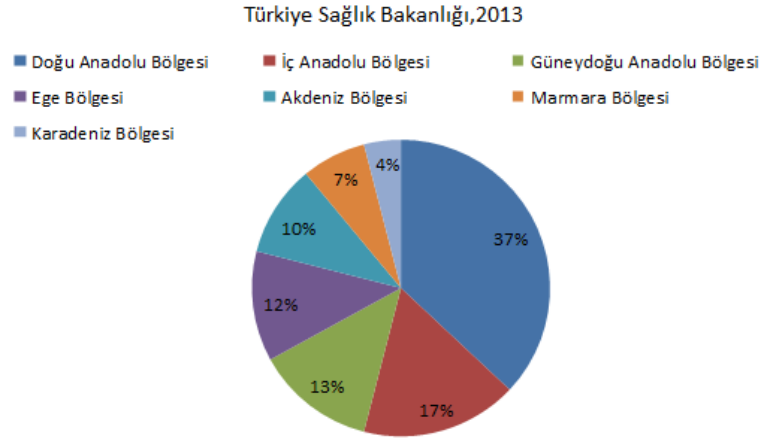
TÜR	KONAKÇI	DİĞER KONAKÇI	İNSANLARDA GÖRÜLME SIKLIĞI
<i>B.melitensis</i>	Koyun, keçi	Sığır	++++ (Olguların %70'i)
<i>B. abortus</i>	Sığır, manda	At	+++ (Olguların %25'i)
<i>B. canis</i>	Domuz, kurt	Sığır	++ (Olguların %5'i)

Türkiye'de brucellozis hayvanlarda ve insanlarda ihbarı zorunlu hastalıklar grubunda yer almaktadır. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanan Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı ve Laboratuvar Rehberine göre, bildirim zorunlu hastalıklar dört gruba ayrılmakta ve *Brucella* "Bildirim Zorunlu Grup A Hastalıklar" arasında yer almaktadır (Anonim 2011a) (Çizelge:1.8).

**Çizelge 1.8:** Türkiye’de Bruselloz ölüm ve hastalık oranları (Sağlık Bakanlığı 2014).

<b>Yıllar</b>	<b>Yıl ortası nüfus</b>	<b>Vaka sayısı</b>	<b>Morbidite hızı (100 000)</b>	<b>Ölüm sayısı</b>	<b>Mortalite Hızı (1 000 000)</b>
<b>2000</b>	67.844.903	10.742	15,83	6	0,09
<b>2001</b>	69.081.716	15.510	22,45	2	0,03
<b>2002</b>	70.415.064	17.765	25,23	1	0,01
<b>2003</b>	71.772.711	14.572	20,30	0	0,00
<b>2004</b>	71.152.000	18.264	25,67	2	0,03
<b>2005</b>	72.065.000	14.644	20,32	1	0,01
<b>2006</b>	72.974.000	10.810	14,81	3	0,04
<b>2007</b>	70.586.256	11.809	16,73	0	0,00
<b>2008</b>	71.517.100	9.818	13,73	1	0,01
<b>2009</b>	72.561.312	9.385	12,93	0	0,00
<b>2010</b>	73.722.988	7.703	10,45	0	0,00
<b>2011</b>	74.724.269	7.177	9,60	0	0,00
<b>2012</b>	75.627.384	6.759	8,87	0	0,00
<b>2013</b>	76.667.864	7.225	9,68	0	0,00

Ülkemizde insanlarda *Brucella* prevalansı tam anlamıyla bilinmemekle birlikte, serum-pozitif *Brucella* oranının yaklaşık % 2-6 arasında olduğu rapor edilmektedir (Topcu-Willke ve ark 1999). Türkiye’de Bruselloz, kırsal kesimde en sık rastlanan enfeksiyon hastalığı olmakla birlikte (Bodur ve ark 2003), hastalığın görülme sıklığı bölgelere göre Doğu Anadolu, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Ege, Akdeniz, Marmara ve Karadeniz bölgeleri olarak sıralanmaktadır (Kaya 2006) (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1:** Türkiye’de Bruselloz vakalarının bölgelere göre dağılımı.

Kenar ve ark (1990), Konya bölgesinde rastgele örnekleme yöntemi ile topladıkları 422 koyun serumunda % 1.2 pozitiflik belirlemişlerdir. Erganiş ve ark (1992) da ayrıca Konya yöresinden toplanmış 47 atık koyun fötusunun 14’ünden (% 30) *B. melitensis* izole edilmiştir. Konya yöresinden 58 atık koyun fötusunun 31’inden (% 53) *B. melitensis* izole edilmiştir (Kaya ve ark 1995). Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’ne 1987-1998 yılları arasında getirilen 799 adet atık koyun materyali *Brucella* yönünden ve atık yapmış sürülerde bulunan 925 adet koyun serum örneği serolojik yöntemlerle incelenmiştir. Atık materyallerinin % 24’nden *B. melitensis* izole edilmiş ve koyun serum örneklerinin % 24.8’i *Brucella* pozitif olarak değerlendirilmiştir (Güler ve ark 1998a). Konya bölgesinden Kıran ve ark (1998)’nin topladıkları 238 adet koyun atığının % 31.1’inde *B. melitensis* ve aynı sürülere ait 1119 adet koyun serumunda % 32.3 oranında *Brucella* antikoru tespit edilmiştir.

Hastalık Türkiye’de her yaş grubunda ve cinsiyette görülmektedir (Çizelge:1.9). Bruselloz görünme oranı 15-35 yaş grubundaki bireylerde en yüksek seviyededir. Özellikle bazı gruplar; hayvan yetiştiriciler, veteriner hekimler, laborantlar, mezbaha çalışanları ve gıda sanayisinde çalışanlar gibi bireyler bruselloz yönünden risk altındaki gruplardır. Enfeksiyon özellikle yaz aylarında dört kat artış göstermektedir. Buna sebep olarak kırsal kesime seyahatlerinin artması, uygunsuz üretilen süt ve süt ürünlerinin tüketiminin artması, taze peynir ve krema tarzında yağların uygunsuz şartlarda taze olarak elde edilmesi gösterilmektedir.



**Çizelge 1.9:** Türkiye’de yıllara göre insan bruselloz olgularının cinsiyet dağılımı (Sağlık Bakanlığı 2010)

Yıllar	Kadın		Erkek	
	n	%	n	%
2005	7778	53,1	6866	46,9
2006	5609	51,9	5201	48,1
2007	6628	52,7	5581	47,3
2008	5058	51,5	4760	48,5
2009	4994	53,2	4391	46,8
2010	3984	51,7	3719	48,3

Konya, ülkemizde insan brusellozunun en yaygın olarak görüldüğü bölgeler arasında yer almaktadır. Sağlık Bakanlığı tarafından Konya’da insanlardaki olgu sayısı 2000 yılında 267 (12,72/100 000), 2005 yılında 367 (15,5/100 000) olarak bildirilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı 2006). Konya bölgesinde koyunlarda ve sığırlarda brusellozun yaygın olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (Erganiş ve ark 1995, Erganiş ve ark 2002). Ülkemizde hastalık her ayda görülmekte ancak koyunların yavrulama dönemleri ve peynir yapımının arttığı dönemlerde sıklığın arttığı görülmektedir (Çizelge:1.10) (Göktaş 1990).

**Çizelge 1.10:** Bruselloz insidansı (European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013)

ÜLKE	İnsan (1/100 000)	Koyun/Keçi (%)	Sığır (%)
İran	23.9	10.2	17.5
Irak	27.9	15	3
Suriye	160	3	3.1
Türkiye	9.6	3.4	2.7
Yunanistan	0.81		
Bulgaristan	0.03		

## 1.5. Bulaşma

### 1.5.1. İnsanlarda Bulaşma

Bruselloz bugüne kadar devam eden eradikasyon çabalarına rağmen, özellikle başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere bütün dünyada önemini korumaktadır (Taşçı 2004). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) her yıl 500 000 yeni Bruselloz olgusunun dünya

üzerinde belirlendiği bildirilmektedir (Pappas ve ark 2006). İnsanlarda hastalık oluşturan en patojenik tür *B. melitensis* olup, bunu sırasıyla *B. suis* ve *B. abortus* izlemektedir (Micolich ve Boyce 1990). Enfeksiyonun insanlar arasında, özellikle de kırsal kesimlerde geniş bir şekilde yayılmasının temel nedenini enfekte gıdalar, özellikle de çiğ süt ve çiğ süttten yapılan taze peynir, krema ve tereyağı oluşturmaktadır (Sözen 1996, Erol 1997).

Ülkemizde tüketime sunulan çiğ sütlerin (Aslantaş ve Yıldız 2003, Atasoy ve ark 2003) ve peynirlerin hijyenik kalitesinin iyi olmadığı (Aygün ve ark 2005, Kaynar ve ark 2005, Kurşun ve ark 2008) ve patojen mikroorganizmalarında içerebildiği (Gönc ve Kılıç 2000, Akkaya ve ark 2007, Hayaloğlu ve Kirbağ 2007) bildirilmiştir. Ülkemizde çiğ sütlerin farklı oranlarda *Brucella spp.* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda Türütoğlu ve ark (2003), Burdur yöresinden topladıkları 404 inek sütünün ve 226 koyun sütünün Milk Ring Testi ile analizini yapmışlar ve inek sütlerinin % 3'nde, koyun sütlerinin ise % 2,2'nde *Brucella* pozitifliği bildirmişlerdir. Serttaş (2006) Isparta'da yaptığı çalışmada, süt örneklerinde Milk-Ring Testi ile %56,1 oranında *Brucella* pozitif tespit etmişlerdir. Terzi (2006), Samsun'da topladığı 50 adet inek ve 50 adet keçi sütünü Milk Ring Testi ile analiz etmiş, inek sütü örneklerini % 20 ve keçi sütü örneklerini % 12 oranında *Brucella* pozitif bulmuştur. Çelebi ve Otlı (2011) Kars'ta yaptıkları çalışmada, atık yapan sığır sütlerinin %4,4'ünde *Brucella spp.* izole etmişler ve tüm izolatları *B. abortus* biyotip 3 olarak tiplendirmişlerdir.

Afyonkarahisar'da sütlerde yapılan Brucelloz tarama çalışmalarında; Kenar ve Altındış (2001) aglütinasyon test ve Ring Testi kullanarak yaptıkları bir çalışmada *Brucella* pozitiflik oranını 120 adet süt örneğinde %6 olarak tespit etmişlerdir. Eren (2004), 100 adet süt örneğinin % 25'inde *Brucella spp.* izole etmiş ve bu izolatların %5'ini *B. abortus*, %20'sini ise *B.melitensis* olarak idendifiye etmiştir. Kenar (2004), koyun sütlerinde %4 oranında *B. melitensis* tespit etmiştir. Kenar ve ark (2008b) koyunlarda *Brucella* oranını Milk-Ring testi ile %16 oranında saptamışlardır.

Küplülü ve Sarımeahmetoğlu (2004), tüketime sunulan dondurmalarda, %5 oranında *Burucella spp.* saptamışlar ve izole edilen suşların hepsini *B. abortus* olarak idendifiye etmişlerdir. Taşcı ve Kaymaz (2009), Ankara'da tüketilen tereyağı, krema ve krem şantililerde *Brucella spp.* saptanmadığını bildirmişlerdir.

Hastalık insanlara çiğ veya pastörize edilmemiş enfekte süt ve süt ürünlerinin tüketilmesinin yanında enfekte karkas, enfekte uterus ve akıntıları ile direkt temas, kontamine tozların inhalasyonu sonucunda da bulaşabilmektedir (Nielsen ve ark 1996). *Brucella* veteriner hekimler, çiftlik hayvanı yetiştiricileri, hayvansal ürün işleme ve paketlenme prosesinde çalışan işçiler ile laboratuvar çalışanlarında görülmektedir (Rubinstein ve ark 1991). Hastalığın hayvanların sağaltımı veya aşılması sırasında ki bulaşma ihtimalinden dolayı veteriner hekimler, laboratuvar çalışmaları esnasında bulaşabilmesinden dolayı ise de laboratuvar personeli hastalık açısından risk altında bulunan meslek gruplarıdır (Young 2000). Bu nedenle Bruselloz bir meslek hastalığı olarak da adlandırılabilir. Bu kişilerdeki bulaşma daha çok deri ve mukozalar yolu ile meydana gelmektedir (Trujillo ve ark 1994). *B. abortus* çalışılan bir mikrobiyoloji laboratuvarında santrifüj tüplerinin kazayla kırılması sonucunda 12 laboratuvar personelinin enfekte olduğu bildirilmiştir (Fiori ve ark 2000). Hayvansal ürün işleme ve paketlenmede çalışan işçiler ise, enfekte karkastan inhalasyon, konjunktival yolla ve derilerinde bulunan yaralar aracılığı ile hastalığa yakalanabilmektedirler (Rubinstein ve ark 1991). Ayrıca hastalığın insandan insana bulaşmasının, organ ve kan nakilleri, cinsel ilişki (Mantur ve ark 1996) ve anne sütü ile (Carrera ve ark 2006) meydana geldiği bildirilmektedir. Nitekim Fanconi anemisi tanısı konmuş 8 yaşındaki bir çocukta, kemik iliği naklinden 4 gün sonra *B. abortus* tespit edildiğini bildirilmiştir. Yapılan incelemede, kemik iliği vericisinin yaklaşık 5 hafta önce, çiğ inek sütünden yapılmış peyniri tüketmesiyle enfekte olduğu tespit edilmiştir (Ertem ve ark 2000). Doğanay ve ark (2001), kan kültüründe *B. melitensis* tespit ettikleri bir hastaya altı hafta önce kan nakli yapıldığını, kan vericisinin babasının bir aydır Bruselloz tedavisi gördüğünü ve vericiye de Bruselloz tanısının koyulduğunu bildirmişleridir. Lubani ve ark (1988), Kuveyt'te yeni doğmuş ve sadece anne sütü ile beslenen bir bebekte ilk defa neonatal Brusellosis tespit ettiklerini bildirmişlerdir. İspanya'da yapılan bir araştırmada ise benzer şekilde 2 ve 7 aylık iki bebeğe Bruselloz tanısı konduğu rapor edilmiştir (Carrera ve ark 2006).

### **1.5.2. Hayvanlarda Bulaşma**

*Brucella spp.* sığır, keçi, domuz gibi hayvanların özellikle genital organlarına yerleşerek abort ve steriliteye neden olmaktadır (Young 2000, Bilgehan 2000). *B.*

*abortus* öncelikli olarak sığırlarda görülmekle birlikte manda, köpek, deve, at, geyik, koyun ve insanları enfekte etmektedir. *B. melitensis* ise keçi ve koyunlar arasında yüksek seviyede bulaşıcı olmasının yanında, sığırları ve insanları da enfekte edebilmektedir (Young 2000).

Sığırlar arasında enfeksiyon, abort yapmış hayvanlara direkt temas, otlak ve hayvan barınaklarının kontamine olmasıyla ve en sıklıkla da kontamine yemlerin alınması ile olmaktadır. Bunun yanı sıra inhalasyon, konjuktival yol, derinin kontaminasyonu ve enfekte süt sağım kapları aracılığı ile hastalığın bulaşması mümkündür. Enfekte boğalardan alınan sperma ile de enfeksiyon oluşmaktadır. Enfeksiyonun oluşumunda hayvanın yaşı, gebelik durumu, kalıtsal direnci, etkenin dozu ve virulansı önemli olmaktadır (Hazıroğlu ve Milli 2001). Geviş getiren hayvanların plesenta ve amniyon sıvılarında karbonhidrat kaynağı olarak eritrol yapısında bir madde izole edilmiş olup, gebe hayvanların *Brucella*'ya duyarlı olmaları bu maddeye bağlanmaktadır (Baldwin 1996).

*Brucella spp.*ler vücuda girdikleri yerde lenf bezlerine ulaşırlar ve lenfanjitise neden olurlar. Lenf yumruları büyür, korteks kalınlaşır ve üzerinde irili ufaklı kanamalar şekillenir. Bu aşamadan sonra etkenler çoğunlukla kan yolu ile yayılmaktadır. Hastalık kronikleştiği takdirde, bakteriyemi kesintili olmakta ve hayvanların %5-10'unda yılda bir kere tekrarlamaktadır. Özellikle doğumda bakteriyemi nüks etmektedir. Tekrarlayan bakteriyemilerde etkenler erkeklerde lenfoid dokular, testis ve erkek eklenti bezlerine yerleşir. Dişilerde ise etkenler dalak, meme bezleri ve gebe uterusu yerleşmektedir. Enfekte inekler istisnasız olarak kolostrum ile *B. abortus*'u saçmaktadırlar (Hazıroğlu ve Milli 2001). Dolayısıyla yeni doğan buzağuların beslenmesinde kullanılan enfekte kolostrum aracılığı ile hastalık taşınabilmektedir (Young 2000). Çoğunlukla sığırlarda ve mandalarda görülen abortlara ek olarak etkenler metritis, retensiyo, zayıf buzağı doğumları ve düşük süt verimi gibi sorunlara neden olmaktadır (Blood ve ark 1989).

Hastalığın koyun ve keçilerdeki bulaşma şekli sığırlardakine benzer olup, çiftleşme ile bulaşma oldukça önemli rol oynamaktadır (Young 2000). Keçiler bakteriyeminin ilk günlerinde çok ağır hastalanabilmekte ve hatta ölebilmektedirler. Koyun Brusellozu ise daha az kronikleşmekte ve hastalığa ait semptomlar birkaç hafta veya ay içerisinde kendiliğinden iyileşebilmektedir. Koyun ve keçilerde ilk

belirti mastitis olmakla birlikte hayvanlarda genellikle gebeliğin son günlerinde abortus şekillenebilmektedir. Etkenler koyunlarda birkaç hafta, keçilerde ise aylarca ve hatta yıllarca süt ile dışarı atılmaktadır (Jubb ve ark 1991).

Köpeklerde görülen *B. canis* infeksiyonları ise, abort yapmış hayvanlar ve bunların akıntıları ile direkt olarak veya çevrenin ve gıdaların kontamine olması nedeniyle görülmektedir. Bununla birlikte köpeklerde Bruselloz infeksiyonunun bulaşmasında, keneler önemli rol oynamaktadır (Anonim 2006b).

## **1.6. Patogenez**

### **1.6.1. Enfeksiyonun Safhaları**

*Brucella*; sindirim, hasarlı deri, konjunktiva veya enfekte aerosollerin solunması gibi birçok yolla vücuda girdikten sonra üreme ilk olarak bölgesel lenf bezlerinde (mezenterik, aksiller, servikal veya supraklaviküler) başlar (Young 1995, Sözen 2002, Sümerkan 2002). Lenf yoluyla vücuda yayılabileceği gibi *Brucella* kan yoluyla da yayılabilir. Karaciğer, böbrek, dalak, merkezi sinir sistemi, kemik iliği, endokard ve akciğerler gibi vücuttaki her organda yerleşim gösterebilir. *Brucella*'lar polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinde onlarda tahrip edilmeden kalabilirler ve çoğalabilirler (Sözen 1996, Sümerkan 2002, Türkçapar ve Kurt 2002).

*Brucella spp.*'ler fagositik ve non-fagositik hücrelerin her ikisinde enfekte edebilirler. Bakteri hücre içerisinde çoğunlukla endoplazmik retikulumla yerleşmekte ancak mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır. Polimorfonükleer ve mononükleer lökositler içerisinde, S-LPS'e sahip *Brucella* bakterileri S-LPS'e sahip olmayanlara göre canlılıklarını daha kolay sürdürmektedirler (Corbel 1997, Türkçapar ve Kurt 2002). Makrofajlardan kaçınmak ya da onları baskılamak için; Adenin ve 5'-Guanin monofosfat (AMP, GMP) üretmeleri neticesinde, nötrofillerdeki myeloperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halojenür mekanizmasının ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) üretiminin baskılanması; makrofajların fagozom-lizozom füzyonunun engellenmesini sağlayan maddelerin salınımı ile nötrofil degranülasyonunun engellenmesi; Cu-Zn superoksit dismutaz enziminin salgılanmasıyla, nötrofillerdeki oksidatif antibakteriyel etkenin önlenmesi düşünülmektedir (Young 1995, Corbel 1997, Young 2000, Türkçapar ve Kurt 2002).

*Brucella*'larda S-LPS çok önemli bir virulans faktördür (Young 1995, Young 2000). Routh kolonilerde virulansite daha düşük ve insan serumu ile yok edilmeye oldukça hassastır. R-LPS'ye sahip *B. ovis* ve *B. canis* suşları; konakçı yanıtı oluşturmada diğer suşlara göre daha sınırlı ve konakçı seçiminde daha hassastır. Sığırdan fötüs tarafından sentezlenen ve bir karbonhidrat olan eritritol *B. abortus*'un uterusu yerleşmesinin nedenidir. Diğer canlı türlerinde bu karbonhidratın üretimi az ya da yoktur (Young 1995, Young 2000). *Brucella spp.* türleri arasında ki farklar oluşan konakçı yanıtının değişmesine neden olmaktadır. *B. suis* ve *B. melitensis* doku abselerine neden olurken *B. abortus* granülomu indüklemektedir (Young 1995, Sözen 1996). *B. suis* ve *B. melitensis* insanlar için *B. canis* ve *B. abortus*'dan daha virulansdırlar (Young 1995).

