

**T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE SATIŞA SUNULAN ÇİĞ SÜT, PEYNİR VE  
TEREYAĞINDA BRUCELLA TÜRLERİNİN İZOLASYONU,  
İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER TEKNİKLERLE  
BELİRLENMESİ**

**Öğr.Gör.GÜVEN GÜLBAZ**  
**Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Yrd.Doç.Dr.Ufuk KAMBER**

**KARS-2011**

**T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE SATIŞA SUNULAN ÇİĞ SÜT, PEYNİR VE  
TEREYAĞINDA BRUCELLA TÜRLERİNİN İZOLASYONU  
İDENTİFİKASYONU VE MOLEKÜLER TEKNİKLERLE  
BELİRLENMESİ**

**Öğr.Gör.Güven GÜLBAZ**  
**Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Yrd.Doç.Dr.Ufuk KAMBER**

Bu araştırma KAÜ Bilimsel araştırmalar Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Proje No:2009-VF05

**KARS-2011**

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Programı Çerçevesinde Öğr.Gör. Güven GÜLBAZ tarafından hazırlanmış olan “**Kars Yöresinde Satışa Sunulan Çiğ Süt, Peynir ve Tereyağında *Brucella* Türlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 18.07.2011

Adı soyadı

İmza

Başkan : Prof.Dr. Haydar ÖZDEMİR

Üye : Prof.Dr. U.Tansel ŞİRELİ

Üye : Doç.Dr. Leyla VATANSEVER

Üye : Yrd.Doç.Dr. Ufuk KAMBER

Üye : Yrd.Doç.Dr. Çiğdem SEZER



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... gün ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet ÇİTİL  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Brusellozis, özellikle sığır, koyun ve keçi gibi evcil hayvanlarda yavru atma, süt veriminde azalma, et üretimi kaybı, damızlık değeri kaybı, kısırlık gibi zararlı etkileri yanında hayvanlardan insanlara bulaşan, ekonomik açıdan ve iş gücü kaybı nedeniyle halk sağlığı yönünden çok önemli bir hastalıktır. Hastalığın çabuk yayılması, tedavinin zor ve uzun süreli, masraflı olması, kontrolü ve mücadelesinin güç olması önemini daha da artırmaktadır.

Brucellozis insanlara hastalık etkenleri ile kontamine çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi, enfekte hayvanlar ve karkasları, atık yavru ve atık yapan hayvanların genital sekresyonları, idrar ve dışkıları ile direk temas yoluyla bulaşır. İnsandan insana bulaşma ve et tüketimiyle bulaşma nadirdir.

Bölgemizde yaşayan insanların gelirlerinin büyük bir kısmını hayvancılık ve hayvansal ürünler oluşturmaktadır. Üretimlerin teknolojik açıdan yetersiz oluşu, özellikle süt ve süt ürünlerinin geleneksel yollarla üretilmesi, pazara getirilmesi, ürünlerin açıkta satılması gibi olumsuzluklar nedeniyle brusellozis, bölgemizde halk sağlığı açısından önemini korumaktadır. Çalışmamızda piyasada satışı sunulan çiğ süt, peynir ve tereyağlarının *Brucella spp.* etkenleri yönünden araştırılması amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteğini gördüğüm Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilimdalı. başkanı Prof.Dr.Abamüslüm GÜVEN'e, tez çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd.Doç. Dr.Ufuk KAMBER'e, çok değerli hocalarım Sayın Doç.Dr. Leyla VATANSEVER, Yrd.Doç.Dr. Nebahat Bilge ORAL, Yrd.Doç.Dr. Çiğdem SEZER'e, 2011 yılında Üniversitemizden ayrılan Yrd.Doç.Dr.Berna DUMAN AYDIN ve mesai arkadaşım Öğr.Gör.Dr.Aksem AKSOY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince laboratuvar ortamında yardım ve desteğini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Özgür ÇELEBİ, Arş.Gör.Dr.Fatih BÜYÜK ve

Mikrobiyoloji AD. Öğretim üyelerine, PCR laboratuvarındaki yardımlarından dolayı Öğr.Gör.Dr.Seyitali BİNGÖL'e, örneklerin toplanmasında yardım eden Öğr.Gör.Faruk KARDAŞ'a, Veteriner Hekim Erhan ÇEKİN'e, tez yazımında yardımlarından dolayı değerli mesai arkadaşım Yrd.Doç.Dr.Kadir ÖNK, Öğr.Gör.Asuman GÜNERHAN ve Öğr.Gör.Dr.Alper TAZEGÜL'e, çalışmamda desteğini esirgemeyen İngilizce öğretmeni Teyzem Melek ÖZTÜRK'e ve doktora programı süresince göstermiş oldukları büyük sabır ve desteklerinden dolayı çok değerli eşim Filiz, kızlarım Ece Nur ve Güliz İnci GÜLBAZ'a sonsuz teşekkür ederim.

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>2-ME-MAT</b>	2-Mererkaptoetanol Mikroaglutinasyon Testi
<b>BAPAT</b>	Buffered Acidified Plate Agglutination Testi
<b>BPAT</b>	Buffered Agglutination Testi
<b>BRT</b>	<i>Brucella</i> Ring Testi
<b>bp</b>	Baz Çifti (Base pair)
<b>DTT-MAT</b>	Dithiothreitol Mikroaglutinasyon Testi
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	Deoksinükleotid Trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>FAO</b>	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (Food and Agriculture organization)
<b>CFT</b>	Komplement Fiksasyon Testi
<b>MRT</b>	Süt Halka Deneyi (Milk Ring Test)
<b>OIE</b>	Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (World Organisation for Animal Health)
<b>OPS</b>	Oligo Polisakkarit
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>RAPD-PCR</b>	Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RBT</b>	Rose Bengal Testi
<b>RBPT</b>	Rose Bengal Plate testi
<b>SAT</b>	Serum Aglutinasyon Testi
<b>SDA</b>	Serum Dekstroz Agar
<b>TB</b>	Tris EDTA
<b>TAT</b>	Tüp Aglutinasyon Testi
<b>TBE</b>	Tris Borik EDTA
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
<b>Ig</b>	İmmunglobulin

**İÇİNDEKİLER**

ÖNSÖZ .....	I
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
TABLolar LİSTESİ .....	VI
ŞEKİL ve RESİMLER LİSTESİ .....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe .....	4
2.2. Brucella'nın Genel Özellikleri.....	6
2.3. Brucella Türleri .....	8
2.3.1. <i>Brucella abortus</i> .....	8
2.3.2. <i>Brucella melitensis</i> .....	9
2.3.3. <i>Brucella suis</i> .....	11
2.3.4. <i>Brucella ovis</i> .....	12
2.3.5. <i>Brucella neotomae</i> .....	13
2.3.6. <i>Brucella canis</i> .....	13
2.4. Brucella'nın Taksonomi Çalışmaları .....	14
2.5. İnsanlarda Brusellozis .....	15
2.6. Hayvanlarda Brusellozis .....	17
2.7. Hastalığın Halk Sağlığı ve Ekonomik Yönden Önemi .....	18
2.8. İnsanlara Bulaşma.....	19
2.9. Epidemiyoloji .....	19
2.10. Korunma.....	21
2.11. Teşhis .....	22
2.11.1. Serolojik Yöntemler .....	23
2.11.2. Bütünleyici testler .....	26
2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Brucella'nın Tanısı.....	28
2.13. Tedavi.....	35
2.14. Literatür Bilgisi.....	35
3. MATERYAL ve METOD .....	46
3.1. MATERYAL.....	46

3.1.1. <i>Brucella</i> Etkenlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri	46
3.1.2. İzolatların H <sub>2</sub> S, oksidaz ve katalaz aktivitelerini belirlemek için kullanılan malzemeler	48
3.1.3. PCR İçin Kullanılan Araç ve Gereçler:	49
3.1.3.1. PCR Kitleri	49
3.1.3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler:	50
3.1.4. DNA ekstraksiyon için kullanılan malzemeler	51
3.2. METOD	53
3.2.1. Örneklerden <i>Brucella</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu:	53
3.2.1.1. Kültürel Yöntem	53
3.2.1.2. Moleküler Yöntem:	56
4. BULGULAR	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
6. ÖZET	72
7. SUMMARY	73
8. KAYNAKLAR	74
9. ÖZGEÇMİŞ	88



**TABLolar LİSTESİ**

<b>Tablo 1:</b> <i>Brucella</i> Genusu Türlerinin ve Biyotiplerinin Ayırıcı Karakterleri .....	32
<b>Tablo 2:</b> <i>Brucella</i> Genusu Türlerinin ve Biyotiplerinin Dekarboksilasyon ve Fermentasyon Özellikleri .....	33
<b>Tablo 3:</b> <i>Bucella</i> türleri, biyotipleri, konağı tercihleri ve tür identifikasyonu.....	34
<b>Tablo 4:</b> İncelenen örnek sayıları.....	46
<b>Tablo 5:</b> İncelenen örneklerden <i>Brucella</i> izolasyon sonuçları .....	62

**ŞEKİL ve RESİMLER LİSTESİ**

<b>Şekil 1:</b> Örneklerden Yapılan Ekimler .....	54
<b>Resim 1:</b> <i>Brucella</i> kolonilerinin <i>Brucella</i> Agar'da görünümü .....	61
<b>Resim 2:</b> <i>Brucella</i> bakterilerinin Gram boyama sonucunda mikroskopik görünümü	62
<b>Resim 3:</b> İzolatlara uygulanan PCR yöntemi ile cins bazında saptanan <i>Brucella</i> DNA'sının %1,5 lik agaroz jeldeki görüntüsü. ....	63
<b>Resim 4:</b> İzolatlara uygulanan Multiplex PCR kiti yardımıyla Tür bazında saptanan <i>Brucella</i> DNA'sının % 1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	64

## 1. GİRİŞ

Brucellozis dünyada yaygın olarak görülen insan, evcil ve yabani hayvan sağlığını yakından ilgilendiren ve hayvansal üretimde önemli verim kayıplarına yol açan *Brucella* cinsine ait türler tarafından oluşturulan bulaşıcı, akut, subakut veya kronik seyirli zoonoz bir enfeksiyöz hastalıktır (11,20,33,90,113,122).

*Brucella* “Akdeniz Ateşi”, “Dalgalı Ateş”, “Malta Humması” ve “Bang Hastalığı” olarak insanlarda, “İnfeksiyöz Abortus”, “Enzootik Abortus”, “Kontagiyöz Abortus” ve “Brucellozis” olarak da hayvanlarda bilinmektedir (11,90,91).

*Brucella* etkeni, *Proteobacteria* âlemi, *Rhodospirilli* sınıfı, *Rhizobiales* takımı, *Brucellaceae* ailesinde yer almaktadır. Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi *Brucella* Taksonomisi Alt Komitesi'ne göre *Brucella* cinsinde birbirleriyle morfolojik ve kültürel yönden benzerlik gösteren *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotemae* olmak üzere 6 tür yer almaktadır. Aynı zamanda, gerçekleştirilen DNA dizi analizleri çalışmaları deniz memelilerinden izole edilen iki yeni tür olarak *B. pinnipediae* ve *B. cetaceae* türlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır (33,90,91).

İnfeksiyon, sığırlarda *B. abortus*, küçük ruminantlarda *B. melitensis* veya *B. ovis*, domuzlarda *B. suis* ve köpeklerde *B. canis* tarafından oluşturulmaktadır. Son zamanlarda deniz memelilerinin de dâhil olduğu pek çok hayvan türünde *B. pinnipeds* ve *B. cetacea* türleri de saptanmıştır. Etken özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atma, damızlık değeri kaybı, infertilite, süt verimi kaybı, ilaçlama ve aşılama masrafları nedeniyle hayvansal üretimde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Brucella*, infekte hayvanlarla direkt temas veya kontamine çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimi sonucu insanlara da bulaşarak iş gücü kaybına, fizik yetersizliğine bununla beraber tedavi ve hastane masrafları sonucu büyük ölçüde ekonomik kayba da yol açmaktadır (11,33,113,122).

Brusellozis bazı Avrupa Birliği ÷lkelerinde, Kuzey Amerika ÷lkelerinde Avustralya ve Yeni Zelanda'da eradike edilmesine rağmen, gelişmekte olan T÷rkiye'de dâhil olmak üzere Akdeniz'e kıyısı olan ÷lkelerde, Ortadoğu, Arap Yarım Adası, Hint Yarım Adası, Batı Asya ÷lkeleri, Afrika, Orta ve G÷ney Amerika'nın bir kısmında hastalık insan ve hayvanlarda hala etkili olmaktadır (11,33).

T÷rkiye'de s÷rd÷r÷lmekte olan kontrol ve aşılama programlarına rağmen bazı illerde hastalık oldukça yaygın olmakla birlikte kontrol altına alınamadığı bildirilmektedir (65). Kesin tanı için laboratuvar testlerine ihtiyaç duyulması, hastalığın bildirilmemesi ve/veya bildirimdeki duyarsızlıklar nedeniyle, T÷rkiye'de Brusellozis prevalansını kesin olarak saptama imkânı olmamakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bildirimlerde kayda değer bir artış g÷r÷lmektedir. T÷rkiye'de brusellozis olgusu insanlarda ilk defa 1915 yılında Kural ve Akalın tarafından İstanbul'da Kuleli Askeri Hastanesi'nde bir askerde saptanmıştır. Hayvanlarda ise Brucellozis Berke tarafından 1932 yılında sığırlarda, K÷yl÷oğlu ve Aktan tarafından 1944 yılında da Bandırma Merinos Çiftliği'ndeki koyunlarda serolojik olarak tespit edilmiştir (11).

T÷rkiye'de 1984 yılında *Brucella* kontrol÷ ve eradikasyonu için 26 yıllık bir proje başlatılmıştır. Plan çerçevesinde 4-8 aylık yaşlardaki dişi buzağıların *Brucella abortus* S-19 suşu aşılarla aşılanması, kuzu ve oğlakların da *B. melitensis* REV-1 suşu aşılarla aşılanması uygun g÷r÷lmüşt÷r. 1989 yılında *Brucella* seroprevelansı sığırlarda %3.56, koyun ve keçilerde %1.26 iken, 1990 yılında bu oran sığırlarda % 1.2, koyun ve keçilerde % 2.08 ve 1991 yılında sığırlarda % 1.01, koyun ve keçilerde ise % 1.83 olarak bulunmuştur (65).

Charisis'in 1999 yılında Akdeniz ÷lkelerinde yaptığı bir araştırmada, T÷rkiye'de insan bruselloz sıklığının tanımlanmadığını ve insan vakalarının 1986 yılında 3.03/100.000 den 1996'ya 15.11/100.000 gibi ciddi bir artış g÷sterdiğini vurgulamıştır. Bu artışın muhtemelen gelişmiş takip ve tanı tekniklerinin kullanılmasıyla daha iyi sonuçların alınması ve raporların daha iyi tutulmasına bağlı olduğu d÷ř÷n÷lmektedir (30).

*Brucella*, hayvanlarda yaşam boyu infeksiyona neden olduğu için meme ve meme üstü lenf yumrularının devamlı infeksiyonuna sıkça rastlanmaktadır. Bu yüzden *Brucella*'ların devam eden laktasyon periyotlarında etkenlerin sütle atılmalarına sebep olduğu bildirilmektedir. Bu nedenden dolayı süttten izolasyon yapılması tavsiye edilmektedir (11).

*Brucella* biyolojik silah olma özelliğine sahip bir zoonozdur. *Brucella* geçmişte bir saldırı aracı olarak araştırma konusu olmuştur ve hala çoğu listelerde B kategorisi patojeni olarak yer almaktadır. *Brucella* hayvan veya insan popülasyonlarına saldırı amacıyla kullanılabilir. Hastalığın endemik olmadığı bölgelerde muhtemelen etkisi çok büyük olabilir. A.B.D'de devlet destekleme programı tarafından biyolojik silah amacıyla deneysel olarak yapılan çalışmalarda *B.melitensis* ve *B.suis* etkenlerinin zayıf infeksiyon kombine dozunu aerosol olarak kullanılan bir biyolojik silah geliştirmişlerdir (105,129) .

*Brucella*'nın tanısında direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır. İndirekt tanı için çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler hızlı, pratik ve az maliyetli olmasına rağmen, bazı durumlarda yanlış pozitif veya negatif sonuçlar vermesi dezavantajlarıdır. Ayrıca kesin tanı için birden fazla testin yapılmasından dolayı da tercih edilmemektedir (11).

*Brucella* ile mücadele genel hijyenik tedbirlerin yanı sıra aşılama, test ve kesim ile bu iki yöntemin birlikte uygulanması gibi üç temel yöntemle dayanmaktadır (11).

Bu çalışmada, Kars'ta satışa sunulan çiğ süt, çiğ süttten yapılmış peynir ve tereyağı örneklerinde *Brucella* etkenlerinin varlığının izolasyon, identifikasyon ve moleküler tekniklerden PCR yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Millattan sonra 79 yılında Roma'nın iki ünlü kenti, Pompeii ve Herculaneum Vezüv yanardağının faaliyeti sonucu tamamen yanarak kül haline gelmiştir. Buradaki kalıntılar arasında bulunan yetişkin iskeletlerinde yapılan antropolojik incelemeler sonucunda brusellozun tipik kemik lezyonları görülmüş ve burada gömülü olarak bulunan karbonlaşmış peynirlerin elektron mikroskoplarıyla yapılan incelenmesinde *Brucella*'ya morfolojik yönden benzeyen kok tarzında formların olduğu tespit edilmiştir (26).

Uzun yıllar öncesi bile insanlar için patojen olan bu mikroorganizmayı ilk izole eden ve İngiliz ordusunda hekim olarak görev yapan mikrobiyolog Sir David Bruce'dur. *Brucella* ismi de bu araştırmacıya ithafen verilmiştir. Bruce tarafından etken 1887 yılında *Streptococcus melitensis* olarak adlandırılmıştır. Aynı yıl Hughes, etkeni Undulant Fever (Dalgalı Ateş) olarak isimlendirmiştir. Bruce, 1886 yılında Malta adasında, ateşli bir infeksiyon sonucu ölen İngiliz askerinin dalak pulpasından izole ettiği bakteriyi deneysel olarak maymunlara bulaştırmış ve hastalığın maymunlarda ortaya çıktığını gözlemlemiştir. Küçük bir kok şeklinde görülen bu etkene *Micrococcus melitensis*, infeksiyona ise "Malta Humması" veya "Akdeniz Humması" adını vermiştir (18,27,64,86).

Danimarka'da 1895 yılında Bang ve Stribolt, abort yapmış bir ineğin fetal membranları ve uterus sıvılarından izole ettikleri Gram negatif basile *Bacterium Infectiosa Bang* adını vermişlerdir. Bang, 1897 yılında etkenin saf kültürünü elde ederek sağlıklı hayvanlarda deneysel olarak infeksiyon oluşturmayı başarmıştır (11,18,86).

Koyunlarda ilk izolasyon 1900 yılında Garcia ve Iscara tarafından yapılmıştır Dr. Zammit, 1905 yılında keçi sütlerinden etkeni izole etmiş ve keçilerin doğuma yakın zamanlarda sık sık abort yaptığını bildirerek etkeni *Micrococcus* olarak adlandırmıştır. Macaristan'da ilk olarak domuzlarda brusellozis Huntyra tarafından 1909 yılında bildirilmiştir (11). Koyun brusellozisine *Brucella melitensis'in* neden olduğu 1910 yılında Dubois tarafından bildirilmiş ve etkenin süt ile yayıldığı Spink tarafından açıklanmıştır (27). 1914 yılında Traum A.B.D.'nin Indiana eyaletinde erken doğum yapan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden *B. suis'i* izole etmiştir (11).

Evans 1918 yılında, sığır, koyun, keçi ve domuzlarda Bruce, Bang ve Traum tarafından bulunan etkenlerin morfolojik, kültürel ve serolojik benzerliklerin bulunduğunu ve birbirlerine çok yakın mikroorganizmalar olduklarını belirtmiştir (11) Meyer ve Shaw, 1920 yılında *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'i bir grupta toplayarak tümüne, bu konuda ilk önemli çalışmaları yapan Bruce'un ismine ithafen *Brucella* grubu mikroorganizmalar, meydana getirdikleri hastalığa da brusellozis adını vermişlerdir (11,86).

Koçlarda epididimitise neden olan *B. Ovis*'i, 1952 yılında ilk kez Yeni Zelanda'da McFarlan ve arkadaşları izole etmiştir. Buddle ve Boyes 1953 yılında bu etkenin *B. melitensis'in* bir varyantı olduğunu ileri sürmüşler ve etkene *B. ovis* ismini 1956 yılında vermişlerdir (11,86). Stoenner ve Lackman 1957 yılında ABD'nin Utah eyaletinde çöl farelerinden *B. neotomae*'yi izole etmişlerdir. *B. canis* 1966 yılında av köpeklerinde abortla seyreden bir salgının araştırılması sırasında izole edilmiş ve 1968 yılında Carmicheal ve Bruner tarafından *B. canis* olarak isimlendirilmiştir (11,87).

Türkiye'de ilk Brusellozis vakası 1915 yılında Kuleli Askeri Hastanesi'nde, Hüsametdin Kural ve Mahmut Sabit Akalın tarafından tedavi edilen bir askerde laboratuvar yöntemleri ile teşhis edilmiştir (11).

## 2.2. *Brucella*'nın Genel Özellikleri

*Brucella* cinsi; konak tercihi, antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre 6 türden oluşur: *B.melitensis* (koyun ve keçi), *B.abortus* (sığır), *B.suis* (domuz), *B.canis* (köpek), *B.ovis* (koyun) ve *B.neotomae* (ağaç ratı). *B.abortus*, *B.melitensis*, ve *B.suis* benzer ciddi hastalık tablosu oluştururlar (72,83). Son yıllarda *Brucella* türlerine deniz memelilerinden izole edilen *B. pinnepediae* ve *B. cetaeae* etkeni de dâhil edilmiştir. *B. pinnepediae* fok, denizaslanı, mors (deniz ayısı)'da, *B. cetaeae* yunus balığı, domuz balığı, balinadan izole edilmiş ve insanlar için infeksiyöz olduğu bildirilmiştir (94,110). Koyun ve keçilerde patojen olan *B.melitensis* insanlarda da yüksek patojeniteye sahiptir ve sıklıkla insan brusellozisine yol açar. Bunun aksine *B.ovis* ve *B.neotomae* ile insan infeksiyonu henüz bildirilmemiştir. *B.canis* ise insanlarda nadir enfeksiyon oluşturur (110).

*Brucella* grubu mikroorganizmalar, Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, flagellasız olup, fakültatif intrasellüler bakterilerdir, birçok hayvan türünü ve insanı etkilemektedir (31). Gerçek kapsülleri yoktur, ancak hastalık olgularından yeni izole edilen smooth (S) karakterindeki suşlarda kapsül bulunduğu bildirilmektedir. Etkenler 0.6-1.5  $\mu\text{m}$  uzunluğunda, 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  eninde kısa çomak, kok ya da koko-basil şeklinde çok kısa zincirler veya kümeler oluşturabilen mikroorganizmalardır. Basit boyalarla kolayca boyanırlar. Kültürlerden yapılan frotilerde tek tek rastlanmalarına karşılık, enfekte dokulardan ya da eksudatlardan yapılan frotilerde kümeler halinde görülürler. Etkenin Brownier hareketi oldukça belirgindir (11,15,90).

*Brucella*'lar fakültatif intrasellüler patojen mikroorganizmalardır (62). Fagositik hücreler içinde canlılıklarını koruyabilir ve üremeye devam edebilirler. *Brucella* suşlarının hücre içinde yaşama şekilleri oldukça ilgi çekicidir. Lipopolisakkaritler hücrede özel fagositik etki ile parazit haline dönüştürülerek hücre içinde oksidatif yaşamayı önleyen bir etken görevi yapar. Yapılan çalışmalar sonucunda düşük moleküler ağırlıklı birleşenlerin bu tarz etkileri olduğu görülmüştür. Yine *B.abortus* ile ilişkili olarak da adenin ve guanin monofosfatın bu olaya etki ettiği kanıtlanmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı birleşenlerin hücre içerisinde yaşamlarını devam ettirip ettirmedikleri ise daha kanıtlanmamıştır (6).



## Besiyerlerinde Üreme

*Brucella* grubu mikroorganizmaların üremeleri yavaş olup, zenginleştirilmiş katı besiyerlerindeki üremesi ancak ikinci günden sonra fark edilir (11,15,92). 2-3 günlük koloniler yuvarlak, konveks, düzgün kenarlı ve 0,5-1  $\mu\text{m}$  uzunluğunda 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  eninde kısa çomak, kok ya da koko-basillerdir. İlk izolasyonlarda koloni üremesi genellikle üçüncü günden sonra başlar ve maksimal gelişme 5-7 günde tamamlanır (11).

