

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

**BRUCELLA SEROPOZİTİF HASTALARDA SERUM
ANTİKOR TİTRELERİ İLE BAZI YANGISAL VE
BİYOKİMYASAL PARAMETERLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Berrin PANCARCI

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ahmet ÜNVER

2010- KARS

ÖNSÖZ

Bu çalışmada insan ve veteriner hekimliğinde yaygın bir sorun olan bruselloz enfeksiyonunun teşhis ve patogenezisini anlamada biyokimyasal ve immunolojik göstergelerden nitrik oksit ve oksidant antioksidant sistemlerinin düzeyleri araştırılmış ve insanlarda seyreden bu enfeksiyonun teşhis ve takibi ile enfeksiyonun patogenizisi bakımından yeni yaklaşımlar sağlanmış olup, bu çalışmadan elde edilen bulguların bu alanda yapılacak yeni çalışmalara kaynak olacağı düşünülmektedir. Kars Devlet Hastanesi Biyokimya laboratuvarı personeline, Seroloji ve Mikrobiyoloji laboratuvar personeline ve Serhat Sağlık Meslek Lisesi laboratuvar bölümü öğrencilerine yardımlarından dolayı teşekkür ederim. KAÜ, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı'ndan Yrd. Doç.Dr. Onur ATAKIŞI' ye de yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Tez danışmanım Doç.Dr. Ahmet ÜNVER'e bilimsel çalışmamda beni yönlendirmesinden dolayı teşekkür ederim. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı başkanı Prof. Dr. Mithat ŞAHİN'e ve diğer öğretim üyeleri ile araştırma görevlilerine teşekkür ederim. Eşim Şükrü Metin PANCARCI'nın yardımlarından ve sabrından dolayı sonsuz teşekkürlerimi bildiriyorum.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AGID	: Agar Gel İmmünodifüzyon
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ASO	: Antistreptolizin O
AST	: Aspartat Aminotransferaz
CRP	: C-Reaktif Protein
DDT-MAT	: Dithiothreitol Mikroaglutinasyon Testi
EDTA-MAT	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit Mikroaglutinasyon Testi
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FFTS	: Fenollü Fizyolojik Tuzlu Su
FPA	: Fluorescence Polarization
KFT	: Komplement Fiksasyon Testi
MRT	: Milk Ring Testi
NO	: Nitrik Oksit
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz
iNOS	: İndüklenebilir NOS
eNOS	: Endotelyal NOS
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAT	: Rivanol Aglutinasyon Testi
RBPT	: Rose Bengal Plate Testi
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SAT	: Serum Aglutinasyon Testi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TOK	: Total Oksidan Kapasite
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO DİZİNİ.....	iv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hastalığın Klinik Semptomları.....	2
1.2. Brusellozun Tanısında Kullanılan Serolojik Yöntemler.....	3
1.3. Bruselloz Ön Tanısında Kullanılan Biyokimyasal ve Hemogram Yöntemleri.....	4
1.4. Nitrik Oksit.....	5
1.5. Oksidan ve Antioksidan Kapasite Dengesi.....	6
2. MATERYAL VE METOD.....	8
2.1. Kan Örnekleri.....	8
2.2. Rose Bengal Testi.....	8
2.3. Serum Aglütinasyon Testi.....	9
2.4. Serum Nitrik Oksit Düzeylerinin Belirlenmesi.....	10
2.5. Toplam Oksidan ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi.....	11
2.6. Serum ALT, AST Aktivitesi ve CRP Düzeylerinin Belirlenmesi.....	12
2.7. Hemogram Analizleri.....	12
2.8. İstatistik Analizler.....	12
3. BULGULAR.....	13
4. TARTIŞMA.....	16
5. SONUÇ.....	22
6. ÖZET.....	24
7. ABSTRACT.....	25
8. ÖZGEÇMİŞ.....	26
9. LİTERATÜR LİSTESİ.....	27

TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: <i>Brucella</i> seronegatif, 1/160, 1/320, 1/640 titrelerdeki örneklerin NO, TAK, TOK, CRP, AST ve ALT seviyeleri.....	13
Tablo 2: <i>Brucella</i> seronegatif, 1/160, 1/320, 1/640 titrelerdeki örneklerin hemogram sonuçları.....	14
Tablo 3: <i>Brucella</i> antikör titreleri ile NO, TAK, TOK, CRP, AST ve ALT. seviyeleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları.....	14
Tablo 4: <i>Brucella</i> antikör titreleri ile hemogram sonuçları arasındaki korelasyon analizi sonuçları.....	15

1. GİRİŞ

Bruselloz Gram negatif, aerobik çomak ve koklar içinde fakültatif hücre içi bir etken olan *Brucella* türleri tarafından neden olunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu türlerin *Proteobacteria* sınıfının bir üyesi olduğu ve Agrobakterium Rhizobium kompleksindeki bitki patojenleri ile aynı addan geldikleri bildirilmiştir (9, 49).

Bruselloz dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen bir enfeksiyon hastalığı olup tarihsel isimleri, 'Ondülan ateş', 'Bang hastalığı', 'Gibraltar humması', 'Akdeniz humması' ve 'Malta humması' olarak anılmaktadır. Her yıl tüm dünyada 500,000 yeni vaka saptanmakta, Asya'nın batısı, Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Afrika ve Latin Amerika'da endemik olarak seyretmektedir (41). Bruselloz esasen hayvanlarda görülen bir hastalık olup koyun, keçi, sığır, köpek, manda ve domuz gibi hayvanların etleri, süt ve idrar gibi vücut sıvıları, enfekte hayvanın yavru zarları, yavru suları, aracılığıyla insanlara da bulaşan zoonotik bir hastalıktır (78). Bruselloz sığır ve koyun yetiştiriciliği yapılan çoğu ülkede görüldüğü gibi, ülkemizde yaygın olarak rastlanmakta, insanlarda başlangıçta septisemiye yol açan, sonra çeşitli organlara yerleşme eğilimi gösteren *Brucella* bakterilerinin sebep olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır (10, 13). İnsanlardaki bulaşma özellikle kırsal bölgelerde pastörizasyon ve kaynatma işleminin yetersiz yapılması, çiğ süttten yapılan peynir, yağ ve diğer süt ürünlerinin tüketimi ile gerçekleşmektedir (26). İnsanlarda brusellozin belirli bir bölgeye yayılmış olması, o yörede hayvancılıkla uğraşılması arasında yakın ilişki bulunmakta ve bu nedenle bir meslek hastalığı olarak nitelendirilmektedir (9, 10, 49). *Brucella* ile enfekte hayvanlar bakterileri genellikle laktasyon döneminde sütleriyle çıkarırlar. Bu sebeple enfekte hayvanların süt ve süt ürünleri önemli enfeksiyon odaklarıdır. Koyun sütünden hazırlanan peynir önemli kaynağı oluşturur. Taze peynirin enfeksiyon kaynağı oluşturduğu ülkelerin başında Akdeniz ülkeleri, Fransa, İtalya, Yunanistan ve Orta Asya ülkeleri gelmektedir.

Brucella bakterileri +4°C 'de muhafaza edilen etlerde uzun süre canlılıklarını korurlar (67, 10).

Brusellozun seyri sırasında, damar içi pıhtılaşmasından hafif hematolojik değişikliklere kadar çeşitli seviyelerde hematolojik bozukluklar bildirilmiş olup en yaygın hematolojik bozukluk anemi ve nötropenidir (3). Kronik hastalık anemisinin en sık görüldüğü enfeksiyon hastalıkları arasında bakteriyel ve fungal endokardit, ampiyem, menenjit, pulmoner hastalıklar, kronik peritonit, kronik osteomyelit ve kronik tüberküloz, tifo, bruselloz gibi her türlü kronik hastalık anemiye sebep olabilir (5). Lökosit bozuklukları enfeksiyondan enfeksiyona ve kişiden kişiye değişir. Lenfoid ve myeloid hücrelerde değişiklik olurken morfolojik, immünolojik ve fonksiyonel değişikliklere de neden olur (5). Lenfosit artışı, akut bakteriyel enfeksiyonlarda azda olsa görülür. Lenfositoz uyarıcı bir faktör olarak bilinmekte olup *Bordetella pertussis* toksininin lenfosit sayısının arttığı görülmüştür. Riketsial enfeksiyonlar, tüberküloz, sifilis ve bruselloz birlikte seyredebilmektedir (25). Trombositopeni septiseminin en sık komplikasyonu olup bakteri, virüs ve mantara bağlı sepsiste görülür ve hayatı tehdit etmektedir (17).