### 1.6.2. İmmün Cevap

Bruselloz vakalarında hücrel ve humoral immün yanıtın her ikisi de görülür (Young 1995, Sümerkan 2002). Ancak savunmada ana mekanizması hücrel bağışıklıktır (Young 1995, Ficht ve ark 1996). Protein yapısındaki antijen makrofajların uyarılarak T-hücrelerini aktive etmesini sağlar. Uyarılan lenfositler lenfokin (IFN-. ve TNF-. gibi) salgılanmasını böylece makrofajların aktive olmasını ancak diğer taraftan da bakterilerin öldürme yeteneğinin artmasını sağlarlar (Young 1995, Türkçapar ve Kurt 2002). Hücrel immünitinin uyarılmasını takiben, antijenlere karşı gelişen geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu sayesinde oluşan granümatöz lezyonların enfeksiyonun sınırlanmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Young 1995).

Humoral bağışıklık tekrarlayan enfeksiyona karşı korunmada etkilidir (Young 1995). Antikorlar LPS'ye karşı gelişerek bakterinin kolay bir şekilde fagozite olmasını sağlar (Young 1995, Türkçapar ve Kurt 2002). Enfeksiyonun ilk safhalarında IgM sınıfı antikorlar saptanmaktadır. Enfeksiyonun ikinci haftasından sonra ise IgG'ler artmaya başlar (Young 1995, Young 2000, Sümerkan 2002). IgG sınıfı antikorlar tedavi edilmeyen olgularda en az bir yıl yüksek kalır. Tedaviye yanıt veren olgularda ise tedavi başlangıcından itibaren altıncı aya doğru oldukça azalır. Vakaların bir kısmında düşük titredeki IgM seviyesi aktif reaksiyon olmaksızın yıllarca devam eder. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde IgG seviyesinin gösterge olabileceği düşünülmektedir. IgG seviyesinde hasta bireylerdeki ani yükselişin nüks

ya da yeni enfeksiyon kaynaklı olabileceği gözardı edilmemelidir (Young 1991, Young 1995, Young 2000, Sözen 2002, Sümerkan 2002). Tekrarlayan enfeksiyonların, konakçı immün yanıt ve bakteri virulans seviyesi arasındaki denge ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Türkçapar ve Kurt 2002).

## **1.7. Klinik Bulgular**

### **1.7.1. İnsanlarda Klinik Bulgular**

Hastalık başlangıçta genel enfeksiyon belirtileri veya sepsis gibi standart belirtiler sergilerken, ileriki dönemlerde bakterinin farklı organ tutulumları sonucu spesifik belirtiler ve komplikasyonlar sergileyen sistemik bir enfeksiyon hastalığıdır (Badur 1990, Sözen 2002, Hatipoğlu 2005). Hastalığın klinik belirtileri bu yüzden oldukça değişkendir (Mayc ve Weyant 2003). Vakalarda inkübasyon periyodu sonrasında gece yükselen ateş, titreme, gece terlemeleri, baş ağrısı, halsizlik, kas ve eklem ağrıları, kilo kaybı gibi nonspesifik yakınmalar ortaya çıkar (Young 1995, Young 2000, Türkçapar ve Kurt 2002). Brusellozda klinik seyir olarak subklinik, akut (8 haftadan kısa), subakut (8-52 hafta) ve kronik (52 haftadan uzun) bir gidişat gözlenmektedir (Sümerkan 2002, Türkçapar ve Kurt 2002).

*Brucella* enfeksiyonları, sistemik belirtiler göstermeksizin spesifik organ tutulumları gösterebilir. Enfeksiyon bütün organlarda tutulum ve komplikasyon oluşturabilir (Young 1991). Spondilit (Tanakol ve ark 1990), menenjit (Aygen ve ark 1995), pnömoni, ampiyem, peritonit, hepatik granülom, epididimit (Serter ve ark 2000), orşit (Serter ve ark 2000, Cesur ve ark 2002), prostatit (Şenel 2004), endokardit (Yavuz ve ark. 1991, Aygen ve ark 1995, Özsoy ve ark 2005), eritema nodozum tarzı deri döküntüleri (Sırmatel ve ark 1993), anemi (Başak ve ark 1997), troidit (Serter ve ark 2000), nörobruselloz (Heper 2004) gibi tutulan organlara yönelik komplikasyonlar görülür (Young 1995, Sözen 2002, Türkçapar ve Kurt 2002). Bruselloza bağlı ölüm nedenlerinin başında endokarditler yer almaktadır (Young 1995, Türkçapar ve Kurt 2002, Özsoy ve ark 2005). Türkiye’de hastalık çoğunlukla yüksek ateş, artrit ve meningoensefalit tabloları ile ortaya çıkmaktadır (Sırmatel ve ark 1993).

Erkek vakalarda infertiliteye neden olabilirken, kadın vakalarda plasentadan eritritol üretimi olmaması nedeni ile abortus oluşmaz. Şekillenen düşüklerin bakteriyemi nedeni ile oluştuğu düşünülmektedir (Young 2006).

### **1.7.2. Hayvanlarda Klinik Bulgular**

Brusellosis'de inkübasyon süresi oldukça değişkendir. Mikroorganizmaların giriş yolu ve bakteri sayısına göre süre 10 gün ile 250 gün arasında değişmektedir (Arda ve ark 1997). Koyun ve keçilerde atık gebeliğin son iki ayında meydana gelir (Buxton ve Fraser 1977, Garrido-Abellan ve ark 2001). Enfekte hayvanlarda başlıca klinik bulgular yavru atma, kısırılık, mastitis, genel düşünlük, zayıflama, bronşit, artritis, topallık, higroma ve orşitistir. Plasentanın içeride kalmasıyla oluşan metrit olaylarına da sıkça rastlanılır. Etken abortusta önce süt ve idrarla, sonra ise uterus akıntıları ile etrafa saçılır (Arda ve ark 1997, Garin-Bastuji ve ark 1998).

Sağlam bir sürünün *B. melitensis* ile enfekte olmasından sonra sürüde atık olayları çok fazladır, enfeksiyon şiddetlidir. Sürüde daha sonraki enfeksiyonlarda daha az atık görülür. Abort yapan hayvanlar ender olarak iki ve üçüncü kez yavru atarlar (Buxton ve Fraser 1977, Arda ve ark 1997). Koyunlarda enfeksiyon süresi keçilere oranla daha kısadır (Arda ve ark 1997).

Nekropside, annenin lenf bezlerinde ve bazı organlarında (meme ve uterus gibi) granülamatöz yangı lezyonları görülebilmektedir fakat bunlar Brusellosis için patognomik değildir (Manthei 1968, Garrido-Abellan ve ark 2001). Uterusta, seroprulent yangı, nekrotik endometritis, kotiledonlar arası bölgede kokusuz bir eksudat bulunur. Placenta, 2-5 cm kadar kalınlaşmıştır ve fibrinli bir irinle örtülmüştür. Kotiledonlar arası bölge kalınlaşmış ve deri görünümündedir. Kotiledonlar normale göre daha sert ve büyük olup, üzerlerinde yapışkan kahverengimsi bir eksudat vardır. Fötal membranlar ödemlidir ve üzerinde yer yer fibrinöz ve purulent lekeler bulunur (Buxton ve Fraser 1977, Arda ve ark 1997).

Aborte fetusta deri altı ödemleri, vücut boşluklarında kanlı bir sıvı birikimi, bazen fibrin yumakları gözlenir. Fetüsün bağırsak dokusunda iltihaplar bulunur ve içerisinde koyu sarı renkli bir sıvı yer almaktadır. Abomazum içeriği limon sarısı rengindedir. Splenomegali ve lenfadenopati görülür, dalak ve lenf bezlerinde nekroz odakları bulundurulur. Vücudun çeşitli yerlerinde kanama odakları ve karaciğerde



nekroz odakları görülebilir. Bazı olgularda yeni doğmuş kuzu veya aborte fetusun akciğerinde enfeksiyona bağlı pneumoni odaklarına rastlanabilir. Bazen de karakteristik şekilde fetusun tırnak duvarında kalsifiye plaklar görülebilir (Arda ve ark 1997).

### **1.8. Teşhis**

Enfeksiyonun teşhisinde klinik belirtiler oldukça yetersizdir. Kesin tanıda, bakteriyolojik kültür gibi direkt yöntemlerin yanısıra serolojik ve alerjik testler gibi indirekt yöntemlerde kullanılmaktadır. Ancak kültürdeki zorluklar ve kontaminasyon riski nedeni ile genellikle serolojik testler de kullanılmaktadır (Erganiş ve ark 1992, Arda ve ark 1997).

Genel olarak tanıda iki ana yol izlenir:

a) İndirekt Tanı : Serolojik Yöntemler

b) Direkt Tan : Kültür, Moleküler Yöntemler

Brusellozun laboratuvar tanısı için muayene maddesi olarak kan kullanılır. Bruselloz şüphesinde kan kültürleri birkaç kez tekrarlanmalıdır. Enfekte dokulardan apse içeriklerinden, kemik iliğinden, karaciğer biyopsisi ile elde edilen materyalden de kültür yapılabilir. Daha seyrek olarak BOS, plevra ve periton sıvısı, eklem sıvısı ve idrar gibi örnekler de Brucella kültürü için kullanılabilir. Kültür için, triptik soy buyyon, triptik soy agar, tiyonin triptoz agar, triptoz agar, serum veya % 5 koyun kanı ilave edilmiş agar besiyeri, Brucella agar, tripticase agar, serumlu patatesli infüzyon agar, serumlu dekstroz agar kullanılır. Ayrıca Kuzdas ve Morse tarafından geliştirilmiş olan basitrasin, polimiksin B, sikloheksimid ve sirkülin içeren özel besiyeri; basitrasin, polimiksin B, nalidiksik asit, vankomisin, sikloheksimid ve nistatin içeren Farrell's selektif besiyeri ve modifiye Thayer-Martin besiyeri kullanılabilir (Gürler 1990, Wilfert 1992). Kan kültürleri 35-37°C'de en az altı hafta inkübe edilmelidir. Mikroorganizmalar kan kültür vasatlarında herhangi bir gözle görünür belirti yapmaksızın bulunabilirler. Bu nedenle kan kültürlerinden en iyi sonucu alabilmek için, haftalık olarak Brucella broth'a körlemesine pasajlar (subkültürler) yapılması tavsiye edilir. Bu tekrarlanan subkültürler boyunca muhtemel kontaminasyonu önlemek için Castaneda tipi bifazik kan kültür şişelerinin

kullanılması tercih edilir. *Brucella* cinsindeki bakteriler kural olarak, sadece hastalığın akut safhasında veya nükslerde izole edilebilirler (Wilfert 1992).

### **1.8.1. İndirekt Tanı Yöntemleri**

İnsandaki akut enfeksiyonda önce IgM yükselir ve ilk hafta süresince tespit edilebilen tek immunglobulin olabilir. IgM hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 ay sonra en yüksek düzeye ulaşır ve sonra düşmeye başlar. IgG seviyesi hastalığın 2. haftasında yükselmeye başlar ve tedavi edilmemiş hastalarda en az bir yıl yüksek kalır. Yeterli derecede tedavi edilmiş hastalarda IgG antikorları, hastalığın başlangıcından 6 ay sonra ya kaybolur ya da çok düşük seviyelere iner (Mikolich ve Boyce 1990, Wilfert 1992, Bilgehan 2000). IgG antikor titrelerinin sürekli yüksek kalması RES'de veya diğer enfeksiyon odaklarında canlı hücre içi organizmaların varlığına bağlı olabilir. Fakat ileri çalışmalarla bu teoriyi desteklemeye ihtiyaç vardır. IgA antikor seviyeleri IgG'den haftalar sonra tespit edilebilir düzeye gelir fakat hiçbir tanı değeri yoktur. Hastalığın reenfeksiyonu ya da reaktivasyonu süresince IgG ve muhtemelen IgM antikorları yükselir bununla birlikte *Brucella* nükslerinde yüksek hale gelen IgM antikorlarının seviyesi tartışmalıdır ve son çalışmalarda *Brucella* reenfeksiyonlu hastalarda IgG'nin yükseldiği fakat IgM'in yükselmediği bulunmuştur (Mikolich ve Boyce 1990).

Tüm enfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında olduğu gibi, brusellozun etiyolojik tanısında da doğal olarak ilk başvurulması gereken yöntem, bakteriyolojik kültür yöntemidir. Fakat örneklerin enfeksiyonun belirli dönemlerinde alınması gerekliliği, ateşsiz dönemlerde kültür alınması ya da kandaki bakteri sayısının düşük olması, hastanın antibiyotik kullanması gibi durumlarda etkenin izolasyon şansının çok azalması, özellikle kronik vakalarda kültür işleminin zorlukları ve kültür işlemi sırasında oluşabilecek kontaminasyon riskleri gibi nedenlerden ötürü, bruselloz tanısında indirek etiyolojik tanı tekniklerine daha sık başvurulmaktadır (Bumin 1977, Badur 1990, Bilgin ve Gün 1991, Göktaş ve ark 1991).

Laboratuvarlarda en yaygın uygulanan serolojik testlerin başında;

- 1) Rose Bengal Lam Aglütinasyon Testi
- 2) Standart Tüp Aglütinasyonu (STA, Wright)
- 3) Flouresan Antikor Testi (FA)
- 4) Coombs Reaktifi İle Yapılan TA
- 5) Kompleman Birleşmesi Deneyi
- 6) ELISA
- 7) Merkaptotanol/Rivanol TA
- 8) İndirek Hemaglütinasyon Deneyi
- 9) Deri Deneyleri

#### **1.8.1.1. Standart Tüp Aglütinasyon Testi (STA, Wright aglütinasyon testi)**

Bu testte hasta serumu bir dizi tüpte, en az 1/640 oranında sulandırılıp, üzerine eşit miktarda standart *Brucella* antijeni (*B. abortus* S 99 ve *B. abortus* 1119 ) ilave edilir. İnkübasyonu takiben (2 saat 37 °C ve bir gece oda ısısı), tüpteki sıvının tamamen berrak olması, aglütinasyonun tüpün dibinde yaygın bir kümeleşme şeklinde görülmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilir. 1/40 ve yukarı sulandırmalardaki aglütinasyon olayı tanı için gereklidir; 1/160 sulandırmadaki pozitiflik ise kesin olarak brusellozun göstergesidir (Mikolich ve Boyce 1990, Badur 1990). Saptanan antikorların hangi sınıftan olduklarının belirlenememesi, düşük titrede alınan pozitiflikleri yorumlamadaki güçlükler ve bu test ile saptanan titrenin zaman içinde süratle azalması, STA'nın olumsuz özellikleridir (Bumin 1977, Mikolich ve Boyce 1990, Badur 1990, Bilgin ve Gün 1991, Göktaş ve ark 1991). STA'nın değişik yapıdaki blokan antikorlar nedeniyle negatif sonuç verdiği ya da bruselloz dışında bir nedenle IgM antikor yüksek olan kişilerde yanlış olarak pozitif bulunduğu olgular da vardır. Ancak bu olumsuz özelliklerine rağmen bugün tüm dünyada ve ülkemizde hemen hemen bütün sağlık kuruluşlarında, brusellozun serolojik tanısında en yaygın kullanılan testtir. Bunun nedenleri arasında testin

uygulama kolaylığı, erken pozitifleşmesi ve bu deneyde antijenlerin her üç tipe karşı oluşmuş antikorlar tarafından aglütine edilebilmesi sayılabilir (Bumin 1977, Göktaş 1990, Göktaş ve ark 1991).

#### **1.8.1.2. Rose-Bengal Lam Aglütinasyon Testi (RBLA)**

Aglütinasyon testi *B. abortus*'un 99 S kökeninden hazırlanan ve özel teknikle, tamponlu tuzlu sudaki yoğun *Brucella* antijenlerinin Rose-Bengal boyası ile boyanıp kullanılarak, lam aglütinasyonu şeklinde de uygulanabilir. Antijen süspansiyonunda kullanılan tamponun pH'ı 3.6-3.7'ye ayarlanmalıdır böylece serum IgM aktivitesi önlenmiş olur. Bu testle saptanan antikorların büyük bölümü IgG yapısındadır. Aglütinasyon testinin serum yerine tam kan ile (parmak ucundan bir damla) uygulanan şekli Spot Test olarak isimlendirilir ve özellikle kitle taramalarında tercih edilir (Badur 1990, Bilgehan 2000).

STA'da 1/40 ve üzeri dilüsyonlarda görülen aglütinasyon reaksiyonları pozitif kabul edilerek, RBLA'a sonuçları ile karşılaştırıldığında, RBLA'nın STA'ya göre duyarlılığı %92.6, seçiciliği de %97.1 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre serolojik olarak pozitif ve negatif kişileri saptama açısından iki test arasında önemli bir fark olmadığı, bruselloz serolojik tanısında RBLA'nın, STA kadar güvenilir ve geçerli bir test olduğu kanısına varılmıştır (Bumin 1977).

Göktaş ve ark (1991), 1200 serum örneği, RBLA ve STA testleri ayrı ayrı çalışmış, her iki testte de 98 olgu pozitif olarak değerlendirilmiştir. RBLA ile 5 olguda daha zayıf pozitif sonuç alınmış, bu olgular STA ile negatif olarak bulunmuştur. Sonuçların değerlendirilmesinde RBLA'nın STA'ya göre daha çabuk sonuç veren, kolay, ucuz ve aynı zamanda güvenilir bir yöntem ve tarama testi sonuçlarına uygun olduğu, bu test ile pozitif sonuç alınan olgularda, STA ile titre belirlenmesi yapılmasının uygun olacağı görüşüne varılmıştır (Göktaş ve ark 1991).

RBLA, STA'dan daha duyarlı bulunmakla birlikte, bu araştırmacılar ELİSA yönteminin bu her iki testten de daha duyarlı olduğunu saptamışlardır (Saz ve ark 1987).

#### **1.8.1.3. Coombs Reaktifi İle Yapılan TA**

Bazı serumlar spesifik *Brucella* antikorları içermelerine rağmen, aglütinasyon meydana gelmez. Bu serumlar blokan antikorlar bakımından araştırılmalıdır. Bu

antikorlar daha çok subakut klinik olgularda oluşurlar ve IgG yapısındadırlar (Badur 1990, Bilgehan 2000). Bu antikorlar tarafından bloke edilen inkomple antikorların, anti-insan globülini (Coombs reaktifi) kullanılarak, antijenle reaksiyon vermeleri sağlanabilir. Bu amaçla, klasik STA uygulamasında aglütinasyon görülmeyen tüpler santrifüjde çevrilir; üç kez yıkanan çökeltide, Coombs reaktifi ilavesi sonucu aglütinasyon olup, olmadığına bakılır. Ortamda blokan antikorlar olması durumunda, antijen-antikor birleşmesi olurken, aglütinasyon oluşmamaktadır. Testte kullanılan Coombs reaktifi, antikorların arasına köprü kurarak gerçek pozitifliği ortaya çıkarmaktadır. Test, düşük titredeki antikorları saptamada ya da negatif olarak değerlendirilen kronik vakaların belirlenmesinde önemlidir (Badur 1990).

#### **1.8.1.4. Merkaptotanol/Rivanol TA**

Klasik STA testinde saptanan immünglobülinlerin hangi sınıftan olduklarını belirlemek mümkün olmaz. Ancak deney öncesinde hasta serumu 2 merkaptotanol ya da rivanol ile muamele edilirse, IgM sınıfı antikor moleküllerinin polipeptit zincirleri kırılarak, bu moleküllerin yıkıma uğratılması mümkündür. Testi takiben belirlenen pozitiflik IgG'ye bağlı olarak gerçekleşecektir (Mikolich ve Boyce 1990, Badur 1990).

#### **1.8.1.5. Kompleman Birleşmesi Deneyi**

Bruselloz tanısında güvenilir bir test olan kompleman birleşmesi deneyinde özellikle IgG'ler, daha az oranda IgM'ler rol oynar. Bir süre sonra negatifleşen, bu nedenle geçirilmiş olguların belirlenmesinde yetersiz kalan bu test, STA ile sonuç alınamayan kronik brusellozun tanısı için uygundur. STA'da saptanan çapraz reaksiyonlar kompleman birleşmesi testi için de geçerlidir. Kompleman birleşmesi testi, makro veya mikro yöntem uyarınca, soğukta veya sıcakta gerçekleştirilebilir (Badur 1990, Bilgehan 1992).

#### **1.8.1.6. İndirek Hemaglütinasyon Testi**

Bakterinin LPS kısımları ile kaplı, tannik asitle muamele edilmiş koyun eritrositlerinin kullanıldığı bu testte, çözülmüş antijenlerden de yararlanılabilir. Çok duyarlı olan bu yöntemde, nanogram düzeyindeki immünglobülinleri bile saptamak mümkündür (Badur 1990).

### **1.8.1.7. Flouresan Antikor Testi (FA)**

Veterinerlik alanında f3tal membranlarda ve d3ş3k materyalinde antijen aramak için geliştirilmiş olan FA y3ntemi, daha sonra spesifik antikorların araştırılmasında indirek-FA şeklinde de kullanılmıştır (Badur 1990).