*Brucella*'lar mikroaerofilik özelliğinden dolayı % 5-10 CO<sub>2</sub> ye ihtiyaç gösterir, 20-40°C'de de üreyebilirler fakat optimum üreme ısıları 37°C ve pH 6.6-7.4 tür (11,15,33). Genel besiyerlerinde üremeleri güç olduğundan üremeleri için özel besiyerlerine ihtiyaç duyarlar (4). Besiyerlerine glukoz, ascites, karaciğer ekstresi, kan, serum veya protein katılması mikroorganizmaların üremeleri üzerine olumlu etkide bulunur. Mikroorganizmaların çoğalmasını artırıcı bir faktör olarak eritrol de kullanılmaktadır. *Brucella* etkenlerinin kültürleri için, çoğunlukla katı besiyerleri kullanılır. Bunun sebebi katı besiyerleri koloni oluşmasını sağlamasının yanı sıra dissosiasyonu da sınırlarlar. Kan, periton ve pleura boşluklarındaki sıvı materyalin kültürü için sıvı besi yerlerinden yararlanılabilir. Bazı suşlar (*B. abortus biyotip-II*) zorunlu serum gereksinimindedirler. Hemolitik değildirler. Basit boyalarla kolayca boyanırlar. Kültürlerden yapılan frotilerde tek tek rastlanmalarına karşılık, enfekte dokulardan ya da eksudatlardan yapılan frotilerde kümeler halinde görülürler. Smooth suşlar düzgün, parlak yüzeyli olup, mat sarı renkte görünürler ve yansıyan ışıpta hafif mavimsi yeşil renkte verirler. Koloniler 6-7 günlük bir inkübasyon sonunda matlaşır ve disosiye olmaya başlarlar. R koloni formundakiler daha büyük çapta, yassı, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. Bundan dolayı Smooth *Brucella* kültürleri rough formlardan ayrılırlar. Belirtilen bu iki ana koloni formundan başka, *intermedier* (I) ve *mucoïd* (M) özellik gösteren koloni varyasyonlarına ve bunların da alt formlarına rastlanabilir (11,15,92). Bu grup mikroorganizmaların bahsedilen bu iki ana koloni formundan başka intermedier (I) ve mukoid (M) özellik gösteren kolonileri ve bunların alt formlarının bulunduğu da bildirilmektedir. Sıvı besiyerinde

yavaş ürerler ve homojen bir bulanıklık yaparak dipte yumurta akı benzeri tortu bırakırlar (11).

### **Dirençlilik**

*Brucella* grubu mikroorganizmaların tamamı pastörizasyon şartlarında 65 °C de 10-15 dakikada ölürler (11). Foster-Lear ve Metzger *B. abortus*'un 62°C'de 23 dakikada ve 72°C'de 14 saniyede öldüğünü saptamışlardır. Otoklavda 121°C 15 dakikada kuru sıcaklıkta 160-170°C de en az 1 saatte ölürler (91). *Brucella* etkenleri antibiyotik ve dezenfektanlara karşı da duyarlıdır, % 1 lizol ve formalin içinde 15 dakikada, % 0,1 süblimedede birkaç dakikada ölürler. Kokuşma sonucu kısa zamanda canlılıklarını kaybederler. Karanlık yerlerde, doku, süt veya uterus akıntıları içinde uzun zaman canlı kalabilirler. Güneş görmeyen toprakta 70, suda 35 gün kadar yaşayabilirler. Kültürlerdeki etkenler -20°C 'de 3-6 ay canlı kalabilirler (11,128).

## **2.3. Brucella Türleri**

### **2.3.1. Brucella abortus**

Danimarkalı veteriner patolog ve bakteriyolog olan L.F. Benhard Bang 1895'te sığırlarda *B. abortus* olarak isimlendirilen bir etken izole etmiştir (87).

Serolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarla birbirlerinden farklı 9 biyotipi bulunan *B. abortus* sığırların enzootik yavru atma hastalığının etkenidir. Koyun, keçi, domuz ve insanlarda da hastalık oluşturur (11,15,27).

Sığır brusellozu genellikle *B.abortus* tarafından, daha az olarak *B. melitensis* ve nadiren de *B.suis* tarafından meydana gelir (91).

*B. abortus*, küçük, kokoid, Gram negatif, hareketsiz ve sporsuz çomakçıklar tarzındaki bir mikroorganizmadır. Etkenin brownier hareketi oldukça belirgindir. Boyutları 0,5-1 mikron kadardır. Hastalık olgularından yeni izole edilen ve S-karakterindeki suşlarda kapsül tespit edilmiştir. Kültürlerde tek tek rastlanmasına

karşılık dokulardan veya eksudatlardan yapılan frotilerde, kümeler halinde görülürler (11,15,109).

*B. abortus*'un sığırlarda bulaşması enfekte bir hayvanın dışkısı, idrarı veya uterus akıntısıyla kontamine süt, gıda veya suyun sindirilmesiyle, derinin temasıyla ya da enfekte boğa ile çiftleştirmeyle olur (27,114).

İnkübasyon periyodu genellikle 30-60 gündür. Enfeksiyon sığırlarda genellikle plasentitise bağlı bakteriyemiden sonra lokalize olur. Eğer hayvan gebe değilse lokalizasyon memelerde ve lenf nodüllerine yakın olur. Organizma sütle atılır. Etken karaciğere, akciğere, lenf nodüllerine veya dalağa lokalize olabilir. Lokalize olduğu yerlerde granulamatoz odak oluşturur. Sığırlar yıllarca enfekte kalabilir (27).

Boğalarda enfeksiyon testis ve sperma kesesine lokalize olabilir. Hastalığın sonunda irinleşme yaygındır ve etken sperma ile atılabilir. Sağlam boğalar enfekte ineklerle çiftleştirildiğinde genellikle enfeksiyonu kapmazlar fakat enfekte boğalar ineklere hastalığı bulaştırabilirler (27,114).

Hastalık bir veya daha fazla belirtilerle karakterizedir: yavru atma, plasentanın atılmaması, orşitis, epididimitis, bununla birlikte nadir olarak sütle ve uterus akıntılılarıyla organizmanın atılımı sonucu arthritisi görülür (91).

### **2.3.2. *Brucella melitensis***

*B.melitensis* birçok karakteristik özelliği ile (morfolojik, kültürel ve biyokimyasal) *B.abortus'a* benzer. Monospesifik serumlarla ortaya konulabilen 3 biyotipi bulunmaktadır (11,15,22).

*B.melitensis* koyun ve keçilerdeki brucellozis'in etkenidir. *B. abortus* ve *B. melitensis* koyunlarda, keçilerde olduğu gibi benzer enfeksiyonlar gösterir. *B. melitensis*'in başlıca etkisi abortlar, ölü doğum ve zayıf yavru doğumlardır. (15,27,90). Patojen, fakültatif intrasellüler bir bakteri olan *B. melitensis* insanlarda ki *Brucella* hastalığının (Malta Humması) asıl etkenidir (39). Sporadik olarak *B.*

*abortus*'ta hastalık oluşturabilir. Koyun ve keçilerde brusellozis'in en çok yaygın olduğu ülkeler; Fransa, İtalya, Almanya, Yunanistan, Sardunya, Malta, İsviçre, Portekiz, Çekoslovakya, Tunus, Cezayir, Türkiye, Yugoslavya, İran, Rusya, Amerika, Meksika ve Latin Amerika'dır. Bulaşma, genellikle, sindirim sistemi, deri, konjunktiva, çiftleşme ve meme başı kanalı yolları ile oluşur. İnfeksiyon kaynakları arasında atık yavru, yavruya ait membranlar, uterus akıntıları, süt, idrar ve sperma başta gelmektedir. Koyunlarda süt ve uterus akıntılarındaki mikroorganizma sayısı keçilerinkinden daha azdır. İlk infeksiyon dışarıdan infekte hayvanların sürüye bilinmeden sokulması suretiyle bulaşır (11,15).

İnfekte hayvanlarda abortusların dışında mastitis, genel düşkünlük, zayıflama, bronşite bağlı kısa öksürük, eklem şişkinlikleri, topallık tespit edilebilir. Genellikle sağlam bir sürünün *B. melitensis*'le bulaşmasında yavru atma olayları çok artar ve şiddetli seyreder. Aynı sürü ikinci ve sonraki yıllar daha az yavru atar. Bazı olaylarda plasenta içerde kalabilir ve septisemilere, kısırılığa neden olabilir (11,90). Bulaşık sürüde bakımsızlık ve paraziter hastalıkların bulunuşu abortusları artırabilir. Abortusdan önce hastalık etkeni süt ve idrarla dışarı çıkar. Abortusdan sonra ise uterus akıntıları ile açılır. Akut olaylarda, mastitis, topallık ve higroma görülen belirtiler arasındadır. Mastitis olaylarında memelerin klinik görünüşü normaldir fakat sütte bazı fiziksel değişiklikler görülebilir. Süt sağıldığında kolayca pıhtılaşır. Süt miktarı önemli ölçüde azalır ve süütün renginde de değişmeler görülür (11,15).

Bir defa abort yapan hayvanlar ender olarak üçüncü defa abort yaparlar (90). Koyunlarda infeksiyon süresi keçilere göre daha kısadır (11). Mastitisin klinik belirtileri yaygın değildir (90). Mastitis olgularında memenin kesitinde içi nekrotik kitlelerle dolu lezyonlar görülür. Bunların büyüklükleri bezelyeden ceviz büyüklüğüne kadar değişir. Ezildiğinde kumlu yapı hissi verirler. Duvarları tam olmayan fibrinöz bir kapsülle çevrilir. Kotiledonların ortaları boz, sarı renkte, nekroze olmuş ve çevreleri koyu kırmızıdır. Uterus mukozası şişkincedir. Atık yavruda milier nekrozlar, hepatitis tablosu görülür. Gebe olmayan koyun uterusunun ise duvarı kalınlaşmış, mukozası kabarık ve yer yer kırmızı benek ve muköz eksudatla kaplıdır. Akut orşitis ve epididimitis erkeklerde ortaya çıkabilir ve infertiliteyle sonuçlanabilir. Arthritis her iki

cinsiyette de görülür. Birçok gebe olmayan koyun ve keçiler asympomatik kalırlar. Epididimide nekroz odakları vardır. Testisler 2-3 misli büyümüşür. Lenf yumrularında büyüme görülür. Koyun ve keçilerde infeksiyonun teşhisi, aynen sığır brusellozunda olduğu gibidir. Ancak allerjik testlerden, özellikle, koyunlarda yararlar sağlanmakta ve bu amaçla bildirilen allergenlerin kullanılmasından iyi sonuçlar alınmaktadır (11,15,88).

### 2.3.3. *Brucella suis*

Domuzlarda *Brucellozis*'i ilk defa 1909 yılında *Huntyra* Macaristan'da bildirmiştir. Traum 1914'de infeksiyonun Amerika'da da bulunduğunu açıklamıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde ki bir *Brucella* türü abort domuz fetüsünden izole edilmiş ve bu bakteri *B. suis* olarak isimlendirilmiştir (11,15,87).

*B. suis*'in neden olduğu hastalıkta, domuzlarda en yaygın semptom yavru atmadır ve bu yavru atma gebeliğin herhangi bir döneminde ortaya çıkabilir (90). Abortla birlikte steriliteye neden olur. Erkeklerde orşitis ve yavruarda fazla ölümlere yol açan kronik ve bulaşıcı karakterde infeksiyonlara neden olur. *B. abortus* ve *B. melitensis*'in neden olduğu infeksiyonların oranı domuzlarda azdır (11,15,93,109).

*B. suis* genel karakterleri bakımından *Brucella* grubundaki diğer etkenlere benzemekle birlikte *B. melitensis* ve *B. abortus*'dan bazı özellikleriyle ayrılır. *B. suis* Gram negatif kokobasil veya kısa çomak şeklindedir. Etken fakültatif intrasellüler patojendir (93). Etkenin 5 biyotipi bulunmaktadır. Biyotip 1, 2, 3 domuzlarda brusellozun başlıca etkenidir. Biyotip-2 epidemiyolojik çalışmalar sonucu Avrupa tavşanlarında, biyotip-3 ise ren geyiklerinde patojendir. Biyotip 4 ren geyikleri ve karibu'larda patojendir ve domuzlarda bulunmaz. Biyotip 5 diğer biyotiplerden farklı olup koyun ve keçilerde de hastalık oluşturabilir (11,15,93,109).

İnfeksiyon sürüye dışarıdan reaktör hayvanların sokulması suretiyle geçer. Hastalığa genellikle erginlerde daha fazla rastlanmaktadır. Bir hayvandan diğerine bulaşma, sindirim sistemi ve çiftleşme ile olur. Deneysel olarak konjuktiva, deri altı, damar içi yolla infeksiyon oluşturulmuştur. Bulaşmada kenelerin de rolü olduğu bildirilmektedir. Atık yavru, yavru zarları, uterus akıntıları, süt ve sperma birer mikrop

kaynağı olarak görev yaparlar. Etkenin patogenezi sığırlardakinin aynısıdır, mikrop kanda iki aylık bir süre kadar bulunduktan sonra uterus, lenf yumruları ve eklemlere yerleşir (11,15).

*B.suis* dünyada domuz yetiştiriciliği yapılan bölgelerde bulunmaktadır. Başta Amerika, Avrupa ülkeleri gibi birçok devlette evcil domuzlardan eradike edilmiştir. Fakat Amerika, Avrupa ve Avustralya'yı da kapsayan bazı bölgelerdeki yabani domuzlar etkenin kaynağı olarak hala kalmaktadır. Bu kaynaklardan zaman zaman hastalığın yayılmasından dolayı evcil sürülerde ve insanlarda sporadik biçimde salgınlar rapor edilmektedir. *B.suis* Güney ve Orta Amerika (Meksika da dâhil) ve Asya'nın bazı ülkelerindeki evcil sürülerde devam etmektedir. Bazı Afrika ülkelerinden, Uganda ve Fildişi Adası da dâhil, ara sıra vakalar rapor edilmektedir (93).

#### 2.3.4. *Brucella ovis*

Hastalık etkeni ilk defa Yeni Zelanda'da *Mc Farlane* ve *arkadaşları* (1952) tarafından koçlarda epididimitis, tunica vaginalis, testis ve vesicula seminalis'den izole edilmiştir. Etken pleomorfik, Gram negatif kokobasil veya kısa çomaklar şeklinde olduğu ve % 10 CO<sub>2</sub> li ortamda geliştiğini bildirmişlerdir. Bu etkeni *Buddle* ve *Boyes* (1953) *B. melitensis*'in bir varyantı olabileceğini ortaya atmışlardır. Fakat sonradan etkene *B. ovis* adı verilmiştir (11,15,72,95).

Etken koyunlarda klinik veya subklinik karakterli semptomlara neden olur. *B. ovis*, koçlarda epididimitis, orşitis gibi genital lezyonlara, dişilerde yavru atma, plasentitis ve perinatal ölümlere neden olur. Yeni Zelanda'da erkek kızıl geyiklerde de benzer semptomlar rapor edilmiştir. İnsanlarda bu etkenden ileri gelen bir hastalık görülmemiştir (11,95,97,109).

Etken bakteriemi döneminden sonra vücudun çeşitli yerlerine ve özellikle epididimislere lokalize olur. Hastalık koçlarda daha az oranda steriliteye neden olurken, koyunlarda nadir olarak yavru atma, plasentitis ve perinatal dönemde ölümlere neden olur. Dişilerde *B. ovis* yavru atma ve plasentitise de sebep olabilir

fakat bu yaygın olarak görülmez. Koçların skrotumunda akut ödem ve epididimitis dikkat çeken semptomdur. Bu epididimitis tablosu şişmiş ve kalınlaşmıştır. Epididimitis tek taraflı veya bazen çift taraflı olabilir. Hastalığın sonunda scrotum sert ve ödemli, testisler atrofik bir durum alır. Koçlarda sperm miktarında azalma ve kalitesinde düşüşler görülebilir (11,94,97).

### **2.3.5. *Brucella neotomae***

Stoanner ve Lackman 1957'de ağaç ratı (*Neotomae lepida*)'ndan *Brucella* etkenlerine benzer etkenler izole etmişler. Farklı boyanma özellikleri, CO<sub>2</sub> ihtiyaçları ve H<sub>2</sub>S üretmelerine dayanarak *Brucella*'nın farklı bir türü olduğunu ve bu türü *B. neotomae* olarak isimlendirip insan ve evcil hayvanlar için patojen olmadığını bildirmişlerdir (25).

### **2.3.6. *Brucella canis***

Erkek ve dişi köpeklerde infeksiyöz karakterde brucellozisin etkenidir. Diğer hayvan türlerinde hastalık oluşturduğu şimdilik bildirilmemiştir (11,96).

Gebe köpeklerde ölü doğum ve abortlara neden olurlar, abortların çoğu, özellikle gebeliğin 7.-9. haftalarında ortaya çıkar. *B. canis* doğurgan hayvanlarda üreme yeteneğini sonlandırabilir. Etken özellikle zoonoz özellikte olup nadiren insanlarda hastalık oluşturur (11,15,96).

*Brucella canis*, *Carmichael* (1967) tarafından izole ve identifiye edilmiştir. Dişi köpeklerde abortuslara neden olmasının yan ısıra, erkek köpeklerde epididimitis, testiküler atrofi ve bazen de kısırlık oluşturur. Laboratuvar kazaları ve infekte köpeklerden bulaşma sonucu hastalığın insanlarda da görülmesi *B. canis*'in halk sağlığı yönünden önemini ortaya koymaktadır. Hastalık köpeklerin çok fazla temasta bulunduğu üreme döneminde yüksek oranda görülmektedir (11).

*B.canis*, fetüs, plasenta, fetal sıvılar ve bir abort ya da ölü doğumdan sonra gelen vaginal akıntılarda bulunur. Bu etken bir aborttan sonra 6 haftaya kadar gelen vaginal akıntılarda bulunabilir. Ayrıca, özellikle östrus sırasında, süte ek olarak,

normal vaginal sekresyonlarla saçılır. *B.canis'in* yüksek konsantrasyonları, enfeksiyondan sonra iki aya kadar semende bulunur ve daha küçük miktarların intermitten saçılması yıllarca oluşabilir. *B.canis* idrarda da bulunur ve düşük konsantrasyonlarda salyadan, nazal ve oküler sekresyonlardan ve dışkıdan salgılanabilir. Diğer taraftan, kedi ve köpekler infekte sütleri içmekle veya aborte olmuş materyalleri yemek suretiyle de enfeksiyona yakalanabilirler (11,96).

*B. canis'in* en karakteristik özelliği mukoid yapıda olması ve smooth *Brucella,*'nın yüzey antijenlerinin parçalanmamasından, *B. abortus, B. suis* ve *B. melitensis'in* serolojik teşhisinde kullanılan antijenler, *B. canis'e* karşı olan antikorların ortaya çıkarılmasında doğru sonuç vermesini güçleştirir. Bu nedenle serolojik teşhiste modifiye merkupto-etanol aglutinasyon testinden yararlanılmaktadır. Etkenin mukoid özelliği güvenilir ve sağlam bir antijenin ve bir aglutinasyon test prosedürünün geliştirilmesini güçleştirmektedir. Serolojik testleri etkileyen diğer bir olumsuz faktörde *B. canis* ile infekte olmayan köpeklerin serumlarında aglutinasyon reaksiyonuna neden olan maddelerin varlığıdır (11).

#### **2.4. *Brucella'nın* Taksonomi Çalışmaları**

1986 yılında *Brucella* Taksonomisi alt komitesi karışıklığı önlemek için bu sınıflandırmada klasik tür isimleri kullanılmasının gerekliliğini zorunluluk olarak kabul etmiştir (84).

Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi *Brucella* Taksonomisi Alt Komitesi'ne göre bu soyda birbirleri ile morfolojik ve kültürel yönden benzerlik gösteren 6 tür yer almakta olup bunlar içerisinde insanlar için patojen olan 4 tür bulunmaktadır. Bu türler konakçı türüne göre sınıflandırılmış olup, koyunlarda ve keçilerde *B. melitensis* (3 biyotip), sığırlarda *B. abortus* (9 biyotip), domuzlarda *B. suis* (5 biyotip) köpeklerde *B. canis*, koçlarda *B. ovis* ve ratlarda *B. neotoma* olarak adlandırılmaktadır. *B. melitensis, B. abortus, B. suis* insanlar için patojen olduğu, *B. ovis* ve *B. neotoma* insanlar için patojen olmadığı bildirilmiştir (43).



*Brucella*'nın tek bir monospesifik genus mu veya çok sınıflı bir genusmu olduğu hala araştırmacılar için tartışma konusudur. Biyokimyasal farklılıkları, boyanma ve faj hassasiyetlerine, konakçı tercihlerine göre altı türe ayrılırlar ve bunlardan bazıları da biyotiplere ayrılırlar (Deniz memelilerinden izole edilenler henüz isimlendirilmeleri onaylanmadığından hariç tutulmuşlardır). Fakat DNA-DNA hibridizasyon ve 16sRNA geni kullanılan sıraya dayalı yaklaşımlara göre bu gruplar arasında homojenlik ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak *B. melitensis* tek bir tür olarak isimlendirilmesi önerilmiştir. (128). Ama bu öneri diğerlerinde tür adı kullanılırken bu tür için evrensel olarak kabul görmemiştir. Sınırlayıcı haritalama ve çapraz hibridizasyon kullanılan metotlar gen indeksini ortaya çıkarmış ve bu sonuçların genusun klasik taksonomisi ile uyum halinde olduğunu ortaya koymuştur (80,81,128).

Deniz memelilerinden izole edilen *Brucella* türleri bu genusun yeniden isimlendirilmesine neden olacaktır. Çünkü taksonomisi belirlenmeyen bu izolatların çok sayıda farklı gruplardan oluşabileceğine dair genetik kanıtlar bulunmaktadır (31).

## 2.5. İnsanlarda Brusellozis

İnsan brusellozisi dünya çapında çok yaygın olan bir hastalıktır (34,41,104). İnsan brusellozisine neden olan dört tür vardır. Bunlar *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* biyotip 1-4 ve nadir olarakta *B. canis* veya *marine mammal brucella*'dır (90).

Dünya genelinde insanlardaki vakaların çoğunu, en invaziv ve patojen olan *B. melitensis* oluşturmasına rağmen, patojenite yönünden bunu sırasıyla *B. suis* ve *B. abortus* takip eder. *B. abortus* biyotip 5, *B. suis* biyotip 2 ve *B. canis* ile infeksiyon insanlarda nadirdir. *B. neotomae* ve *B. ovis*' den kaynaklanan hiç bir infeksiyon ise bildirilmemiştir (54,55).

İnsanlarda hastalığın görülme sıklığı koyun, keçi ve sığırlarda infeksiyonun yaygınlığına bağlıdır. Hastalığın görüldüğü risk gurupları; veteriner hekimler, hayvan bakıcıları, kasaplar, mezbaha çalışanları ile et ve süt işletmelerinde çalışanlardır, bunlar hayvanlar ve hayvansal ürünlerle her zaman direkt temas halinde olduklarından enfeksiyon riski ile karşı karşıyadırlar. İnsandan insana

bulaşma nadirdir. *Brucella* mikroorganizmalarını ihtiva eden havanın solunması sonucu da mukoza ya da konjonktivalardan etkenler bulaşabilirler. Bu tür bulaşma daha çok laboratuvar çalışanlarında görülür (11,64).

Hastalık *Brucella* bakterileri ile oluşturulur. Etkenler insanlarda akut ya da sinsi başlangıçlı olabilen, bazen atipik belirti ve bulgularla seyredabilen ve kronik hastalığa kadar değişebilen klinik tablolara yol açabilirler. İnsan brusellozunun epidemiyolojisi son 10 yıldan daha fazla süredir uluslararası seyahatlerin gelişmesiyle birlikte sosyoekonomik ve politik nedenlerden, farklı hijyenitelerden dolayı şiddetli değişikliğe uğramıştır (41,104). Hastalık dünyada bazı ülkelerde eradike edilmişse de günümüzde bir çok ülkede yeniden önem kazanan enfeksiyon olma özelliğindedir. Dünyada en sık görülen zoonotik enfeksiyon olma özelliğinde ve yıllık yarım milyondan fazla olgu görülmekte, bazı ülkelerde prevalansı 10/100.000'e kadar çıkmakta ve önemli oranda ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (41).

İnsanlarda bruselloza yatkınlık bağışıklık durumu dâhil, enfeksiyonun giriş yolu, inokulumun büyüklüğü, *Brucella* türleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (129).

Etkenin vücuda alınması derideki kesik ve yaralardan, mukozalardan, etkeni ihtiva eden havanın solunmasıyla ve en yaygın olarak ta pastörize edilmeden tüketilen süt ve süt ürünlerinden olmaktadır (129). İnsandan insana bulaşma çok az olarak anne sütü, nadiren cinsel temas ve kan transfüzyonu ile olur (41).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1970-1999 yılları arasındaki 30 yıllık süre içinde 98.502 olgu bildirim yapılmıştır. Bruselloz herhangi bir yaşta görülebilir, ancak Amerika'daki istatistik sonuçlarına göre hastalık 20-40 yaşları arasındaki genç erkeklerde daha sık görüldüğü ortaya konmuştur. Ülkemizde de enfeksiyonun özellikle 15-45 yaşında pik yaptığı gözlenmiştir (41).