1.1. Hastalığın Klinik Semptomları

İnsanlarda brusellozin bulaşması sindirim sisteminin yanı sıra temas ve solunum yoluyla da olabilmektedir (10). Genellikle sindirim, solunum, deri, konjunktiva ve genital yolla bulaşan etken lenf dolaşımı ve retikülo-histiosit sistem ile hedef doku ve organlara yerleşir (79). İnsanlarda enfeksiyonla beraber etken lenf yumruları, karaciğer, dalak, kemik iliği ve retikülo-histiosit sisteme yerleşir. Hastalık on-otuz günlük inkubasyon döneminin ardından, üşüme, titreme, baş ve eklem ağrısı, halsizlik, dalgalı ateş ve gece terlemesi şeklinde kendini gösterir (41). *Brucella* çeşitli organ ve dokuları tuttuğu için çeşitli değişik tablolara neden olmaktadır. Osteoartiküler tutulum *Brucella*'nın en sık görülen komplikasyonudur. Çeşitli kaynaklarda % 2-80 arasında değişen oranlarda belirtilmiştir. Bunlardan bazıları

artralji, periferik artrit, miyalji, spondilit, sakroileit ve osteomyelittir (27, 63, 88). Etkenin yerleşim yerine göre menejit, ensefalit, endokardit, abortus, pnömoni gibi belirtiler de gösterebilir. İnsanlarda brusellozda genellikle etken olarak *B. melitensis*'e rastlanılmakla birlikte *B. abortus*, *B. canis* ve *B. suis*'e de rastlanabilmektedir (28, 39, 48).

1.2. Bruselloz tanısında kullanılan serolojik yöntemler

Tüm infeksiyon hastalıklarının laboratuvar tansında olduğu gibi, brusellozun tanısında ilk başvurulması gereken işlem, bakteriyolojik kültür yöntemleridir. Ancak incelenecek örneklerden etkenin üretilmesi için muayene materyalinin hastalığın belirli dönemlerinde alınması gerekliliği, ateşsiz dönemlerde örnek alınması veya kandaki bakteri sayısının düşük olması, hastanın antibiyotik kullanması gibi durumlarda etkenin izolasyon şansının azalmasıyla, özellikle kronik olgularda kültür yöntemlerinin her zaman sonuç vermemesi ve kültür tekniklerinin her laboratuvarında bulunmayan bazı koşulları gerektirmesi gibi durumlardan dolayı, bruselloz tanısında indirekt tanı tekniklerine daha sık başvurulmaktadır (10, 15, 21, 42).

Bruselloz'un teşhisinde etken izolasyon ve identifikasyonu'nun yanı sıra serolojik teşhis metotlarının da oldukça yaygın kullanımı vardır. Bu amaçla Rose Bengal Plate Testi (RBPT) (19, 30, 33), Serum Aglutinasyon Testi (SAT) (7, 60), Rivanol Aglutinasyon testi (RAT) (46, 50, 68), Komplement Fiksasyon Testi (CFT) (18, 72), Dithiothreitol Mikroaglutinasyon Testi (DTT-MAT) (86), Etilen Diamin Tetra Asetik Asit Mikroaglutinasyon Testi (EDTA-MAT) (37, 60, 86), Milk Ring Testi (MRT) (82), Agar Gel Immunodiffusion Test (AGIT) (34), ELISA (36, 77) ve Fluorescence Polarization Assay (FPA) (69), Coombs gibi teknikler geliştirilmiştir. Bruselloz için KFT referans test olarak kabul edilmektedir. Diğer yandan SAT ve RBPT testleri ise yaygın serolojik tarama testleri olarak kullanılmaktadır (41, 48). Ayrıca RBPT 2-Merkapto-etanol testi ve FAT'da serolojik teşhis için kullanılabilir (23). *Brucella* etkenlerinin kültürde üretilmeleri güç olduğundan dolayı standart