### **1.8.1.8. Deri Deneyleri**

Allerjik tanı için bakterilerden elde edilen ve saflaştırılmış n3kleoprotein kompleksinden oluşan “Brucellergen” deri içine enjekte edilir ve 24 saat içinde enjeksiyon yerinde kızartı, 3dem ve sertlik şeklinde g3r3len reaksiyon olumlu kabul edilir. Bu kişilerin *Brucella*’lara karşı aşırı duyarlı oldukları anlaşılır. Hastaların birçoğunda bu test olumlu ise de olumsuz olması bruselloz tanısını uzaklaştırmaz. Ayrıca kısıtlı kullanım alanı olan bu test ile kronik vakaların belirlenmesi oldukça zordur (Badur 1990, Bilgehan 2000).

Belirtilen bu tanı tekniklerinin akut ve kronik bruselloz olgularındaki sonuçları farklı olmaktadır. 3rneğın; STA deneyi akut olgularda pozitif sonuç verirken, sadece IgG’lerin belirlendiği 2 merkaptetanoll3 TA negatif sonuç vermekte; zamanla STA titresi azalırken, merkaptetanol ile saptanan titre artış g3stermektedir. Diğer yandan uygulama koşulları nedeniyle, bruselloz tanısında kullanılan kompleman birleşmesi testinde IgM’ler saptanamaz ve bu test infeksiyonun erken d3nemlerinde negatif sonuç verebilir (Badur 1990).

### **1.8.1.9. ELISA ve RIA**

RIA ve ELISA bruselloz tanısında g3n3m3zde sık olarak kullanılmaya başlanmıştır. ELISA uygulamalarında STA için hazırlanmış 3l3 bakteri s3spansiyonu, LPS ekstreleri veya çeşitli protein fraksiyonlarından antijen olarak yararlanılabilir. Teknik akut vakaları belirlemede en g3venilir y3ntemdir. Test kronik vakaların belirlenmesinde de STA ve RBLA’dan daha g3venilirdir (Hewitt ve ark 1984, Nielsen ve ark 1988, Barbudde ve ark 1994, Kittelberger ve ark 1994). Brusellozun serolojik tanısında, ELISA, STA ve RBLA’larının karşılaştırılması yapılmış, hem IgG, hem de IgM için yapılan ELISA testlerinin STA ve RBLA’dan daha duyarlı olduğunu ve insan brusellozunun serolojik tanısında, STA ve RBLA’da

görülen yetersizliklerin ELISA ile giderilebileceğini bildirmişlerdir (Bilgin ve Gün 1991).

Nörobrusellozda BOS'daki antikoları saptamak için ELISA testi uygundur. ELISA ile spesifik IgG ve IgM'lerin birlikte incelenmesinin ve elde edilecek sonuçların kompleman birleşmesi deneyi bulguları ile beraber yorumlanmasının en sağlıklı tanı yöntemi olduğunu ileri sürmektedirler (Badur 1990).

Bruselloz tanısındaki önemli bir gelişme de, çeşitli vücut sıvılarında ELISA ile direk antijen aranması ile ilgili olup, farelerde yapılan ön çalışmalarda başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Sonuç olarak ELISA, bruselloz tanısı için, duyarlı, özgül, süratli ve rutin laboratuvarlar için çok sayıda örneğin bir arada incelenmesine olanak tanıyan bir tekniktir (Nielsen ve ark 1988, Badur 1990, Bilgin ve Gün 1991).

Immünradyolojik metodlarda *Brucella* spesifik immunglobülinlerinin tek tek direk ölçülmesini sağlayıp, şüphede kalınan olgularda doktora yeterli miktarda bilgi verirler. Ayrıca bu metodla konvansiyonel serolojik tekniklerle elde edilemeyen, immünolojik cevap görünümleri de elde edilebilir (Hewitt ve Dayne 1984).

*B. ovis* hücrelerinden ekstrakte edilen antijen esasına dayalı basitleştirilmiş elektroforetik immunoblotting tekniği, koyunlarda, kompleman birleşmesi testi, ELISA ve jel difüzyon testi ile karşılaştırılmış, bu testin standart testlere benzer duyarlılık ve özgüllük gösterdiği belirlenmiştir (Kittelberger ve ark 1994).

## **1.8.2. Direkt Tanı Yöntemleri**

### **1.8.2.1. Bakteriyoskopi**

İnsanlarda karaciğer biopsisi, kemik iliği ve BOS örneklerinde; hayvanlarda atık materyali, fötal mide içeriği, fötal karaciğer, fötal akciğer, kotiledon, vaginal akıntı veya plasenta örneklerinden hazırlanmış sürme ve tuşe preparatlar Modifiye Ziehl-Neelsen (Stamp) veya Köster yöntemleri kullanılarak boyanmalı ve mikroskopik muayeneye *Brucella* morfolojisine sahip mikroorganizmalar aranmalıdır. Boyama sonrasında bakteriler mavi zemin üzerinde kırmızı renkte gözlenirler (Buxton ve Fraser 1977, Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997, Castrucci 2000, Quinn ve ark 2002). *Chlamydophila abortus* veya *Coxiella burnetti* gibi bakteriyel etkenler ile karışabileceğinden sonuç kültür yöntemi ile doğrulanmalıdır.

Süt ve süt ürünlerinde bakteriyoskopi yöntemi genelde doğru sonuç vermeyebilir (Alton ve ark 1988, Garin-Bastuji ve ark 1998, Garin-Bastuji ve ark 2005).

### 1.8.2.2. Kültür

*Brucella*'ların izolasyonunda, koloni morfolojisinin incelenmesine elverişli olduğu ve kontaminantların üremesini sınırladığı için genellikle katı besiyerleri kullanılmaktadır. Az miktarda etken içeren ya da miktar olarak fazla büyük olan örneklerin incelenmesinde sıvı besiyeri kullanılır. *Brucella* kültürü enfekte doku materyali veya kan ve kemik iliği ile yapılabilir. Akut vakalarda kan kültür yöntemleri tercih edilmelidir. Otomatize kan kültür yöntemleri ile 7 gün içerisinde üreme yakalanabilmektedir. Hastada kan alım öncesi antibiyotik kullanımı sonucu olumsuz yönde etkiler. Bakteriyemi vakaların hepsinde şekillenmeyebilir bu nedenle üreme yakalanamayabilir. Kültür yöntemleri ile yakalanamayan vakalar için serolojik yöntemler tanıda oldukça önem arz eder (Arda ve ark 1997).

*Brucella* kültürü, hastalığın evresi, tedavi uygulanmış olması, uygulanan protokol (örnek türü, sayısı, miktarı), kullanılan besiyeri, bakterinin virulansı gibi birçok etkenden etkilenebilir. Kemik iliğinde üreme şansı oldukça fazladır. Fakat işlemin zorlukları, kan kültürü tanısal kolaylığı, serolojik tanı olanaklarının varlığı yöntemin kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Kemik iliği kültürü; kronik Bruselloz vakalarında, kan kültürünün ve serolojik yöntemlerinin negatif olduğu tanı konulamamış vakalarda, nüks vakalarda, nedensiz ateş olgularında, açıklanamayan artrit ve hematolojik anomalilerde yapılmalıdır (Alton ve ark 1988).

Fakültatif hücre içi paraziti olan *Brucella* bakterilerinin kültürden izolasyonu 5-7 gün arasında bir zamanı gerektirmektedir. Rutin kültürler bir hafta boyunca takip edilerek süre sonunda üreme saptanmaması halinde negatif sonuçlar bildirilmelidir. Bu bakterilerin optimal ısı gereksinimleri 35°C dolaylarındadır. Özellikle *B. abortus*'un ilk izolasyonunda %10 CO<sub>2</sub> içeren atmosferik koşulların tercih edilmesi uygundur. Steril olmayan vücut bölgelerinden alınan örneklerin kültürünün, kontamine flora bakterilerinin üremesini engellemek için seçici besi yerlerinde yapılması uygun olmaktadır. Et ekstresi, triptoz, glikoz tuz içeren ortamlarda birçok türünün izole edilebilmesine rağmen birçoğu da tiamin, niasin, nikotinik asit, biotin ve serum gibi maddelerin varlığında üreyebilmektedir. *Brucella*'ların üretiminde, %5



koyun kanlı agar, triptoz agar, triptikaz soy agar, serumlu dekstroz agar, gliserol dekstroz agar ve kan kültürü şişeleri kullanılan besi yerleridir (Baysal 1999). Spesifik olmayan, bifazik Castaneda besiyeri, kan ve diğer vücut sıvıları ya da süttten *Brucella* izolasyonunda tercih edilmektedir. Tüm temel ortamlar *Brucella* bakterilerinin dışındaki organizmaların üremesini engellemek için antibiyotik ilave edilerek seçici hale getirilebilir. Bu amaçla, belirli oranlarda polimiksin B, basitrasin, sikloheksimid, nalidiksik asit, nistatin, vankomisin içeren antimikrobik komplekslerinin kullanılması uygun olmaktadır (Marin ve ark 1996).

*Brucella* türlerinin direk izolasyonu ve kültürü için genellikle katı besiyerleri tercih edilmektedir. Katı besiyerlerinin en önemli avantajlarından birisi gelişen bakteri kolonilerinin morfolojisinin incelenmesi ile tanıya katkı sağlamasıdır. Katı yüzeylerde elde edilmiş kolonileri 1-2 mm çapında, hemolitik olmayan, şebnem tanesine benzer saydam, küçük, kabarık, S tipi kolonilerdir. Yavaş üreyen bakterinin kolonileri 48 saat sonra gözle görülebilir büyüklüğe erişmektedir. Koloniler eskidikçe çapları büyür ve matlaşır. Gram boyamada çok küçük, zayıf boyanan Gram olumsuz kokobasiller şeklinde gözlenir. Gram morfolojisi *Francisella tularensis* ile benzerlik gösterir. Kolonilerine uygulanan oksidaz ve katalaz testlerinden pozitif sonuç alınır. Hareketsiz olan organizmalar nitrat redüksiyonu yapar. Cristian'ın üre agarında *B. suis* için bir saat, *B. abortus* ve *B. melitensis* için 24 saat içerisinde üreaz aktivitesi olumlu olarak saptanır.

Bruselloz nedeni ile ortaya çıkan ateşin ikinci gününden sonra kan kültürlerinden olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Olumlu sonuç elde edebilmek için farklı zamanlarda alınan birden fazla kan kültürünün yapılması uygundur (Baysal 1999). Yapılan kültürlerden alınan pozitif sonuçların oranı yöreden yöreye ve laboratuvaradan laboratuvara oldukça değişmektedir.

Kan kültürleri sadece sıvı ortamlarda (buyyon kültürü) ya da bifazik ortamlarda yapılabilir. Buyyonda yapılan kan kültürleri bir ay inkübe edilerek *Brucella* bakterilerinin izolasyon şansının artırılması amaçlanır. Castaneda tarafından geliştirilen aynı kan kültürü şişesinde sıvı ve katı besiyeri içeren bifazik ortamlarda da kültür yapılır. Besi yerine kan örneği eklendikten sonra, katı ortam üzerine sıvı besi yerinin geçmesini sağlayacak şekilde şişe eğdirilerek kanın besi yerine yayılması sağlanır. Şişe dik pozisyonda etüvde inkübe edilir ve üç gün

boyunca her gün incelenir. Katı kısımda koloni oluşumu halinde alt kültürler yapılır. Eğer koloni oluşmamışsa yine üç gün boyunca inkübasyona tabi tutularak yeniden incelenir. Bu yöntemle kültür genellikle bir hafta içinde pozitif sonuç verir, 15 günden sonra pozitif sonuç almak nadirdir. Ancak olumsuz sonuçlar 21 günlük inkübasyondan sonra rapor edilmelidir. Bakterilerin izolasyon süresini kısaltmak amacıyla “liziz konsantrasyon yöntemi” uygulanmaktadır. Bu yöntemde ozmotik basınçla kan hücreleri lize edilerek hücre içi bakterilerin açığa çıkması sağlanır. Santifüj ile yoğunlaştırılan bakteri süspansiyonu agar içeren besi yerlerine ekilir. *Brucella* bakterilerinin izolasyonunda kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla ticari otomatik kan kültürü sistemlerinden de yararlanılmaktadır (Young 2000).

*Brucella* bakterilerinin fagositoz hücreleri içerisinde yaşamaları ve retiküloendotelial sistemde lokalize olması nedeniyle kemik iliği, karaciğer ve lenf nodüllerinden izolasyonları daha kolay olmaktadır. Brusellozlu olguların kan kültürlerinden izole edilemeyen bakterilerin, kemik iliği kültürlerinden %20 oranında izole edildiği bildirilmektedir. Bu değerlerin istatistiksel olarak önemli olduğu yazılmaktadır. Kemik iliği kültürlerinden pozitif sonuç alma süresi kan kültürüne oranla daha kısa olmaktadır. Bakterilerin kültürden izolasyonunu sınırlayan en önemli faktörlerin başında antibiyotik kullanımı gelmekte, antibiyotik kullananlarda kan kültürlerinden önemli ölçüde hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Antibiyotik kullananlardan kemik iliği kültürlerinin yapılması durumunda daha olumlu sonuçların alındığı bildirilmektedir. Bu nedenle, bruselloz kuşkusu olan olgulardan kan kültürü negatifliği durumunda kemik iliği kültürünün yapılması önerilmektedir (Young 2000).

### **1.8.2.3. İdentifikasyon ve tiplendirme**

*B. abortus* ve *B. ovis* ilk izolasyonda %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortama gereksinim gösterirken, *B. melitensis* CO<sub>2</sub> 'li atmosfer gereksinimi göstermez. Koloniler ekimi takiben yaklaşık 2 gün inkübasyon sonrası gözle görünebilir büyüklüğe ulaşır. Fakat kültür negatif denebilmesi için 8 ila 10 gün inkübasyon süresi geçmelidir. İnkübasyonda dördüncü günü takiben, 1-2 mm çapına ulaşan koloniler şebnem tanesi görünümündedir. Birkaç defa tekrarlına pasajlar sonrası veya bekletilen kolonil koyu bir renk alır ve büyür. (Buxton ve Fraser 1977, Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997).

Ekimi takiben oluşan kolonilere Gram boyama metodu (veya Stamp yöntemi) uygulanmalıdır. Boyamada Gram negatif kokobasil olarak değerlendirilen numunelere ait kolonilerden anti-Brucella poliklonal serumuyla lam aglütinasyon testi yapılmalı, pozitif sonuçlar *Brucella* olarak değerlendirilmelidir (Alton ve ark 1988). Tür düzeyinde identifikasyon için katalaz, üreaz, sitrat, oksidaz, nitrat indirgeme, Voges Proskauer ve indol kimyasal testleri uygulanmalıdır. (Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997, Garrido-Abellan ve ark 2001).

Kültürdeki routh koloni oluşumu bakterinin antijen yapısı ve virülansını etkilemektedir. Bu nedenle aşı üretimi gibi antijen kullanılması gereken durumlarda smooth koloniler tercih edilmelidirler. Rough koloni yapısında ki kültürler, monospesifik serum ve *S-Brucella* faj tiplendirmelerinde kesinlikle kullanılmamalı smooth koloniler tercih edilmelidir. Koloni morfolojisi belirlemede birçok yöntem kullanılabilir. İlk olarak Henry (1933) tarafından kullanılan yöntem, kolonilerin 45 °C'lik açı ile oblik ışık altında stereoskopik mikroskop ile incelenmesine dayanır. Smooth koloniler mavi-yeşil röfle verir, routh koloniler ise mat sarı renkli görünür. Bir başka yöntem ise, kolonilerin % 0.01'lik nötral akriflavin ile muamele edilmesine dayanır. Smooth koloni yapıları homojen şekilde süspanse görünürken, routh koloniler aglütine olur. Kolonilerin Kristal violet ile boyandığı metotda ise, smooth koloni boya almaz iken non-smooth koloni kırmızı bir renge dönüşür ve yüzeydeki çatlak yapı el merceğiyle tesbit edilebilir (Alton ve ark 1988).

Biyovar düzeyindeki tiplendirmelerde *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* türleri 4 ana teste; H<sub>2</sub>S üretimi, CO<sub>2</sub> ihtiyacı, monospesifik A ve M antiserumları ile aglütinasyon ve boya (tiyonin ve bazik fuksin) duyarlılığı tabi tutulur (Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997, Garin-Bastuji ve ark 1998, Plommet ve ark 1998).

#### **1.8.2.4. Hayvan Deneyleri**

Hayvan deneylerinde kobay kullanılır. Saf halde üretilen kültür kobaya intraperitoneal, kontaminasyon ihtimali taşıyan marazi maddeler ise subgutan veya kas içi enjekte edilmelidir. İdrar ve süt santrifüj edilerek pelet fizyolojik tuzlu su ile sulandırılıp 0.2 ml kobaya intraperitoneal uygulanır. Amnion mai, sinovial sıvılar ile göğüs ve karın boşluğu sıvıları da bir misli FTS ile sulandırılıp 0.5 ml miktarında periton içine verilmelidir (Arda ve ark 1997).

Kobaylardan birisi 3 ve diğeri ise 6 hafta sonra öldürülür. Otopside; karaciğerde nekrotik odaklar, dalak ve lenf yumrularının büyümesi ile epididimitis görülür. Lezyonlu organlardan uygun besiyerlerine (serum dekstroz agar gibi) ekimler ve kesim öncesi alınan kanlar ile aglutinasyon yapılarak da sonuca varılabilir (Buxton ve Fraser 1977). *Brucella*'ların izolasyonunda ender olmakla birlikte 4-7 günlük embriyolu tavuk yumurtası da kullanılabilir (Arda ve ark 1997). Ayrıca canlı aşı suşlarının virülanslarının belirlenmesinde de deney hayvanları (fare) kullanılmaktadır (Alton ve ark 1988).

#### 1.8.2.5. Moleküler Yöntemler

PZR, bir DNA parçasının bilinen iki bölgesinin arasındaki kısmın enzimatik olarak çoğaltılması tekniğine dayalı in vitro bir tekniktir. Başlangıçta belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde edilebilirken, günümüzde PZR kullanılarak birkaç saat içerisinde tek bir gen bölgesinden milyarlarca kopya elde edilebilmektedir.

Brusellozun semptom ve bulguları tanıda spesifik olmadığı için kesin tanı *Brucella* bakterilerinin ya da nükleik asitlerinin izolasyonu ile ya da spesifik immün yanıtın kanıtlanması ile yapılır (Coppola 2001). Bruselloz tanısını daha güvenilir kılmak amacıyla PZR yöntemlerinden yararlanılmaktadır (Bricker 2002). İnsan brucellozunun tanısında PCR kullanımı kan kültürü yönteminden duyarlı ve serolojik yöntemlere nazaran daha spesifiktir (Navarro ve ark 2002). Brusellozlu olduğu klinik olarak tanımlanan olgularda geleneksel kültür yöntemleri ile PZR testi karşılaştırılmış ve PZR'in konvansiyonel kültürlerle göre çok daha fazla duyarlı ve hızlı olduğu, laboratuvarında çalışanları riske atmamak için bu testin kullanılmasının yerinde olacağı, brusellozun merkezi komplikasyonlarının tanısı için yararlı bir araç olacağı bildirilmektedir (Morata ve ark 2001).

PZR'de alt tiplendirmeler için BCS P31 geni (31kDA kodlayan), BP26 geni (26kDA periplasmik proteini kodlayan), 16 S rRNA geni kodlayan ve dış membran proteini kullanılmaktadır. PZR ile yaklaşık 700 cfu/mL bakteri saptanabilir. Duyarlılık-özellik % 98,3-100'dır. Değerlendirmede hastalığın tedavisini takiben 5 ay sonrası bile PCR pozitif olarak değerlendirilebilir.

Tanının doğruluğu brusellozun eradikasyon ve tedavi süreci açısından önemlidir. *Brucella spp.*'nin kültür ve tiplendirme aşamalarında çevresel

kontaminasyon ihtimalinin fazla olması, kültürdeki zaman kaybı ve maliyet yüksekliği tanıda kültür kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenlerle tanıda DNA tanılama testlerinin kullanımı özellikle zaman ve testin duyarlılığı açısından Bruselloz tanısında oldukça kullanışlıdır. Tanıda PZR kullanımı *brucella* genomlarındaki en sık tekrar bölgelerinin incelenerek belirlenmesi sonucunda hazırlanmıştır. *Brucella* türlerinde tekrar eden gen bölgeleri 6-17 arası değişiklik göstermektedir. Tanıda kullanılan diğer yöntemlere nazaran PZR oldukça spesifiktir. (Morata ve ark 2001).

### 1.9. Tedavi

*Brucella* türleri birçok in vitro ortamda antibiyotik duyarlılığı gösterir fakat tedavinin başarılı olabilmesi kombine, uzun süreli bir tedaviyle sağlanabilir (Sümerkan 2002, Eşel ve ark 2004). Brusellozda tedavinin şekli ve süresi, hasta yaşı, alerjik durumlar, gebelik, böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıkların tabloya eklenmesi gibi durumlara bağlı değişiklik gösterebilir (Solera ve ark 1997, Türkçapar ve Kurt 2002). Tedavide kullanılan antibiyotiklerin en az bir tanesinin makrofaj hücre duvarını geçerek, içerisine girebilen ve fagolizozomların asit ortamlarında etkili olabilen bir antibiyotik olması uygundur (Young 1995, Akova ve ark 1999, Turkmani ve ark 2006). Ancak asidik pH etkinliklerinin azalmasına neden olur (Kocagöz ve ark 2002).