Yıl içerisinde mevsimlere göre dağılımında ise bahar aylarında hastalığın daha aktif olduğu görülmektedir. İlkbahar ve yaz aylarında insanların kırsal kesime

seyahat etmesinin sıklığı, süt ve süt ürünlerinden taze peynir ve krema tüketiminin artması nedeniyle hastalığın görülme oranı da artmaktadır (41).

*Brucella* enfeksiyonlarında üç haftalık inkübasyondan sonra, septomlar aniden veya daha sonra ortaya çıkabilir. Bazen inkübasyon süresi bir haftadan üç aya kadar çıkabilir. Bruselloz hastalığının klinik belirtileri diğer enfeksiyonlara benzemesi nedeniyle teşhisi zordur (6). İnsanlarda akut bruselloz, düzensiz ateş, üşüme-titreme, gece terlemesi ve halsizlik-yorgunluk, kronik bruselloz ise sıklıkla subfebril ateş, halsizlik-yorgunluk, anksiyete ve depresyon ile seyrederek (41). Genelde ateş, kas ve eklem ağrıları ve şiddetli baş ağrısı gibi septomlar gözlenir. Ayrıca dalak, karaciğer büyümesi ve lenfadenopati de gözlenebilir. *Brucella* enfeksiyonlarının septomları kronik seyirli ya da uzun bir süreçte artan veya azalan bir seyir izler (6,33).

Hastalığın tedavisi antibiyotiklerle yapılmaktadır. Ancak hastalığın tedavisinde başlangıçta başarısızlık ve tedavi edilen olgularda ise relaps gözlenmesi nedeniyle problemler bulunmaktadır (41).

## 2.6. Hayvanlarda Brusellozis

Hastalık etkeni taşıyıcıları *B. abortus* için en çok sığır, sonra domuz, keçi ve koyunlardır. Sığırlarda *B. melitensis* ve nadiren de *B. suis*'ten kaynaklanan enfeksiyonlarda gözlenmektedir. Keçi ve koyun Bruselloz'unun asıl etkeni *B. melitensis*'tir. *B. melitensis* en çok keçi, koyun ve sonra sığır ve domuzlarda, *B. suis* daha çok domuz ve sonra sığır ve at gibi hayvanlarda enfeksiyon yaptıkları bilinmektedir. Sığır, keçi ve koyunların bir arada yetiştirilmesi, *B. abortus* ve *B. melitensis*'in kendi ana konakçısı dışında diğer hayvanlara yayılmasına neden olmaktadır. Bu üç *Brucella* türü değişik şekillerde karışık enfeksiyon oluşturabilirler (11,27,33,68,86,90).

Hayvanlar arasında enfeksiyon kaynağı olarak atık yavrular, fetal membranlar, uterus akıntıları, süt, idrar ve sperm önemli rol oynamaktadır (11,115). Gebe hayvanlarda gebeliğin ikinci döneminden başlayarak plasenta ve endometrium'da kolonileşmeler olduğu (bundan dolayı fetüs ölümü ya da abortlar şekillendiği)

bildirilmiştir. *Brucella* etkenlerinin hızla çoğalarak bağırsaklara kadar yayıldığı da bilinen sonuçlardandır (88).

### **Patojenite**

Brusellozun'in retikülo-histositer bir sistem hastalığı olması en önemli özelliğidir ve belli organ ve dokulara yerleşir. Etkenler vücuda girdikten sonra bölgesel lenf yumrularına ve buradan da birkaç gün içinde kan dolaşımına karışırlar. Kanda 2-3 hafta kalırlar ve bakteriyemi sonucu kan ile doku ve organlara yayılıp sonra kandan yavaş yavaş çekilirler. Bu süreç sonunda organlarda lezyonlar oluşmaya başlar. Hastalık etkenleri zamanla organlardan dalak, meme ve lenf yumruları gibi dokulara yerleşir ve uzun süre bu dokularda canlılıklarını korurlar (11).

### **2.7. Hastalığın Halk Sağlığı ve Ekonomik Yönden Önemi**

Brusellozun Dünya üzerinde en yoğun olarak görüldüğü ülkeler; Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Afrika, Asya, Orta Doğu ve Akdeniz ülkeleridir. Birçok ülkede hastalığa karşı önlemler alınmasına rağmen, brusellozis hem insanlarda hem de hayvanlarda düşüş eğilimi göstermemektedir. Hastalığı kontrol altına almış olan ülkelerde bu konuda çalışmalar yoğun şekilde devam ettirilmektedir (20,104).

Bruselloz ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. İnsanda uzun süren tedaviler ve hastalıktan kaynaklanan güç kaybı nedeniyle insanların sürekli çalışmaması, gebe hayvanlarda ise yavru atma, ergin hayvanlarda kısırlık, süt veriminin düşmesi ve canlı ağırlık kayıpları ekonomik açıdan önem taşımaktadır (41).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), *Brucella* çalışmalarında güvenlik seviyesi II veya üzeri güvenlik kabinlerinde çalışılmasını, kullanılan araç ve gereçlerin sterilize edilmesi gerektiğini savunmaktadır. Solunum yolu ile bulaşma söz konusu olabileceği için de çalışmalarda maske takılmasının gerekliliğini zorunlu kılmıştır (129,133).

## 2.8. İnsanlara Bulaşma

Brusellozis'in yaygın olduğu bölgelerde çiğ süt ve çiğ süttten üretilen peynir, krema, tereyağı ve çiğ et, iyi pişirilmemiş et ve sakatatlar gibi gıdaların insanlar için enfeksiyon kaynağı olduğu bildirilmektedir. Özellikle *Brucella*'nın insanlara bulaşmasında, çiğ süttten yapılan ve olgunlaşmadan tüketime sunulan peynirler büyük öneme sahiptir (11,44,64). Süte meme ve supra mammary lenf nodüllerinden geçen *Brucella* etkenlerinin sayısının  $10^3$  ile  $2 \times 10^6$  organizma/ml arasında olabileceği tahmin edilmektedir (33).

Hayvanlarla direk temasta bulunanlarda; peynir, tereyağı ve kaymak üretenler ve bunları salamura etmeden veya tuzsuz tüketenlerde; besiciler, kasaplar ile süt toplayıcısı ve süt ürünleri imalathanelerinde çalışanlarda brusellozis görülme oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (37,44).

## 2.9. Epidemiyoloji

Bazı ülkelerin hastalığı eradike programları ile yok etmesine rağmen, dünyanın birçok bölgesinde hala yerleşik olarak bulunmaktadır (130). Brusellozun dünyadaki yaygınlığı ile ilgili hiçbir genel tahmin yapılamamaktadır. Bunun nedenleri arasında birçok ülkede insan ve hayvanlardaki hastalığın ortaya çıkarılmasında yeterli bilgi noksanlığı ya da teşhis için laboratuvar eksikliği, bazen de resmi yetkililerin hastalığı ortaya çıkarmaktaki isteksizliği sayılabilir. Buna ek olarak, insanlardaki bazı bruselloz vakalarının hafif veya doğru olarak teşhis edilmeyen klinik semptomlar göstermesi de bir başka gerekçedir (33).

Dünyada yıllık 500.000 brusellozis olgusu olduğu tahmin edilmektedir. Brusellozis dünyanın her bölgesinde görülmekle birlikte Portekiz, İspanya, Güney Fransa, İtalya, Yunanistan, Türkiye ve Kuzey Afrika ülkelerinin yer aldığı Akdeniz Havzası, Güney doğu Avrupa ile Arap Yarımadası, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney Amerika'da hiperendemiktir. Buna karşın İngiltere, Kuzey Avrupa ülkelerinin

büyük çoğunluğu, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kanada'da ise brusellozis eradike edilmiştir (53,104).

Güney ve Orta Amerika'da, Karayipler ve Meksika önemli bir insan ve hayvan bruselloz kaynağı olarak yer almaktadır. Hayvanlarda bruselloz Güney Amerika boyunca varlığını sürdürmektedir. Ancak hastalık insanlarda yerleşik değildir. Güney Amerika, başta Peru ve Batı Arjantin insan brusellozunda *B.melitensis*'in yaygın olduğu ve Doğu Arjantin ve diğer Güney Amerika bölgelerinde de *B.abortus*'un yerleşik bir etken olduğu düşünülmektedir (104).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1960'lara kadar, insanlardaki bruselloz vakalarının *B. abortus*'tan kaynaklandığı ve 1947'de 6321 vaka ile bruselloz hastalık düzeyinin çok yüksek seviyelere çıktığı bildirilmiştir. Brusellozun yok edilmesi için başlatılan bir eradikasyon kampanyası insanlarda ve hayvanlarda hastalık vakalarında önemli bir oranda düşüş sağlamıştır. Ancak ABD'de bizonların ve elk geyiklerinin yaşadığı vahşi yaşam alanları enfeksiyon odağı olarak kalmıştır. Sığırlarda enfeksiyonun bu habitat çevrelerinden yayıldığı rapor edilmiştir (53).

Avrupa Birliği tarafından, İsveç, Danimarka, Finlandiya, Birleşik Krallık (Kuzey İrlanda hariç), Avusturya, Hollanda, Belçika ve Lüksemburg brusellozsuz bir bölge olarak kabul edilmiştir. Ayrıca Norveç ve İsviçre'de brusellozsuz ülkeler olarak kabul edilmektedir. Kuzey İrlanda'da 1998'den sonra, toplam 98 vaka ile bir *B.abortus* salgını gelişmiştir. Akdeniz havzası da bir endemik insan brusellozu bölgesi olarak tanınır. Hastalığın ilk görüldüğü Malta'da ise bugünlerde tek tek vakaların görüldüğü bildirilmektedir. Fransa başarılı bir eradikasyon programı uygulamıştır. İspanya'da her ne kadar insan brusellozunun azaltılmasında çok büyük ilerleme sağlanmış olsa da, bu ülke hala yılda en fazla vaka görülen Avrupa ülkesidir. Portekiz'de insan brusellozunu azaltmada önemli bir ilerleme kaydetmiştir. Yunanistan dünya çapında en yüksek vaka olan ülkeler arasında 25. sırada olmaya devam etmektedir (104).

Bruselloz Doğu Avrupa ülkelerinde yerleşik değildir. Özellikle Polonya’da, hastalık veterinerlerle sınırlıdır. Rusya’da bruselloz genellikle Kafkas bölgelerinde çok sık görülmektedir. Bu bölgede ki vaka oranı 1/10.000’dir. Yine de büyük ölçüde rapor edilmeyen vakalarda bulunmaktadır (104).

Orta Doğu genellikle yerleşik bir bölge olarak düşünülmüştür. Çünkü on ülkeden beşi bu bölgedeki en yüksek insan brusellozu oranına sahiptir. Suriye, OIE’den alınan bilgilere göre, endişe verici bir oran olan yıllık 1 milyonda 1603 vaka sayısı ile bütün dünyada hastalığın en yüksek oranının olduğu ülkedir, Moğolistan da onun arkasından ikinci sıradadır. Bu ülkeler son yıllarda dünyada en önemli insan brusellozunun yerleşim yeri olarak ortaya çıkmışlardır ve hastalık kontrol edilememektedir. Sürekli artan vakalar ve özellikle yetersiz sağlık alt yapıları nedeniyle çok ciddi bir toplum sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Kuzey Afrika’da bruselloz için yerleşik bir alan olarak düşünülmektedir. Bruselloz sahra çölü altındaki Afrika boyunca varlığını sürdürmesine rağmen esas olarak yaygınlığı konusunda çok şey bilinmemektedir (104).

Brusellozis ülkemizde ilk olarak 1915’de rapor edilmiş ise de en geniş ve kapsamlı araştırmalar 70.000 serum örneğinin test edildiği 1984-1987 yılları arasında yapılmıştır. Hastalık prevalansının % 1.8 ile % 6 arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Bu prevalans düzeyi ile yaklaşık 1.75 milyon insanın brusellozdan etkilendiği hesap edilmiştir (112). Yine ülke çapında 1989 yılında bölgelere göre yapılan serolojik tarama sonuçları % 0-10 oranındaki hastalık prevalansı, sığırlar ve koyunlarda sırasıyla % 3.56, % 1.26, 1990 yılında % 1.2, % 2.08; 1991 yılında % 1.01, % 1.83 olarak belirlenmiştir (11).

## 2.10. Korunma

Hayvanlarda, ekonomik olmaması ve hastalık taşıyıcılığının ortadan kaldırılamaması nedeniyle tedavi uygulanmamaktadır. Ancak koruma amacıyla başta aşılama olmak üzere gerekli tedbirler alınmaktadır. Aşı olarak koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev 1, sığırlarda *B. abortus* S 19 aşısı kullanılmaktadır. Trakya Bölgesi’nde 1991 ve 1993 yılları arasında yapılan pilot çalışma sonrasında bütün ergin

sığır ve koyunların düşük doz *Brucella* aşılı ile aşılınmaları ülkesel kontrol ve eradikasyon programı uygulamaya konulmuştur. Son yıllarda Türkiye’de brusellozis ile ilgili yapılan en kapsamlı çalışma, 1997 yılında başlatılan Tarım ve Köyişleri Bakanlığı projesidir. Bu proje ile sığır ve koyun brusellozis prevalansının belirlenmesi ve brusellozis kontrol programının yeniden gözden geçirilmesi amaçlanmıştır. 2000 yılında yayınlanan çalışma sonuçlarında, ülke çapında her ilin dörder ilçesinden tesadüfi örnekleme yoluyla 34.458 adet sığır, 30.433 adet koyundan olmak üzere toplam 64.891 serum örneği alındığı, serumların Rose-Bengal testi ile taranıp pozitif bulunan bu serumların Komplement Fiksasyon testi(CFT) ile doğrulanmasının yapıldığı araştırma sonucu brusellozis prevalansının sığır popülasyonunda % 1.43, koyun popülasyonunda ise % 1.97 olarak bulunduğu bildirilmiştir (65).

### 2.11. Teşhis

Hastalığın klinik semptomlarına bakılarak teşhisi mümkün olabilir. Ama *Brucella*’nın teşhisinde standart yöntem kültürel tekniklere dayalı bakteriyel izolasyondur. *Brucella* etkenlerinin kültürel tekniklerle izolasyonunun zaman alması, sütün mikrobiyal kalitesinin düşük olması sonucu etkenlerin dominant flora tarafından baskılanması, selektif besiyerinde mantarların gelişmesinden dolayı kültürel tekniğin birçok olumsuz yönleri bulunmaktadır (31). Kültürel tekniklerin dışında Serum Aglutinasyon testi (SAT), Rose Bengal Testi (RBT), Complement Fiksasyon Testi (CFT) ve Enzim-Linked İmmunosorbent Assay Testleri (ELISA) gelmektedir (4). Son yıllarda çok hassas, direkt etkenin varlığını ortaya koyan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmaktadır.

İnsanlarda bu hastalıktan şüphe edildiği zaman, teşhis genellikle serolojik yöntemlerle yapılır. Oligo Polisakkarit (OPS)’e karşı direkt antikorların belirlenmesine dayanır. Birçok sayıda serolojik tekniğin geliştirilmesine ve test edilmesine rağmen, altın standart olarak bilinen tüp aglutinasyon testi daha çok kullanılır. Tüp aglutinasyon testini doğru yorumlamak için uzun zamana ve deneyime ihtiyaç vardır. Bu test için indirect Coombs testi dâhil, Rose Bengal ve Slide Aglutinasyon testleri geliştirilmiştir (89,131). Mikroorganizmaları kümeleştirmede kullanılan serum yeterliliğini ölçen bu test, anti-O-polisakarit



antikorun varlığını yansıtır. Monomerler içindeki IgM'yi ayırmak için 2-mercaptoethanol ya da dithiothreitolle serum tedavisinden sonra tüp aglütinasyon testin kullanımı IgG antikorunu meydana çıkarır. 1/160 titre ve yukarısı hastalığın varlığı için pozitif düşünülür. Hastaların çoğu zaten klinik sunum sırasında yüksek titrelerle sahiptir. Bu yüzden, titrede 4 katı bir artış gözükülebilir. IgM hastalığın erken safhalarında yüksektir ve başarılı bir tedaviden aylar, hatta yıllar sonra bile 1/20 gibi düşük seviyelerde kalmaya devam edebilir (23). Serum testi, düşük seyreltmelerde ortaya çıkabileceği için, her zaman en az 1/320 seyreltme içermelidir. Tüp aglütinasyon testi *B. canis* antikorlarını meydana çıkarmaz, çünkü pürüzlü organizmanın yüzeyinde O-polisakarit yoktur. İmmünoenzimatik yöntemler (mesela enzime bağlı immunosorbent yöntemleri (ELISAs)) *B. canis* ile birlikte kullanım için geliştirilmiştir, ancak iyi bir şekilde standartlaşmamıştır (64).

Serolojik testlere ek olarak, teşhis, mikrobiyolojik kültür ile takip edilmelidir. Kültürler, laboratuvar çalışanları için aşırı derecede bulaşıcı olmaları nedeniyle sadece biyolojik tehlike ambleminin olduğu yerlerde ekimleri yapılmalıdır (56).

### 2.11.1. Serolojik Yöntemler

*Brucella*'nın serum ya da sütteki belirli antikorların ortaya çıkarılması teşhisin temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla serolojik testlerden yararlanır. En etkili yöntem genellikle enfeksiyon kapmış hayvanlarda, etkeni belirlemek için spesifite ve hassasiyeti yüksek, ucuz ve hızlı bir test kullanarak ortaya koymaktır. İncelemeye uygun olan numuneler daha sonra, yapılacak son teşhis için daha sofistike, özel teyit edici testler kullanılır. Anti-*B.abortus* serumunun kullanılmasına karşı standardize edilmiş antijenler kullanan testleri kullanmak kesinlikle esastır. Uygun kalite kontrol serasının her test grubunu kapsaması gerekir ve eğer kalite kontrol kriterleri karşılanmıyorsa testler tekrarlanmalıdır (64,129).

Serolojik sonuçlar, hastalık sıklığına, aşı kullanımına ve diğer mikroorganizmalarla enfekte olmaları gibi yanlış pozitif reaksiyonların ortaya çıkmasına karşı değerlendirilmelidir. Laboratuvara dayalı teşhisle birlikte, tek tek hayvanların denetim izini, numune numarası ve hayvan ile sonuç arasındaki bağın

tam ve kesin olması amacıyla test sonucunun doğru bir şekilde belirlenmesi zorunludur (64,129).

### **Rose Bengal Plak Testi (RBT)**

RBT, *Brucella* antijen testleri olarak bilinen testlerden biri olup düşük pH derecesinde antijene bağlanan IgM antikorlarının varlığını ortaya koyan, antijen varlığına dayanan bir testtir. RBT, tamponlanmış plak aglütinasyon testleri ve kart testi gibi testlerle dünya çapında *Brucella* bakterilerinin serolojik teşhisinde çok yaygın kullanılmaktadır (64,129).

RBT boyanmış antijen damlalarının ve serumun bir plak üzerinde karıştırıldığı ve aglütinasyonun pozitif bir reaksiyon anlamı ortaya çıkaran basit bir nokta aglütinasyon testidir. Bu test mükemmel bir görüntüleme testi olmasına rağmen özellikle aşılınmış olan hayvanların teşhisi için yüksek derecede hassas olabilir. Yine bu test çok sayıdaki numuneleri işlemek için özel yapılmış aletler gerektirebilir (129).

### **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA )**

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) teknolojisi günümüzde çok büyük çeşitlilikte insan ve hayvan hastalıklarını teşhis etmede kullanılmaktadır. ELISA testleri basit, hassas ve spesifik testlerdir. ELISA testleri esasta insan ve hayvan türlerinden alınan her türlü serum ve gıdalar için kullanılabilirler de sonuçlar kullanılan metodolojiye ve laboratuvarlar göre değişiklik gösterebilir. Sığır, koyun ve keçi sütlerinde *Brucella* antikor varlığını ELISA uygulamasıyla belirlemek için birçok araştırmacı tarafından çalışma yapılmıştır (29,49,127). ELISA küçük laboratuvarlarda kullanmak için Komplement Fiksasyon Testinden(CFT) çok daha uygundur. Fakat ELISA'lar RBT den daha hassas olsa da, bazen RBT nin pozitif olduğu enfeksiyon kapmış hayvanları ortaya çıkarmazlar (129).

*Brucella* etkenlerinin teşhisi amacıyla kullanılan ELISA tekniğinde antijen olarak *Brucella*'ların tüm hücreleri, lipopolisakkaritleri, tuzla ekstrakte edilen

proteinleri, nativ haptin polisakkariti ve dış membran proteinleri kullanılabilir. Serumda Brusellozun başlangıcında özgül IgM, üçüncü haftadan sonra ise özgül IgG antikorları saptanabilir. Akut ve kronik bruselloz tanısında Ig sınıflarının profilini veren, hızlı, duyarlı, spesifik, güvenilir ve geniş kitlelerin taranmasında en uygun yöntem ELISA'dır. ELISA yöntemiyle brusellozun seyri sırasında IgG, IgM, IgA antikor titrelerindeki değişiklikler klasik serolojik testlerden daha iyi tespit edilir ve kronik bruselloz tanısında iyi bir yöntemdir (10,12).

### **Serum Aglütinasyon Testi (SAT)**

Hastalığın teşhisinde önemli olan temel testlerden birisidir. Genellikle, erken olguların ortaya konulmasında kullanılan bu testin uygulanmasında ve değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken hususlar önemlidir. Bu test, gerek aşılama ve gerekse infeksiyon sonu oluşan spesifik antikorları belirler, ancak ayrımlarını yapamaz. Abortuslardan hemen sonra kandaki antikorları saptayamaz. Kronik olgularda ise negatif çalışabilir. Ayrıca, kullanılan antijenin hazırlanmasındaki ve uygulanmasındaki aksaklıklar da testi olumsuz yönde etkileyebilir (15).

Serum Aglutinasyon Test (SAT) bruselloz teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve uygulaması basit ve ucuz olmasına rağmen hassasiyet ve spesifitesi düşüktür. Bu nedenle test sadece alternatif tekniklerin yokluğunda kullanılmaktadır (6,129).

### **Komplement Fiksasyon Testi (CFT)**

Komplement Fiksasyon Testi(CFT) bruselloz tanısında ilk defa Larson (Larson 1912) tarafından kullanılmıştır. Komplement Fiksasyon Testi (CFT) zaman alan, yoğun iş gücü isteyen, birçok ayırıcın kullanıldığı ve bazı serumlarda anti-komplement aktivitesinin karşılaşıldığı bir yöntemdir. Komplement Fiksasyon Testi'nin (CFT) hassasiyet ve spesifitesi yüksek, ancak, uygulanması için iyi laboratuvar olanakları ve eğitilmiş personel gerektiren karmaşık bir yöntemdir. Eğer bu koşullar yerine getirilir ve düzenli olarak yürütülür ise ancak o zaman

memnuniyet verici olabilir. Veteriner hekimlikte brusellozu teşhis etmek için CFT uzun yıllar kullanılmıştır. Bunun sebebi *Brucella* aşısı ile aşılandıktan sonra ortaya çıkan antikörlara nispeten duyarsız olup hastalığa karşı oluşan antikörları tespit eder. CFT testi ile 2ME testi sonuçları paralellik göstermesine rağmen her gün taze ayıraçların hazırlanması ve kompleks metodoloji, kullanım alanını kısıtlamaktadır. (6,129,132)

Serum aglutinasyon testine oranla, özellikle, kronik olgularda daha spesifik bir testtir. Ancak, spesifik olmayan ve inkomple antikörların araya girdiği durumlarda hemen daima negatiftir. İnfeksiyonun ortaya çıkarılmasında önemli bir test olarak değerini korumakta ise de araştırmacılar, bu testle birlikte Coombs (Antigulobulin) testinin uygulanmasıyla daha kesin sonuç alınacağını ileri sürmektedirler (15).

Komplement-fiksasyon testinin (CFT) diyagnostik hassasiyeti, tamponlanmış aglutinasyon testlerinden daha düşüktür, ama bu spesifite klasik testler içinde en yüksek olandır. Sonuç olarak, CFT, Bruselloz için sıklıkla onaylayıcı test olarak kabul edilmektedir (89).

### **2.11.2. Bütünleyici testler**

Birçok farklı serolojik testler kullanılmaktadır, bunlardan daha çok kullanılan SAT'ın çeşitlerinden olan Rivanol ya da 2-ME testi yaygın olanlarıdır. Bu testler spesifik olmasına rağmen birçok dezavantajları bulunmaktadır. Standart test yerine böyle testlerinin kullanımı tavsiye edilmemektedir (129).

### **Milk testi**

Süt işletmelerinde pratik ve ucuz olması nedeniyle brusellozun ortaya konmasında ideal bir testtir. Test düzenli olarak tekrarlanabilir ve serum antikörların iyi bir yansımasını sağlar. Yayık ya da süt tankındaki sütlerde, sürü içindeki enfeksiyon kapmış hayvanları ortaya çıkarmak için kullanılabilir ve daha sonra kan testi kullanılarak değerlendirilebilir. Bu teşhis yöntemi, çok etkilidir ve genellikle süt işletmeciliği yapılan çiftliklerde tercih edilmektedir (129).