Tedavide ilk olarak 45 gün doksisisiklin 2x100 mg ve streptomisin 14 gün 1x1 gr İM kullanılması uygundur. Streptomisin kullanılmayan hastalarda tedaviye gentamisin ya da netilmisin de ilk 7 gün 5-6mg/kg eklenebilir (Solera ve ark 1997, Türkçapar ve Kurt 2002). Doksisisiklin ve streptomisin kombinasyonu kullanılan hastalar nüksün en az görüldüğü vakalardır (Türkçapar ve Kurt 2002). İkinci seçenek kırbeş gün doksisisiklin 2x100 mg ve rifampisin 1x600-900 mg ikilisinin kullanılmasıdır (Solera ve ark 1997, Türkçapar ve Kurt 2002). Her iki tedavi yöntemini de “Centers for Disease Control and Prevention” önermektedir (Türkçapar ve Kurt 2002).

Tetrasiklin kullanımı gebe, çocuk ve emziren anneler için uygun değildir (Solera ve ark 1997, Türkçapar ve Kurt 2002). Streptomisinler ise gebelerde fetüde sinir hasarına neden olmasından dolayı kontraendikedir (Sözen 2002, Türkçapar ve Kurt 2002). Tedavi çocuklarda kırkbeş gün rifampisin ve kotrimaksazol veya

rifampisin ve gentamisin ikilileri şeklinde planlanmalıdır. Hamile ve emziren annelerde kırkbeş gün rifampisin tercih edilmelidir (Solera ve ark 1997). Hücreiçi geçişi iyi olan azitromisin gebelerde rifampisine ek olarak tercih edilebilir (Eşel ve ark 2004). Çocuklarda 8 yaş sonrası tedavi yetişkinlere göre düzenlenir (Türkçapar ve Kurt 2002).

Tetrasiklin grubunda yer alan doksisisiklinler; bakteride 30S'lik ribozomal bölgeye bağlanarak tRNA'nın, mRNA-ribozom kompleksine bağlanmasını engeller. Bu bağlanma peptid zincire yeni aminoasit eklenmesini engeller böylece bakteri protein sentezleyemez (Çokça 2002, Yao ve Moellering 2003).

Doksisisiklinlerin hücreiçerisine girişini lipofilik özelliği sağlamaktadır. Doksisisiklinler oral alındıklarında %90-95 oranında absorbe edilirler. Beyin omirilik sıvısına geçişi plazmadaki konsantrasyonuna göre %10 ya da daha azdır yani BOS miktarı yetersizdir. Tetrasiklin fetüse teratojeniktir ve emziren kadınlarda süte geçer, bu sebeple gebelik ve emzirme dönemlerinde kullanılmamalıdır (Çokça 2002, Parlak 2003). Tedavide doksisisiklinler streptomisin ya da rifampisinle birlikte kullanılmalıdır (Çokça 2002). Doksisisiklin kullanılmayacak ise Streptomisin tetrasiklinlerle kombine edilerek kullanılır (Willke 2003).

Streptomisinler aminoglikozidler grubundandır. Bakterinin protein sentezlemesini baskılar ya da mRNA'daki genetik kodun okunmasını engeller. Hızlı bakterisidal etkiye sahiptir (Willke 2003). Streptomisinler beta laktam antibiyotik grupları ile birlikte iyi çalıştıkları için tedavide çoğunlukla tercih edilirler. Bu grubun kimyasal yapıları stabildir ve geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Ayrıca allerjik yan etkileride oldukça azdır (Willke 2003). Sindirim sisteminden emilimleri oldukça düşüktür, bu nedenle kas içi uygulamaları gerekmektedir. Kas içi uygulamalarda 50 dakika içerisinde en yüksek plazma düzeyine kavuşur. BOS'da yeterli tedavi düzeyine ulaşamaz (Willke 2003).

Rifampisinler yarısentetik antibiyotiklerdir. Etkilerini DNA'ya bağımlı RNA polimerazını baskılayarak gösterirler, bakterisid etkilidirler. Bakterilerin bir kısmında ise bakterisidal etkilidirler. Oral kullanımlarda hastanın aç olması hızlı ve tam emilimini sağlar. Bütün vücut dokularında dağılımı iyidir (Erol 2003). Rifampisinler menenjit vakalarında BOS geçişi nedeni ile tedavide kullanılırlar (Erol 2003, Yao ve

Moellering 2003). Ancak emziren kadınlarda süte geçmesi nedeni ile tercih edilmezler (Erol 2003). Tedavide doksisisiklinlerle beraber altı hafta kullanılmaları önerilmektedir (Erol 2003).

Sefalosporinlerin 3. Kuşağında yer alan seftriakson, penisilin gibi bakteri hücre duvarında yer alan proteinlere bağlanarak peptidoglikan tabakanın üretilmesini engeller (Leblebicioğlu 2003, Yao ve Moellering 2003). Seftriaksonlar BOS, perikart, böbrek, sinovya, akciğer, periton ve plevral mayiye kolayca geçerler (Leblebicioğlu 2003, Eşel ve ark 2004). Kan serumu yarılanma ömrü sekiz saat kadar uzun bir süredir. Yenidoğan bebeklerde serum proteinleriyle bağlanmada bilirubinlerle yarışarak sarılık görülen bebeklerde kernikterus oluşturma ihtimali yüksektir, yenidoğanlarda tercih edilmemelidir (Leblebicioğlu 2003).

Kinolonlar DNA giraz enzimini baskılayarak bakterinin DNA rekombinasyonunu önleyen sentetik antibiyotiklerdir (Hussain 1989, Yao ve Moellering 2003, Willke 2003). Yüksek dozlarda RNA ve protein sentezini baskırlar (Willke 2003). Bu grup üyesi antibiyotikler makrofaj ve lökosit hücrelerinin içerisine iyi penetre olurlar, nötrofillerin içerisindeki konsantrasyonları serum konsantrasyonunun 14 katına kadar ulaşabilir. *Salmonella*, *Brucella*, *Listeria* ve *Mycobacterium* gibi hücre içi bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde oldukça kullanışlıdır (Rubinstein 1991, Garcia-Rodriguez ve ark 1995, Yao ve Moellering 2003). Geniş spektrumlu antibiyotikler olmaları, oral yolla rahatlıkla kullanılabilmeleri, doku içinde yüksek konsantrasyona ulaşabilmeleri ve hücre içi geçiş yeteneklerinin iyi olması nedeni ile hücre içi bakteri enfeksiyonlarında tedavide kullanışlıdır (Rubinstein 1991). Bruselloz tedavisinde ilk tercih antibiyotikler arasında yer almazlar (Garcia-Rodriguez ve ark 1995).

### **1.10. Brusellozda Korunma**

Brusellozdan korunmada ilk sırada konakçı hayvanların kontrol edilmesi ve eradikasyon programlarının uygulanması yer almaktadır (Young 2000, Türkçapar ve Kurt 2002). Gıda kontaminasyonunun önlenmesi, süt ve süt ürünleri hazırlanırken kontrollerin dikkatli yapılması, bakteriyel temas ihtimali yüksek meslek gruplarında koruyucu önlemlerin dikkatli bir şekilde alınması gerekmektedir (Türkçapar ve Kurt 2002).

İnsanlarda kullanılabilir bir aşının olmamasına karşın hayvanlarda *B. melitensis* Rev-1 suşu kullanılarak hazırlanmış canlı aşı uygulanmaktadır, fakat bu aşı koyunlarda *B. ovis* enfeksiyonlarının şekillenmesine engel olmaz. *B. abortus* 19 suşu kullanılarak hazırlanan canlı aşı ise sığırlarda kullanılır (Young 1995, Sözen 2002, Türkçapar ve Kurt 2002). Aşı uygulaması insanlarda ciddi alerjik reaksiyonlara neden olmasından dolayı canlı aşı uygulaması kullanılmamaktadır. Fakat aşı çalışmaları devam etmektedir (Türkçapar ve Kurt 2002).

Bu çalışmada, *B. melitensis* ve *B. abortus* türlerinin biyotip seviyesindeki identifikasyonunda kullanılan 4 ana testin (CO<sub>2</sub> ihtiyacı, H<sub>2</sub>S üretimi, boyaların (tiyonin ve bazik fuksin) varlığında üreme ve monospesifik A ve M antiserumlarıyla aglütinasyon) PZR sonuçları ile karşılaştırılması amaçlanmaktadır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. *Brucella* suşlarının temini

Bu çalışmada Konya Eğitim Araştırma Hastanesi'ne 2007-2014 yılları arasında yüksek ateş, eklem ve baş ağrısı, halsizlik, lenfadenopati gibi klinik bulgularla enfeksiyon hastalıkları polikliniğine başvuran 113 hastadan alınan kan numunelerinden standart metodla izole edilen ve *Brucella spp.* olarak tanımlanan izolatlar çalışmaya dahil edildi. Araştırmaya dahil edilen suşların yıllara göre dağılımı çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1:** Araştırmaya dahil edilen suşların yıllara göre dağılımı.

Yıllar	Temin edilen <i>Brucella ssp.</i> suşları
2007	12
2008	16
2009	18
2010	16
2011	6
2012	13
2013	17
2014	15
<b>Toplam</b>	<b>113</b>

İzolatlar çalışmaya alınmaya kadar brain-heart infusion broth (BHI) içerisinde buzdolabında, -80°C'de bekletildi. Örnekler -80°C'den çıkartıldıktan sonra BHI'dan %5 defibrine koyun kanlı agara çift olarak pasajlandı. Birinci ekimler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> 'li ortamda, ikinci ekimler 37°C'de 48'er saat inkübasyonda tutuldu ve inkübasyon sonrası koloniler incelenmeye alındı.

#### 2.1.2. Standart *Brucella* Suşları

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kültür koleksiyonundan 2 adet *B. melitensis* ve 1 adet *B. abortus* referans suşu temin edildi.

### **2.1.3. Besiyerleri**

Çalışmada kullanılan besi yerleri, solüsyon ve boyalar üretici firmalar tarafından önerilen yöntemlerle hazırlandı. Besiyerlerinin pH'sı ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakikada sterilize edildi.

#### **2.1.3.1. Serum Dekstroz Agar (SDA)**

Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, CM0131B) hazırlanıp otoklav edildikten sonra 56°C'ye soğutulup 950 mililitresine, milipor filtre ile sterilize edilmiş % 20 dekstroz içeren Horse Serum (Oxoid, SR0035C) stok solüsyonundan 50 ml eklendi (Alton ve ark 1988, OIE 2004).

#### **2.1.3.2. *Brucella* selektif besiyeri**

SDA'a *Brucella* selektif suplement (Oxoid, SR0083A) ilave edilerek hazırlandı (Alton ve ark 1998).

#### **2.1.3.3. Thionin ve bazik fuksinli besiyerleri**

Distile su ile tiyonin (Sigma, T3387) ve bazik fuksinden (Sigma, B0904) % 1 lik stok solüsyonlar hazırlandı ve kaynar suda 1 saat tutuldu. Otoklav edilmiş 1000'er ml TSA'lara tiyonin ve bazik fuksin stok boya solüsyonlarından 2'şer ml (20µg/ml) ilave edilerek 1/50000 konsantrasyonunda tiyonin veya bazik fuksin içeren besiyerleri hazırlandı. (Alton ve ark 1998).

#### **2.1.3.4. Diğer besiyerleri**

Çalışmanın çeşitli safhalarında Blood Agar Base (Oxoid, CM0271B), Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, CM0131B), Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM0337), Simon Sitrat Agar (Oxoid, CM0155), Nutrient Broth (NB) (Oxoid, CM0001B), Sülfid-İndol-Motilite Agar (SİM) (Oxoid, CM 01435), MacConkey Agar (Oxoid, CM0007B) ve Brain Heart Infusion Broth (BHİB) (Oxoid, CM0225B) kullanıldı.

#### **2.1.4. Pozitif Serum**

Suşların *Brucella ssp.* doğrulaması için 1/160 titrede Pozitif Serum ile lam aglütinasyon testi uygulandı. Çalışmada kullanılan Pozitif Serum, *Brusella* pozitif hayvan serumlarından elde edildi.

#### **2.1.5. Katalaz Ayıracı**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 ml (% 3'lük)

H<sub>2</sub>O 8 ml

#### **2.1.6. Kurşun - Asetat Ayıracı**

Distile su 50 ml

Kurşun asetat 10 gr

Süzgeç kağıdı 7 mm X 5 cm ebatlarında

Kurşun asetatdan 10 gr tartılarak 50 ml su içerisinde kaynatılarak eritildi. Hazırlanan süzgeç kağıdı eriğik haldeki kurşun asetat içerisinde konularak petri kutularının içerisinde etüvde kurutuldu (Bilgehan 2002).

#### **2.1.7. Üreaz Testi (Christensen's Metodu)**

Üre %39'lük (Oxoid-SR020K) solüsyon halinde hazırlanarak filtre yöntemi ile steril edildi ve steril cam tüplere 5'er cc dağıtıldı.

#### **2.1.8. Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)**

Oksidaz testi için Identification Sticks Oxidase (Oxoid BR64A) hazır stripleri kullanıldı.

#### **2.1.9. Kristal Violet Solüsyonu**

Kristal violetin (Sigma, C3886) 2 gramı 20 ml absolut etanolde ve 0,8 gram amonyum oksalat 80 ml distile suda çözdürüldükten sonra her iki solüsyon karıştırıldı ve stok solüsyon elde edildi. Stok boya solüsyonu distile su ile 1:40

oranında sulandırılıp smooth kolonilerin belirlenmesinde kullanıldı (Alton ve ark 1988).

#### **2.1.10. *Brucella* Antiserumları**

Poliklonal *Brucella* antiserumu ile A ve M monospesifik antiserumlar Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edildi.

#### **2.1.11. Akriflavin Solüsyonu**

Nötral akriflavinin (Sigma, A8126) distile suda 1/1000'lik dilüsyonu her test için günlük olarak hazırlandı (Alton ve ark 1988).

#### **2.1.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Testi**

##### **2.1.12.1. DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonunda Promega DNA Purification Kiti (Lot# 210462) kullanıldı.

##### **2.1.12.2. DNA amplifikasyonu'nda kullanılan malzemeler**

###### **2.1.12.2.A. Thermal cyclers**

Eppendorf (Mastercycler gradient 5331 000.010, Germany) marka thermal cyclers kullanıldı.

###### **2.1.12.2.B. Primerler**

Primer olarak, sadece *Brucella* türlerinde bulunan, tekrarlayan genetik element IS711'in gen bölgesine yönelik seçilen, *B. melitensis* spesifik (5'-AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA-3'), IS711 spesifik (5'-TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT-3') ve *B. abortus* spesifik (5'-GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC-3') oligonükleotid primerleri (Bricker ve Halling 1994) sentezletirildi (IDT). 100.M'lık Primerler 1/4 oranında sulandırılarak 1µM konsantrasyonunda kullanıldı.

###### **2.1.12.2.C. Master Mix**

Master Mix (Solis BioDyne 2X FIREPol) kullanıldı.

#### **2.1.12.2.D. Film**

Bio-Rad Gel Doc (Model #2000) görüntüleme sistemi kullanıldı.

#### **2.1.12.2.E. Marker**

Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Cat.#SM0321) 0.5 µl kullanıldı.

#### **2.1.12.2.F. Pozitif ve negatif kontrol**

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi kültür koleksiyonundan temin edilen 2 adet *B. melitensis* ve 1 adet *B. abortus* referans suşlarına DNA ekstraksiyon işlemi uygulandı ve PZR'a tabi tutuldu. Elde edilen PZR ürünü pozitif kontrol olarak kullanıldı. Steril ultra saf su ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

#### **2.1.12.2.G. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler**

##### **1) Tris asetat (TBE) tamponu (10X)**

Tris base	60.5 g
Borik asit	30.85 g
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	3.72 g
H <sub>2</sub> O (Distile su)	1 L'ye tamamlandı.

Kullanılincaya kadar oda sıcaklığında saklandı.

##### **2) Agaroz gel (%1.5) (w/v)**

Agaroz	3 g (w/v)
TBE	200 ml

##### **3) Etidyum bromür stok solüsyonu (10mg/ml)**

Etidyum Bromür	20 mg
Distile Su	1.98 ml

Karanlıkta muhafaza edildi ve stok solüsyon agaroz jele 0.5 µg/ml oranında katıldı.

#### **4) Yükleme tamponu**

6X Loading dye solution (MBI Fermentas, R0411)

Örneklerin jele yüklenmesi için 42 göze sahip (20x0.1x8) taraklarda: 1,4 µl (6x) yükleme tamponu ile 6 µl PZR ürünü kullanılmıştır.

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Etken İzolasyonu**

Konya Eğitim Araştırma Hastanesi'nden bifazik hemokültür şişesinde stoklanan suşların ekimleri *Brucella* Selektif Besiyeri, MacConkey ve % 5 koyun kanı içeren Kanlı Agara derhal yapıldı. Tüm örnekler ikişer besiyerine ekildi ve petrilerin yarısı aerobik atmosfer ortamına kalan yarısı ise % 5-10 CO<sub>2</sub> ihtiva eden mikroaerofilik etüve kaldırılarak 37°C de 8-10 gün inkübe edildi. Koloni oluşumu günlük olarak kontrol edildi. Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan standart suşların *Brucella* Selektif Besiyerine ekimleri de aynı şekilde gerçekleştirildi (Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997).

### **2.2.2. Suşların İdentifikasyonu**

#### **2.2.2.1. Gram Boyama**

Üreme görülen petri kutularında tipik 1-2 mm çapındaki *Brucella* kolonileri seçilerek Gram yöntemi ile boyandı. Karakteristik Gram negatif kokobasil ya da kısa basil şekillerini gösteren koloniler BHIB'a ekilerek daha sonra biyokimyasal testler ve moleküler tekniklerin yapılmasında kullanıldı (Alton ve ark 1988).

#### **2.2.2.2. Katalaz,üreaz ve oksidaz testleri**

Gram negatif basillere katalaz, üreaz ve oksidaz testleri uygulandı (Alton ve ark 1988).

### **2.2.2.3. *Brucella* Antiserumu**

Karakteristik Gram negatif kokobasil ya da kısa basil şekillerini gösteren, Oksidaz, Katalaz, Üreaz pozitif olan suşlara *Brucella* antiserumu ile aglütinasyon testi uygulandı (Alton ve ark 1988).

### **2.2.2.4. Koloni morfolojisi**

İzolatların koloni morfolojilerini belirlemek için, kristal violet solüsyonu petrideki kolonilerin üzerine 10-15 saniye damlatıldı. Daha sonra boya pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve koloniler hemen bir el merceği ile muayene edildi. Boya almayan koloniler S, kırmızımsı gölgeli boyananlar ise R koloni olarak değerlendirildi.

Aynı amaçla, taze hazırlanmış nötral akriflavinden lam üzerine bir damla alınıp, birkaç koloni ile süspansiyon sağlandı ve smooth koloniler homojen bir süspansiyon oluşturdular. (Alton ve ark 1988).

Ayrıca, koloni morfolojisi belirlenen izolatlara indol ve Voges-Proskauer testleri uygulandı (Alton ve ark 1988, Arda 2000).

## **2.2.3. Tür ve Biyotip Tanısında Kullanılan Yöntemler**

### **2.2.3.1. Üremede serum gereksinimi**

*Brucella* izolatları, serum ihtiva eden SDA ve serum içermeyen TSA'a ekim yapıldı ve petrilere % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüve kaldırıldı. Petrilere 37°C de 2-3 gün inkübe edilip üremeler karşılaştırıldı (Alton ve ark 1988).

### **2.2.3.2. Üremede karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ihtiyacı**

*Brucella* izolatları, 1'er ml Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) içerisinde yoğun bir şekilde süspanse edildi. Süspansiyonlardan ikişer adet yatık TSA tüplerine ekim yapıldı ve tüplerden birisi normal etüve, diğeri % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüve kaldırıldı. Tüpler 37°C de 2-3 gün inkübe edilip üremeler karşılaştırıldı (Alton ve ark 1988).

### **2.2.3.3. Hidrojen sulfid (H<sub>2</sub>S) üretimi**

Taze kültürlerden TSA içeren yatık tüplere ekim yapıldıktan sonra % 10'luk nötral kurşun asetat emdirilmiş filtre kağıtları besiyelerine değmeyecek şekilde

tüplere yerleştirildi ve 37°C de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. Kurşun asetat kağıtları günlük değiştirildi. Kağıdın renginin siyaha dönüşmesi pozitif olarak kabul edildi (Alton ve ark 1988).

#### **2.2.3.4. Thionin varlığında üreme**

Kültürlerin süspansiyonları, 1 ml steril FTS içerisinde eşit yoğunluklarda hazırlandı. Steril öze ile bakteriyel süspansiyonlar 1/50000 konsantrasyonunda thionin içeren her bir petride 6 örnek olacak şekilde çizgi ekim yapıldı. Kontrol petrisi olarak TSA kullanıldı ve ona da aynı şekilde ekim yapıldı. Petriler etüve kaldırılarak 37 °C de 3-4 gün inkübe edildi ve sürenin sonunda kolonilerin varlığı kontrol edildi (Alton ve ark 1988).

#### **2.2.3.5. Fuksin varlığında üreme**

Kültürlerin süspansiyonları, 1 ml steril FTS içerisinde eşit yoğunluklarda hazırlandı. Steril öze ile bakteriyel süspansiyonlar 1/50000 konsantrasyonunda fuksin içeren her bir petride 6 örnek olacak şekilde çizgi ekim yapıldı. Petriler etüve kaldırılarak 37°C de 3-4 gün inkübe edildi ve sürenin sonunda kolonilerin varlığı kontrol edildi (Alton ve ark 1988).

#### **2.2.3.6. Monospesifik anti-serumlar ile aglütinasyon**

Test edilecek her bir suşdan, FTS ile eşit yoğunlukta 1-2 ml'lik bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyonlar 65°C'lik sıcak su banyosunda 1 saat tutularak inaktive edildi. Petri içine yerleştirilmiş bir lama A ve M serum dilüsyonlarından birer damla damlatıldı. Her seruma birer damla bakteri süspansiyonundan damlatılıp karıştırıldı. Serumların 1 dakika içinde aglütinasyon vermesi pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

#### **2.2.3.7. Biyotiplendirme**

İzolatların biyotip düzeyinde ki sınıflandırmaları biyokimyasal test sonuçları ve PZR sonuçlarının karşılaştırılması ile yapıldı.



## **2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Metotları**

### **2.2.4.1. DNA ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonunda ticari DNA purifikasyon kiti (Promega DNA Purification Kiti Lot# 210462) üretici firmanın belirttiği şekilde kullanıldı. Sıvı besiyerinde üretilmiş bakteri kültürü 7500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısım atılarak pelet üzerine 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu ilave edilip 80 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 µl RNAaz enzimi ilave edilerek 37 °C'de 1 saat daha inkübe edildi. Süspansiyon üzerine 200 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklenerek 20 saniye vorteks yapıldı, 5 dakika kırık buz üzerinde bekletildi. 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Üstteki aköz kısım yeni bir tüpe alınıp üzerine 600 µl oda ısısında izopropanol eklendi, yavaşça tüpler 1-2 dakika karıştırılıp 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Üst kısım dikkatlice döküldükten sonra 20 dakika tüpler kurumaya bırakıldı. Pelet üzerine 600 µl % 70 soğuk etanol ilave edilip 20'şer kez tüpler alt-üst edildi. 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısım dikkatlice döküldü, 30 dakika süre ile tüpler kurutuldu. Üzerine 100 µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenerek 65 °C'de 1 saat inkübe edilerek DNA'lar elde edildi.

### **2.2.4.2. Ekstraksiyonu yapılan DNA'ların absorbands tayini**

Ekstraksiyonu yapılan DNA örneklerinin saflık ve miktar tayinlerini hesaplamak için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteleri (OD) spektrofotometre (Eppendorf, Model 6131, Germany) kullanılarak saptandı. Distile su blank olarak kullanıldı. 5 µl ekstrakte edilen DNA örneği distile su ile 100 µl'ye tamamlandı ve 260 nm (OD260) ve 280 nm (OD280)'de ölçümleri yapıldı. DNA örneklerinin konsantrasyonları ng/ml cinsinden elde edildi.

OD260 ve OD280 değerlerine göre hesaplanan DNA miktarları birbiri ile oranlanarak (OD260 / OD280), bu oranın 1,8-2,0 arasında bulunanlar PZR'da kullanıldı.

### **2.2.4.3. PZR ile DNA amplifikasyonu**

Her bir PZR tüp içeriğinde amplifikasyon için toplam 20 µl olacak şekilde oligonükleotid primerlerinden toplam 1,2 µl (IS711 1 µl, *B. melitensis* spesifik

primer 0,1 µl ve *B. abortus* spesifik primer 0,1 µl), Master Mix 10 µl, steril nuclease-free su 3,8 µl ve 5 µl DNA kullanılarak hazırlandı. Bu karışım ısı döngü cihazında, 95°C 'de 3 dakika ön denatürasyondan sonra her döngüsü 95 °C'de 2 dakika, 55.5°C de 2 dakika ve 72°C 'de 2 dakikalık adımlardan oluşan 35 döngülük bir reaksiyon ile çoğaltıldı. Son uzatma olarak DNA'lar 72 °C'de 4 dakika tutuldu (Bricker ve Halling 1994).

PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid ve % 1,5'lik agaroz jelde elektroforez uygulandı. Marker olarak 100 bp'lık oluşturan marker kullanıldı. 731 bp büyüklüğündeki bantlar *B. melitensis*, 500 bp büyüklüğündeki bantlar *B. abortus* pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* suşlarının DNA ekstraksiyonları kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril ultra saf su kullanıldı (Bricker ve Halling 1994).

#### **2.2.5. İstatistik**

Bu çalışmada, istatistiksel analizler SPSS 15 istatistik paket programı kullanıldı. Sensitivite (Duyarlılık), Spesifite (Özgüllük), Pozitif Prediktif Değer, Negatif Prediktif Değer ve Test geçerliliği analizleri yapıldı. Kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri PZR referans sonuç kabul edilerek hesaplandı.

#### **2.2.6. Etik Kurul Kararı**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 18.02.2014 tarih ve 2014/4 sayılı etik kurul kararı alınmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Brucella Suşlarının İzolasyonu

Konya Eğitim Araştırma Hastanesi'nden temin edilen izolatların ekim sonuçları 48-72 saat sonunda değerlendirildi. Numunelerin tamamında üreme gözlemlendi (Şekil:3.1).



Şekil 3.1: Selektif *Brucella* Agarda üreme.

Serum ihtiva eden SDA ve serum içermeyen TSA'ya yapılan ekim sonuçları 72 saat sonra her iki ortamda da bütün suşlarda üreme gözlemlendi. Suşlara gram boyama uygulandı. 113 suş da gram negatif kokobasil olarak gözlemlendi. SÜVF stok suşlarından temin edilen 2 adet *B. melitensis* ve 1 adet *B. abortus* suşları da üreme ve gram boyama sonuçları yönünden değerlendirildi. Bütün suşlar katalaz ve oksidaz yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Hemoliz, hareket ve indol negatif olarak değerlendirildi (Şekil:3.2).



Şekil 3.2: Hareket muayenesi.

### 3.2. *Brucella* İzolatlarının Tür ve Biyotip Test Sonuçları

#### 3.2.1. CO<sub>2</sub> Gereksinimi ve H<sub>2</sub>S Üretimi

Ekim yapılan yatık SDA tüplerinden 113 izolat % 5-10 CO<sub>2</sub>'li etüvde üreme gösterdi; 91 izolat aerobik ortamda üreme gösterirken 22 adet izolat aerobik ortamda üremedi (Çizelge:3.1). SÜVF stoklarından alınan 3 adet suş her iki ortamda da üreme gösterdi.

**Çizelge 3.1:** CO<sub>2</sub>'li ortamda üreme sonuçları.

	Gerçek Test		Toplam
	<i>B. melitensis</i> (+)	<i>B. abortus</i> (-)	
<i>B. melitensis</i> (+)	91	0	91
<i>B. abortus</i> (-)	3	19	22
<b>Toplam</b>	94	19	113

Toplam izolatların 19 tanesinde 4 günün sonunda H<sub>2</sub>S üretimi gözlenirken diğer 94 izolatta H<sub>2</sub>S üretimi gözlenmedi (Çizelge 3.2). SÜVF stoklarından alınan *B. abortus* H<sub>2</sub>S üretimi gösterdi.

**Çizelge 3.2:** H<sub>2</sub>S üretimi sonuçları

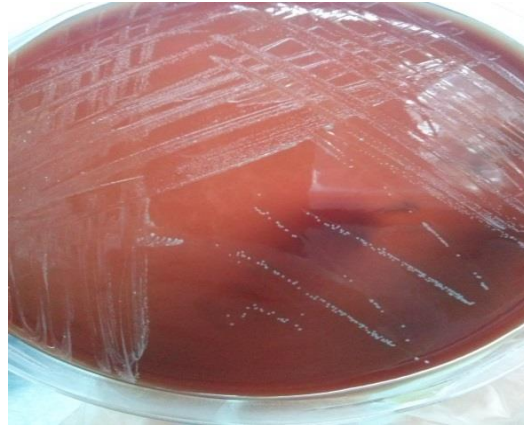
	Gerçek Test		Toplam
	<i>B. melitensis</i> (+)	<i>B. abortus</i> (-)	
<i>B. melitensis</i> (+)	94	0	94
<i>B. abortus</i> (-)	0	19	19
<b>Toplam</b>	94	19	113



**Şekil 3.3:** SDA'da üreme ve H<sub>2</sub>S üretimi.

### 3.2.2. Koloni Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

*Brucella* izolatlarının tamamı koloni morfolojisi yönünden smooth koloni olarak değerlendirildi (Çizelge:3.6).



**Şekil 3.4:**Koloni morfolojisi incelenmesi.

### 3.2.3. Tiyonin İçeren Besi Yerinde Üreme

Tiyonin (1/50 000) içeren besi yerlerine yapılan ekimlerden 97 adet suş ve 1 adet SÜVF *B. melitensis* suşunda üreme gözlenirken, diğer 16 suş ve SÜVF *B. melitensis* ve *B. abortus* suşlarında üreme gözlenmedi (Çizelge:3.3).

**Çizelge 3.3:** Tiyonin içeren besi yerinde üreme verileri

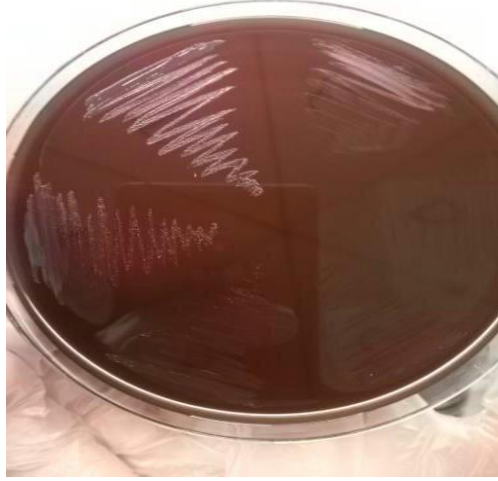
	Gerçek Test		Toplam
	<i>B. melitensis</i> (+)	<i>B. abortus</i> (-)	
<i>B. melitensis</i> (+)	94	3	97
<i>B. abortus</i> (-)	0	16	16
<b>Toplam</b>	94	19	113



**Şekil 3.5:** Tiyonin içeren besi yerinde üreme.

#### **3.2.4. Fuksin İçeren Besi Yerinde Üreme**

Fuksin (1/50 000) içeren besi yerine yapılan ekimlerden 81692, 47915, 69370, 7823, 11559, 5648, 61713 protokol numaralı numuneler dışındaki bütün numunelerde ve SÜVF 2 adet *B. melitensis* ve 1 adet *B. abortus* suşlarında üreme gözlemlendi (Çizelge:3.7).



**Şekil 3.6:** Fuksin'li besiyerinde üreme.

### 3.2.5. Üreaz Test Sonuçları

113 numune ve 3 adet kontron suşu üreaz pozitif olarak değerlendirildi. Üreaz aktivite saatleri değişkenlik gösterdi (Çizelge:3.4).

**Çizelge 3.4:** Üreaz aktivitesi 1-2 saat arası *B. abortus* olarak değerlendirildi.

	Gerçek Test		Toplam
	<i>B. abortus</i> (-)	<i>B. melitensis</i> (+)	
<i>B. abortus</i> (-)	19	21	40
<i>B. abortus</i> haricindeki(+)	0	73	73
<b>Toplam</b>	19	94	113



**Şekil 3.7:** Üreaz ve indol test sonuçları.

### 3.2.6. Streptomycin Duyarlılığı

Streptomycin duyarlılıklarında zone çapları farklılıklar göstermekle beraber (Çizelge:3.6) 113 izolatın tamamı streptomycine duyarlı olarak tesbit edildi. SÜVF suçlarından 1 adet *B. melitensis* dirençli iken diğer iki suçun duyarlı olduğu tesbit edildi.



Şekil 3.8: Antibiogram üreme.

### 3.2.7. A ve M Monospesifik Antiserumlar İle Aglütinasyon Test Sonuçları

Anti-A serumu ile 31975, 3125806, 27461, 46579, 11678, 30683, 30950, 12180, 66122, 72145, 4972, 61820, 1827 protokol numaralı suçlar; Anti-M serumu ile 71625, 7741, 7823, 11891, 11691, 70256, 11559, 5648, 19886, 70453, 34567, 496781, 28781, 11538, 67549, 61713, 969, 173, 23468 protokol numaralı suçlar negatif diğer suçlar pozitif olarak değerlendirildi (Çizelge:3.7).

### 3.2.8. PZR sonuçları

Toplam 113 adet *Brucella* izolatı, SÜVF 2 adet *B. melitensis* ve SÜVF 1 adet *B. abortus* referans suçlarının IS711, *B. melitensis* ve *B. abortus* spesifik primerleri ile yapılan PZR sonucunda numuneler agoroz jel elektroforezinde değerlendirildi. 731bp düzeyinde görüntü veren 96 numune *B. melitensis*; 500bp düzeyinde görüntü veren 20 numune *B. abortus* olarak belirlendi (Çizelge:3.5).



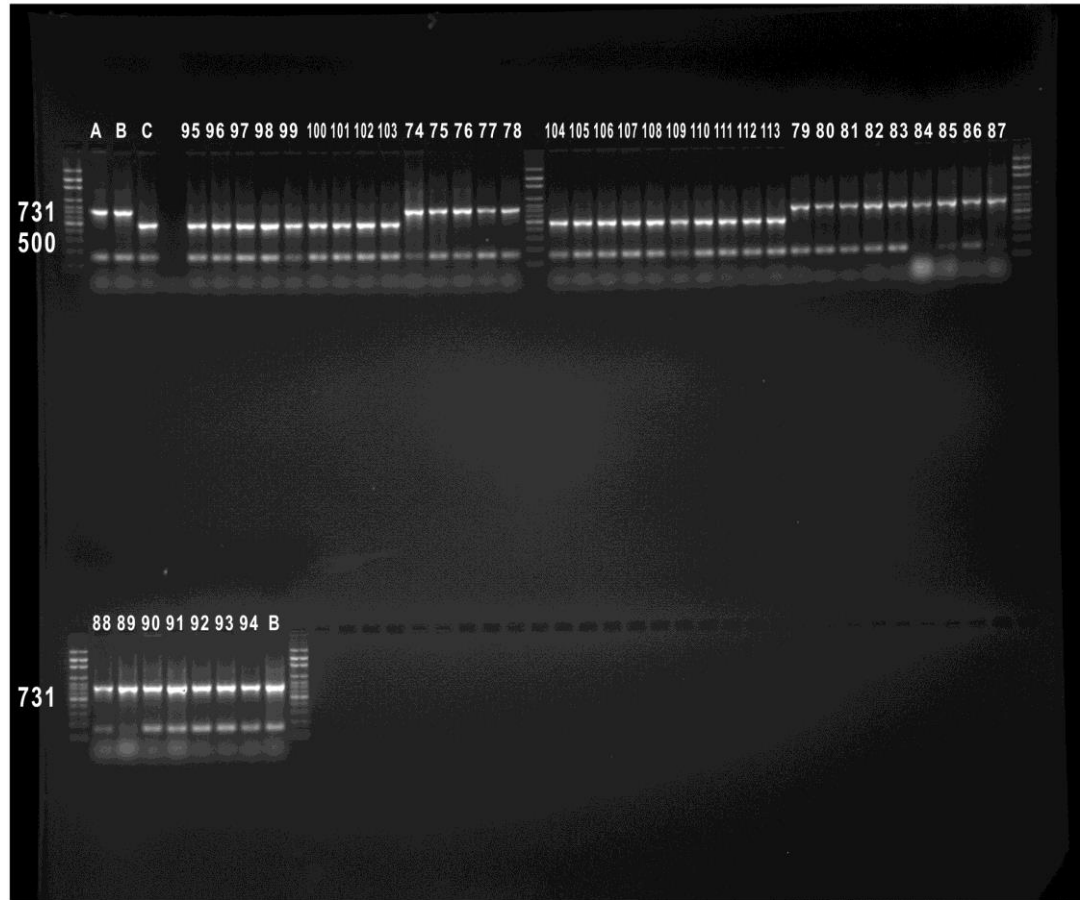
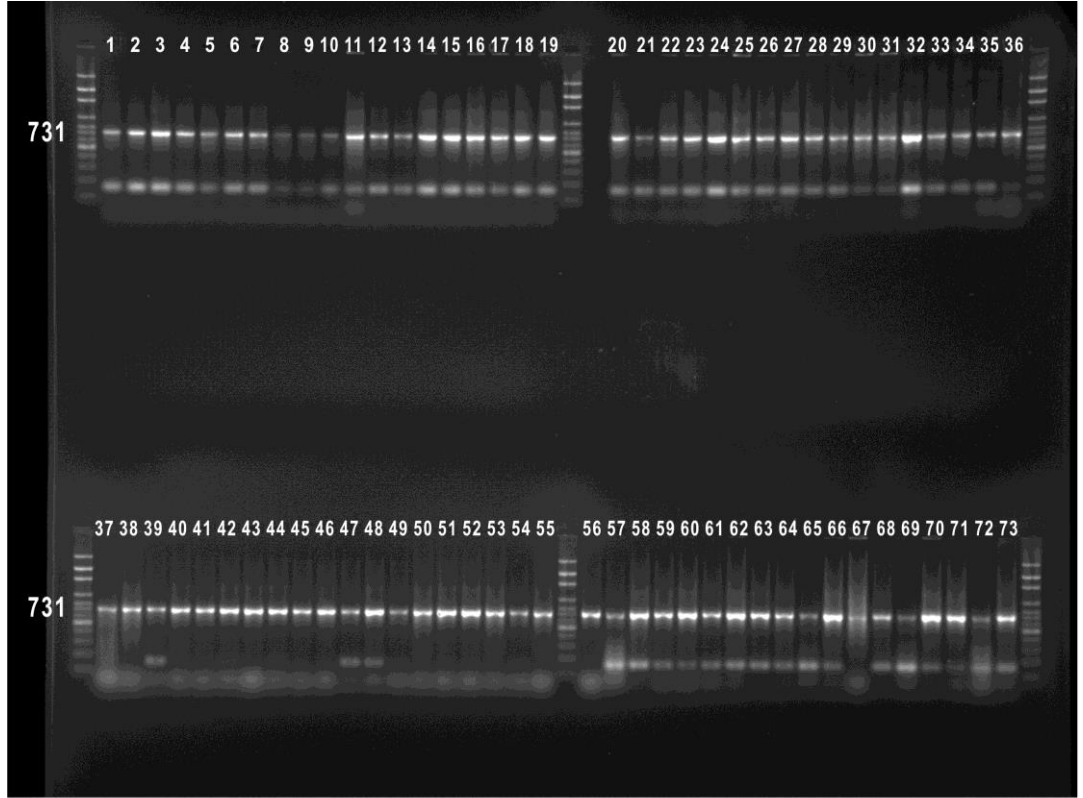
**Çizelge 3.5:** Yıllara göre dağılım ve yüzdeleri.

Yıllar	<i>B. melitensis</i>	%	<i>B. abortus</i>	%
2007	9	75	3	25
2008	11	68,75	5	31,25
2009	16	88,89	2	11,11
2010	15	93,75	1	6,25
2011	4	66,66	2	33,34
2012	11	84,62	2	15,38
2013	14	82,35	3	17,65
2014	14	93,33	1	6,67

### 3.2.9. Biyotiplendirme

Biyotiplendirme için PZR sonuçları ile biyokimyasal test sonuçlarının değerlendirilmesi ortak olarak yapıldı. PZR sonuçlarına göre *B. melitensis* olarak değerlendirilen 94 tane izolatın Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon test sonuçları değerlendirildi. 7, 9, 19, 31, 42, 49, 54, 55, 66, 77, 84, 90 sıra numaralı test izolatları (biyotip 1) sadece M anti-serumu ile aglütinasyon gösterirken diğer izolatlar (biyotip 3) her iki anti-serum ile de aglütinasyon göstermiştir. Sonuç olarak 94 tane *B. melitensis* izolatının 12 tanesinin biyotip 1 ve 82 tanesinin biyotip 3 olduğu belirlendi.

PZR sonuçlarına göre *B. abortus* olarak belirlenen 19 tane izolatın biyotiplendirilmesinde ise CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S oluşumu, boyalarda üreme ve Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon test sonuçları ortak olarak değerlendirildi. İzolatları hepsinin de ilk izolasyonda CO<sub>2</sub> ihtiyacı göstermelerinden dolayı biyotip 5, 6, 7 ekarte edildi. İzolatların hepsinde H<sub>2</sub>S üretimi gözlenmesinden dolayı biyotip 5 ve 8 ekarte edildi. İzolatların tamamı Anti-A anti-serumu ile aglütinasyon gösterdiği için biyotip 4, 5, 8 ve 9 ekarte edildi. Boya varlığında üreme sonuçlarına göre 95, 96, 98, 99, 100, 103, 104, 105, 109, 111, 112 ve 113 sıra numaralı izolatlar (biyotip 1) sadece Fuksin varlığında üreme gösterdi; 97, 101, 102, 110 sıra numaralı izolatlar (biyotip 2) her iki boya varlığında da üreme göstermedi ve 106, 107, 108 sıra numaralı izolatlar (biyotip 3) her iki boya varlığında da üreme gösterdi. Sonuç olarak 19 tane *B. abortus* izolatının 12 tanesinin biyotip 1, 4 tanesinin biyotip 2 ve 3 tanesinin biyotip 3 olduğu belirlendi.