### **Milk Ring Testi**

Milk Ring Testi (MRT) basit ve etkili bir yöntemdir, ama sadece inek sütlerinde kullanılabilir. Bir damla haematoksin boyalı antijen, bir bardak ya da plastik bir tüp içinde küçük bir miktar süt ile karıştırılır. Eğer sütte spesifik bir antikor var ise antijene bağlanarak sütün üzerinde kremayla birlikte mavi bir halka şeklinde görülür. Bu test hassas olmasına rağmen büyük bir sürü içindeki az sayıda enfeksiyon kapmış hayvanın belirlenmesinde başarısız olabilir. Yine bu testin spesifitesi düşüktür. Bu nedenle hatalı sonuçların yüzdesi yüksek olur. ELISA testleri bu testten çok daha hassas ve spesifiktir (6,129).

### **Intradermal Test**

Brucellin INRA ya da Busellarjen OCB gibi standardize edilmiş hazır antijen kullanılan bu testte, bruselloz görülmeyen bölgelerdeki sürülerin durumunu gözlemlmek için kullanılabilir. Bu yöntem hassas ve spesifiktir, ancak aşılınmış hayvanlarda yanlış pozitif reaksiyonlar ortaya çıkabilir (129).

### **Diğer Testler**

Slide Aglütinasyon testi, diğer geleneksel testlere kıyasla düşük hassasiyetli bir testtir (7). Buffered Plate Agglutination testi (BPAT), Buffered Acidified Plate Antigen testi (BAPAT), Rose Bengal Testi (RBT) ile hassasiyet ve spesifitede aynı düzeydedirler ve özellikle IgG<sub>1</sub>'in belirlenmesinde daha fazla analitik hassasiyete sahiptirler. Her ne kadar bu üç testin diyagnostik seviyeleri farklı olsa da, SAT'dan daha fazla hassasiyet ve spesifite gösterdikleri üzerinde görüş birliği vardır. Riv.T ve 2-mercaptoethanol testlerinde IgM'nin kümeleşim hareketi diyagnostik spesifiteyi geliştirmek amacıyla çıkarılmak zorundadır. IgG<sub>1</sub> reaktivitesinin miktarı gelişmiş diyagnostik spesifiteye yol açmaktadır (89).

## 2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle *Brucella*'nın Tanısı

Moleküler diyagnostik teknikler diyagnostik uygulamada önemli bir devrimi temsil eder (32,78). İlk kez K. Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanan ve kendisine 1993 yılında Nobel ödülünü kazandıran bu yöntem, günümüzde moleküler biyolojinin vazgeçilmez araçlarından birini oluşturmaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) belirli bir DNA bölgesinin in vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılarak antijenin varlığının ortaya konmasına dayalı bir tekniktir. Hedef genetik materyalin, oligonükleotit primerler, deoksinükleotid trifosfatlar(dNTP'ler), tampon sistemi ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi varlığında farklı ısı değişimleri yardımıyla çoğaltılması PCR'ın temelini oluşturmaktadır (45).

PCR yöntemi ilk olarak 1987 yılında Mulis ve Faloona tarafından tanıtılmasından sonra *Brucella*'nın tanısında önemli gelişmelere yol açmıştır. 1987 yılından sonra *Brucella*'nın tanısında birçok PCR yöntemi geliştirilerek kullanılmıştır. Günümüzde konakçı dokuları, süt veya vaginal akıntılardan alınan şüpheli bakteri kolonilerinin tespitinde PCR yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Duyarlılığının yüksek ve hızlı olması herhangi bir vücut dokusunda uygulanabilmesi ve etkenin bulaşmasından 10 gün sonra dahi pozitif sonuç vermesi PCR'ın önemli avantajlarıdır. Farklı hedef genler, primer çiftleri, uygulama teknikleri ve ekstraksiyon yöntemleri içeren farklı PCR yöntemleri, hem hayvan hem de insan *Brucella* infeksiyonlarının tespitinde de kullanılmaktadır (42,85,103).

*Brucella*'nın varlığından günümüze kadar birçok teşhis yöntemleri geliştirilmiş olsa da, son yıllarda kullanımı yaygınlaşan moleküler yöntemlerle *Brucella*'nın teşhisi oldukça önem kazanmıştır. Moleküler yöntem olarak kullanılan PCR ile BCSP31 geni (31 kDa kodlayan), 16 S rRNA geni kodlayan ve dış membran proteini kodlayan genler kullanılarak alt tiplendirmeler yapılmaktadır. PCR ile yaklaşık 700 cfu/mL bakteri saptanabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü %98,3-100'dür (21).

Daha önce tür olarak tanımlanabilirken biyotip ayrımı yapılamamaktaydı, daha sonraki PCR teknolojisindeki gelişmelerle PCR ile biyotip ayrımını yapabilen yöntemler de geliştirilmiştir. Fekete ve ark. (47) ilk olarak 1990 yılında *Brucella*'nın tür spesifik identifikasyonunda PCR'ı kullanmışlardır Bu yöntemlerle *Brucella* cinsine ait türlerde korunan genetik bir lokus olan *BCSP31* veya *16S rRNA* genleri saptanabilmektedir (21).

Bir çok tür ya da 16S rRNA geni, 16S-23S gen arası boşaltan bölgesi, OMP2 ve BCSP31 gibi farklı gen dizilerinden kaynaklanan primerleri kullanan geleneksel spesifik tür deneyler oluşturulmuştur. Bu deneyler brusellanın farklı klinik türlerinin belirlenmesinden uyarlanmışlardır. Çalışmaların çoğunluğunda, geleneksel PCR klinik türlerden alınan *Brucella* DNA'sını belirlemede iyi bir araç olduğunu kanıtlamıştır (32,78).

Leal-Klavezas ark. (77) belirlenebilir antikor miktarlarının, *B.abortus* olan keçilerin yapay aşılamasından ilk 12-16 gün sonra bile kaydedilmediğini belirtmiştir. Diğer taraftan, hastalık kronikleştiğinde, antikor titri belirlenemez bir seviyeye düşebilir ve bu da özellikle *Brucella spp.* hücre içi organizmalarında olur. Serokonversiyon olmayan gizli enfeksiyon, özellikle pubertal öncesi hayvanlarda bu sorunu karmaşık hale getirir. Yine Leal-Klavezas ve ark. (78) yaptığı bir çalışmada süt örneklerinden PCR' da % 64 oranında pozitiflik saptarken aynı örneklerden etken izolasyonu yapamamışlardır.

Queipo-Ortuno ve ark. insan brusellozu için hızlı bir diyagnostik alet geliştirmek amacıyla PCR'da Light Cyclus (ışık döndürücüsü) sistemini ve SYBR Green 1'i kullanmışlardır. Bu Real-Time PCR testlerde, *B.abortus*'un dış zarının imünofektör 31 kDa proteinini kodlayan 223 bp gen dizisini meydana çıkarmayı hedeflemektedir. Araştırmacılar, aktif bruselloz olan 60 hastadan alınan 62 serum örneklerini incelemişler ve analizin %91,9 hassasiyeti ve %96,4 spesifitesi olduğu sonucuna varmışlardır (108).

### **Brusellozda Real-Time PCR Kullanımı**

Real-time PCR'nin tanıtımı, geleneksel PCR'a kıyasla performansın geliştirilmiş hassasiyetini, spesifitesini ve hızını sunar. Farklı belirleme kimyasal maddeleri kullanan birkaç Real-Time PCR deneyi oluşturulmuştur. Ayrıca, bunların bazıları insan ve hayvan kaynaklarından alınan çeşitli klinik örneklerle toparlanmıştır. Araştırmacılar, Real-Time PCR'nin klinik örnekler için çok hassas bir yöntem olduğunu onaylamışlardır (38,45,74,107,111). Bununla beraber, standart serolojik ve bakteriyolojik yöntemlerle karşılaştırıldığında, doğal olarak enfeksiyon kapmış olan ineklerden alınan kan süt ve lenf örneklerinde Real-Time PCR kullanmada hiçbir avantaj bulamamıştır (79).

Real-Time PCR kullanılarak bruselloz tanısıyla ilgili ilk çalışma Redkar ve ark. (111) tarafından yapılmıştır. Real-Time PCR testinin yapılması için; hedef DNA, iki primer, dört nükleotid trifosfat (dNTP), polimeraz enzimi, tampon çözelti içinde magnezyum iyonları gereklidir. Reaksiyon thermocycle cihazında ısı döngüleriyle yapılmakta; çift zincirli hedef DNA'nın denaturasyonu için ısı yükseltilir ve sonra primerlerin tek zincirli DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlamak için ısı düşürülür. Daha sonra polimeraz enzimi yardımıyla tek zincir DNA kalıplarına bağlanan primerler 5-3 yönünde uzatılır (21,32,74).

Real-Time PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünlerin varlığının saptanması; çift zincirli DNA arasına giren bir floresan boya veya floresan ile işaretli probun aracılığıyla yapılır. Bu amaç için Syber Green veya floresan probun kullanılmaktadır (45,82). PCR ile bruselloz tanısında Taqman probu; jel elektroforeze göre daha özgül bulunmuştur (19).

Günümüzde gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde Real-Time PCR'a dayalı uluslararası standart metotların geliştirilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Hatta bazı patojenlerin tespitinde kullanılan ticari Real-Time PCR kitleri piyasaya sunulmuştur. Real-Time PCR teknikleri, kültürel yöntemler ve geleneksel PCR tekniklerine kıyasla; hızlı ve multipleks özelliğe sahip olmaları ve uygulama



kolaylığı gibi çok önemli avantajlara sahiptir. PCR ile uygun örnek alındıktan sonra 24 saat içinde etken saptanabilmektedir (32,38,45,74,82,108,111).

Diğer yandan, Real-Time PCR oldukça dinamik bir teknik olmanın yanında ortamdaki canlı ve ölü hücre ayırımını yapmamaktadır. Real-Time PCR'ın bir diğer dezavantajı ise pahalı olmasıdır. Ancak bildirilen tüm dezavantajlarına rağmen Real-Time PCR, sonsuz açılımı olan ve giderek kendine yeni kullanım alanları bulan bir tekniktir. İşte patojen bakterilerin tespiti de bu alanlardan birisidir. Dolayısıyla Real-Time PCR, çeşitli gıdalarda patojen mikroorganizmaların tespitinde gelecek vaat eden bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (32,38,45,74,82,108,111).

**Tablo 1:Brucella Genusu Türlerinin ve Biyotiplerinin Ayırıcı Karakterleri (6,25,27,91)**

Biyotip	Biyotip	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Üreaz	Boyalarda üreme					Aglutinasyon			Tb RTD Faj duyarlılık	Konakçı
					B.Fuksin		Thionin			Anti A	Anti M	Anti R		
					b	c	a	b	c					
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	D	+	+	-	+	+	-	+	-	-	Koyun
	2	-	-	D	+	+	-	+	+	+	-	-	-	Keçi
	3	-	-	D	+	+	-	+	+	+	+	-	-	İnsan
<i>B. abortus</i>	1	+,-	+	1-2 h	+	+	-	-	-	+	-	-	-	Sığır  İnsan
	2	+,-	+	1-2 h	-	-	+	-	-	+	-	-	+	
	3	+,-	+	1-2 h	+	+	-	+	+	+	-	-	+	
	4	+,-	+	1-2 h	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
	5	-	-	1-2 h	+	+	-	+	+	-	+	-	+	
	6	-	-	1-2 h	+	+	-	+	+	+	-	-	+	
	7	-	+,-	1-2 h	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
	8	+	-	1-2 h	+	+	-	+	+	-	+	-	+	
	9	-	+	1-2 h	+	+	-	+	+	-	+	-	+	
<i>B. suis</i>	1	-	+	0-30dk	-	-	+	+	+	+	-	-	-	Domuz
	2	-	-	0-30dk	-	-	-	+	+	+	-	-	-	Domuz
	3	-	-	0-30dk	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Domuz,İnsan
	4	-	-	0-30dk	+	+	+	++	+	+	+	-	-	Ren geyikleri
	5	-	+	0-30dk	-	-	+	+	+	-	+	-	-	Kemiriciler
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	0-30dk	-	-	+	+	+	+	-	+	-	Neotomae lepida
<i>B. ovis</i>	1	+	-	0	+	+	-	+	+	-	-	+	-	Koç
<i>B. canis</i>	1	-	-	0-30dk	-	+	+	+	+	-	-	+	-	Köpek, İnsan

**Tablo 2: Brucella Genusu Türlerinin ve Biyotiplerinin Dekarboksilasyon ve Fermentasyon Özellikleri (6,11)**

Biyotip	Biyotip	L- alanin	L- aspar.	L- glutamik asit	L- arabinoz	D- galaktoz	D- riboz	D- glukoz	L- eritrit	D- ksiloz	L- alginin	L- lizin
<i>B. melitensis</i>	1	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>B. abortus</i>	1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. suis</i>	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	+	+	+	+	d	+	+	-	-
<i>B. ovis</i>	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>	1	-	-	-	-	-	+	+	d	-	+	+

+ : Pozitif

- : Negatif

D: Değişken

**Tablo 3: Brucella türleri, biyotipleri, konakçı tercihleri ve tür identifikasyonu (18,103)**

Tür	Biyotip	Konakçı	Tanımlayan	Tür identifikasyonu
<i>B. melitensis</i>	1-3	Koyun, Keçi Deve	Bruce,1887	Fuksin(+) Thionin(+) Safranin inhibisyonu (-) H <sub>2</sub> S üretimi (-) Üreaz 24 saatte (+) CO <sub>2</sub> üretimi (-) Tibilis faj lizis (-) Weybridge faj lizis (-)
<i>B. abortus</i>	1-6,9	Sığır Deve Yak Bufalo	Bang,1897	Fuksin(+) (Biyotip 2 hariç) Thionin(-) (Biyotip 1-2 ve 4) Safranin inhibisyonu (-) H <sub>2</sub> S üretimi (+),(Biyotip 5 hariç) 24 saatte üreaz(+), CO <sub>2</sub> üretimi (+)(Biyotip 1-4) Tibilis faj lizis (+) Weybridge faj lizis (+)
<i>B. suis</i>	1-5	Domuz (biyotip 1-3) Yabani Tavşan (biyotip 2) Ren geyiği (biyotip-4) Karibu (biyotip-4) Yabani kemiriciler(biyotip-5)	Traum,1914	Fuksin(-)(biyotip-3 hariç)Thionin(+) Safranin inhibisyonu (+) H <sub>2</sub> S üretimi (+)(biyotip-1) Üreaz 15 dakikada (+) CO <sub>2</sub> üretimi (-)Tibilis faj lizis (-) Weybridge faj lizis (+)
<i>B. canis</i>	--	Köpekgiller	Carmichael ve Bruner 1968	Fuksin(+,-) Thionin(+) Safranin inhibisyonu (-) H <sub>2</sub> S üretimi (-) Üreaz 15 dakikada (+) CO <sub>2</sub> üretimi (-)Tibilis faj lizis (-) Weybridge faj lizis (-)
<i>B. ovis</i>	--	Koyunlarda	Van Drimmelen, 1953	Fuksin(-) bazı türler için Safranin inhibisyonu (-) H <sub>2</sub> S üretimi (-) üreaz (-) CO <sub>2</sub> üretimi (+) Tibilis faj lizis (-) Weybridge faj lizis (-)
<i>B. neotomae</i>	--	Kemirgenlerde	Stoenner ve Lackman 1957	Fuksin(-) Safranin inhibisyonu (-) H <sub>2</sub> S üretimi (+) Üreaz15 dakikada (+) CO <sub>2</sub> üretimi (-) Tibilis faj lizis (+,-) Weybridge faj lizis (+)
<i>B. pinnepediae</i> ve <i>B. cataceae</i>	--	Balina Yunus Domuz Balığı (pinnepediae) Fok (cetaceae)	Ewalt ve Ross, 1994	Fuksin(+) Thionin(+) Safranin inhibisyonu (-) H <sub>2</sub> S üretimi (-) üreaz (+) CO <sub>2</sub> üretimi (-)Pinnepediae CO <sub>2</sub> üretimi (+)cetaceae Tibilis faj lizis (-) Weybridge faj lizis (+)pinnepediae Weybridge faj lizis (-)cetaceae

### 2.13. Tedavi

Bruselloz hastalığının etkeninin intrasellüler olmasından dolayı uzun süre tedavi gerektirir (60). *Brucella* bakterileri, çok sayıda oral yolla alınan antibiyotiklere ve aminoglikozlara karşı hassastır. Tek bir ilaçla tedavi yüksek bir nüksetme oranı ile sonuçlandığından mümkün olduğu zaman kombine kürler kullanılmaktadır. Tedavinin başlangıcında ilk 2 haftadan 3 haftaya kadar kas yoluyla verilen 1 g/d streptomisinle birlikte oral yolla verilmesi gereken 6 haftalık bir 200 mg/d doksisisilin kürü, hasta olan yetişkinin tedavisinde etkilidir. Spondilitis olan hastaların daha uzun bir tedaviye ihtiyacı olabilir. Altı haftalık oral yolla alınan 900 mg/d rifampin ve 200 mg/d doksisisilin kürü etkili olmaktadır. Ancak, birkaç inceleme, streptomisin ve doksisisilin kombinasyonu ile yapılan tedavinin rifampin ve doksisisilin kombinasyonu ile yapılan tedaviden daha az sıklıkta nüksle sonuçlandığını öne sürmektedirler (83).

Bruselloz sonucu oluşmuş endokarditis, en az 6 hafta boyunca rifampin, streptomisin, ve deoksisisiline ile tedavi edilebilir. Yine hastalık sonucu oluşmuş Merkezi Sinir Sistemi enfeksiyonlarında rifampin ve trimethoprin/sulfametaxazole kombinasyonuna cevap vermektedir, ancak uzun bir tedavi gerektirebilir. Bu antibiyotik kombinasyonu 8 yaşın altındaki çocukların enfeksiyonunda da etkilidir. Birleşik Gıda ve Tarım Organizasyonu-Dünya Sağlık Örgütü Uzman Komitesi, enfekte hamile kadınların rifampin ile tedavisini tavsiye etmektedir (64).

### 2.14. Literatür Bilgisi

Bruselloz, dünyanın birçok ülkesinde insan ve hayvan sağlığı açısından hala önde gelen zoonzlardan biri olmaya devam etmektedir. Hastalık hayvanlarda abortuslar, süt verimi kaybı, infertilite, hastalığa bağlı olarak veteriner ve aşılama masrafları nedeniyle hayvansal üretimde kayıplara sebep olurken, hastalık taşıyan hayvanlarla direkt temas veya kontamine süt ve süt ürünleri tüketimiyle de önemli bir halk sağlığı problemi olarak görülmektedir. Bruselloz dünyada olduğu gibi ülkemizde de insan ve hayvanlarda sıklıkla rastlanılan bir hastalıktır. Bu konuda yapılan çalışmalarda; Türtütoğlu ve ark. (124) Burdur yöresinde sığır sütlerinde *Brucella spp.* varlığını ve *Brucella* türlerine karşı oluşmuş antikorları belirlemek

amacıyla 101 inek ve 226 koyundan 630 süt örneğini toplamışlar. Süt örneklerinden etken izole etmediklerini ancak Milk Ring Test (MRT) ile inek süt örneklerinin 12'sinde (% 3), koyun süt örneklerinin 40'ında (%17.7), SAT' ile inekte 9 (% 2,2) ve koyunda 31'inde (%13.7) pozitiflik saptadıklarını ve bruselloz oranının ineklerde %1, koyunlarda % 3,5 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Güllüce ve Leloğlu'nun (60) Kars merkez ve ilçelerine bağlı yerlerde yaptığı çalışmada, *Brucella* enfeksiyonunun olduğu bilinen 22 yerleşim biriminden alınan 712 adet inek sütü örneği ELISA ve Milk Ring Test (MRT) ile araştırılmış, MRT ile %56), ELISA ile %65,59 pozitif sonuç saptanmıştır.

Terzi (123) Samsun'da 50 adet inek sütü ve 50 adet keçi sütlerinde *Brucella* antikorlarının saptanması amacıyla yaptığı bir çalışmada, toplam 100 adet süt örneğinde aglütinasyon testi (Whey-AT) ve Milk Ring Test (MRT) ile *Brucella* antikorlarının varlığı araştırılmış, Milk Ring Test (MRT) sonuçlarına göre inek sütü örneklerinin %20, keçi sütü örneklerinin de %12'si *Brucella* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Serum aglütinasyon testinde (Whey-AT) saptanan antikor titrelerine göre inek sütü örneklerinin %8'i pozitif, %6'sı şüpheli, %86'sı negatif, keçi sütü örneklerinin ise %6'sı pozitif, %4'ü şüpheli, %90'ı da negatif olarak bulunmuştur.

Zowghi ve ark. (134) İran'da yaptıkları bir çalışmada; incelenen 6,472 adet inekten 1,056 tanesi serolojik olarak pozitif, bu ineklerden alınan 6,472 süt örneğinin 1,632'si ise MRT testi ile pozitif olarak bulunmuştur. Bütün süt örneklerine kültür işlemi uygulanmış, 397 adet *B. abortus* izolatu elde edilmiştir. İzolatların 119'u seronegatif ineklerden izole edilmiştir.

Barrow ve ark. (17) 1161 adet taze krema ve krema ürünleri örneğini bakteriyolojik yöntemler ve hayvan deneyi kullanarak incelemişler ve 19 adet *B. abortus* izolatu saptamışlardır.

Taşcı (121) Ankara'da tüketime sunulan market, pazar ve pastanelerden alınan 35 mutfaklık tereyağı, 35 krema ve 35 kremşantili pasta örneklerinin hiçbirinin *Brucella* bakterileri ile kontamine olmadığını bildirmiştir.

Küplülü ve Sarımehmetoğlu (75), dondurma örneklerinde *Brucella* izolasyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada 80 vanilyalı, 75 çikolatalı ve 62 meyveli olmak üzere toplam 214 dondurma örneğini incelemişler. Bunlardan çikolatalı ve meyveli dondurmalarından *Brucella* izole edemezken vanilyalı dondurmaların 5 tanesinde *B. abortus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Leal-Klevezas ve ark. (78) PCR hassasiyetini, klinik olarak sağlıklı olan 300 keçiden alınan 23 süt ve kan örnekleri üzerinde yaygın olarak kullanılan bazı serolojik ve bakteriyolojik tekniklere karşı kıyasladıkları çalışmalarında; kan örneklerinin serolojik yöntemde %60 pozitif iken, %86'sının PCR'da pozitif olduğunu göstermişlerdir. Etkeni sadece bir kan örneğinden izole etmişlerdir. Süt örneklerinin %64'ü PCR'da pozitif bulunurken kültürlerde bakterilerin üremediğini bildirmişler. Bu incelemeyle, PCR'ın hassasiyetinin RBT ve kültürel tekniklere kıyasla daha yüksek olduğunu açıklamışlardır.

İlhan ve ark. (66) 102 süt örneğinin Farrel dekstroza agarla %7,8'inin *Brucella* pozitif olarak tespit etmişler. Süt örneklerine PCR ürünleriyle yaptıkları analiz sonucunda 24 örnekte (%23,5) *B. melitensis* DNA'sının 731 bp genişliğinde bant verdiğini bildirmişlerdir. Yine Milk Ring Testi (MRT) ile 102 sığırın %27,4'ü *Brucella* pozitif olduğunu vurgulamışlardır. PCR ve kültür analizleri sonuçlarını karşılaştırdıklarında, her iki testin sonucunda 8 pozitif ve 78 negatif olduğunu, PCR ile MRT'ni karşılaştırdıklarında 22 örneğin pozitif, 72 örneğin ise negatif olduğunu açıklamışlardır. PCR ve MRT testlerini karşılaştırdıklarında aralarında %96 gibi bir uyum olduğu kanısına varmışlardır.

Ataş ve ark. (13) Sivas il merkezinde satışa sunulan taze ve salamura beyaz peynir örneklerinden alınan 135 adetinin 8'inde (% 5.9) *Brucella* cinsi bakteriler izole edilmiştir. Bu örneklerden % 2.9'u *B. melitensis*, % 2.9'u *B. abortus* olarak

tiplendirilmiştir. Market ve şarküterilerde satışa sunulan 120 adet salamura beyaz peynir örneğinde *Brucella* cinsi bakterilere rastlanmamıştır.

Romero ve ark. (116), seropozitif olarak belirlenen 56 süt örneklerinde izolasyon ile PCR yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, kültürde pozitiflik oranını % 100 bulurken, PCR'da % 87,5 olarak belirtmişlerdir. Araştırmacılar PCR'da pozitiflik oranının daha düşük olmasının nedeninin DNA amplifikasyonunu engelleyen inhibitörlerin neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Akcankale (2) Burdur il merkezi ve ilçelerinde kurulan semt pazarlarından kendi yaptıkları peynirleri satan yetiştiricilerden temin ettiği 50'şer adet inek ve koyun sütünden yapılmış toplam 100 taze beyaz peynir örneğini *Brucella* varlığı yönünden incelemiş ve 100 adet peynir örneğinin %7'sinde *Brucella* spp. izole etmiştir.