Şekil 3.9: Agoroz jel elektroforezi görüntüleri, A-B: *B. melitensis* C: *B. abortus*

**Çizelge 3.6: *Brucella* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.**

S. no	Yıllar	Prt. No	Gram boya	Koln.	Oksdz.	Katlız.	Üre/saat	Harkt.	Hemlz.	İndl .	Antise. Aglü.
1	2014	81690	-	s	+	+	4	-	-	-	+
2	2014	81692	-	s	+	+	4	-	-	-	+
3	2010	34023	-	s	+	+	4	-	-	-	+
4	2014	83477	-	s	+	+	8	-	-	-	+
5	2013	70726	-	s	+	+	24	-	-	-	+
6	2014	87800	-	s	+	+	24	-	-	-	+
7	2009	27461	-	s	+	+	1	-	-	-	+
8	2013	72855	-	s	+	+	4	-	-	-	+
9	2011	46579	-	s	+	+	8	-	-	-	+
10	2014	83477	-	s	+	+	8	-	-	-	+
11	2010	30767	-	s	+	+	24	-	-	-	+
12	2013	74076	-	s	+	+	2	-	-	-	+
13	2009	28693	-	s	+	+	24	-	-	-	+
14	2013	73393	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
15	2008	14472	-	s	+	+	24	-	-	-	+
16	2008	12188	-	s	+	+	24	-	-	-	+
17	2009	27437	-	s	+	+	1	-	-	-	+
18	2008	11549	-	s	+	+	1	-	-	-	+
19	2008	11678	-	s	+	+	4	-	-	-	+
20	2007	4972	-	s	+	+	8	-	-	-	+
21	2013	72856	-	s	+	+	8	-	-	-	+
22	2013	72145	-	s	+	+	8	-	-	-	+
23	2009	20266	-	s	+	+	2	-	-	-	+
24	2014	81775	-	s	+	+	2	-	-	-	+
25	2013	74077	-	s	+	+	24	-	-	-	+
26	2009	26490	-	s	+	+	24	-	-	-	+
27	2010	33949	-	s	+	+	24	-	-	-	+
28	2013	72855	-	s	+	+	8	-	-	-	+
29	2008	11678	-	s	+	+	8	-	-	-	+
30	2009	26492	-	s	+	+	1	-	-	-	+
31	2010	30683	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
32	2009	25159	-	s	+	+	1	-	-	-	+
33	2007	1575	-	s	+	+	1	-	-	-	+
34	2014	81795	-	s	+	+	4	-	-	-	+
35	2010	31749	-	s	+	+	8	-	-	-	+
36	2009	20260	-	s	+	+	8	-	-	-	+
37	2011	46379	-	s	+	+	24	-	-	-	+
38	2010	31767	-	s	+	+	24	-	-	-	+
39	2008	16961	-	s	+	+	24	-	-	-	+
40	2007	7729	-	s	+	+	24	-	-	-	+
41	2009	27435	-	s	+	+	24	-	-	-	+

**Çizelge 3.6:** (Devam) *Brucella* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.

S. no	Yıllar	Prt. No	Gram boya	Koln.	Oksdz.	Katlz.	Üre/saat	Harkt.	Hemlz.	İndl .	Antise. Aglü.
42	2010	33950	-	s	+	+	8	-	-	-	+
43	2014	83470	-	s	+	+	24	-	-	-	+
44	2010	32241	-	s	+	+	1	-	-	-	+
45	2008	11672	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
46	2009	26492	-	s	+	+	24	-	-	-	+
47	2013	74177	-	s	+	+	8	-	-	-	+
48	2008	14475	-	s	+	+	2	-	-	-	+
49	2008	12180	-	s	+	+	8	-	-	-	+
50	2009	25492	-	s	+	+	8	-	-	-	+
51	2012	67918	-	s	+	+	1	-	-	-	+
52	2012	67855	-	s	+	+	4	-	-	-	+
53	2007	602	-	s	+	+	4	-	-	-	+
54	2012	66122	-	s	+	+	2	-	-	-	+
55	2013	72145	-	s	+	+	8	-	-	-	+
56	2013	73393	-	s	+	+	24	-	-	-	+
57	2012	55298	-	s	+	+	2	-	-	-	+
58	2010	33399	-	s	+	+	24	-	-	-	+
59	2012	56601	-	s	+	+	24	-	-	-	+
60	2007	4972	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
61	2014	83472	-	s	+	+	8	-	-	-	+
62	2014	87800	-	s	+	+	4	-	-	-	+
63	2014	81692	-	s	+	+	4	-	-	-	+
64	2012	69913	-	s	+	+	8	-	-	-	+
65	2012	55108	-	s	+	+	8	-	-	-	+
66	2012	61820	-	s	+	+	24	-	-	-	+
67	2013	70450	-	s	+	+	24	-	-	-	+
68	2012	69924	-	s	+	+	24	-	-	-	+
69	2011	47915	-	s	+	+	4	-	-	-	+
70	2014	81818	-	s	+	+	24	-	-	-	+
71	2013	70265	-	s	+	+	24	-	-	-	+
72	2012	69370	-	s	+	+	8	-	-	-	+
73	2012	67490	-	s	+	+	8	-	-	-	+
74	2010	31975	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
75	2007	317	-	s	+	+	24	-	-	-	+
76	2007	1821	-	s	+	+	24	-	-	-	+
77	2007	1827	-	s	+	+	8	-	-	-	+
78	2007	1913	-	s	+	+	4	-	-	-	+
79	2013	72855	-	s	+	+	4	-	-	-	+
80	2008	17239	-	s	+	+	4	-	-	-	+
81	2009	23467	-	s	+	+	24	-	-	-	+
82	2008	17239	-	s	+	+	8	-	-	-	+
83	2009	21309	-	s	+	+	8	-	-	-	+
84	2010	31975	-	s	+	+	4	-	-	-	+

**Çizelge 3.6:** (Devam) *Brucella* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.

S. no	Yıllar	Prt. No	Gram boya	Koln.	Oksdz.	Katlz.	Üre/saat	Harkt.	Hemlz.	İndl .	Antise. Aglü.
85	2009	21307	-	s	+	+	4	-	-	-	+
86	2009	24346	-	s	+	+	24	-	-	-	+
87	2010	31978	-	s	+	+	4	-	-	-	+
88	2009	26938	-	s	+	+	2	-	-	-	+
89	2014	5517487	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
90	2014	3125806	-	s	+	+	24	-	-	-	+
91	2010	38666	-	s	+	+	24	-	-	-	+
92	2011	497118	-	s	+	+	24	-	-	-	+
93	2010	32802	-	s	+	+	8	-	-	-	+
94	2010	34364	-	s	+	+	24	-	-	-	+
95	2013	71623	-	s	+	+	1	-	-	-	+
96	2009	7741	-	s	+	+	1	-	-	-	+
97	2008	7823	-	s	+	+	1	-	-	-	+
98	2008	11891	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
99	2008	11691	-	s	+	+	2	-	-	-	+
100	2013	70256	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
101	2008	11559	-	s	+	+	2	-	-	-	+
102	2007	5648	-	s	+	+	2	-	-	-	+
103	2011	19886	-	s	+	+	2	-	-	-	+
104	2013	70453	-	s	+	+	1	-	-	-	+
105	2010	34567	-	s	+	+	1	-	-	-	+
106	2014	496781	-	s	+	+	1	-	-	-	+
107	2011	28781	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
108	2008	11538	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
109	2012	67549	-	s	+	+	1,5	-	-	-	+
110	2012	61713	-	s	+	+	2	-	-	-	+
111	2007	969	-	s	+	+	2	-	-	-	+
112	2007	173	-	s	+	+	1	-	-	-	+
113	2009	23468	-	s	+	+	1	-	-	-	+
a	SÜVF	B.mel.	-	s	+	+	4	-	-	-	+
b	SÜVF	B. mel.	-	s	+	+	8	-	-	-	+
c	SÜVF	B. abort.	-	s	+	+	1	-	-	-	+

Simgeler: a: *B.melitensis*, b: *B.melitensis*, c:*B.abortus*

**Çizelge 3.7:** *Brucella* izolatlarının tür test sonuçları.

Sıra No	Thionin'de Üreme	Fuksin'de Üreme	CO <sub>2</sub> ihtiyacı	H <sub>2</sub> S Üretimi	Streptomycin Duyarlılığı	Anti-A Aglütin.	Anti-M Aglütin.	Serum Gereks.
1	+	+	-	-	14	+	+	-
2	+	+	-	-	14	+	+	-
3	+	+	-	-	17	+	+	-
4	+	+	-	-	17	+	+	-
5	+	+	-	-	17	+	+	-
6	+	+	-	-	23	+	+	-
7	+	+	-	-	20	-	+	-
8	+	+	-	-	16	+	+	-
9	+	+	-	-	17	-	+	-
10	+	+	-	-	17	+	+	-
11	+	+	-	-	19	+	+	-
12	+	+	-	-	14	+	+	-
13	+	+	-	-	17	+	+	-
14	+	+	-	-	15	+	+	-
15	+	+	-	-	16	+	+	-
16	+	+	+	-	17	+	+	-
17	+	+	-	-	20	+	+	-
18	+	+	-	-	16	+	+	-
19	+	+	-	-	21	-	+	-
20	+	+	-	-	18	+	+	-
21	+	+	-	-	16	+	+	-
22	+	+	-	-	18	+	+	-
23	+	+	-	-	12	+	+	-
24	+	+	-	-	20	+	+	-
25	+	+	-	-	25	+	+	-
26	+	+	-	-	20	+	+	-
27	+	+	-	-	20	+	+	-
28	+	+	-	-	20	+	+	-
29	+	+	-	-	17	+	+	-
30	+	+	-	-	22	+	+	-
31	+	+	-	-	22	-	+	-
32	+	+	-	-	23	+	+	-
33	+	+	-	-	20	+	+	-
34	+	+	-	-	20	+	+	-
35	+	+	-	-	21	+	+	-
36	+	+	-	-	20	+	+	-
37	+	+	-	-	16	+	+	-
38	+	+	-	-	19	+	+	-
39	+	+	-	-	23	+	+	-
40	+	+	-	-	17	+	+	-
41	+	+	-	-	20	+	+	-

**Çizelge 3.7:** (Devam) *Brucella* izolatlarının tür test sonuçları.

Sıra No	Thionin'de Üreme	Fuksin'de Üreme	CO <sub>2</sub> ihtiyacı	H <sub>2</sub> S Üretimi	Streptomycin Duyarlılığı	Anti-A Aglütin.	Anti-M Aglütin.	Serum Gereks.
42	+	+	-	-	19	-	+	-
43	+	+	-	-	17	+	+	-
44	+	+	-	-	14	+	+	-
45	+	+	-	-	17	+	+	-
46	+	+	-	-	19	+	+	-
47	+	+	-	-	21	+	+	-
48	+	+	-	-	17	+	+	-
49	+	+	+	-	17	-	+	-
50	+	+	-	-	20	+	+	-
51	+	+	-	-	17	+	+	-
52	+	+	-	-	15	+	+	-
53	+	+	-	-	21	+	+	-
54	+	+	-	-	16	-	+	-
55	+	+	-	-	17	-	+	-
56	+	+	-	-	16	+	+	-
57	+	+	-	-	20	+	+	-
58	+	+	-	-	23	+	+	-
59	+	+	-	-	14	+	+	-
60	+	+	-	-	20	+	+	-
61	+	+	-	-	21	+	+	-
62	+	+	-	-	18	+	+	-
63	+	-	-	-	17	+	+	-
64	+	+	-	-	20	+	+	-
65	+	+	-	-	17	+	+	-
66	+	+	-	-	22	-	+	-
67	+	+	-	-	24	+	+	-
68	+	+	-	-	17	+	+	-
69	+	-	-	-	16	+	+	-
70	+	+	-	-	12	+	+	-
71	+	+	-	-	17	+	+	-
72	+	-	-	-	18	+	+	-
73	+	+	-	-	20	+	+	-
74	+	+	-	-	16	+	+	-
75	+	+	-	-	23	+	+	-
76	+	+	-	-	21	+	+	-
77	+	+	-	-	17	-	+	-
78	+	+	-	-	18	+	+	-
79	+	+	-	-	18	+	+	-
80	+	+	-	-	19	+	+	-
81	+	+	-	-	18	+	+	-
82	+	+	-	-	20	+	+	-
83	+	+	-	-	17	+	+	-

**Çizelge 3.7:** (Devam) *Brucella* izolatlarının tür test sonuçları.

Sıra No	Thionin'de Üreme	Fuksin'de Üreme	CO <sub>2</sub> ihtiyacı	H <sub>2</sub> S Üretimi	Streptomycin Duyarlılığı	Anti-A Aglütin.	Anti-M Aglütin.	Serum Gereks.
84	+	+	+	-	18	-	+	-
85	+	+	-	-	18	+	+	-
86	+	+	-	-	21	+	+	-
87	+	+	-	-	17	+	+	-
88	+	+	-	-	12	+	+	-
89	+	+	-	-	20	+	+	-
90	+	+	-	-	18	-	+	-
91	+	+	-	-	16	+	+	-
92	+	+	-	-	18	+	+	-
93	+	+	-	-	19	+	+	-
94	+	+	-	-	18	+	+	-
95	-	+	+	+	18	+	-	-
96	-	+	+	+	17	+	-	-
97	-	-	+	+	19	+	-	-
98	-	+	+	+	21	+	-	-
99	-	+	+	+	18	+	-	-
100	-	+	+	+	20	+	-	-
101	-	-	+	+	20	+	-	-
102	-	-	+	+	18	+	-	-
103	-	+	+	+	18	+	-	-
104	-	+	+	+	19	+	-	-
105	-	+	+	+	18	+	-	-
106	+	+	+	+	17	+	-	-
107	+	+	+	+	20	+	-	-
108	+	+	+	+	21	+	-	-
109	-	+	+	+	17	+	-	-
110	-	-	+	+	16	+	-	-
111	-	+	+	+	18	+	-	-
112	-	+	+	+	19	+	-	-
113	-	+	+	+	21	+	-	-
a	-	+	-	-	10	-	+	-
b	+	+	-	-	16	+	+	-
c	-	+	-	+	21	+	-	-

PZR sonuçlarına göre 1-94 sıra numaralı suşlar *B. melitensis*, 95-113 sıra numaralı suşlar ise *B. abortus* olarak bulunmuştur.



#### 4. TARTIŞMA

İnsan ve hayvan sağlığına çeşitli zararları nedeni ile brusellozun űlkelere ekonomik kayıpları büyüktür. Brusellozis FAO, WHO, OIE brusellozu dünyada görűlen en yaygız zoonoz hastalık olarak kabul etmişlerdir (Yurtalan 1999). Bruselloz, dünya genelinde ve Türkiye’de enfeksiyöz bir hastalık olarak önemli bir yere sahiptir. Sığırlarda ve koyunlarda atıklara, kısırılık ve sűt üretiminde azalmalara neden olmasından dolayı büyük ekonomik kayıplara sebep olan bu hastalık insanlara da bulaşarak halk sağlığı ve hayvan sağlığı yönünden tehlike oluşturmaktadır (Sümer ve ark 2003). Özellikle *B. melitensis* infeksiyonlarının oldukça sorunlu ve karmaşık durumda olduğu değerlendirilmektedir. Bunun nedeni uygulanan *B. abortus* S19 aşılarının *B. melitensis* infeksiyonlarına karşı koruyucu etkili olmaması ve *B. melitensis* Rev-1 aşılarının da sığırlarda kullanımının sonuçlarının ve değerlendirilmesinin tam anlamıyla bilinmemesi olduğu bildirilmektedir. Rev-1 aşısı ile yapılan aşı uygulamalarına rağmen, dünya çapında insanlarda görűlen Bruselloz’unun en önemli kaynağı *B. melitensis*’tir (Lopez-Merino, 1989). Bu çalışmada 2007-2014 tarihleri arasında Konya Eđitim Araştırma Hastanesinde Bruselloz tanısı konulmuş ve *Brucella spp.* izole edilen 113 suşun 94 adedinin *B. melitensis* (%83,19), 19 adedinin *B. abortus* (%16,81) olduğu bulundu. Yıllara göre *B. melitensis* dağılımına bakıldığında 2007 yılında %75; 2008 yılında %68,75; 2009 yılında %88,89; 2010 yılında %93,75; 2011 yılında %66,66; 2012 yılında %84,62; 2013 yılında %82,35; 2014 yılında %93,33 olduğu bulundu.

Brusellozis’de ortaya çıkan klinik belirtiler enfeksiyonun tanısında yeterli belirtiler vermez. Brusellozun kesin tanılanmasında, bakterinin izolasyon ve identifikasyonu ile molekűler metotları kapsayan direkt yöntemler ve serolojik ve alerjik testleri kapsayan indirekt yöntemlerden yararlanılabilir (Erganiş ve ark 1992, Arda ve ark 1997). Hastalığın teşhisinde, bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon yöntemi “altın standart” olarak görűlmektedir (Alton ve ark 1988).

*B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* türlerinin biyotip seviyesindeki fenotipe dayalı identifikasyonu 4 ana teste dayanmaktadır. Bu amaçla kullanılan testler, karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ihtiyacı, hidrojen sűlfid (H<sub>2</sub>S) üretimi, boya (tiyoin ve bazik fuksin) varlığında üreme ve monospesifik A ve M antiserumları ile aglütinasyondur (Alton ve ark 1988, Arda ve ark 1997, Corbel 1997, Garin-Bastuji ve ark 1998).

*Brucella spp.* gram olumsuz, sporsuz, hareketsiz ve kirpiksizdir. Küçük olmalarından dolayı moleküler titreşim hareketi nedeniyle yerlerinde titreşim görüntüsü verirler (Braunien hareket). İlk izolasyonlarında smooth koloniler oluşturdukları gözlenir. (Arda ve ark 1992, Baysal 1999, Yıldırıncı 1999, Bilgehan 2000, Sümerkan 2002, Chu ve Weyant 2003). Katalaz ve oksidaz pozitifler. Sitrat, İndol, Voges-Proskauer ve Metil Red testleri negatiftir (Arda ve ark 1997, Quinn ve ark 2002). İnkübasyonu takiben 48 saat sonrasında yüzeyden kabarık, şeffaf, konveks, parlak yüzeyli smooth koloni yapısı gösterirler (Holt ve ark 1994). Smooth koloni yapısı bozulmuş routh koloniler, monospesifik serum veya smooth *Brucella* fajları ile tiplendirilemezler. Bu nedenle tiplendirme kullanmak için smooth kolonilerin kullanılması gerekmektedir (Alton ve ark 1988). Bu çalışmada incelenen tüm izolatların koloni morfolojileri, nötral akriflavin ile aglütinasyon ve kristal violet ile boyama yöntemleri ile test edildi ve izolatların tamamının Smooth koloni olduğu belirlendi. Ayrıca bütün örneklerin gram negatif, hareketsiz, indol negatif, katalaz pozitif, oksidaz pozitif ve smooth koloni olduğu belirlendi.

Kükürt içeren aminoasitlerden H<sub>2</sub>S üretimleri değişken olmasına karşın *B. melitensis*'ler H<sub>2</sub>S negatiftir, *B. abortus*'lar pozitifdir (Buxton ve Fraser 1977, Alton ve ark 1988, Koneman ve ark 1992). *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* organik kükürtlü bileşiklerden H<sub>2</sub>S oluştururlar. *B. suis* 3 ila 5 gün içerisinde ve en fazla miktarda, *B. abortus* 2 günde ve orta miktarda, *B. melitensis* ise bir günde ve en az miktarda H<sub>2</sub>S üretir (Bilgehan 2000). Bazen H<sub>2</sub>S üretimini kodlayan genlerde oluşacak mutasyonlar sonucu, bu test yönünden atipik suşlar oluşabileceği bildirilmektedir (Alton ve ark 1988). Bu çalışmada 113 numunenin 5 günlük inkübasyon sonrası 94 adedinde H<sub>2</sub>S üretimi gözlenmezken 19 adet suшта H<sub>2</sub>S üretimi gözlemlendi. H<sub>2</sub>S üretimi gösteren suşların PZR işlemi sonrasında *B. abortus* olduğu belirlendi.

*B. melitensis* Rev-1 streptomisine (2,5 µg/ml) dirençli iken diğer *B. melitensis*'ler duyarlıdır (Alton ve ark 1988). *B. melitensis* Rev-1 aşısı suşunun streptomisine direncinin, rpsL gen bölgesinde bulunan 91. kodondaki (kodon 91: CCG yerine CTG) mutasyondan kaynaklandığı belirlenmiştir (Cloeckaert ve ark 2002b). Streptomisin duyarlılık testleri aşısı ve saha suşlarının ayırımında kullanılmaktadır (Alton ve ark 1988). Lucero ve ark (2006), Arjantin'de insanlardan

izole ettikleri 9 adet atipik *B. melitensis* biyotip 1 suşunun, penisilin, tiyonin, bazik fuksin ve safranin O duyarlılığı ve küçük koloni morfolojileri ile *B. melitensis* Rev-1 aşısı suşuna benzediklerini fakat streptomisin (2.5 mg/ml) varlığında inhibe olduklarını bildirmişler ve bu suşların *B. melitensis*'in yeni mutant varyantları olduklarını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada 113 numune ve SÜVF stok koleksiyonundan alına 3 adet suşun streptomycin duyarlılıkları değerlendirildi. SÜVF stoklarından alınan 1 adet *B. melitensis* streptomycine dirençli iken diğer bütün suşların streptomycine duyarlı olduğu belirlendi. Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan *B. melitensis* izolatlarının aşısı suşu olmadığı, saha suşu olduğu düşünüldü.

*Brucella* türleri ilk izolasyonda kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Bakteriler et özütü, triptoz gibi kompleks pepton, glikoz ve tuz içeren besi yerlerinde daha iyi üreme gösterirler (Gürler 1990). Bakteriler kemoorganotroftur ve birçok tür kompleks aminoasit içeren besiyerlerine ihtiyaç gösterir. Üremelerinde esansiyel olan maddeler nikotinik asit, tiyamin, magnezyum iyonları, niyasin, vitaminler ve biyotindir (Gürler 1990, Moyer ve ark 1991, Mayc ve Weyant 2003). Besiyerinde kan ve serum varlığı üreme üzerine olumlu etki yapar (Holt ve ark 1994). Bu çalışmada serum ihtiva eden SDA ve serum içermeyen TSA'ya yapılan ekimler sonucunda bütün agarlarda üreme gözlemlendi. Ancak serum ihtiva eden agarlarda üremelerin daha önce başladığı gözlemlendi. Üremede serum gereksinmesinin zorunlu olmadığı ancak üremeyi destelediği ortaya konulmuştur.

Üreaz, CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi, bazik fuksin ve tiyonin mavisi boyalarına karşı duyarlılık türlere göre değişkenlik gösterir. Bazik fuksin ve tiyonin mavisi boyalarına karşı duyarlılık biyovaryantların belirlenmesinde kullanılabilir. *B. melitensis* besiyerine belirli konsantrasyonda eklenen thionin, bazik fuksin, kristal viyole ve pironin gibi boyalar karşısında inhibisyona uğramaz. Ancak thionin varlığında *B. abortus* inhibe olur. *B. suis* ise bazik fuksin, kristal viyole, pironin varlığında inhibe olurken thionin varlığından etkilenmez ve üremesine devam eder (Bilgehan 2000). Boya duyarlılık testleri için bazik fuksin, tiyonin ve safranin O içeren besiyerleri kullanılır (Alton ve ark 1988). Corbel (1997), 1980-1986 yılları arasında Avrupa, Asya, Afrika ile Güney ve Orta Amerika ülkelerinden Weybridge Merkez Veteriner Laboratuvarına gönderilen 500 adet *B. melitensis* suşunu biyotiplendirmiş ve 29 tanesinin boya duyarlılık testlerine göre atipik *B. melitensis*

suşu olduğunu rapor etmiştir. Araştırmacı, *B. melitensis*'in 3 biyotipinden de atipik suşların bulunduğunu ve atipik *B. melitensis* suşlarının tamamının bazik fuksin (20 µg/ml) ve safranin O (200 µg/ml) varlığında ürediğini fakat tiyonine (20 µg/ml) duyarlı olduklarını bildirmiştir. Ayrıca, tiyonine duyarlı bu atipik suşların mevcut sınıflandırmaya uymadığını ve klasifikasyon sisteminin modifikasyon gerektirdiğini bildirmiştir.

Üreaz etkinliği için üre besiyerine ekim yapılmakta ve renk değişikliği saatlik olarak gözlenmektedir. Pembe rengin oluşması üreazın pozitif olduğunu göstermektedir (Bilgehan 2000). *B. melitensis* de üreaz 24 saat içerisinde pozitif olurken, *B. abortus*'da 1-2 saat içerisinde pozitiflik görülür (Al Dahouk 2003a). Bu çalışmada kullanılan 113 izolatın saatlik üreaz aktiviteleri değerlendirildi. Toplam 40 numune ilk 2 saat içerisinde üreaz aktivitesi gösterirken diğer 73 suş ise üreaz aktivitesini 2-24 saat içerisinde gösterdiği, testin özgüllüğünün *B. melitensis* ve *B. abortus*'u ayırt etmek için % 77,66 olduğu belirlendi. PZR sonuçları ile karşılaştırıldığında 19 adet *B. abortus* suşunun ilk 2 saat içerisinde üreaz aktivitesi gösterdiği, testin özgüllüğünün *B. abotus* için % 100 olduğu belirlendi.

*B. suis* ve *B. abortus* üreyebilmek için ilk izolasyonda %5-10 CO<sub>2</sub>'li atmosfere ihtiyaç gösterir (Sümerkan 2002). *B. abortus* ilk izolasyonda gayet yavaş üreme gösterir (Gürler 1990). Birsonraki pasajlarda ise aerop etüvde üreme gösterir. *B. melitensis* CO<sub>2</sub> ihtiyacı göstermez (Bilgehan 2000). Bakteri zorunlu anaerop şartlar altında üremez (Gürler 1990). En uygun üreme ısısı 37°C isede 20 ila 40°C'ye kadar geniş bir ısı aralığında üreme gösterir (Holt ve ark 1994, Mayc ve Weyant 2003). Bu çalışmada ikişer adet yatık TSA tüpüne yapılan eş zamanlı ekimlerden birisi normal etüve, diğeri % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüve kaldırıldı. Tüpler 37°C de 2-3 gün inkübe edilip üremeler karşılaştırıldı. SÜVF kültür koleksiyonundan alınan 3 adet suş her iki ortamda da üredi. 113 suşdan tamamı CO<sub>2</sub> li ortamda üreme gösterirken; 22 izolatta normal etüvde üreme göstermedi. PZR sonuçları ile karşılaştırıldığında CO<sub>2</sub> ihtiyacı gösteren 22 izolattan 19 tanesinin *B. abortus* olduğu belirlendi. Testin sensitivitesi % 96,81, spesifitesi % 100 olarak değerlendirildi. Sensitivitedeki düşmenin ekim hataları, üremedeki gecikme gibi nedenlerden dolayı olabileceği düşünüldü. Kültür koleksiyonundan alınan bir adet *B. abortus* suşunun

her iki ortamda da üreme göstermesi birçok pasaj geçiren suşlar için normal olarak değerlendirildi.

C-NMRN yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, *B. melitensis* biyotip 1-16M (M+), biyotip 2-63/7 (A+), biyotip 3-Ether (A+,M+) ve *B. abortus* biyotip 1 (A+) suşları analiz edilmiş ve taşıdıkları M antijen miktarı sırasıyla 2.08, 0.016, 0.38 ve 0.005 mg, A antijen miktarı 0.005, 2.62, 2.39 ve 1.38 mg olarak bulunmuştur (Meikle ve ark 1989). S forma sahip *Brucella* türleri her iki Anti-A ve Anti-M antiserumu ile tek tek veya her iki antiserumla pozitiflik verebilir(Alton ve ark 1988).

Smooth koloni oluşturan *Brucella* suşları *E.coli* O:116, O:157, *Salmonella* grup N (0:30), *Vibrio cholera*, *Pseudomonas maltophilia*, ve *Yersinia enterocolitica* O:9 ile serolojik olarak çapraz reaksiyon gösterebilir. Kullanılan tanı testleri *Brucella spp.*'nin SLPS antijeni ile çapraz reaksiyon vermesi sonucu yanlış pozitiflik olarak değerlendirilir (Timoney ve ark 1988, Quinn ve ark 2000).

Bu çalışmada kullanılan referans suşlardan, boya içeren besiyerlerinde üreme yönünden beklenen reaksiyonlar alındı. Çalışmaya konu olan diğer suşlar da ise Tiyonin içeren besiyerlerinde ki üreme sonuçları PZR sonuçları ile karşılaştırıldığında *B. melitensis* suşlarının tamamında üreme gözlenirken, *B. abortus* suşlarında tiyoninli besiyerinde üç numunede üreme gözlendi. Testin *B. melitensis* ve *B. abortus* suşlarını ayırt edebilme özgüllüğü % 84,21 olarak hesaplandı. Sonuçlar Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında PZR sonucu *B. abortus* olarak değerlendirilen 19 adet suşdan 496781, 28781, 11538 protokol numaralı suşlar biyotip 3; 7823, 11559, 5648, 61713 protokol numaralı suşlar biyotip 2; diğer 12 suş ise biyotip 1 olarak değerlendirildi. PZR sonucu *B. melitensis* olarak değerlendirilen 94 adet suşun boya varlığında üreme ve Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon sonuçları karşılaştırıldığında 27461, 46579, 11678, 30683, 33950, 12180, 66122, 72145, 61820, 1827, 31975, 3125806 protokol numaralı suşlar biyotip 1 diğer 82 adet suş ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada değerlendirilen 113 izolatın CO<sub>2</sub> li ortamda üreme, üreaz üretimi, H<sub>2</sub>S üretimi, Tiyonin ve fuksin varlığında üreme, Anti-A ve Anti-M serumları ile aglütinasyon sonuçları PZR sonuçları ile karşılaştırıldığında H<sub>2</sub>S

üretimi ile tiplendirme verileri en güvenilir olarak görüldü. Ancak kimyasal analizler yapılırken testlerin uzun zaman alması, *Brucella spp.* numunelerinin üremelerinin geç olması, biyogüvenlik şartlarının risk taşıması, CO<sub>2</sub> li ortamda üreme verilerinin 2 ekimden sonra sonuç değiştirmesi, testlerin tamamıyla testi uygulayan kişinin genel laboratuvar becerilerine dayalı olması testler açısından olumsuzluklar oluşturmaktadır. Ayrıca bütün uygulana test sonuçlarının mutlaka PZR sonucu ile birlikte değerlendirilmesi sonuçların güvenilirliği açısından daha olumlu olarak değerlendirildi.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmaya dahil edilen toplam 113 *Brusella spp.* izolatından 94'ü *B. melitensis*, 19'u *B. abortus* olarak değerlendirildi ve izolatlar arasında yaygın olarak görülen suşun *B. melitensis* olduğu gözlemlendi.

Bakteri kültürlerinin uygun besi yerlerinde yapılması üremenin değerlendirilmesi ve tiplendirmenin doğru yapılabilmesi açısından önem arz etmektedir. Kimyasal testler ile tiplendirme yapılabilmesi için ilk izolasyon değerlendirme sonuçları çok önemlidir. Çünkü smooth *Brucella* türleri üreme süresince dissosiyeye olma eğilimindedirler. Bir kültürün koloni morfoljisindeki değişiklik, antijenitesi ve infektivitesinde değiştirmektedir. Özellikle aşı ve antijen üretiminde S kolonilerin seçimine dikkat edilmelidir. S-tipinde olmayan koloniler, monospesifik serum veya smooth *Brucella* fajları ile tiplendirilemediğinden, tiplendirme için smooth koloniler seçilmelidir. Bu çalışmada değerlendirilen 19 adet *B. abortus* suşu ilk ekimde üreme için CO<sub>2</sub> 'te ihtiyaç duyarken sonraki pasajlarda normal atmosfer şartlarında üremeye adapte olduğu gözlemlenmiştir. Sık pasajlama sonrası S kolonilerde R koloni dönüşümü gözlemlendi. R koloni oluşumu biyokimyasal testlerde farklı sonuçlara neden olmaktadır. Üreaz aktiviteleri değerlendirilirken 24 saat süre ile test sonuçlarının düzenli aralıklarla değerlendirilmelerinin yapılması gerekmektedir. H<sub>2</sub>S üretiminde günlük olarak kurşun asetatlı kağıtların değiştirilmesi gerekmektedir. İdentifikasyonda kullanılan bütün test yöntemleri ciddi enfeksiyon riski taşımaktadır. Bu nedenle testler uygulanırken biyogüvenlik yöntemlerinin mutlaka dikkat edilmelidir.

Streptomycin duyarlılıklarına bakıldığında bu suşların *B. melitensis* Rev 1 aşı suşu olmadığı izolatların tamamının saha suşu olduğu gösterildi.

Aşılama programlarındaki aksaklıklar hayvan ve dolayısı ile insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bruselloz tedavisi ciddi zaman, iş gücü ve maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle Brusellozis kontrol ve eradikasyon çalışmalarının aksatılmadan yürütülmesi gerekmekte; enfeksiyon varlığı, yaygın suş ve tiplendirmeye yönelik çalışmaların belirli aralıklarla yapılması gerekmektedir. Bruselloz gibi özellikle gıda kaynaklı bulaşma riski taşıyan bir hastalıkta tedavideki güçlükler bulaşma önleme yolunda çalışmaların hızlandırılmasını gerektirmektedir. Bu

amaçla yaygın suşun belirlenmesi ve buna yönelik koruyucu sağlık hizmetleri açısından tedbirlerin alınması, toplum sağlığının korunması açısından hayati önem arz etmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Akkaya L, Alişarlı M, Kara R, Telli R, 2008. Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Çiğ Süt ve Peynirlerde E. coli O157:H7 Varlığının Belirlenmesi. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi, 18(1), 1-5.
- Akova M, Gür D, Livermore D, Kocagöz T, Akalın HE, 1999. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against B.melitensis at neutral and acidic pHs. Antimicrob Agents Chemother, 43(5),1298-1300.
- Aktaş, O. 2003a. Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. Ankem Dergisi. 17: 336-339.-Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory based diagnosis of brucellosis:A review of the literature. Part I: Tecniques for direct detection and identification of Brucella ssp. Clin Lab, 49,487-505.
- Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D 2003a. Laboratory based diagnosis of brucellosis-A review of the literature. Part 1: Tecniques for direct detection and identification of Brucella ssp. Clin Lab, 49,487-505.
- Almuneff MA, Memish Z A, Balkhy HH, Alotaibi B, Algoda S, Abbas M 2004. Importance of screening household members of acute Brucellosis cases in endemic areas. Epidemiol Infect, 132, 533-40.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris. INRA, 1-155.
- Anonim 2006b. World Health Organization (WHO). Brucellosis in humans and animals. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Aragon V, Diaz R, Moreno E, Moriyon I, 1996. Characterization of Brucella abortus and B. melitensis native haptens as outer membrane o-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharite. J Bacteriol, 178 (4), 1070-1079.
- Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Leloğlu N, Kahraman M, Ilgaz A, Diker S 1997. Özel Mikrobiyoloji 4. Baskı. Ankara. Medisan Yayınevi, 110-125.
- Arimi SM, Koroti E, Kang'ethe EK, Omere AO, Mcdermott JJ 2005. Risk of infection with Brucella abortus and Escherichia coli O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. Acta Tropica, 96, 1-8.
- Arslan A 2002. Et Muayenesi ve Et Ürünleri Teknolojisi. Medipres Yayınları, Elazığ, 101-103.
- Aslantaş Ö, Yıldız P 2003. Kars ilinde çiğ sütlerden Listeria monocytogenes izolasyonu. FÜ Sağlık Bil Dergisi, 17 (1), 11-15.
- Atasoy FA, Türkoglu H, Özer BH 2003. Şanlıurfa ilinde üretilen ve satışa sunulan süt, yoğurt ve Urfa Peynirlerinin bazı mikrobiyolojik özellikleri. HR ÜZF Dergisi, 7 (3-4), 77-83.
- Aydın N, Erdeğer J, Yardımcı H 1988. Brucella mikroorganizmaları ile diğer mikroorganizmalar arasındaki antijenik ilişkiler. Uluslararası Brusellosis Sempozyumu, Özet Kitabı, 30, 18-29.
- Aydın, N, 2006. Brucella infeksiyonları. 145-163. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke-Emek Yayınları, Ankara. 332.
- Aygen B, Sümerkan B, Kardaş Y, Doğanay M, İnan M, 1995. Bruselloz: 183 olgunun değerlendirilmesi. Klimik Derg 8(1),13-16.
- Aygün O, Aslantaş Ö, Öner S, 2005. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese Journal of Food Engineering, 66, 401-404.
- Badur S, 1990. Brusellozda serolojik tanı ve seroepidemioloji. Klimik Dergisi, 3 (1), 17-20.
- Baldwin C, 1996. Pathogenesis of Brucellosis. Intracellular Bacterial Infections. Ed: Pechere E.J. First edit. Cambridge Med Pub, 87-92.
- Başak M, Gül S, Gözaydın M, Koçak N, Özsoy MF, Çankır Z, Yenen OŞ, Danacı M, 1997. Derin hemolitik anemi ile seyreden bir bruselloz olgusu. Klimik Derg 10(3), 152-154.

- Baysal B, 1999. *Brucella*. Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 572-577.
- Bilgehan H, 2000. Klinik Mikrobiyoloji. 10. Baskı, İzmir, Barış Yayınları 199-215.
- Bilgin M, Gün H, 1991. Bruselloz'un serolojik tanısında Elisa, standart tüp aglütinasyon ve Rose-Bengal plate testlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 5(3), 171-3.
- Blood DC, Radostitis OM, Arundel JH, Gay CC, 1989. A testbook of disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Veterinary medicine 7. ed. Bailliere., Tindall.
- Buddle MB, 1956. Studies on *Brucella ovis* n. Sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *Journal of Hygiene*, 54, 351-364.
- Bodur H, Balaban N, Aksaray S, 2003. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. *Scand J Infect Dis*, 35, 337-338.
- Boschiroli ML, Foulongne V, Ocallaghan D, 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, 4, 58-64.
- Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G, 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolisaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect and Immun*, 3945-3952.
- Bricker BJ, Halling SM, 1994. Differentiation of *brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *brucella melitensis*, *brucella ovis* and *brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*, 32 (11), 2660-2666.
- Bricker BJ, 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 90(1-4), 435-46.
- Bruce D, 1887. Not on the discovery of a microorganism in Malta fever. *practitioner*, 39,161-70.
- Bumin MA, 2002. Bruselloz'un serolojik tanısında Rose-Bengal testinin önemi. *Türk Hij Den Biyol Derg*.
- Buxton A, Fraser G, 1977. *Animal Microbiology volume 1*. First Edition. Edinburgh. Blackwell Scientific Publications, 133-141.
- Bundle DR, Cherwonogrodzky J, Meikle PJ, Gidney M, Perry M, Peters T, 1989. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 2829-2836.
- Buxton A, Fraser G, 1977. *Animal Microbiology volüm 1*. First Edition. Edinburgh Blackwell Scientific Publications, 133-141.
- Caporale V, Nannini D, Giovannini A, Morelli D, Ramasco M, 1992. Prophylaxis and control of Brucellosis due to *Brucella melitensis* in Italy: acquired and expected results. In: *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean countries. Proceedings of the International Seminar CIHEAM CEC, MINAG (Malta), FIS (Malta)*. Valletta: CIHEAM, 127-145.
- Caro-Hernandez P, Fernandez-Lago L, de Miguel M, Martin-Martin AI, Cloeckaert A, Grillo M, Vizcaino N, 2007. role of the omp25/omp31 family in outer membrane properties and virulence of *brucella ovis*, *Infect Immun*, 75 (8): 4050-4061. -461.
- Carrera A, Rodriguez MJL, Sapina AM, Lafuente AL, Sacristan ARB, 2006. Probable Transmission of Brucellosis by Breast Milk. *J Trop Pediatr*, 52 (5), 380-381.
- Castrucci G, 2000. *Brucella melitensis* infection. Gn: WB Martin, ID Aitken, editors. *Diseases of Sheep*, Third Edition. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications; p. 114-119.
- Cesur S, Çapar Y, Demir P, Kurt H, Sözen TH, Tekeli E, 2002. Brusella orşiti: dört olgunun incelenmesi. *Klimik Derg*, 15(1),22-24.
- Chu MC, Weyant RS, 2003. *Francisella and Brucella*. Murray PR (Ed). *Manuel of Clinical Microbiology*, 8th Edition, Volume 1, ASM Pres Washington, D.C, 797-805.
- Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, 2002b. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev-1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. *Vaccine*, 20, 2546-2550.
- Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt SM, 1999. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6, 627-629.