Patel ve ark. (102) 13 sığır ve 40 bufalodan elde edilen toplam 53 adet süt örneğini PCR ve ELISA teknikleri ile *Brucella* antikorlarını belirlemek amacıyla analiz etmişler. Analiz sonucunda 9 örnek PCR yöntemiyle pozitif bulunurken, ELISA ile 15 örnekte pozitiflik tespit etmişlerdir. Hem PCR ve hem de ELISA ile 6 örnekte pozitiflik tespit edilirken, PCR yöntemiyle pozitif bulunan 3 örneği ELISA ile negatif tespit etmişlerdir.

Funk ve ark. (49) indirekt ELISA yöntemiyle 147 süt örneğini incelediklerinde 13 örneğin pozitif olduğunu 134 örneğin negatif olduğunu belirlemişlerdir.

Al-Mariri ve ark. (5) PCR'la sığır sütünde *B. abortus*'un teşhisi için 50 örneği incelemiş, sütün arıtma sistemi kullanarak direkt DNA ekstraksiyonu yaptıklarında 46 örnekte etkeni tanımlamış ve sensitiviteyi %92 olarak bulmuşlardır. Alkalın DNA ekstraksiyon yöntemini kullanarak 44 örneği tanımlamışlar sensitiviteyi %88 olarak bulmuşlardır. MRT ile tanımlama sonucunda ise 36 örnekte *Brucella* tespit etmişler sensitiviteyi % 72 olarak belirtmişlerdir.



Hamdy ve Amin (63) *Brucella* türlerini tespit etmek için 52 sığır, 21 koyun, 18 keçi ve 12 deveden topladıkları 103 süt örneğini sırasıyla Standart Tüp Aglutinasyon testi (SAT), Rose Bengal Plate testi (RBPT), Milk Ring testi (MRT) ve Polimeraz Chain Reaction (PCR) teknikleri ile incelemişlerdir. PCR'la 29 sığır, 10 koyun, 13 keçi ve 1 deve süt örneğinden *Brucella* DNA'sı ampflie etmişlerdir. Direkt kültür metoduyla ise 24 sığır, 12 koyun, 10 keçi süt örneğinde pozitif bulmuşlardır. Deve süt örneklerinden ise herhangi bir *Brucella* türü tespit edememişlerdir.

Güllüce ve ark. (59) Erzurum piyasasından topladıkları çeşitli peynir örneklerinde *B. abortus* antijenlerinin sıklığını ELISA tekniği ile araştırmışlardır. Araştırmalarında toplam 120 beyaz peynir, 60 civil peynir ve 52 lor peyniri örneğini incelemişler ve 120 beyaz peynir örneğinin %21.66'sında *B. abortus* antijeni saptamışlardır. Civil peynir ve lor peyniri örneklerinde ise *B. abortus* antijenine rastlamamışlardır.

Gupta ve ark. (57) geçmişlerinde abort yapmış keçilerden toplanan 54 süt örneğini incelemişler ve serolojik yöntemlerle sadece %59 örnekte *B. melitensis* tespit edebilmişler, PCR yöntemi ile ise %88.8 örnekte pozitif bulmuşlardır. Bundan dolayı PCR'ın yüksek hassasiyet ve özgünlüğünün keçilerde *Brucella*'nın teşhisi için değerli bir araç olacağı kanaatine varmışlardır.

Zuniga ve ark. (135) *B. abortus*'un fermente süt ürünleri ve buzdolabı ısısında canlılıklarını araştırdıkları bir çalışmada *B. abortus* inokule ettikleri fermente süt ürünlerinde bu bakterilerin canlı kalabileceğini, ayrıca pastörize edilmeyen kontamine fermente süttten *Brucella*'nın bulaşabileceğini ifade etmişlerdir.

Vanzini ve ark. (127) süt örneklerinde *B. abortus* antikörlerinin varlığının tespiti için indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (iELISA) ve *Brucella* Ring testini (BRT) karşılaştırmak için yaptıkları bir çalışmada, infekte olduğu bilinen 54 süt örneğinin %98.1'ini, ELISA ile %72.2'sini BRT ile pozitif bulmuşlardır. İnfekte olmayan 42 örnekte ise ELISA yöntemiyle 5, BRT ile de 4 örnek pozitif bulunmuştur.

Abdulkareem (1) Trakya yöresinde 75 süt örneğini kültür yöntemi ve PCR tekniği ile analiz ettiği çalışmasında kültür yöntemiyle 3 izolattan *Brucella* şüpheli koloni tespit etmiştir. Daha sonra tüm örnekler üzerine uyguladığı PCR tekniği sonucunda bu 3 izolatla beraber 17 örneğin *Brucella* pozitif olduğu ve bunlardan yalnızca 1 tanesinin *B.melitensis* olduğunu bildirmiştir.

Tunçbilek (125) Ankara'da kurulan semt pazarlarında satışa sunulan 66 adet beyaz peynir ve değişik semtlerdeki marketlerden sağlanan 34 beyaz peynir numunesini *Brucella* yönünden incelemiş, toplam 100 adet numuneden %4'ünde etkeni izole etmiştir. İzole edilen bu 4 numunenin de semt pazarlarından temin edilen peynirler olduğunu belirtmiştir.

Aydın (14) 2006-2007 tarihleri arasında Mersin ili merkeze bağlı 10 farklı köyden 240 çiğ inek sütü, 122 çiğ koyun sütü, 95 çiğ keçi sütü örneği, Mersin merkezde bulunan 40 farklı pastaneden 105 dondurma örneği, Mersin merkezde kurulan semt pazarlarında ve şarküterilerde satışa sunulan 102 adet çiğ süttten yapılmış taze beyaz peynir örneği olmak üzere toplam 664 adet süt ve süt ürünleri örneklerini *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırmıştır. Bakteriolojik değerlendirme sonucunda 240 inek sütü örneğinden ve 105 dondurma örneğinden sadece 1'er örnekte *Brucella* cinsi bakteri izole etmiş, inek sütünden izole edilen suşun *B. melitensis* biovar 1, dondurma örneklerinden izole edilen suşun ise *B. melitensis* biovar 3 olduğunu bildirmiştir.

Keskin ve ark. (70) 10 sürüdeki 116 keçiden 222 adet süt örneği toplamışlar ve PCR yöntemiyle incelediklerinde 50 süt örneğinde *B. melitensis* saptamışlardır.

Çelebi ve Otlu (36) Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan ve hastalığa karşı aşılammamış 250 inekten aldıkları 500 süt ve vaginal svap örneklerini *Brucella* cinsi bakteriler yönünden kültürel olarak değerlendirmişler. İnceleme sonucunda 250 süt örneğinin %4.4'ünden ve 250 vaginal svap örneğinin %6.4'ünden olmak üzere toplam %5.4 örnekten *Brucella spp.* izolasyonu yapmışlardır. Bu izolatların PCR incelemesinde hepsinin *Brucella spp.* ve saha suşları olduğunu bildirmişlerdir. İzole edilen tüm suşları *B. abortus*

biyotip 3 olarak tiplendirmişler, ayrıca bu izolatların RAPD-PCR ile incelemesi sonucunda DNA profillerinin, *B. abortus* S19 ile homoloji gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Süt, peynir ve tereyağı dışında hayvanların sekresyonları, kan serumları, plasentaları, mide içeriği ve iç organlarında *Brucella* etkenlerinin varlığı üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Büyükcangaz ve Şen (24) 2004 ve 2005 yıllarında Marmara Bölgesinde atık sığır fetüsünün iç organlar ve abomazum içeriklerinden 8 (%19.5)'inde izole etmişlerdir. Chahota ve ark. (28) 290 sığırın uterus atığı ve plasentalarından yapılan analizler sonucunda sadece 5 tanesinden *B.abortus* biyotip 1 izole etmişlerdir. Genç ve ark. (50), Genç ve Kamber (51), Güler ve ark. (58), Verger ve ark. (126) atık sığır fetüsünden yapmış oldukları çalışmalar sonucunda %31.03-%59.7 arasında *Brucella* tespit etmişlerdir.

Solmaz ve ark. (118) Van il merkezi ve köylerinden alınan 320 adet süt sığır kan serumlarında RBPT ve SAT yöntemleriyle, Parin(106) Aydın ili çevresinde bulunan sığırlardan rastgele örnekleme metodu ile toplanan 200 adet sığır kan örneğinin 57'sinde mPCR, Şahin ve ark.(119) 2001-2006 yılları arasında geçmişlerinde abort hikâyeleri olan 27 sürüden alınan 626 serum örneğini Rose Bengal Plate testi (RBPT), Serum Agglutination Test (SAT) ve ELISA yöntemleriyle, Genç ve Ark. (52) aşılammış 163 abort yapmış sığır kan serum örneklerinde Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA), Complement Fixation Test (CFT), Rose Bengal Plate Test (RBPT) ve Serum Agglutination Test (SAT) ile incelemişler, çalışmalar sonucunda %6.25-%68.1 oranında *Brucella* tespit etmişlerdir.

Omer ve ark. (98) 1294 inekten aldıkları 110 (%8.5) örnekte seropozitiflik tespit etmişler. Bunun yanında test edilen 62 erkek sığırdan sadece 1'inde (%1.6) seropozitiflik olduğunu kaydetmişlerdir. Laktasyon ve gebelik durumuna bakılmaksızın yetişkin sığırlarda seropozitifliğin yüksek olduğu, doğum yapmamış genç ineklerde ise seropozitiflik oranını %3,5 olarak bildirmişlerdir. Kaoud ve ark. (69) 26 sığır, 45 koyun ve 55 keçi sürüsünden topladıkları 1670 serum örneğini RBPT (Rose Bengal Plate Test) ve iELISA testi ile analiz etmişler, RBPT ile koyun

sürüsünde %26.66, keçi sürüsünde %18.88 ve sığır sürüsünde %21.6 olarak iELISA testi ile koyun sürüsünde %21.20, keçi sürüsünde %14.5 ve sığır sürüsünde %17.22 olarak *Brucella* prevalansını belirlemişlerdir.

İlhan ve ark. (67), kesime götürülen 162 koyunla yaptıkları bir çalışmada izolasyon, PCR ve serolojik bulgu sonuçlarını karşılaştırmışlardır. İzolasyon sonucunda kandan iki, lenf dokusundan 28 *B. melitensis*, PCR yöntemiyle kanda 45, lenf dokusunda 47 pozitiflik saptamışlar, 45 koyunun *Brucella* yönünden seropozitif olduğunu belirlemişlerdir. *Brucella* etkenlerini saptamak için PCR tekniğinin daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır.

Otlu ve ark. (100) Kars'ın 9 farklı köyünden abort yapmış 167 kan örneğini Serum Aglutinasyon testi (SAT) ile incelemişler ve bunların 71'inde (%40,11) *B.melitensis* pozitif bulmuşlar.

Apan ve ark. (9) 301 sığır ve 503 koyundan toplam 804 serum örneğini araştırmaları sonucu RBPT ile 52 (%6.47) seropozitiflik gözlemlemişler. Pozitif tespit edilen hayvanlar SAT testi ile de aynı sonuçları vermiştir. CFT testi ile yapılan doğrulama tayininde sığırlarda seropozitifliği %1 ve koyunda %8 olarak bulmuşlardır.

Öngör ve ark. (101) koyun sürüsünde atık yapmış koyunlarda *Brucella melitensis*'e karşı oluşan antikorlar, Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA), serum aglutinasyon test (SAT), 2-mererkaptoetanol Mikroaglutinasyon test (2-ME-MAT), Dithiothreitol Mikroaglutinasyon test (DTT-MAT), Rose Bengal Plate test (RBPT), Komplement Fiksasyon testi (CFT) ile saptamışlar. Elazığ ve çevresinde atık yapmış 36 koyun sürüsünden elde edilen toplam 500 adet kan serumunda ELISA ile 103(%20,6), RBPT ile 55 (%11), SAT ile 84(%16,8), CFT ile 89(%17.8), 2-ME-MAT ile 79(%15.8) ve DTT-MAT ile 81 (%16.2) örnekte pozitiflik saptamışlar. Bu değerler karşılaştırıldığında; ELISA ile CFT, SAT, 2-ME-MAT ve DTT-MAT arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı ( $p>0,05$ ) fakat ELISA ile RBPT sonuçları arasında önemli ölçüde bir farklılık olduğunu belirtmişler( $p<0.001$ ).

Şahin ve Yıldız (120) Hatay yöresinde ELISA yöntemiyle kan örneklerinde yaptıkları inceleme sonucunda 462 koyunun 155'i (%33.5) ve 458 keçinin 177'sinde (%38.6) *Brucellosis* seropozitif bulmuşlar. Abort yapan 72 koyunun 56'sında (%77.8), 157 keçinin 71'inde (%45.2) ve abort yapmayan 390 koyunun 99'unda (%25.4), 301 keçinin 106'sında (%35,2) hastalığın seropozitif olduğu ve hem koyun hem de keçilerde abort yapanlardaki seropozitiflik oranlarının, abort yapmayan hayvanlardaki oranlardan önemli derecelerde yüksek olduğunu saptamışlardır.

Gürtürk ve ark. (61) Van yöresinde yaptıkları bir çalışmada Van Belediyesi mezbahasında kesimi yapılan 636 adet koyun ve bölgede atık yapmış 469 koyunun kan serumları ile 518 adet sığırın sütlerini incelemişler. Kan serumlarında RBPT ile yapılan serolojik incelemede, mezbahada kesimi yapılan koyunlardan 29'unda (%4.5), yavru attığı bilinen koyunların ise 63'ünün (%13.4) *Brucella* spesifik antikor varlığını tespit etmişlerdir. Sığırlardan alınan 518 süt örneği süt halka testi ile yapılan serolojik incelemede 11 adet (%2.1) süt örneğinde *Brucella* yönünden pozitif bulmuşlardır.

Çelebi ve Atabay (35) 400 koyun serumunu, Complement Fixation Test (CFT), Rose Bengal Plate Test (RBPT), Rivanol Agglutination Test (RAT) ve Serum Agglutination Testleri (SAT) ile incelemişler ve CFT ile 135 (%33.75), RBPT ile 139 (%34.75), RAT ile 142 (%35.5) ve SAT ile 147 (%36.7) tanesinde *Brucella* antijenini pozitif bulmuşlardır.

Amin ve ark (8) *B. melitensis* ile infekte oldukları bilinen karantinaya alınmış çiftliklerden serolojik olarak pozitif olan hayvanlara ait 65 boğa ve 55 koça ait semen örneğini kültürel ve moleküler yöntemlerle incelemişlerdir. Araştırmacılar 64 boğadan aldıkları örneklerin 4'ünde koçlardan alınan örneklerin ise 3'ünde *B. melitensis* biyotip 3 izole ve tanımlamışlardır. 120 örneğin tamamına uygulanan direkt PCR metodu ile 7 boğa ve 5 koç örneğinde *B. melitensis* saptamışlardır.

Çetinkaya ve ark. (37) 16 adet koyun mide içeriğini *Brucella* yönünden PCR ve kültür teknikleriyle incelemişler. Kültür yöntemiyle 5 örneği pozitif olarak

değerlendirmişler, PCR yöntemiyle bu 5 örnek incelendiğinde 4'ü pozitif, 1 örnek ise negatif olarak tespit edilmiştir.

İnsanlarda bruselloz olgularının araştırıldığı çalışmalarda; Al- Attas ve ark. (3) bruselloz hastalarından alınan 17 kan örneğinin sadece 14'ünü tedaviye başlamadan önce pozitif bulmuşlardır. Teknik olarak örneklerde, seroloji, kültürel metotlar ve PCR kullanmışlardır. Bütün örneklerin Standart Tüp Aglütinasyon testi (STA) ile yüksek titre gösterdiğini ve %57 pozitif olduğunu, PCR ile %100 hassasiyetlik derecesinde bütün örneklerin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. PCR'ın hem hassasiyet, hem de spesifitesinin kültür ve serolojide olduğundan önemli derecede daha yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir. Salehi ve ark. (117) 95 abort fetüs ve 25 insan kan kültürünü RFLP-PCR analiz yöntemini kullanarak incelemişler. 95 fetüs örneğinin 92'si (%97) *B.melitensis* biyotip 1 ve 3 örnek (%3) *B.abortus* olarak tespit etmişlerdir. 25 insan kan kültürünü incelediklerinde 24'ü (%97) *B.melitensis* biyotip 1 ve 1 (%4) örnek *B.abortus* olarak belirlemişlerdir. Elfaki ve ark. (42) Suudi Arabistan'da 25 hastada serolojik, kültür ve PCR yöntemiyle *Brucella* DNA'sını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada 25 hastanın serolojik yöntemle 21'inde, kültür yöntemiyle 9'unda ve PCR yöntemiyle de 24'ünde pozitif bulmuşlardır. Fekete ve ark. (48) anneye ve fetüse ait 105 numuneyi PCR ve bakteriyolojik yöntemlerle incelemişler ve bu numunelerden 56'sını kültürel metotla, 55'ini PCR ile pozitif bulmuşlardır. Hassasiyetin %98 olduğunu vurgulamışlardır. Dizer ve ark. (40) 2000-Mayıs tarihleri arasında anamnez ve fizik muayene bulgularıyla bruselloz olduğu düşünülen, Rose Rengal Lam Aglütinasyon testi (RBT) ve Wright Tüp Aglütinasyon testi (TAT) pozitif bulunarak tanısı kesinleşen 24'ü erkek, 8'i kadın hastada bruselloz tanı yöntemlerinin etkinliğini araştırmışlar. Olguların %100'ünde RBT ve TAT, 12 (%37,5) hastada *Brucella* IgM pozitif bulmuşlar. ELISA yöntemiyle bakteriye karşı oluşan antikorların tespitinin, hastalığın tanı ve tedavisinin takibinde anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Hastaların %18,7'sinde kanda, %28,1'inde kemik iliğinde üreme saptamışlardır. Koçoğlu ve ark. (73) 15 yaşın üstünde olan 67 kişide *Brucella* antikorlarının varlığını Rose Bengal (RBT) ve Serum Aglutinasyon Testi (SAT) ile araştırmışlar ve incelenen 67 olgunun 10'unda (%15) RBT pozitif, sekizinde (%12) SAT pozitif bulmuşlardır. Khosravi ve ark. (71) 30 hastanın kan serumlarını kültür

ve PCR yöntemleriyle incelemişler. Kültür ve biyokimyasal yöntemlerle 8 (%26,6) hastada *B.melitensis* identifiye etmişler. PCR tekniği ile serumların 28'ini (%93,3) pozitif bulmuşlardır. Otlu ve ark.(99) Kars'ta 2004-2006 yılları arasında brusellozis'in prevalansını araştırmak için çiftçilerden, veterinerlerden ve sığırlardan aldıkları kan serumlarını incelemişler. Toplam 407 serum örneğini 27 farklı sürüdeki abort hikâyesi olan sığırlardan, 130 erkek, 116 kadın olmak üzere 246 serum örneğini çiftçilerden ve 28 serum örneğini de veterinerlerden toplamışlardır. Bu serum örneklerini RBPT, SAT ve ELISA testleriyle *Brucella* antikorları yönünden analiz yapmışlardır. Sığır serumlarından yapılan analizlerde RBPT ile 134 (%32.92) ve SAT ile 141 (%34.64) pozitiflik belirlenmiştir. Çiftçilerden alınan serum örneklerinde pozitiflik oranı RBPT ile 32 (%13), SAT ile 35 (%14.22) ve ELISA yöntemindeyse 44 (% 17.88) olarak bulunmuştur. Cinsiyet bakımından çiftçiler arasında seropozitiflik bakımından önemli bir fark bulunmamıştır. Veteriner hekimlerden alınan 28 serum örneğinin serolojik incelemesi sonucu 13 (%46.42) pozitiflik saptamışlardır. Bu sonuçlara göre bölgemizde hem insanlarda hem de sığırlarda brusellozis'in oldukça yaygın bir prevalansa sahip olduğunu saptamışlardır.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. MATERYAL

Bu çalışmada Mayıs 2009 - Temmuz 2010 tarihleri arasında 215'i inek sütü, 50'si peynir ve 50'si de tereyağı olmak üzere toplam 315 adet örnek *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırıldı.

Tablo 4: İncelenen örnek sayıları

İncelenen Materyal	Örnek Sayısı
Peynir	50
Tereyağı	50
Süt	215
TOPLAM	315

Analizde kullanılan numuneler Kars'ta bu ürünlerin satışını yapan çeşitli market, mandıra ve bakkallardan alınarak soğuk zincir altında hızlı bir şekilde Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi, örnekler analize alınmaya kadar +4°C' de bekletildi.

Süt numuneleri marketlerde kullanılan steril poşetlerde aseptik koşullarda yaklaşık 200 ml olacak şekilde alındı, peynir ve tereyağı da yine aseptik şekilde aynı poşetlerde en az 100 gr olacak şekilde laboratuara getirildi.

#### 3.1.1. *Brucella* Etkenlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri

**Brucella Medium Base (Oxoid CM0169):** 45 g besiyeri 1 litre distile su içerisinde eritilip otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Sonra 50°C'ye kadar soğutulup içerisine 2 flakon Brucella Selektif Supplement (Oxoid SR0083) eklendi ve pH 7.2 ± 0.2'ye ayarlanarak petri kutularına dökülüp +4°C'de buzdolabına konuldu. Hazırlanan Brucella Medium Base ayrıca Brucella Agar besiyerinin hazırlanmasında da kullanıldı.



**Brucella Broth Besiyeri:** Hassas terazide 28 gr Brucella Broth tartıldı ve 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü. 10 g/1 glukoz (Merck 1.083461000) ilave edildi. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içine % 5 oranında 56°C'de 30 dak. inaktive edilmiş at serumu (Oxoid SR0035) ve 1 flakon/500ml Brucella Selective Supplement (Oxoid SR0083) ilave edildi. İyice karıştırılıp pH 7.0±0.2'ye ayarlandı. Kullanılncaya kadar +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi(6,46).

**Brucella Agar Besiyeri:** Brucella Medium Base'den 45 gr tartıldı ve 1 litre distile suda çözdürüldü sonra içine 10 g/1 glukoz (Merck 1.083461000) eklendi. Otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra % 5 oranında 56°C'de 30 dak. inaktive edilmiş at serumu (Oxoid SR0035) ve 1 şişe/500ml Brucella Selective Supplement (Oxoid SR0083) eklendi. İyice karıştırılıp pH'sı 7.0±0.2 ayarlandı. Petri kaplarına yaklaşık 4 mm kalınlığında döküldü. Soğuduktan sonra kullanılncaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi (6,46).

**Christensen's Üre Agar (Oxoid CM053):** *Brucella* bakterilerinin üreaz aktivitelerini saptamak amacıyla kullanıldı. Besiyerinden 21 g tartılarak üzerine 1 lt. distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Sonra 50°C 'ye kadar soğutuldu ve içerisine steril % 40'luk üre solüsyonundan (Oxoid SR020) 5 ml ilave edilip, tüplere 5'er ml dağıtılarak katılaşması sağlandı. Kullanılncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı (16).

**Serum Dekstroz Agar:** Tryptic Soy agardan (Oxoid CM0131) 40 g tartılarak 950 ml distile su içerisinde eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde serum-dekstroz solüsyonu ilave edildi. pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı. Sonra petrilere ve vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Kullanılncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.(6).

**Brucella Selective Supplement** (Oxoid SR0083) Brusellaların besiyerinde izolasyon seçiciliğini artırmak amacıyla Brucella Agar ve Brucella Broth'un bileşimine ilave edildi. 1 flakon supplementin içine 5'er ml distile su ve methanol katılarak 35°C'de 10-15 dk. etüvde inkübe edildi. Daha sonra Brucella Agar ve Brucella Broth besiyerlerine 1 flakon/500 ml. kullanıldı.

### **3.1.2. İzolatların H<sub>2</sub>S, oksidaz ve katalaz aktivitelerini belirlemek için kullanılan malzemeler**

#### **Kurşun Asetat Kağıdı:**

*Brucella* bakterilerinin H<sub>2</sub>S aktivitelerini saptamak amacıyla kurşun asetatlı kağıtlar(Merck 1.09511) kullanıldı.

#### **Oksidaz Ayıracı**

*Brucella* izolatlarının oksidaz aktivitelerini saptamak amacıyla ticari olarak temin edilen oksidaz ayıracı GBL İdantirosa 534100 kullanıldı.

#### **Katalaz Ayıracı**

*Brucella* izolatlarının katalaz aktivitesini saptamak amacıyla ticari olarak temin edilen katalaz ayıracı GBL İdantirosa 0532 kullanıldı.

#### **Gram Boya Seti:**

*Brucella* kolonilerinden hazırlanan preparatların Grama Boyama yöntemi ile mikroskopik olarak incelenmesi için kullanıldı. Gram boyama; hazırlanan preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılarak 2 dakika bekletildi ve lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırıldı. Preparata tekrar lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilip, distile su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırıldı. Preparatın üzerine %96 'lık etil alkol damlatılarak 10 saniye bekletildi, distile su ile yıkandı ve eosin-fuksinle 20 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkanarak havada kendi

halinde kurumaya bırakıldı, preparata immersiyon yağı damlatılıp 100 'lük objektifle incelendi. Mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise gram negatif olarak değerlendirildi.