- Coppola N, 2001. New diagnostic frontiers in brucellosis, *Infez Med*, 9-130.
- Corbel MJ. 1989. Microbiology of the genus *Brucella*. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. In: Young EJ, Corbel MJ, (Eds.). Florida, USA: CRC Pres, Inc., Boca Raton, 54-67.
- Corbel MJ, 1997a. Recent advances in Brucellosis. *J Med Microbiol*, 46: 101-103.
- Çelebi, S, 2003. Brucellozun Epidemiyolojisi. *Ankem Dergisi*, 3, 340-343.
- Çokça F. Tetrasiklinler. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, 2002 (Editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 245-248.
- De Lay J, Mannheim W, Segers P, Lievens A, Denijin M, Vanhoucke M, Gillis M, 1987. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *Int J Syst Bacteriol*, 37, 35-42.
- Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF, 1990. Entry and intracellüler localization of *Brucella* spp. In vero cells: Fluorescence and electron microscopy. *Vet Pathol*, 27,317-328.
- Deyoe BL, Dorsey TA, Meredith KB, 1979. Effect of reduced dosages of *B. abortus* S19 in cattle vaccinated as yearlings in proceedings 83 rd Annula meeting, Us Animal Health Assiciation.
- Diaz R, Garatea P, Jones LM, Moriyon I, 1979. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J Clin Microbiol*, 10, 37-41.
- Diker S, istanbulluoğlu E, Ayhan H, Soysal G, 1984. Bursa bölgesindeki insanlarda *Brucella canis* enfeksiyonları üzerinde serolojik bir inceleme. *Mikrobiyol Bült*, 18 (4), 203–207.
- Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ, 1984. Porins of brucella species. *Infect Immun*, 44 (1), 16-21.
- Doğanay M, Aygen B, Eşel D 2001. Brucellosis deu to blood transfusion. *J Hosp Infect*, 49, 151-152.
- Dubos JR, Hirsch GJ, 1965. *Bacterial And Mycotic Infections Of Man*. Fourth Edition, JB Lippincott Company, Philadelphia, Toronto, 698-723.
- Erganiş O, Kaya O, Güler L, Kenar B, 1992. Koyun Brucellosis'inin sahada koaglutinasyon testi ile teşhisi. *Veterinarium*, 3 (1), 11-13.
- Erganiş O, Kaya O, Hadimli HH and Güler L, 2002. Rapid diagnosis of ovine Brusella, *Camplobacter* and *Salmonella* infections from fetal stomach contents by coagglutination test. *Small Ruminant Research*, 45, 123-127.
- Erganiş O, Ok Ü, Hadimli HH, Güler L ve Türütoğlu H, 1995. Koyunların *Brusella*, *Klamidya* ve toksoplazma enfeksiyonlarının eia (ımmun comb) testi ile teşhisi üzerinde karşılaştırmalı bir çalışma, 9. Kükem Kongresi.
- Eroğlu M. Türkiye'deki Bruselloz tipleri. Uluslararası Brucellosis Sempozyumu, 18-20 Ekim 1988. Pendik Hayvan Hast. Merk. Araştırma Enst, 9,28-35.
- Erol İ1997. Gıda Kaynaklı *Brucella* İnfeksiyonlarının Halk Sağlığı Yönünden Önemi. *Üretim*, 3(4), 33-37.
- Erol S, 2003. Rifampisin. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 417-421.
- Ertem M, Kürekçi AE, Aysev D, Ünal E, İkincioğulları A, 2000. Brucellosis Transmitted by Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transp*, 26, 225-226.
- Eşel D, Sümerkan B, Ayangil D, Telli M, 2004. *Brucella melitensis* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde agar dilüsyon ve e-test yöntemlerinin karşılaştırılması. *Ankem Dergisi*, 18(4), 196-199.
- Ficht TA, Hussein HS, Derr J, Bearden S W, 1996. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. *Int J Syst Bacteriol*, 46(1),329-331.
- Fiori PL, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P, 2000. *Brucella abortus* Infection Acquired in Microbiology Laboratories. *J of Cli Mic*, 2005- 2006.

- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A, 2007. *Brucella ceti* sp.nov. and *Brucella pinnipedialis* sp.nov. for *Brucella* strains with cateceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57,2688-2693.
- Garcia- Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujillano I, Garcia Sanchez E, Garcia Garcia MI, Fresnadillo MJ, 1995. Susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to clinafloxacin and four other new fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(5),1194-1195.
- Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger JM, 1998. *Brucella Melitensis* Infection in Sheep:Present and Future. *Vet Res*, 29, 255-274.
- Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marin C, Albert D, 2005. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. 6th International Sheep Veterinary Congress, Abstract Book, 61.
- Garrido-Abellan F, Duran-Ferrer M, MacMillan A, Minas A, Nicoletti P, Vecchi G, 2001. Brucellosis in sheep and goats. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 12 July 2001, European Commission.
- Godfroid, J., Scholz, H.C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A.M., Cloeckaert, A., Blasco, J.M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J.B., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Letesson, J, 2011. Brucellosis at the animal /ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century, *Preventive Veterinary Medicine*, 102, 118-131.
- Godfroid F, Taminau B, Danese I, Denoel I, Tibor A, Weynants V, 1998 et al. Identification of the perosamine synthetase gene of *B. melitensis* 16M and Involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infec Immun*, 5485-5493.
- Golem SB, 1943. Memleketimizdeki insan ve ehli hayvanlarda *Brucella* bakımından serolojik araştırma, *Türk Hıfzısıha ve Tecr. Biol Mec*, 1,105-116.
- Gotuzzo E, Carrillo C, 1998. *Brucella Infectious Diseases*, 2. Baskı, WB Saunders Company, Philadelphia, 1837.
- Göktaş P, Sümer S, Oktay G, 1991. Bruselloz tanısında iki testin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 21 (2),199-203.
- Göktaş P, 1990. Bruselloz'da serolojik yanıtın seyri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 20,199-203.
- Gönç S, Kılıç S, 2000. Beyaz peynirde *Listeria monocytogenes* aranması üzerinde bir araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37(1), 105-111.
- Gupta VK, Verma DK, Singh SV, Vihan VS, 2007. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *B. melitensis* in goat and sheep Brucellosis. *Small Ruminant Research*, 70 (2-3), 260-266.
- Güler L, Gündüz K, Baysal T, 1998. Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne getirilen atık materyallerinin bakteriyolojik ve serolojik muayene sonuçlarının değerlendirilmesi. *Veterinarium*. 9 (1), 3-10.
- Gürler N, 1990. Brusellozda bakteriyolojik tanı yöntemleri. *Klimik Dergisi* 3(1),21.
- Hagan W, 1973. The animal reservoirs of brucellosis, *Cornell Veterinarian* 26-14.
- Halling SM, 2003. Comparison of the genomic sequences of *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus* biovars: structure and pseudogenes. *Brucellosis 2003 International Research Conference, Abstract Book*, 44.
- Hatipoğlu ÇA, Kınıklı S, Tülek N, Koruk ST, Arslan S, Ertem GT, Koruk İ, Demiröz AP, 2005. Bir eğitim hastanesinin infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniğinde izlenen 202 Bruselloz olgusunun epidemiyolojik verilerinin irdelenmesi. *Klimik Dergisi* 18 (3), 94-98.
- Hayaloğlu AA, Kirbağ S, 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kufllu cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 376-380.
- Haziroğlu R, Milli ÜH, 2001. *Veteriner Patoloji Cilt 2*, Medipress. Ankara 248-253.
- Heper Y, Yılmaz E, Akalın H, Mıstık R, Helvacı S, 2004. Nörobruselloz: 9 olgunun irdelenmesi. *Klimik Derg;* 17(2),99-102.

- Hewitt WG, Dayne DJH, 1984. Estimation of IgG and IgM Brucella antibodies in infected and noninfected persons by a radioimmune technique. *J. Clin Pathol*, 37,692-6.
- Holt J, Sneath P, Williams S, Krieg NR, Staley JT, 1994. *Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Maryland: William&Wilkins, 137-138.
- Hoover, DL, Friedlander, AM, 1997. Brucellosis. 513-521. *Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Ed: Zajtchuk, R. US Department of the Army, Surgeon General, and the Borden Institute. Washington D.C. 691.
- Hughes ML, 1897. *Mediterrian, Malta or undalant fever*. Macmillan:London.
- Hussain SM, Akhtar M, Ueno Y, Al-Sibai MB, 1989. Susceptibility of *B. melitensis* to fluoroquinolones. *Drugs Exptl Clin Res*, 15(10), 483-485.
- Irmak H, 2010. Brusellozisin kontrolü amacıyla Sağlık Bakanlığınca yapılan çalışmalar. III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Ankara. 54-58.
- Jahans KL, Foster G, Broughton ES, 1997. The characterisation of Brucella strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol*, 57, 373-382.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, 1991. *Pathology of Domestic Animals 4. Edition Vol:3*, Academic pres. INC., ABD.
- Kaya O, Erganiş O, Güler L, Hadimli HH, 1995. Koyunlarda atıklara sebep olan Brucella, Campylobacter ve Salmonella'ların teşhisi için bakteriyolojik muayene ve koaglutinasyon tekniğinin karşılaştırılması. *Veterinarium*, 6, 40-43.
- Kaya S, 2006. Bruselloz ve Tedavi Sorunu. *İnfeksiyon Dergisi*, 20(3), 227-230.
- Kaynar Z, Kaynar P, Koçak Ç, 2005. Ankara piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kalitelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 62(1,2,3), 1-10.
- Kenar B, Erganiş O, Kaya O, Güler E, 1990. Konya Bölgesinde koyunlarda atıklara sebep olan Brucella, Campylobacter, Salmonella ve Chlamydia'ların bakteriyolojik ve serolojik incelenmesi. *Veterinarium*, 1 (1), 17-20.
- Kittelberger R, Hansen M, Ross GP, 1994. A sensitive immunoblotting tecnique for the serodiagnosis of Brucella ovis infections. *J Vet Diagn Invest*, 6(2), 188-94.
- Kocabeyoğlu Ö, Koşan E, Öztürkeri H, Emekdaş G, Yılmaz M, Durgun T, 1994. Bruselloz tanısında çeşitli testlerin birlikte uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Der* 24,30-33.
- Kocagöz S, Akova M, Altun B, Gür D, Haşçelik G, 2002. In vitro activities of new quinolones against *B. melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2,240-242.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Win WC, 1992. *Colour atlas and texbook of diagnostic microbiology*. 4. Ed. Philadelphia. JB Lippincott Co, 334-349.
- Kurşun Ö, Güner A, Kırdar SS, Akcan-Kale AS, 2005. Burdur'da Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, 799-802. *Microbiol*, 8, 60-66.
- Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP, 2005. Brucella lipopolysaccaride acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 8, 60-66.
- Leal-Klevezas DS, Martinez-de-la-Vega O, Ramirez-Barba EJ, Osterman B, Martinez-Soriano JP, Simpson J, 2005. Genotyping of Ochrobactrum spp. by AFLP analysis. *J Bacteriol*, 187, 2537-2539.
- Leblebicioğlu H, 2003. Parenteral Sefalosporinler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). *Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 375-378.
- Lopez-Merino A, 1998. Brucellosis como una zoonosis de interes an Mexico.En: *Memoriala III foro National of Brucellosis*. Acapulco, Gro. Mexico, 53-62.
- Lubani M, Sharda D, Helin I, 1988. Probable transmission of brucellosis from breast milk to a newborn. *Tropical and Geographical Medicine*, 40(2), 151-152.

- Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Grayson M and Jacques I, 2006. A new variant of *Brucella melitensis*, *Clinical Microbiology and Infection*, 12(6), 593-596.
- Manthei CA, 1968. Brucellosis as a Cause of Abortion Today. In: LC Faulkner, editor. *Abortion Diseases of Livestock*. Illinois: Charles C Thomas Publisher, 80-94.
- Mantur BG, Amarnath, SK, Shinde RS, 2007. Review of Clinical and Laboratory Features of Human Brucellosis. *Ind J of Med Mic*, 25(3), 188-202.
- Mantur BG, Mangalgi SS, Mulimani M, 1996. *Brucella melitensis*: Asexually transmissible agent. *Lancet*, 347, 1763.
- Marin CM, Alabart JL, Blasco JM, 1996. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B.abortus*, *B.melitensis* and *B.ovis*, *J Clin Microbiol* 34:426.
- Marquis H, Ficht TH, 1993. The *omp2* gene locus of *brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect Immun*, 61 (9), 3785-3790.
- Marston JA, 1861. Report on fever (Malta) Great Britain Army Med Dept Rep, 3,486.
- Martinez JEL, Teran CM, 2002. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Mic*, 90, 19–30
- Massis F, Girolamo A, Petrini A, Pizzigallo E, Giovannini A, 2005. Correlation between animal and human Brucellosis in Italy during the period 1997– 2002. *Clin Microbiol Infect*, 11, 632–636.
- Mayc CHV, Weyant R, 2003. Francisella and Brucella. In; Murray R.P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover BC, (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology* 8 th ed. Herndon: Washington, DC, 797-808.
- Meikle PJ, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Bundle DR, 1989. Fine structure of A and M antigens from *brucella* biovars. *Infect Immun*, 57 (9), 2820-2828.
- Meyer KF, Shaw EB, 1920. Comparison of morphologic, cultural and biochemical characteristics of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: Studies on genus *Brucella* Nov. Gen. 1. *Infect Dis*, 27, 173-84.
- Meyer ME, 1990. Evolutionary development and taxonomy of the genus *Brucella*, “Adams LG (eds): *Advances in Brucellosis Research*” *kitabinda s. 12*.
- Meyer, M.E. 1990. *Brucella*. *Diagnostic Procedures in Veterinary*, 85-91.
- Mikolich DJ, Boyce JM, 1990. *Brucella* species In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Edited by Mandell, Douglas, Bennett. 3rd edition Churchill Livingstone 1735-41.
- Morata P, Queipo-Ortuno MI, Requera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, Colmenero JD, 2001. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis, *J Clin Microbiol*, 39-3743.
- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H, 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the Alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol*, 172 (7), 3569-3576.
- Moreno E, 2002. Brucellosis in Central America. *Vet Mic*, 90: 31–38.
- Moriyon I, Lopez-Goni I, 1998. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl Microbiol*, 1, 19-26.
- Moyer NP, Holcomb LA, Hausler WJ. *Brucella*. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, 1991. *Manuel of Clinical Microbiology*. 5 th ed. Atlanta, Georgia: Massachusetts, 457.
- Navarro E, Escribano J; Fernandez J, Solera J, 2002. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples, *FEMS Immunol Med Microbiol* 34-147.
- Nicoletti P, 2002. A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90, 5-9.
- Nicoletti, P, 1977. Adult vaccination in Crawford RP, Hidalgo RS (ed): *Bovine brucellosis-An International symposium*. College Station, Texas A.M. University Press. 201-208.
- Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Balsevicius S, Basse J, Nicoletti P, Kelly W, 1996. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine Brucellosis, *Prev Vet Med*, 26, 17-32.

- Nielsen KH, Wright PF, Kelly WA, 1988. A review of Enzyme Immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in Cattle Veterinary Immunology and Immunopathology, 18, 331-47.
- Özsan K, 1990. Brusellozisin tarihçe ve etyolojisi. XXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları.
- Özsoy- Hitit G, Özyürek SÇ, Karagül E, 2005. *Brucella melitensis*'in neden olduğu bir prostetik kapak endokarditi olgusu. Klimik Derg, 18(2), 75-76.
- Palmer DA, Douglas JT, 1989. Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. J Clin Microbiol, 27 (10), 2331-2337.
- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV, 2006. The new global map of human Brucellosis. Lancet Infect Dis, 6, 91-99.
- Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, Grayon M, Verger JM, De Bolle X, Lakey JH, Letesson JJ, Cloeckaert A, 2001. Molecular, antigenic and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. Jour of Bac, 183, 4839-4847.
- Parlak M, 2003. Tetrasiklinler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2003, 375-378.
- Plommet M, Diaz R, Verger JM, 1998. Brucellosis, In: SR Palmer, L Soulsby, DIH Simpson, editors, Zoonoses. 3th ed. Oxford: Oxford University Press, 23-35.
- Poester FP, Goncalves VSP, Lage AP, 2002. Brucellosis in Brazil, Vet Mic, 90, 55-62.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR, 2000. Clinical Veterinary Microbiology, Mosby, Edinburgh, 261- 267.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC Leonard FC, 2002. Veterinary microbiology and microbial disease, Forth Edition, London, Blackwell Science, 162-167.
- Renner DE, Hausler JW, 1980. *Brucella*. Balow A, Hausler WJ, Traut JP, Lennette HE (Eds). Manual Of Clinical Microbiology. Third Edition, American Society For Microbiology, Washington DC, 325-329.
- Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M, 2002. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/ eradication of Brucellosis in India. Vet Mic, 90, 183-195.
- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamanstein L, Joseph G, 1991. et al. In vitro susceptibility of *B. melitensis* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother, 1925-1927.
- Saz JV, Bertran M, Agulla A, 1987. et al. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Brucellosis. Eur J Clin Microbiol, 6, 71-3.
- Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Flèche PL, Whatmore AM, Al Dahouk S, Krüger M, Lodri C, Pfeffer M, 2008b. Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerging Infectious Diseases, 14 (8), 1316-1317.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedláek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn E, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ. Nöckler K, 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol, 58, 375-382.
- Serter D, Dereli D, Çavuşoğlu C, Kabalak T, 2000. Epididimo-Orşit ve tiroidit komplikasyonları ile seyreden bir bruselloz olgusu. Türk Mikrobiol Cem Derg, 23, 151-152.
- Seshadri R, Paulsen I, 2003. Genome comparisons of three *Brucella* species: *B. suis*, *B. melitensis* and *B. ovis*. Brucellosis 2003 International Research Conference, Abstract Book, 84
- Sırmatel F, Özgöztaş O, Baydar İ, 1993. Cilt döküntüsü ile seyreden bir bruselloz olgusu. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 23, 12-14.
- Solera J, Martinez- Alfaro E, Espinosa A, 1997. Recognition and optimum treatment of brucellosis, Drugs, 53(2), 245-256.
- Sözen TH. Bruselloz. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, 2002. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. 2 baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 636-642.

- Sözen TH. Bruselloz. Wilke A, Söyletir G, Doğanay M, 1996. İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 486-491.
- Stoenner HG and Lackman DB, 1957. A new species of Brucella isolated from the desert wood rat, *Neotomae lepida* Thomas. American Journal of Veterinary Research, 18, 947-951.
- Sümer H, Sümer Z, Alim A, Nur N, Özdemir L, 2003. Seroprevalence of Brucella in an Elderly Population in Mid-Anatolia, Turkey. J Health Popul Nutr, 21(2), 158-161.
- Sümerkan B. Brusella türleri. Willke A, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler), 2002. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1647-1652.
- Şenel Ş, Yamazhan T, Gökengin D, 2004. Akut prostatit ile seyreden seronegatif bir bruselloz olgusu. Klimik Derg, 17(3), 209-210.
- Tanakol R, Tanakol M, Aral O, Alpan H, 1990. Lökomotor sistem tutulması görülen bruselloz olgularının tedavisinde streptomisin ve tetrasiklin ile rifampin ve tetrasiklin uygulamasının karşılaştırılması. Klimik Derg , 3(1), 30-32.
- Taşçı F, 2004. Gıda Kaynaklı Brucellosis ve Önemi.Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med. 1-23, 137-142.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE, 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8 th edition, Cornell University Press, London, page 135- 152.
- Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, 1999. İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 486-491.
- Trujillo IZ, Zavala AN, Cacares JG, Miranda CQ, 1994. Brucellosis. Infect Dis Clin North Amr, 8, 225-241.
- Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaides F, Tselentis Y, 2006. In vitro susceptibilities of *B.melitensis* isolates to eleven antibiotics. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 5-24.
- Türkçapar N, Kurt H. Bruselloz. Uzun Ö, Ünal S (Editörler), 2002. Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları. 2. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 1015-1024.
- Türütöğlü H, Mutluer B, Uysal Y, 2003. Burdur Yöresinde toplanan sütlerin Brucella infeksiyonu yönünden araştırılması. Turk J Vet Anim Sci, 27, 1003-1009.
- Ugalde RA, 1999. Intracelluler lifestyle of Brucella spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens and endosymbionts. Microbes and Infec, 1, 1211-1219.
- Uysal Y, Erdenliş S, 2001 Hayvanlarda Brucellosis'in İzlenmesi, Önlenmesi ve Kontrolü.
- Velasco J, Diaz R, Grillo MJ, Barberan M, Marín C, Blosco JM, Moriyon I, 1997. antibody and delayed type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough Brucella spp. Clin Diagn Lab Immunol, 4, 279-284.
- WHO, 1986 Weekly Epidemiological Record.No:45,Nov.
- Wilfert CM, 1992. Brucella İn: Zinsser Microbiology Edited by: Joklik WK. 20th edition Appleton and Lange Connecticut, 609-14.
- Willke TA, 2003. Aminoglikozitler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, (Editörler). Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 313-323.
- Wright AE, Smith F, 1897. On the application of the serum test to the diferantial diagnosis of typhoid fever and Malta fever. Lancet, 1,656-9.
- Yao JCD, Moellering A, 2003. Antimicrobial agents. In: Murray RP, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Robert HY, (Eds.). Manuel of Clinical Microbiology 8 th ed. Herndon: Washington, DC, 1041-1060.
- Yavuz AS, Adalet K, Rasim B, Dilmener M, Çalangu S, 1991. Brucella karditi: bir vaka bildirisi. Klimik Derg, 4(1), 36-37.
- Yıldırıncı G, 1993. İstanbul piyasasında satışa sunulan tulum peynirlerinde Brucella etkenlerinin mevcudiyeti üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul.



- Young E. 2006. *Brucella* spp. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley&Sons Ltd., England, 604,265-71
- Young EJ, 1995. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (Eds.). Principles and Practice of Infectious Diseases. 4 th ed. New York: Churcill Livingstone Inc. 2053-2060.
- Young EJ, 2005. *Brucella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious disease. 6 th ed. Philadlphia:Churchill Livingstone, 2669-72.
- Young EJ, 1991. Serologic diagnosis of human Brucellosis. Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev Infec Dis, 13,359-372
- Young EJ, 2000. Induction of protection, antibodies and cell mediated immune responses by *Brucella abortus* strain RB51, *Ochrobactrum anthropi* and recombinants thereof. Doktora Tezi, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Yurtalan S, 1999. Türkiye’de *Brucella abortus* hastalığı kontrolünün ekonomik önemi. Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez AraGturma Enstitüsü Dergisi, 30, 35-41.
- Yüce A. Çavuş SA, 2006. Türkiye’de Bruselloz: Genel Bakış. Klimik Dergisi, 19(3), 87-97.
- Zammit T. 1905. Report of the Commission on Mediterrianean fever, part 3. Harrison and Sons, London, .83.

## **7. EKLER**

### **EK A: Etik Kurul Kararı**

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2004 yılında GATA HYO’dan mezun oldu ve aynı yıl GATA TIP Fakültesi Hastanesinde göreve başladı. Evli ve iki çocuk annesidir. Halen Konya Asker Hastanesinde görev yapmaktadır.