### 3.1.3. PCR İçin Kullanılan Araç ve Gereçler:

#### 3.1.3.1. PCR Kitleri

##### 1-Brucella Genius Dedection PCR Kit (FC BİOTEC.0303)

*Brucella* izolatlarının cins düzeyindeki moleküler tanısında, *Brucella* genomlarının incelenmesi sonucunda belirlenen en sık tekrar bölgelerine spesifik primerler kullanılarak hazırlanan, tekrar bölgeleri bakteri türüne göre 6 ile 17 arasında değişen, her biyotip için özgül gen bölgeleri incelendikten sonra seçilen, primer dizilimleri en gelişmiş Genbank dataları incelenerek hazırlanan ve PCR yöntemi ile test edilmiş 10-100/DNA kopyası saptayabilme yeteneğine sahip oldukça hassas ve özgül nitelikte *Brucella* yüksek duyarlılıklı PCR kiti (FC- Biotek Code: 0303) kullanıldı. Bu yöntemde *Brucella spp.* türleri % 1,5'luk agaroz jelde 250 bp büyüklüğünde amplifiye ürün oluşturmaktadır.

##### 2-Brucella Multiplex PCR Kit (FC BİOTEC, 0301)

*Brucella* izolatlarının tür düzeyinde moleküler tanısında bakteri türlerinin genomlarının incelenmesi sonucu oluşturulan, tek bir PCR tüpünde *B.abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. canis*'i farklı PCR bantları ile tanımlayan, her tür için özgül gen bölgeleri tür genomları incelendikten sonra seçilen, primer dizilimleri en gelişmiş Genbank verileri incelenerek hazırlanan ve PCR yöntemi ile test edilmiş 10-100/DNA kopyası saptayabilecek kadar duyarlılığı yüksek olan *Brucella Multiplex* PCR kiti (FC- Biotek Code: 0301) kullanıldı. Bu yöntemde 1,5'luk agaroz jelde *B. abortus* yaklaşık 650, 450 ve 305 bp büyüklüğünde 3 farklı bant profili *B.melitensis* 650 ve 360 bp büyüklüğünde 2 farklı bant tipi oluşturmaktadır.

**3.1.3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler:**

1. PCR cihazı (Bio-Rad, MJ mini Gradient Thermal Cyclers,)
2. Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad, Mini-sub cell gt)
4. Elektroforez Tankı ( Minicell Primo EC 320 )
5. Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
6. Soğutmalı eppendorf santrifüj (HERAEUS Biofuge Fresco)
7. Pikofüj (Labnet, C1301)
8. Blok ısıtıcı (Pro-Lab)
9. UV transilluminatör (UVP, 3uvt-Benchtop,LMS-20E)
10. Derin Dondurucu (Bosch)
11. Etüv (nüve)
12. Mikroskop(Olympus)
13. Otoklav (Nüve- OT 020)
14. Hassas Terazı (Scaltec)
15. Buzdolabı (Bosch)
16. Vortex (NM- 110)
17. Distile su cihazı (Nüve NS 108)
18. Otomatik pipet seti (Ependorf)
19. Öze
20. Petri kutuları
21. Desikatör
22. Lam
23. Lamel
24. Havan
25. Mikropipet uçları
26. Pipet ucu
27. Balon joje
28. Ependorf tüpler
29. Cam flakon
30. Deney tüpleri

### 3.1.4.DNA ekstraksiyon için kullanılan malzemeler

#### 1- DNA ekstraksiyon kiti (Fermentase)

#### 2- Proteinaz-K

Hazır olarak alınan liyofilize 10 mg Proteinaz-K (Sigma) 1 ml steril distile su ile çözülerek 10 mg/ml'lik konsantrasyona getirildi. 50 µl'lik porsiyonlara ayrıldı. 0°C'de saklandı.

#### 3- TE tampon çözeltisi

10 mM Tris-HCl ( pH:8)	0.08 g.
1mM disodium EDTA	0.019 g.

Tartılan kimyasal maddeler 50 ml distile su içinde çözdürüldü.

#### 4- Kloroform-İzoamil Alkol Çözeltisi

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

#### 5- %70'lik etil alkol

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

#### 6- %95'lik etil alkol (100 ml için)

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

## **Elektroforez için Kullanılan Solüsyonlar**

### **1-10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu (pH 8.8)**

Tris Base ..... 108 g.  
Borik Asit ..... 55 g.  
EDTA ..... 8.3 g.

Bu maddeler balon jøjeye konup üzerine biraz distile su ilave edilerek eritildi ve pH'sı 8.8'e ayarlandı. Daha sonra 1 litreye tamamlanıp karıştırılarak oda ısısında muhafaza edildi.

### **2- Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)**

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

### **3- % 1.5'luk Agaroj jel solüsyonu**

Ethidium Bromide (Sigma E7637)  
Proteinaz K (Sigma P 2308)  
Agaroj Jel (Sigma A-9539 Lot 013K0008)  
Loading dye (6x) Fermentase R0611)  
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas SM 1331)

0.75 g agaroj tartılıp 50 ml 1X TBE Buffer içerisinde çözdürüldü ve bu çözeltili mikrodalga fırında eritildi.

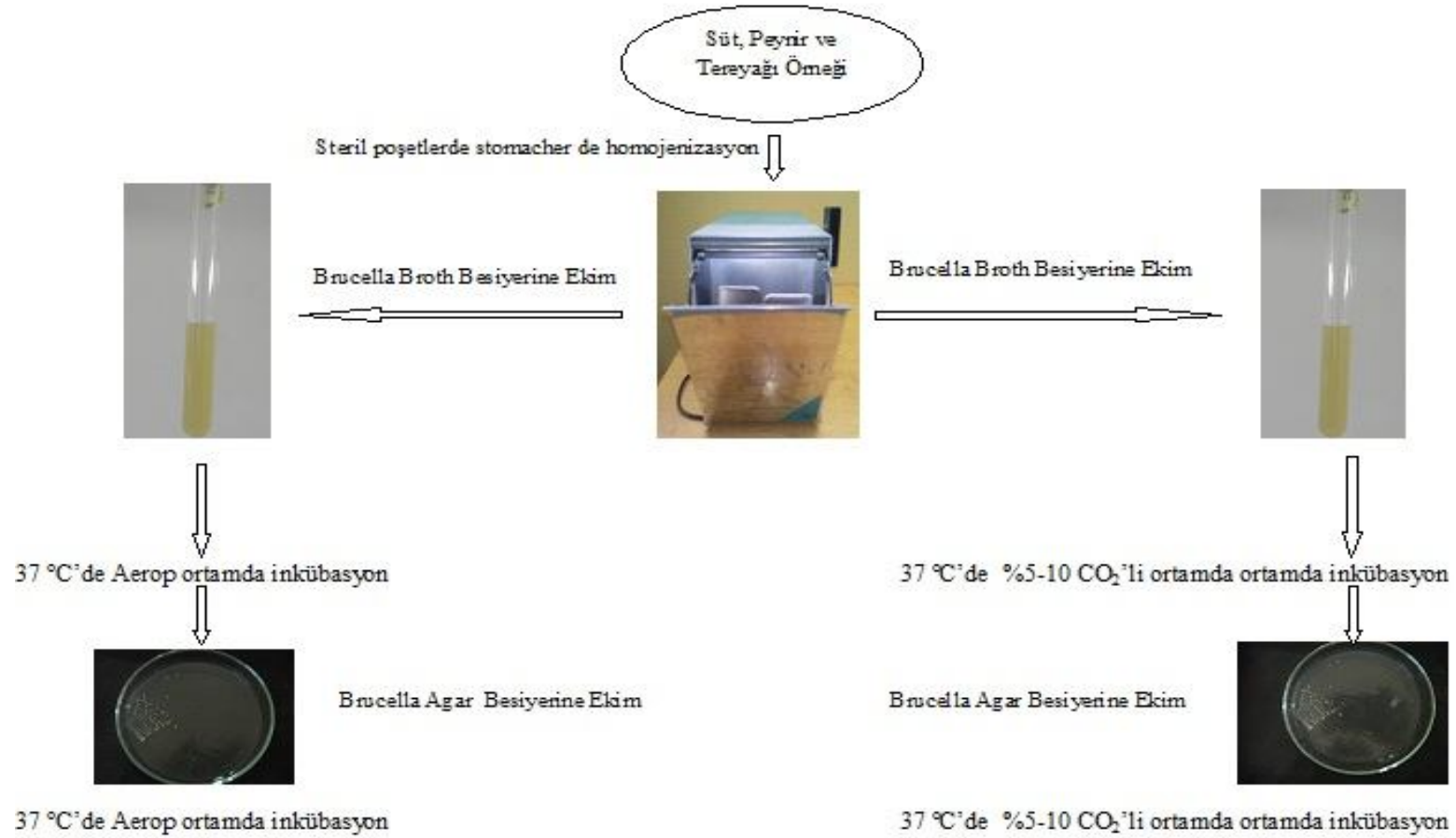
## **3.2. METOD**

### **3.2.1. Örneklerden Brucella İzolasyonu ve İdentifikasyonu:**

#### **3.2.1.1. Kültürel Yöntem**

Örneklerden 10 ml süt, peynir ve tereyağı örneklerinden ise 10 gr alınarak, 90 ml Brucella Broth besiyeri bulunan poşete konularak stomacherde 2-3 dakika homojenize edildi. Zenginleştirme amacıyla her karışımın 1'er ml' inden içerisinde 9 ml Brusella Broth bulunan iki adet test tüpüne inoküle edilerek vortekslendi. Tüplerden biri aerobik, diğeri %10'luk CO<sub>2</sub>'li ortamda 37±2°C'de 5-7 gün süreyle inkübe edildi. Aerobik ve %10'luk CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmiş homojenatlardan Brusella Agar besiyerine bir özeyele çizme yöntemi ile ekim yapıldı. %10'luk CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmiş tüplerden Brusella Agar'a ekim yapılan pasajlar yine %10'luk CO<sub>2</sub>'li ortamda, aerob ortamda inkübe edilmiş tüplerden yapılan pasajlar da aerob ortamda 37 °C'de 5-7 gün inkübe edildi (7).

Şekil 1: Örneklerden Yapılan Ekimler





## **Biyokimyasal Özelliklerin Tespiti**

### **1- Gram Boyama Özelliklerinin Tesbiti**

İnkübasyondan sonra etüvden çıkarılan besiyerleri biyogüvenlik şatları altında koloni morfolojileri yönünden incelendi. Besiyerleri üzerinde üreyen *Brucella* şüpheli kolonilerden Gram boyama yapmak üzere preparat hazırlanıp, preparatlar immersiyon objektifle mikroskopta incelendi. Gram negatif özellikteki küçük kokobasil şeklindeki kolonilere ait izolatlara oksidaz, katalaz deneyleri yapıldı. Oksidaz ve katalaz deneyler sonucu pozitif olan koloniler *Brucella* pozitif olarak değerlendirildi.

### **2- Üreaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Kolonilerden yatık Christensen's Üre Agar besiyerlerinin yüzeylerine sürme ve dip kısımlarına batırılarak öze ile ekim yapıldı. Ekim yapılmış Christensen's Üre agarlardan biri aerob ortamda, diğeri %5-10'luk CO<sub>2</sub>'li anaerobik jar içerisinde 37°C'de inkübe edildi.

### **3- Karbondioksit (CO<sub>2</sub>) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretimi:**

İnkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda selektif Brusella besiyerlerinde üreyen her bir Brusella izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak ikişer adet yatık Serum Dekstroz Agar (SDA) tüplerine pasajlar yapıldı. Kurşun asetatlı kâğıt şerit, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirildi. Birinci tüpler % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren anaerobik jarda, diğeri ise aerob koşullarda 37°C'de, 4 gün süreyle etüvde inkübe edildi. Kurşun asetatlı kâğıtlar inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirildi. İnkübasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kâğıtlarda oluşan siyah renk değişikliği pozitif olarak değerlendirildi(109).

### 3.2.1.2. Moleküler Yöntem:

#### 1-DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için oluşturulan protokol aşağıdaki gibi yürütülmüştür.

1. Brucella agarda üretilen kolonilerden yaklaşık  $2 \times 10^9$  olacak şekilde (Mac Farland No: 4'e göre) 1,5 ml FTS içeren ependorflara konularak homojenize edildi.
2. Alınan koloni örneği 1.5 veya 2 ml'lik ependorflara konularak  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5000 g'de (7253 rpm) 10 dk santrifüj edildi. Peletin üstündeki süpernatant döküldü.
3. Peletin üstüne 180  $\mu\text{l}$  Digestion Solüsyonu eklenerek vortekslendi. Daha sonra üzerine 20  $\mu\text{l}$  Proteinaz K eklenerek tekrar vortekslendi.
4.  $56^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk inkubasyonda tutuldu. İnkubasyon esnasında her 5-10 dk'da bir vortekslendi.
5. Örneğe 200  $\mu\text{l}$  Lisis Solüsyonu eklenerek 15 sn süreyle vortekslendi.
6. 400  $\mu\text{l}$  %50 ethanol eklenerek tekrar vortekslendi.
7. Hazırlanan Lizat Genjet tüplerine aktararak. 1dk 6000 g'de (8000 rpm) santrifüj edildi. Alttaki toplama kabında biriken sıvı atılarak üstteki saflaştırma tüpü yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Üzerine 500  $\mu\text{l}$  ethanollü Yıkama Solüsyonu I eklendi. Sonra 1dk 8000 g'de (9175 rpm) santrifüj edildi. Toplama kabındaki sıvı atılarak saflaştırma kabı tekrar yerine yerleştirildi.
9. Daha sonra bunun üzerine 500  $\mu\text{l}$  ethanollü yıkama solüsyonu II eklenerek 3 dk. en az 12000 g (11237 rpm)'de santrifüj edildi. (saflaştırma tüpünde sıvı kaldıysa toplama kabındaki sıvıyı atıp tekrar santrifüj edildi).
10. Saflaştırma tüpleri steril edilmiş ependorflara yerleştirildi.
11. 200  $\mu\text{l}$  Elution buffer eklendi (saflaştırma kabının tam ortasına denk gelecek şekilde) oda ısısında 2 dk. beklendikten sonra 1 dk. 8000 g (9175 rpm)'de santrifüj edildi.
12. Saflaştırma kabı atıldı.
13. Ependorfdaki DNA örneği analiz için hemen kullanıldı kullanılmayan kısım -  $20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

## **PCR İŞLEMİ**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işleminde hatalı sonuçları ortadan kaldırmak amacıyla öncelikle aşağıdaki hususlara dikkat edildi.

**1-Reaksiyon** karışımlarının dış ortam kaynaklı DNA molekülleri ile kantaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılan sarf malzemelerin ve çözeltilerin steril olması sağlandı.

**2-Reaksiyon** bileşenleri ekstraksiyon işleminin yapıldığı biyogüvenlik kabininden ayrı, temiz bir kabinde hazırlandı. PCR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 µL'lik PCR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı.

**3-Reaksiyonun** gerçekleştirilmesi için de thermal cycler cihazı ile 0.5–10 µL, 10–100 µL ve 50–200 µL'lik otomatik pipetler kullanıldı.

## **PCR Protokolü**

### **1- Amplifikasyon**

Her bir örnek için 0,2 ml'lik tüpler içerisinde hazır olan 45 µl'lik reaksiyon karışımına 5 µl DNA ekstraktı ilave edildi ve amplifikasyon işlemi üretici firma tarafından verilen talimatlar doğrultusunda gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak Brucella PCR kiti üretici firmasından gelen pozitif kontroller kullanıldı. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

## 2- Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayıları

Thermocycle cihazına yerleştirilen ependorflardaki DNA'lar sırasıyla ilk denatürasyon için 94°C' de 3 dk. 1 döngü, denatürasyon için 94°C' de, primer bağlanması (Annealing) için 60°C' de, Zincir uzaması (Elongasyon) için 72°C' de 45'er sn. 40'ar döngü ve Son uzama (Post elongasyon) içinde 72°C' de 10 dk. 1 döngü şeklinde işleme tabi tutuldular. İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

## 3- Agaroz Jel Elektroforez işlemi

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan %1.5'luk agaroz jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, 100-1000 bp standart uzunluktaki 5 adet DNA fragmentleri ile kıyaslanarak saptandı.

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

### Agaroz jelin hazırlanması

Bir balon jode 0,75 gr agaroz 50 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırınında 3 dk. şeffaf hale gelinceye kadar eritildi. Buhar çıkışı durduktan sonra etidiyum bromid'den 2 µl eklendi. Erimiş halde ve etidiyum bromid içeren agaroz jel, uygun sayıda aralığa sahip tarağın yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca soğumaya bırakılan jel, soğuma esnasında etidiyum bromidin ısı etkilenmemesi ve aktivitesini yitirmemesi için ışıktan korundu. Katılaşması için yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

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

### **Agaroz Jelde *Brucella* DNA'sının varlığının tespiti**

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

### ***Brucella* Etkeninin Tiplendirilmesinde Kullanılan PCR Protokolü**

#### **Amplifikasyon**

Her örnek 0,2 ml'lik tüpler içerisindeki 45 µl'lik reaksiyon karışımına 5 µl DNA ekstraktı eklendi ve amplifikasyon işlemi üretici firma tarafından verilen talimatlar doğrultusunda gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak *Brucella* PCR kiti üretici firmasından gelen pozitif kontroller kullanıldı. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

### **Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayıları**

Thermocycle cihazına yerleştirilen ependorflardaki DNA'lar sırasıyla ilk denatürasyon için 94°C' de 2 dk. 1 döngü, denatürasyon için 94°C' de, primer bağlanması (Annealing) için 58°C' de, Zincir uzaması (Elongasyon) için 72°C' de 45'er sn. 40'ar döngü ve Son uzama (Post elongasyon) içinde 72°C' de 10 dk. 1 döngü şeklinde işleme tabi tutuldular. İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabında muhafaza altına alındı.

### **Agaroz jelin hazırlanması**

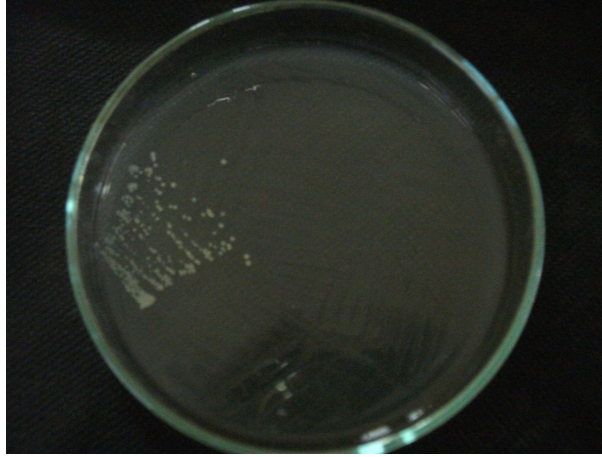
Bir balon jodede 0,75gr agaroz 50 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırınında 3 dk. homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra etidiyum bromid'den 2 µl eklendi. Erimiş halde ve etidiyum bromid içeren agaroz jel, uygun sayıda bölmeye sahip tarağın yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca soğumaya bırakılan jel, soğuma esnasında etidiyum bromidin ısı etkilenmemesi ve aktivitesini yitirmemesi için gün ışığından korundu. Katılaşıma kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

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

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada 2009-2010 yılında Kars'ta satışa sunulan 215 çiğ süt örneği, 50 taze beyaz peynir ve 50 tereyağı örneği olmak üzere toplam 315 örnek *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı yönünden incelemeye alındı.

Alınan örneklerden süttten 10 ml. Peynir ve tereyağından 10 ar gr. hijyenik koşullarda *Brucella* Broth besiyerinde homojen hale getirilerek yine 9 ml *Brucella* Broth içeren 2 ayrı tüpe 1'er ml ilave edildi. Tüplerden biri 37 °C de etüvde 5-7 gün inkübasyona bırakıldı. Diğer tüp 37°C de etüvde % 5-10'luk CO<sub>2</sub>'li ortamda 5-7 gün inkübasyona bırakıldı. 5-7 günün sonunda üreme görülen tüplerden *Brucella* Agar besiyerine ince uçlu öze yardımıyla 2'şerli ekimler yapıldı. Bunlardan biri 37°C de etüvde 5-7 gün inkübasyona bırakıldı, diğeri de 37°C de etüvde % 5-10 'luk CO<sub>2</sub>' li ortamda 5-7 gün inkübasyona bırakıldı. (Resim 1)



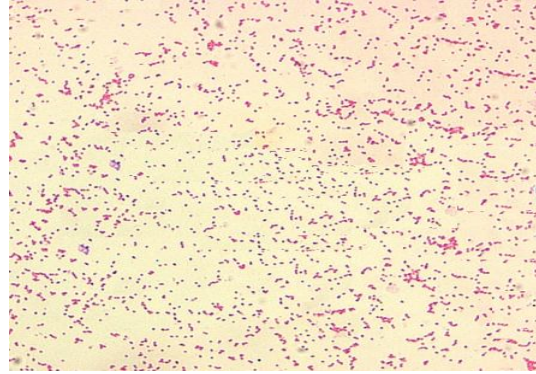
Resim 1: *Brucella* kolonilerinin *Brucella* Agar'da görünümü

**Tablo 5: İncelenen örneklerden *Brucella* izolasyon sonuçları**

İncelenen Materyal	Örnek Sayısı	Üreme	Gram Boyama		Oksidaz		Katalaz		Üreaz		H <sub>2</sub> S	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Peynir	50	-										
Tereyağı	50	-										
Süt	215	17	8	9	4	5	4	5	4	5	4	5

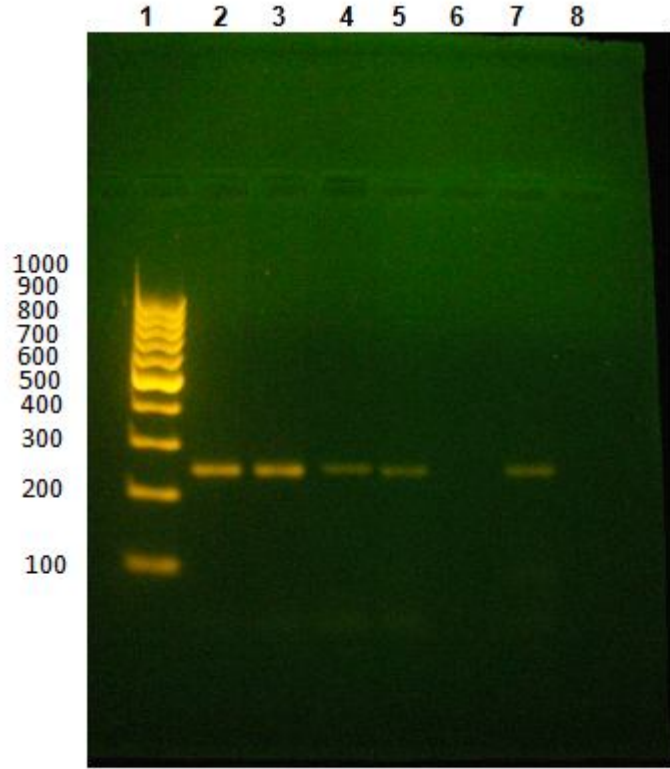
Bu verilere göre 215 süt örneğinden 17 tanesinde üreme olduğu ve üreme olan kolonilere yapılan Gram boyamada 8 örnek Gram pozitif, 9 örnek Gram negatif olarak belirlendi. Gram negatif örneklere yapılan oksidaz, katalaz ve üreaz deneyleri sonucu sadece 4 (% 1.86) örnekten *Brucella* pozitif olarak tespit edildi.

Şüpheli örneklerden alınan koloniler Gram boyama yöntemiyle boyanarak mikroskop altında 100'lük objektifte incelendi. Yapılan inceleme sonucunda 4 adet örneğin Gram negatif olduğu belirlendi. Ayrıca yapılan katalaz, oksidaz ve üreaz deneyleri sonucu pozitif oldukları gözlemlendi (Resim 2).

**Resim 2: *Brucella* bakterilerinin Gram boyama sonucunda mikroskopik görünümü**

Daha sonra *Brucella* pozitif örnekler için PCR işlemi uygulandı. PCR işlemi için önce DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA'ları elde edildi. Bu örneklerden elde edilen DNA'lar daha sonra cins ve tür bazında üretici firma tarafından verilen protokoller uygulanıp agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Resim 3,4).





**Resim 3: İzolatlara uygulanan PCR yöntemi ile cins bazında saptanan *Brucella* DNA'sının %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü.**

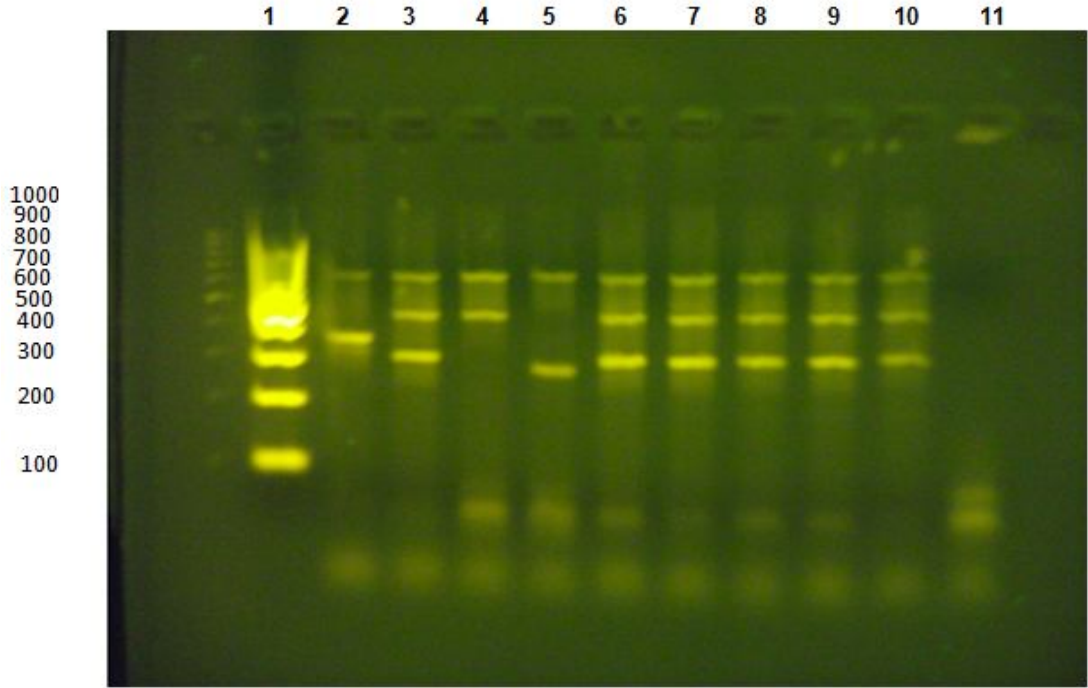
1-nolu kolon; 100 bp DNASTep ladder plus marker

2-5 nolu kolon; izolatlar

7-nolu kolon; pozitif kontrol

8-nolu kolon; negatif kontrol

Agaroz jelde elde edilen görüntüye göre kültürel yöntemle elde ettiğimiz 4 adet izolatın PCR yöntemiyle de 200-300 baz çifti aralığında bant oluşturması sonucu bu 4 izolatın *Brucella* olduğu teyit edilmiştir.



**Resim 4: İzolatlara uygulanan Multiplex PCR kiti yardımıyla Tür bazında saptanan *Brucella* DNA'sının % 1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü**

- 1- nolu kolon; 100 bp DNAsstep ladder plus marker
- 2- nolu kolon; *Brucella melitensis* (Kontrol)
- 3- nolu kolon; *Brucella abortus* (Kontrol)
- 4- nolu kolon; *Brucella ovis* (Kontrol)
- 5- nolu kolon; *Brucella canis* (Kontrol)
- 6-9 nolu kolon izolatlar
- 10- nolu kolon Mikrobiyoloji AD'dan alınan pozitif *Brucella abortus* kontrol suşu
- 11- nolu kolon negatif kontrol

PCR yöntemiyle belirlediğimiz 4 izolatu Multiplex PCR kiti kullanarak tür bazında incelediğimizde 3 nolu kolonda bulunan *B.abortus* pozitif kontrol ile bizim elde ettiğimiz 4 izolatu aynı bant aralığında olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen izolatların tamamının *B.abortus* olduğu PCR yöntemiyle kanıtlanmıştır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*Brucella* ülkemizde olduğu gibi dünyadaki birçok ülkede sığır, koyun, keçi ve domuzlarda çok sık görülen bulaşıcı, akut veya kronik seyirli, nekrotik yangısal enfeksiyonlarla kendini gösteren, eradikasyonu zor olan zoonotik bir hastalıktır (11,15,20,76). Hastalığın bulaşma kaynaklarının başında gelen süt ve ürünlerinin birçok işletme ve evlerde halen geleneksel yöntemlerle üretilmesi sonucu halk sağlığını tehdit edici boyutlarda olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda bölgede üretilen süt ve bazı süt ürünlerinde *Brucella* etkeninin prevelansı belirlenip, PCR gibi moleküler tekniklerle etkenin varlığının daha kısa sürede ve kesin olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada Kars ili merkezinde satışa sunulan 215 çiğ süt, 50 peynir ve 50 tereyağı olmak üzere toplam 315 örnek incelenmiştir.

Bu çalışmada incelenen 215 adet çiğ süt örneğinin 4'ünde (%1.86) *B. abortus* tespit edilmiştir. Bu değer çiğ sütlerde yapılan araştırmalarda *Brucella* oranı; Zowghi ve ark. (134)'nın çiğ inek sütünde %25.22, Leal-Klevezas ve ark. (78) çiğ keçi sütlerinde PCR'la %64 oranında, Türtütoğlu ve ark. (124) MRT ile inek süt örnekleri de % 3, koyun sütünde ise %17.7, Güllüce ve Leloğlu'un (60) inek sütü örneklerinde MRT ile %56, ELISA ile %65.59 oranında bildirdikleri değerlerden düşük bulunurken; Gürtürk ve ark. (61)'nin sığır süt örneğinde serolojik inceleme sonucunda %2.1, Çelebi ve Otlu (36)'nın inek sütü örneğinde bakteriyolojik inceleme sonucunda %4.4 oranın da bildirdikleri değere benzer bulunmuştur.

Çiğ süt dışında incelenen peynir ve tereyağı numunelerinde *Brucella* izolasyonu tespit edilmemiştir. Bu çalışmada, peynir ve tereyağında *Brucella* türlerine rastlanılmaması bazı araştırma (13,14,59,121) sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Fakat Ataş ve ark. (13)'nin taze ve salamura beyaz peynir örneklerinde % 5.9, Güllüce ve ark. (59) beyaz peynir, civil peynir ve lor peyniri örneklerinde %21.66, Akcankale (2)'nin taze beyaz peynir örneğinde % 7 ve Tunçbilek (125)'in beyaz peynir

örneklerinden %4, Barrow ve ark. (17)'i krema ve krema ürünlerinde %1.64 pozitiflik elde ettikleri *Brucella* oranlarından farklılık göstermektedir.

Bu araştırmada ve daha önce yapılmış olan araştırmalarda peynir ile tereyağlarında *brucella* etkenlerinin izole edilmemesinin son yıllarda *brucella* ile mücadelenin giderek artması ile başarılı sonuçlar alınmasından ve bunun sonucunda da *brucella* enfeksiyonu yönünden azalma olduğu düşünölmektedir. Ayrıca özellikle son yıllarda üreticilerin *brucella* hastalığına maruz kalması, artık peynir üretiminde çığ sütle değil, sütün ısıtılarak veya pastörize edilerek kullanılmasından kaynaklandığı bilincinin oluşması *brucella* enfeksiyonunun daha az rastlanmasına sebep olabileceği tahmin edilmektedir. Bunların dışında son yıllarda ailesel işletmeler giderek büyük süt işletmeleri haline dönüşmesi, pazara sunulan hayvansal ürünlerin denetlenmesi buna bağlı olarak marketlerin hayvansal ürünleri hijyenik koşullarda ve sağlıklı hayvanlardan elde edilen ürünlerden tercih etmeleri *brucella*'nın daha az görülmesi nedenleri arasında sayılabilir.

Bu çalışmada Kars ve çevresinde brusellozun çok yaygın olması düşünöldüğünde bu oranın çok düşük kalmasının sebebi bire bir görüşülen üreticilerin son yıllarda bilinçlenmesinin ve atık yapan hayvanların sütünün satışa sunulmamasının, aynı zamanda satışa gelen sütünün hijyenik koşullarda muhafaza edilmesinin büyük etkisi olduğu düşünölmektedir. Bunun yanında enfeksiyonun belli bölgelerde sıklıkla görülmesinin sebebi, genç hayvanlarda yapılmasına riayet gösterilmesi gereken koruyucu aşılamalardır. Ancak maalesef bu aşılamalara riayet gösterilmemekte ve hayvanlar korunamadığı enfeksiyonla ilk gebelik döneminde tanışmakta, yavrularında abort şekillenmektedir. Bu da büyük maddi külfet getirmektedir.

Bu çalışmada bakteriyolojik yöntemlerle belirlenen 4 adet *Brucella* izolatının DNA ekstraksiyonu yapılarak PCR tekniğiyle *Brucella* izolatının %100 *B.abortus* olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızda hassasiyet oranının, diğer araştırma sonuçlarına göre yüksek çıkması, PCR tekniğini kullanmamızdan kaynaklanabilir. PCR teknikleri ile süt ve süt ürünlerinde *brucella* türleri tanımlanması için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda PCR tekniklerinin hızlı, hassasiyetli, spesifitesi ve otomasyona uygun olması gibi avantajlarından dolayı gıda kaynaklı patojenlerin tespitinde umut verici bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, süt ve süt ürünlerinde bulunabilecek patojenlerin tespitinde PCR tekniklerinin kullanım imkânları ile yöntemin bu alandaki geleceği değerlendirilmiştir.

*Brucella* belirlenmesinde kullanılan PCR tekniği ile hassasiyet oranını; Romero ve ark. (116), seropozitif olarak belirlenen 56 süt örneklerinde izolasyon ile PCR yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, kültürde pozitiflik oranı % 100, PCR' da ise % 87,5 olarak, Al-Mariri ve ark.(5) PCR'la sığır sütünde *B.abortus*'un teşhisi için 50 örneği incelemiş, sütün arıtma sistemi kullanarak Direkt DNA ekstraksiyonu yaptıklarında 46 örneği tanımlamışlar ve sensitiviteyi %92 olarak tespit etmişlerdir.

*Brucella* belirlenmesinde kullanılan PCR tekniği ile diğer yöntemlerde hassasiyet oranını; Gupta ve ark. (57) keçilerden toplanan 54 süt örneğini incelemişler ve serolojik yöntemlerle sadece 32 (%59) örnekte *B.melitensis* tespit edebilmişler, oysa PCR ile 48 (%88.8) örnekte pozitif bulmuşlar. Bundan dolayı PCR'ın yüksek hassasiyet ve özgünlüğünün keçilerde *Brucella*'nın teşhisi için değerli bir araç olacağı kanaatine varmışlardır.

Bizim çalışmamızda ise 215 süt örneğinden 4 adet *Brucella* pozitif olduğu tespit edilmiş olup bu örneklerin hepsinin PCR yöntemiyle *B.abortus* olduğu kesinlik kazanmıştır.

Abdulkareem (1) Trakya yöresinde 75 süt örneğini kültür yöntemi ve PCR tekniği ile analiz ettiği bir çalışmada kültür yöntemiyle 3 izolat *Brucella* şüpheli koloni tespit etmiştir. Daha sonra tüm örneklerle uyguladığı PCR tekniği sonucunda bu 3 izolatla beraber 17 örneğin *Brucella* pozitif olduğu ve bunlardan yalnızca 1

tanisinin *B.melitensis* olduğunu bildirmiştir.

Patel ve ark. (102) 13 sığır ve 40 bufalodan toplam 53 adet süt örneği toplamışlar ve bu örnekleri PCR ve ELISA teknikleri ile *Brucella* antikorlarını belirlemek amacıyla analiz etmişler. Analiz sonucunda 9 örnek PCR yöntemiyle pozitif bulunurken ELISA ile 15 örnekte pozitiflik tespit etmişlerdir. Hem PCR ve hem de ELISA ile 6 örnekte pozitiflik tespit edilirken, PCR yöntemiyle pozitif bulunan 3 örneği ELISA ile negatif tespit etmişlerdir.

Al-Mariri ve ark. (5)'nin Alkalın DNA ekstraksiyon yöntemini kullanarak 44 örneği tanımlamışlar ve sensitivite oranını %88 olarak bulmuşlar. MRT ile tanımlama sonucunda ise 36 örnekte *Brucella* tespit etmişler sensitivite oranını %72 olarak belirtmişlerdir.

Hamdy ve Amin (63) sığır, koyun, keçi ve deve sütlerinde *Brucella* türlerini tespit etmek için 52 sığır, 21 koyun, 18 keçi ve 12 deveden topladıkları 103 süt örneğini sırasıyla standart tüp aglutinasyon testi (SAT), Rose Bengal Plate testi (RBPT), Milk Ring testi (MRT) ve Polimeraz Chain Reaction (PCR) teknikleri ile *Brucella* türlerini tespit etmek için incelemişler. PCR'la 29 sığır, 10 koyun, 13 keçi ve 1 deve süt örneğinden *Brucella* DNA'sı amplifiye etmişlerdir. Direkt kültür yöntemiyle 24 sığır, 12 koyun, 10 keçi süt örneklerinde belirleyebilmişlerdir.

Vanzini ve ark. (127) süt örneklerinde *B.abortus* antikorlarının varlığının tespiti için indirekt Enzyme-linked İmmunosorbent Assay (iELISA) ve *Brucella* Ring testini (BRT) karşılaştırmak için yaptıkları bir çalışmada enfekte olduğu bilinen 54 süt örneğinin %98.1'i ELISA ile %72.2'si BRT ile pozitif bulunmuşlardır. Enfekte olmayan 42 örnekte ise ELISA yöntemiyle 5, BRT ile de 4 örnek pozitif bulunmuştur.

Türtütoğlu ve ark. (124) sığır sütlerinde *Brucella spp.* varlığını ve *Brucella* türlerine karşı oluşmuş antikorları belirlemek amacıyla 630 süt örneklerinden bakteriyolojik muayenelerinde *Brucella* türlerini izole etmediklerini, ancak MRT ile

inek süt örneklerinin % 3, koyun süt örneklerinin %17.7'sini pozitif olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Güllüce ve Leloğlu'un (60) 712 adet inek sütü örneğinde *Brucella* enfeksiyonlarına karşı oluşturulan antikorlar ELISA ve Milk Ring Test (MRT) ile araştırılmış, MRT ile %56, ELISA ile %65,59 pozitif sonuç saptamışlardır.

Terzi (123) Samsun'da 50 adet inek sütü ve 50 adet keçi sütü olmak üzere toplam 100 adet süt örneğinde *Brucella* antikorlarının varlığını Serum Aglutinasyon testi (Whey-AT) ve Milk Ring testi (MRT) ile araştırmışlar. Milk Ring testi (MRT) sonuçlarına göre inek sütü örneklerinin %20, keçi sütü örneklerinin de %12'si *Brucella* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Serum Aglutinasyon testinde (Whey-AT) saptanan antikor titrelerine göre inek sütü örneklerinin 4'ü pozitif (%8), 3'ü şüpheli (%6), 43'ü negatif (%86), keçi sütü örneklerinin ise 3'ü pozitif (%6), 2'si şüpheli (%4), 45'i de (%90) negatif olarak bulmuştur. Keskin ve ark. (70) 222 adet süt örneğinden PCR yöntemiyle incelediklerinde %22.5 süt örneğinde *B. melitensis* saptamışlardır.

İlhan ve ark. (66) 102 süt örneğinin Farrel Dekstroz Agarla 8'inin (%7,8) *Brucella* pozitif olarak tespit etmişler. Süt örneklerine PCR ürünleriyle yaptıkları analiz sonucunda 24 örnekte (%23,5) *B. melitensis* DNA'sının 731 bp genişliğinde olduğunu bildirmişlerdir. Yine Milk Ring testi (MRT) ile 102 sığır sütünün 28'inin (%27,4) *Brucella* pozitif olduğunu vurgulamışlardır. PCR ve kültür analizleri sonuçlarını karşılaştırdıklarında, her iki testin sonucunda 8 pozitif ve 78 negatif olduğunu PCR ile MRT'yi karşılaştırdıklarında 22 örnek pozitif, 72 örnek ise negatif olduğunu açıklamışlardır. PCR ve MRT testlerini karşılaştırdıklarında aralarında %96 gibi bir uyum olduğu kanısına varmışlardır.

Gürtürk ve ark. (61) sığırlardan alınan 518 süt örneği süt halka testi ile yapılan serolojik incelemede 11 adet (%2.1) süt örneğinde *Brucella* yönünden pozitif bulmuşlardır. Çelebi ve Otlu (36) bakteriyolojik inceleme sonucunda 250 süt örneğinin 11 (%4.4) *Brucella* spp. izolasyonu yaptıklarını ve bu izolatların PCR

incelemesinde hepsinin *Brucella spp.* ve saha suşları olduğunu belirtmişlerdir. İzole edilen tüm suşlar *B. abortus* biyotip 3 olarak tiplendirmişlerdir.

Aydın (14) Mersin ili merkeze bağlı 10 farklı köyden 240 çiğ inek sütü, 122 çiğ koyun sütü, 95 çiğ keçi sütü örneği, *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı açısından araştırmıştır. Bakteriyolojik değerlendirme sonucunda inek sütünden izole edilen suş *B. melitensis* biovar 1 olarak tiplendirmiştir.

Funk ve ark. (49) ELISA yöntemiyle 147 süt örneğini incelediklerinde 13 örneğin pozitif 134 örneğin negatif olduğunu belirlemişlerdir.

Brusellozisin kontrolünde en etkili yöntem enfekte hayvanların süt, süt ürünleri, kan ve diğer dokulardan *Brucella* antikorlarının serolojik, bakteriyolojik ve moleküler tekniklerle tespit edilip kontrol altına alınmalarıdır (7,129).

Brusellozisle mücadelede, çiftlik hayvanlarının aşılması, hasta hayvanların sürüden ayıklanması, halkın bruselloz ve bulaşma yolları hakkında bilinçlendirilmesi, süt ve süt ürünlerinin üretimi ve pazarlama aşamasında daha etkin denetlenmesi sonucu hastalık oranının ve brusellozun kaynağını önemli derecede azaltacağı kanısındayız. Brusellozisten korunmanın en iyi yolu insan tüketiminde kullanılan tüm sütlerin düzgün şekilde pastörize edilmesidir. Yine halkın süt ve süt ürünlerinin işlenmesinde gerekli hijyenik ve teknik koşulların sağlanması, halkın sütün pastörizasyonu konusunda eğitilmesi gerekmektedir. Yine dikkat edilmesi gereken konulardan bir diğeri de hayvan barınakları ve ekipmanları düzenli periyotlarla dezenfekte edilmesi gerekmektedir. Hayvanlarda hastalıkla mücadelede önemli bir yöntemde aşı uygulamalarıdır. İnsanlar içinde aşı ile ilgili çalışmalar önemli yol alınmıştır.

Lezzet kültürüne aşırı riayet gösterilerek yapılan, kaynatılmamış sütlerle gerçekleştirilen yöresel peynir mayalamaları da yine insanlara bulaşmada köprü durumundadır.



Çalışmada satışa sunulan sütlerde *Brucella*'nın varlığı çiğ süt ve süt ürünlerinden hastalığın bulaşma riskinin göz önünde bulundurulması gerektiği ortaya çıkmıştır.

## 6. ÖZET

### **Kars Yöresinde Satışa Sunulan Çiğ Süt, Peynir ve Tereyağında *Brucella* Türlerinin İzolasyonu İdentifikasyonu ve Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi**

Bu çalışma çiğ süt, taze beyaz peynir ve tereyağı örneklerinde *Brucella* cinsi bakterilerin varlığını belirlemek amacıyla yapıldı. Bu amaçla 215 adet çiğ süt örneği ile 50'şer adet taze beyaz peynir ve tereyağ örneği incelenmiştir.

Örneklerde *Brucella spp.* türlerinin varlığı klasik kültür tekniği kullanılarak saptanmıştır. Bunu takiben klasik kültür tekniğinde pozitif olarak belirlenen örneklere ait suşlar ise PCR tekniği ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucu incelen 215 adet çiğ süt örneğinin 4'ü *Brucella abortus* yönünden pozitif bulunmasına karşın, taze beyaz peynir ve tereyağı örnekleri ise *Brucella spp.* yönünden negatif bulunmuştur. Aynı şekilde klasik kültür tekniğinde pozitif olarak belirlenen örneklere ait suşların tamamı PCR tekniği ile pozitif bulunmuştur.

Çalışmada taze beyaz peynir ve tereyağ örneklerinde *Brucella spp.* bulunmamış olup, bunun muhtemel nedeninin üretimde kullanılan sütün ısı işlemi görmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bununla birlikte çiğ süt kullanımının ise halk sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturacağı ve süt ürünleri üretiminde pastörize süt kullanılmasının önemli olduğu görüşüne varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Brucella*, Çiğ Süt, Peynir, Tereyağı, PCR

## 7. SUMMARY

### **The Identification Of Brucellosis Types In The Raw Milk, Cheese And Butter That Are Launched For Sales In Kars District And The Determination Of It With Molecular Techniques**

This study has been carried out in order to determine the existence of Brucellosis types of bacteria in raw milk, fresh white cheese and butter samples. For this purpose, 215 raw milk samples and 50 fresh white cheese and butter samples have been analysed.

The existence of *Brucellosis spp.* types in the samples has been determined using the classical culture technique. Following this, the strains that belong to the samples positively determined in classical culture technique have been confirmed by PCR technique. Despite *Brucella abortus* was positive in four raw milk samples out of 215; fresh white cheese and butter samples were *Brucellosis spp.* negative. Similarly, all of the strains belong to the samples determined positively in classical culture technique were found positive by PCR technique.

In the study, it has not been found *Brucellosis spp.* in fresh white cheese and butter samples and the heat process used in production has been considered the possible cause of it. However, it has been agreed that it is greatly important that the use of raw milk is a potential risk for the public health and it is a must to use pasteurized milk for the production of dairy products.

Key Words: *Brucella*, Raw Milk, Cheese, Butter.

## 8. KAYNAKLAR

1. **Abdelkareem, A.A;** Trakya yöresinde Yetiştirilen Sığırların Sütlerinden *Brucella* Türlerinin Varlığını Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırmalı olarak Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. İstanbul-2008

2. **Akcankale, A.S.:** Burdur Yöresinde Tüketime Sunulan Taze Beyaz Peynirlerde *brucella* spp. Varlığı. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi, Konya- 2009

3. **Al-Attas, R.A, Al-Khalifa, M, Al-Qurashi, A.R., Badawy, M., Al-Gualy, N.:** Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human Brucellosis. *Ann Saudi Med* **2000**. 20: 224–228

4. **Al Dahouk S, Le Flèche P, Nöckler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H:** Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human Brucellosis. *J Microbiol Methods* 2007, **69**:137-145

5. **Al-Mariri, A. Haj-Mahmoud, N.;** Detection of *Brucella abortus* in Bovine Milk by Polymerase Chain Reaction. *ACTA VET. BRNO* **2010**, 79: 277-280;

6. **Alton, G.G., Jones, M.L., Pietz, D.E.;** Laboratory techniques in Brucellosis World Health Organization Monograph Series No:55 Second edition Geneva **1975**.

7. **Alton, G.G., Jones. ML., Angus. R.D., Verger, JM.;** Techniques for the Brucellosis laboratory INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), Paris, France, **1988**.

8. **Amin, A.S., Hamdy, M.E., İbrahim, A.K.;** Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* **2001**. 83, 37 – 44.

9. **Apan, T.Z., Yıldırım, M., İstanbulluoğlu, E.:** Seroprevalence of Brucellosis in human, sheep and cattle populations in Kırıkkale (Turkey). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2007; 31: 75-78.

10. **Araj, G.F., Lulu, A.R., Mustafa. M.Y., Khateeb, M.I.;** Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic *Brucellosis* in human beings. *J. Hyg. Camb.*, 1986. 97: 457-469,

11. **Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Karaman, M., Akay, Ö., Ilgar, A., İzgür, M., Diker, K.S.:** Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı, Medisan, Ankara. 1997.

12. **Ariza, J., Bosilkovski, M., Cascio A., Colmenero, J.D., Corbel, M.J., Falagas, M.E., Memish, Z.A., Roushan M.R.H., Rubinstein, E., Sipsas, N.V., Solera, J., Young, E.J., Pappas, G.,;** Perspectives for the treatment of Brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med*; 2007.4:e317.

13. **Ataş, M.,Poyraz, Ö., Alim, A., Ataş, A.D., Çelik, A.;** Sivas il Merkezinde Satışa Sunulan Taze ve Salamura Beyaz Peynirlerin *Brucella* Bakterileri Yönünden İncelenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2007;64 (2) 9-14.

14. **Aydın, F.E.:** Süt ve Süt Ürünlerinde *Brucella* cinsi Bakterilerin Araştırılması. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Mersin, 2007.

15. **Aydın, N., İzgür, M., Diker, K.S., Yardımcı, H., Esenal, Ö., Paracıkhoğlu, J., Akan, M.:**Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) İlke Emek Yayınları 2006 ANKARA

16. **Baron, E.J. Finegold, S.M.:** Baily & Scott's Diagnostic Microbiology. Eighth Edition. California. USA. 1990 : 410-412

17. **Barrow, G.I., Path, M.C., Miller, D.C., Johnson, D.L, Hingston, C.W.J.;** *Brucella abortus* in Freash Cream an Cream Product *British Med. J.* 1968; 2: 596 - 601.

18. **Bennett, L.B., Davis, E.N.;** Brucellosis: A Disease of Animals and Humans Governor's School for Agriculture, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061

- 19. Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeck, P.S., Ahrens, P., Hoorfar, J.;** Validated 5' Nuclease PCR Assay for Rapid Identification of the Genus *Brucella*. *J Clin Microbiol*; **2004. 42:** 2261–63.
- 20. Boschioli, M.L, Foulongne, V., O'Callaghan, D.:** *Brucellosis a Worldwide Zoonosis*. *Curr. Opin Microbiol.* **2001.** 4: 58-64,
- 21. Bricker, B.J.** PCR as a Diagnostic Tool for *Brucellosis Veterinary microbiology* **2002;** 90 (435-446).
- 22. Bricker, B.J., Halling, S.M.:** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J.Clin. Microbiol.* **1994;** 32:2660-2666.
- 23. Buchanan, T.M., Faber, L.C.;** 2-mercaptoethanol *Brucella* Agglutination Test: Usefulness for Predicting Recovery From *Brucellosis*. *J Clin Microbiol* 1980; **11:** 691–93.
- 24. Büyükçangaz, E., Şen, A.:** The First Isolation of *Brucella melitensis* from Bovine Aborted Fetus in Turkey. *J. Biol. Environ. Sci.* **2007,** 1 (3): 139-142
- 25. Cameron, H.S, Meyer, M.E.:** Metabolic Studies on *Brucella neotomae* (Stoenner and Lackman). *J Bacteriol* **1958. 76:**546-548.
- 26. Capasso, L.,** Bacteria in two-millennia-old Cheese, and Related Epizoonoses in Roman Populations. *J. Infect.,* **2002. 45:** 122–127.
- 27. Carter, G.R., Chengappa, M.M., Roberts, A.W.;** Essential of Veterinary Microbiology Fifth edition Williams and AVilkins. USA, 1995. Y25
- 28. Chahota, R., Sharma, M., Katoch, R.C., Verma, S., Singh, M.M., Kapoor, V., Asrani, R.K.;** Brucellosis Outbreak in an Organized Dairy Farm Involving Cows and in Contact Human Beings, in Himachal Pradesh, India. *Vet, Archiv* 2003.73(2): 95-102
- 29. Chand, P., Rajpurohit, B.S., Malhotra, A.K., Poonia, J.S.:** Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection in Sheep. *Vet Microbiol,* 2005.108, 305-311,

- 30. Charisis, N.S.:** The MZCP Report on the Third Workshop on Human and Animal *Brucellosis* Epidemiological Surveillance in the MZCP Countries. Damascus, Syrian Arab Republic, 1998
- 31. Cloeckert, A., Grayon, M., Grepinet, O., Boumedine, K.S.:** Classification of *Brucella* Strains Isolated from Marine Mammals by Infrequent Restriction site-PCR and Development of Specific PCR Identification Tests. *Microbes Infect* 2003, **5**:593-602.
- 32. Colmenero, J.D., Queipo-Ortuno, M.I., Reguera, J.M., Baeza, G., Salazar J.A., Morata, P.;** Real-Time Polymerase Chain Reaction: a New Powerful Tool for the Diagnosis of NeuroBrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; **76**: 1025–27.
- 33. Corbel, M.J.;** Brucellosis: an Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonose. *Emerging Infectious Diseases* **1997**;3(2)
- 34. Corbel, M.J.;** Identification of dye Sensitive Strains of *Brucella melitensis* Journal of Clinical Microbiology. 1991;29(5) : 1066-1068.
- 35. Çelebi, O., Atabay, H.I.:** Seroepidemiological Investigation of *Brucellosis* in Sheep Abortions in Kars, Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41:115-9.
- 36. Çelebi, Ö., Otlu, S.:** Kars Yöresinde Atık Yapmış İnek Sürülerinden Alınan Süt ve Vaginal Sıvı Örneklerinden Brusella Etkenlerinin Bakteriyolojik ve Moleküler Tanımlanması. *Kafkas Univ. Vet Fak Derg.* 2011
- 37. Çetinkaya, B., Öngör, H., Muz, A., Ertuş, H.B., Kalender, H., Erdoğan, H.M.:** Detection of *Brucella* species DNA in the Stomach Content of Aborted Sheep Fetuses by PCR. *Vet. Rec.* **1999**: 144:239-240.
- 38. Debeaumont, C., Falconnet, P.A., Maurin, M.;** Real-time PCR for Detection of *Brucella* spp DNA in Human Serum Samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; **24**: 842–45.
- 39. DelVecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., Mujer.:** The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 2002;90(1–4):587–92.

40. **Dizer, U., Beker, C.M., Çiçek, H., Güner, Ö.R., Zeren, İ, Pahsa, A.;** Bruselloz Tanı Yöntemlerinin Etkinliğinin Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 31 (2) 87-93, 2005
41. **Elaldı, N.:** Sorunlu Enfeksiyonlar: Tanı ve Tedavide Yeni Yaklaşımlar. 3. Türkiye EKMUD Kongresi. 2010. 145-150
42. **Elfaki, M.G., Uz-Zaman, T., Al-Hokail, AA, Nakeeb, S.M.:** Detection of *Brucella* DNA in Sera from Patients with *Brucellosis* by Polymerase Chain Reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, **53**:1-7
43. **Erdağ, B., Bahadır, A.Ö., Balcıoğlu, K., Bahar, A.:** Moleküler Biyoloji Yöntemleri Kitabı. TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü 2010. 18-31
43. **Erol, İ.:** Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd.Şti. Ankara 2007
45. **Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J.D.C, Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill III, F. R., Smith, T. F.:** Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol. Rev.*2006.. **19**:165–256.
46. **Farrell, I.D, Robertson, L.:** A Comparison of Various Selective Media, Including a New Selective Medium for the Isolation of *Brucellae* from Milk. *J Appl Bacteriol.* **1972** ; 35(4):625-630.
47. **Fekete, A., J. A. Bantle, S. M. Halling, and M. R. Sanborn.** 1990. Preliminary Development of a Diagnostic Test for *Brucella* Using Polymerase Chain Reaction. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:216–227.
48. **Fekete A, Bantle JA, Hailing SM,,** Detection of *Brucella* by Polymerase Chain Reaction in Bovine Fetal and Maternal Tissue *J. Vet. Diag. Invest.* **1992**;4, 79-83.
49. **Funk, N.D., Tabatabai, L.B., Elzer, P.H., Hagius, S.D., Martin, B.M. and Hoffman, L.J.:** Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of *Brucella melitensis*-specific Antibodies in Goat Milk. *J Clin Microbiol* 2005. **43**, 721–725.



**50. Genç, O., Otlu, S., Şahin, M., Kamber, U.:** İnek atıklarından izole edilen *Brucella abortus* suşlarının biyotiplendirilmesi. 5.Ulusal Veteriner Kongresi, 22-24 Eylül, Konya. 2002

**51. Genç, O., Kamber, U.:** Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *The Indian Veterinary Journal* 2004 .81(11):1164-1166

**52. Genç O., Otlu S., Şahin M., Aydın F., Gökçe H.İ.:** Seroprevalence of *Brucellosis* and Leptospirosis in Aborted Dairy Cows. *Türk J Vet Anim Sci.*, 2005. 29: 359-366

**53. Godfroid J, Cloeckert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin- Bastuji, B., Letesson. J.J.;** From the Discovery of the Malta Fever's Agent to the Discovery of a Marine mammal Reservoir, *Brucellosis* has Continuously been a re-emerging Zoonosis. *Vet Res.* 2005;36:313–26.

**54. Godfroid J.,** *Brucellosis* in wildlife, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 21 (2002) 277–286.

**55. Gorvel, J P :** *Brucella* a Mr "Hide" Converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect* 2008.10(9)- 1010-3.

**56. Gotuzzo, E., C. Carrillo, J. Guerra, and L. Llosa.** An Evaluation of Diagnostic Methods for *Brucellosis*-the Value of Bone Marrow Culture. *J. Infect. Dis.* 1986. **153**:122–125.

**57. Gupta, V.K., Deepak, K.V., Rout, P.K., Singh, S.V., Vihan, V.S.:** Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of *Brucella melitensis* in Goat Milk. *Small Rumin. Res.* 2006;65:79-84.

**58. Güler, L., Gündüz, K., Ok. Ü., :** Comparison of Polymerase Chain Reaction and Bacteriological Culture for the Diagnosis of Sheep *Brucellosis* Using aborted fetus samples. *Vet. Microbiol.*, 2003, **93**, 53-61.

**59. Güllüce, M., Adıgüzel A., Algur Ö.F.;** Erzurum bölgesinde temin edilen çeşitli peynir örneklerinde *Brucella* antijenlerinin ELISA ile saptanması. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 2003; 33: 356-60.

**60. Güllüce M., Leloğlu N.;** Kars ve Çevresinde Süt Sığırlarında *Brucella abortus*'a Karşı Oluşan Antikorların ELISA ve MRT ile Saptanması, Sonuçlarının Karşılaştırılması. *Tr. J of Veterinary and animal Sciences* **1996** ; 20:251- 255.

**61. Gürtürk, K., Alan, M., Boynukara, B., Solmaz, H.;** Van ve Yöresinde Koyun ve Sığır Brusellozis'inin İnsidensi Üzerinde Sero-Epidemiyolojik Araştırmalar. *Y.Y.Ü.Vet.Fak.Derg.* 1994. 5(1-2) 121-125

**62. Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L. Qing, Z., Li, L. L., Kapur, V., Alt, D. P., and Olsen, S. C.;** Completion of the Genome Sequence of *Brucella abortus* and Comparison to the Highly Similar Genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol* 2005. **187**:2715–2726.

**63. Hamdy M.E.R , Amin AS** Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *The Veterinary Journal.* **2002**; 163: 299-305.

**64. Hoover. D. L., Friedlander, A. M.:** Brucellosis Chapter 25 medical aspects of Chemical and Biological Warfare

<http://www.au.af.mil/au/awc/awcgate/medaspec/Ch-25electrv699.pdf>

**65. İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Gökçen Düzgün S., Ersoy, Y., Eskizmirliler, S., Güler, Gündüz, K., Işık, N., İçyerioğlu A.K., Kalender, H., Karaman, Z., Küçükayan, U., Özcan, C., Seyitoğlu, Ş., Tuna. İ., Tunca, T., Üstünakın, K., Yurtalan, Ş.:** Türkiye’de Sığır ve Koyunlarda Brucellosis’in Seroepidemiolojisi. *Pendik Vet. Mikrobiyoloji Dergisi.* **2000**; 31(1):21 -75

**66. İlhan, Z., Solmaz, H., Aksakal. A., Gülhan, T., Ekin, I.H., Boynukara, B.;** Detection of *Brucella melitensis*. DNA in the Milk of Sheep After Abortion by PCR Assay. *Arch Med Vet.* 2008;40(2):141-6.

**67. İlhan Z, Aksakal A, Ekin IH, Gülhan T, Solmaz H, Erdenlig S:** Comparison of Culture and PCR for the Detection of *Brucella melitensis* in Blood and Lymphoid Tissues of Serologically Positive and Negative Slaughtered Sheep. *Lett Appl Microbiol* 2008, 46:301-306.

- 68. Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Caillaghan, D., Ramuz, M.:** Differences in Chromosome Number and Genome Rearrangements in the Genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.*, 27:99-106,1998.
- 69. Kaoud, H.A, Zaki, M.M, Shimaa A.R.D., Nasr, A:** Epidemiology of *Brucellosis* Among Farm Animals. *Nature and Science* 2010, 8:190-197.
- 70. Keskin, D., Atay, O., Kırkan, S., Gökdal, Ö., Tekbiyık, S., Kaya, O. & Eren, V.:** Detection of *Brucella melitensis* in Milk of Hair Goat (*Capra hircus*) by Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*, 2009. 15: 157
- 71. Khosravi, D. Z., Abassi, E., Alavi, M. S.:** Isolation of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from *Brucellosis* Patients by Conventional Culture Method and Polymerase Chain Reaction Technique. *Pak. J. Med. Sci.* 2006. **22** (4): 396-400.
- 72. Kittelberger, R., Hansen, M.F., Ross, G.P., Hilbink, F.:** A Sensitive Electrophoretic Immunoblotting Technique for the Serodiagnosis of *Brucella ovis* Infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6:188- 194.
- 73. Koçoğlu, E., Karabay, O., İnce, N.:** Bruselloz İçin Serolojik Taramanın Değeri. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* 2008. 38 (1): 23-26
- 74. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögren B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N.:** The Real-time Polymerase Chain Reaction. *Molec Aspects Med* 2006, **27**:95-125
- 75. Küplülü O., Sarımeahmetoğlu B.:** Isolation and Identification of *Brucella spp.* in Ice Cream. *Food Control.* **2004**; 15(7) 511-514.
- 76. Lang, R., Banai, M., Lishner, M., Rubinstein. E.:** *Brucellosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 5. 1995: 203-208
- 77. Leal Klevezas DS, Martinez –Vazquez IO, Garcia-Cantu J, Lopez – Merino, A., Martinez-Soriano, J.P.:** Use of Polymerase Chain Reaction to Detect *Brucella abortus* Biovar 1 in Infected Goats. *Vet. Microbiol.* **2000**; 75: 91-97.

- 78. Leal Klevezas D.S., Martinez-Vazquez I.O., Lopez-Merino A., Martinez-Soriano J.P.:** Single Step PCR for Detection of *Brucella spp.* from Blood and Milk of Infected Animals *J. Clin. Microbiol.* **1995**; 33 : 3087-3090.
- 79. Leary, S. O., Sheahan, M., Sweeney, T.:** *Brucella abortus* Detection by PCR Assay in Blood, Milk and Lymph Tissue of Serologically Positive Cows. *Research in Veterinary Science* 2006. **81**: 170–176.
- 80. Michaux-Charachon, S., E. Jumas-Bilak, A. Allardet-Servent, G. Bourg, M. L. Boschioli, M. Ramuz, and D. O’Callaghan.:** The *Brucella* Genome at the Beginning of the Post-genomic Area. *Vet. Microbiol.* 2002. **90**:581–585.
- 81. Michaux-Charachon, S., G. Bourg, E. Jumas-Bilak, P. Guigue-Talet, D. O’Callaghan, A. Allardet-Servent, and M. Ramuz.** Genome Structure and Phylogeny in the Genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 1997. **179**:3244–3249.
- 82. Monis, P.T., Giglio, S.:** Nucleic Acid Amplification-based Techniques for Pathogen Detection and Identification. *Infect. Genet. Evo.* **2006**, 6: 2-12.
- 83. Montejo, J. M., I. Alberola, P. Gonza’lez-Zarate, A. Alva’rez, J. Alonso, A. Ca’novas, and C. Aguirre.** Open, Randomized Therapeutic Trial of Six Antimicrobial Regimens in the Treatment of Human *Brucellosis*. *Clin. Infect. Dis.* 1993.**16**:671–676.
- 84. Moreno, E., A. Cloeckert, and I. Moriyon.** 2002. *Brucella* Evolution and Taxonomy. *Vet. Microbiol.* **90**:209–227.
- 85. Navarro, E., M. A. Cassao, and J. Solera.** 2004. Diagnosis of human *Brucellosis* using PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **4**:115–123.
- 86. Nelson-Jones, A.:** *Brucellosis*. St. Leonard’s Hospital, London 1952. 529-534
- 87. Nicoletti, P.:** A Short History of *Brucellosis*. *Veterinary Microbiology* 2002. **90**: 5-9
- 88. Nicoletti P.:** *Brucellosis*: Past, Present and Future. Contributions. Section of Biological and Medical Sciences. Macedonian Academy of Sciences and Arts. 2010;**31**:21-32.

**89. Nielsen, K.:** The Epidemiology of Bovine *Brucellosis*. Veterinary Microbiology. Vet. Microbiol.2002 **90**:447–459.

**90. OIE:** Brucellosis, Undulant Fever, Malta Fever, Mediterranean Fever, Enzootic Abortion, Epizootic Abortion, Contagious Abortion, Bang's Disease . Last Updated: July 19,2009.

**91. OIE:** Bovine Brucellosis. OIE Terrestrial Manual,  
[www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03BOVINE\\_BRUCCELL.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03BOVINE_BRUCCELL.pdf).2009

**92. OIE:** Bovine Brucellosis: *Brucella abortus* Undulant Fever, Contagious Abortion, Bang's Disease, 2009

**93. OIE:** Porcine and Ruminant Brucellosis: *Brucella suis*, Enzootic Abortion, Contagious Abortion, Undulant Fever, 2009.

**94. OIE:** Brucella Marine Mammals. 2009

**95. OIE:** Ovine Epididymitis: *Brucella ovis* 2009

[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/Brucellosis\\_ovis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/Brucellosis_ovis.pdf)

**96. OIE:** Canine Brucellosis: *Brucella canis*: Contagious Abortion, Undulant Fever2009

**97. OIE:** Ovine Epididymitis (Brucella Ovis) OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.7.9

[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.09\\_OVINE\\_EPID.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.09_OVINE_EPID.pdf)

**98. Omer M.K., Skjerve E., Woldehiwet Z., Holstand G.:** Risk Factor for *Brucella* spp. Infection in Dairy Cattle Farms in Asmara, State of Eritrea. *Prev. Vet. Med.*, 2000a, **46**, 257-265.

**99. Otlu, S., Şahin, M., Atabay. H.I., Ünver, A.** Serological Investigation of *Brucellosis* in Cattle, Farmers and Veterinarians in the Kars District of Turkey. *Acta Vet. Brno*. 2008. **77**: 117-21

**100. Otlu, S., Şahin, M., Ünver, A., Çelebi, Ö. (2007):** Detection of *Brucella melitensis* and *Chlamydia abortus* Antibodies in Aborting Sheep in the Kars Province of Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy*. **51**:493-5.

**101. Öngör, H., Muz, A., Çetinkaya, B.:** Atık Yapmış Koyunlarda Brucellozis'in Teşhisinde ELISA ile Diğer Serolojik Testlerin Karşılaştırılması. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 2001; 25: 21-26.

**102. Patel, T.J., Kanani, A.N., Lata Jain. Joshi , C.G., Purohit J.H.:** Evaluation of PCR and Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Bovines *Buffalo Bulletin Vol.27 No.2 2008 p. 207-211*

**103. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E.** Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 2005. 352, p: 2325-2336.

**104. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V.:** The new global map of human *Brucellosis*. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:91–99.

**105. Pappas, G. Panagopoulou, P., Chriatou, L., Akriüdis, N.:** *Brucella* as a biological weapon *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. 63(19-20); 2229-36.

**106. Parin, U.:**Sığırlarda *Brucella* ve *Leptospira* Türlerinin Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPCR) İle Tanımlanması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek lisans Tezi. Aydın 2008

**107. Queipo-Ornuto MI, Morata P, Ocon P, MAnchadoP, Colmenero JD.** Rapid Diagnosis of Human *Brucellosis* by Peripheral Blood PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* **1997**; 35:2927-2930

**108. Queipo-Ortuno, M. I., J. D. Colmenero, J. M. Reguera, M. A. Garcia- Ordonez, M. E. Pachon, M. Gonzalez, and P. Morata.** Rapid Diagnosis of human Brucellosis by SYBR green I-based Real-time PCR assay and melting curve analizis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.*2005.. **11**:713– 718.

**109. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C.:** *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Blackwell Science Ltd., Oxford. 2002; 162-167

**110. Rajashekara, G., J. D. Glasner, D. A. Glover, and G. A. Splitter.** Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004. **186**:5040–5051.

- 111. Redkar, R., Rose, S., Bricker, B., DelVecchio, V.:** Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Celi. Probes*. 15(1): 43-52,2001.
- 112. Refai M.** Incidence and control of Brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* 2002;90:81-110.
- 113. Renukaradhya, G.J, Isloor, S and Rajasekhar, M.** Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of Brucellosis in India. *Veterinary Microbiol.* **2002.**, 90: 183-195.
- 114. Richey, E.J., Dix Harrell, C.:** *Brucella abortus* Disease (Brucellosis )in *Beef Cattle 1*. Document of the Departament of Karge Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. 17p.
- 115. Rijpens NP, Jannes G., Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM.,** Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes *Appl. Environ. Microbiol.* **1996;** 62, 1683-1688.
- 116. Romero, C. Pardo, M, Grillo, MJ, Diaz, R, Blasco, J.M., Lopez Goni, I.** Evaluation of PCR and indirevt enyzme linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of *Brucellosis* in dairy cattle. *J Clin Microbiol* .**1995** ; 33: 3198-3200.
- 117. Salehi, M., Pishva, E., Salehi, R., Rahmani, M.:** Isolation of *Brucella abortus* using PCR-RFLP analizis. *Iranian J. Pub. Health*, 2006. 35(4), pp.22-27
- 118. Solmaz, H., Tütüncü, M., Gülhan, T., Ekin, İ. H., Taşal, İ.:** Van Yöresi Süt Sığırlarında Brusellozis'in İnsidensi Üzerine İncelemeler. *YYÜ.Vet. Fak. Derg.* 2002, 13(1-2):54-56
- 119. Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlı S:** Investigation of bovine *Brucellosis* in the Northeastren Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40, 281-286, 2008.
- 120. Şahin, T., Yıldız, A.:** Hatay yöresindeki koyun ve keçilerde brusellozisin seroprevelansının araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2006: 20 (5): 331 – 335

**121. Taşçı, F., Kaymaz, Ş.:** Ankara'da Tüketime Sunulan Mutfaklık Tereyağı, Krema ve Krem Şantili Pastaların *Brucella Spp.* Yönünden İncelenmesi. F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg. 2009;23(1): 05-08

**122. Taşçı, F.:** Gıda Kaynaklı Brucellozis ve Önemi. *Uludağ Üniversitesi J. Fac. Vet. Med.* **2004**; 23(1-2-3):137-142.

**123. Terzi, G.:** Samsun Bölgesinden Toplanan Sütlerde Milk Ring Test Ve Aglütinasyon Testi ile *Brucella* Antikoruğunun Araştırılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **2006**: 5 (3):196-200

**124. Türütoğlu H, Mutluer M Uysal Y.** Burdur Yöresinden Toplanan Sütlerin *Brucella* İnfeksiyonu Yönünden Araştırılması. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* **2003**; 27: 1003-1009.

**125. Tunçbilek M.** Ankara piyasasında satılan taze beyaz peynirlerin *Brucellozis* riski yönünden incelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. *Yüksek Lisans Tezi.* **1992.**

**126. Ünver, A., Erdoğan, H.M., Atabay, H.İ., Şahin, M., Güneş, V., Çitil, M., Gökçe, H.İ.:** Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Karkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 12(2): 121-127, 2006.

**127. Vanzini, V.R., Aguirre, N.P., Valentini, B.S., Torioni de Echaide, S., Lugaresi, C.I., Marchesino, M.D., Nielsen, K.:** Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Veterinary Microbiology.* 2001;82(1):55–60.

**128. Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.D.A., Grayon, M.:** Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 235-238,1987.

**129. WHO:** Brucellosis in human and animals. 2006.

**130. Whatmore, A.M.:** Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, 9: 1168-1184,2009.316

**131. Young, E.J., Corbel, M.J.:** Clinical manifestations of human Brucellosis, in *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects.* FL, 97-126, 1989.



**132. Young, E.J.:** Serologic Diagnosis of Human Brucellosis: Analysis of 214 Cases by Agglutination Tests and Review of the Literature. *Rev Infect Dis.* 1991;13: 359-372.

**133. Zervos, M. J., and G. Bostic.** 1997. Exposure to *Brucella* in the laboratory. *Lancet* **349**:651.

**134. Zowghi, E., Ebadi, A., Yarahmadi, M.;** Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases.* 3(4): 185-188, 2008

**135. Zúñiga, E.A., Mota, de la G.L., Sánchez, M.M., Santos, L.E.M., Filardo, K.S., López, M.A.;** Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Rev Latinoam Microbiol,* 2005 47(3-4), str. 88-9

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Kars'ın Arpaçay ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Kars'ta tamamladım. 1986 yılında Atatürk Üniversitesi Kars Veteriner Fakültesinde üniversite eğitimime başladım. 1992 yılında bu üniversiteden mezun oldum. Aynı yıl Kars Et ve Balık kurumunda muayene veterineri olarak mesleğe başladım. 1995 yılında askerliğimi yaptım. 1995- 1998 yılları arasında Bingöl Et ve Balık kurumunda muayene veterineri ve işletme şefi olarak görev yaptım. 1998 yılında Et ve Balık kurumundan ayrılarak Kafkas Üniversitesi Kars Meslek Yüksek okulunda Okutman olarak göreve başladım. Daha sonra öğretim görevlisi kadrosuna atandım. 2001-2004 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi AD'da yüksek lisansımı tamamladım. 2004 yılından itibaren aynı Anabilim Dalında Doktora yapmaktayım. Evli ve 2 kız çocuk babasıyım.