tüp aglütinasyon testi klinik bulgularla birlikte değerlendirildiğinde teşhis için oldukça pratik bir test olarak kabul edilmektedir. Fakat SAT testinin uzun zaman ve işgücü alması ve yalancı negatif durumlarla karşılaşılması bu test için dezavantajları oluşturmaktadır (89). Son yıllarda nükleik asit amplifikasyonuna dayalı direk metotlar geliştirilmiştir. Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kesin, etkili ve hızlı bir metot olarak bruselloz'un teşhis amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (14, 23). Ancak pratikliğinin yüksek olması ve spesifik ekipmanlara ve personele ihtiyacının az olması nedenleriyle RBPT, SAT ve diğer serolojik testler brusellozun tanısında günümüzde yaygınlıkla kullanılmaktadır (9, 14, 23).

1.3. Bruselloz ön tanısında kullanılan biyokimyasal ve hemogram yöntemleri

Rutin biyokimya bulguları Bruselloz'un nonspesifik tanısında önem arz etmektedir. Bruselloz'da lökosit sayısı genellikle normal olmakla birlikte lökopeni ve lökositoya da bazı olgularda rastlanılmaktadır. Kimi kronik olgularda ise anemi ve trombositopeni de görülebilmektedir (78). Aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) karaciğer fonksiyon testlerindedir. Karaciğer hücrelerinin enfeksiyon ve toksik maddeler gibi çeşitli nedenlerle hasar görmesi durumunda hastada AST ve ALT miktarları artar (6). C-Reaktif Protein (CRP, Komplement Reaktif Protein) yangı reaksiyonları sırasında kanda miktarı artan ve karaciğer ile yağ hücreleri tarafından üretilen akut faz reaktanları adı verilen proteinlerdendir (6). CRP akut faz reaktanı olarak hepatositler tarafından sentezlenmektedir ve kompleman sistemi ile reaksiyona girerek vücudun immunolojik savunma sistemine yardımcı olmaktadır. Enfeksiyonlarda, romatizmal ateş, romatoid artrit, tüberküloz ve kanser gibi bir çok hastalıkta serum CRP düzeyi yükselmektedir. Klinik olarak hastalığın başlamasıyla CRP düzeyi 10 saat içinde artmakta ve yangı uyarılarının sona ermesinden itibaren birkaç gün içerisinde normale dönmektedir (11).

1.4. Nitrik Oksit

Nitrik Oksit (NO) L-arjinin sitrulline dönüşümü sırasında sentez edilen, suda çözülebilen, yarı ömrü çok kısa olan serbest radikal etkili bir moleküldür (80). L-argininden NO sentezi sırasında moleküller oksijen ve kofaktör olarak NADPH'a ihtiyaç duyar (22, 84). Nitrik oksit'in sentezi köken aldığı doku ve fonksiyonel özelliklerine göre üç izoform olarak bulunan NO sentetaz (NOS) enzimine bağlıdır. Bunlardan nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) olanlar temel olanlardır ve sürekli bazal seviyede NO salınımından sorumludurlar. Fakat üçüncü form olan uyarılan (indüklenebilir, iNOS) ise yangısal sitokinlere ve lipopolisakkaritlere cevap olarak uyarılır (66). Bu üç izoformdaki enzimler nöronlar, mide ve bronş epitelleri, iskelet kası, makrofajlar, kalp kası hücreleri hepatositler ve kondrositler gibi farklı hücrelerde bulunmuştur. Nitrik oksit oldukça geniş bir alandaki fonksiyonlara katılmaktadır. Bunlar vazodilatasyonu belirler, platelet agregasyonunu ve nötrofillerin endotelial hücrelere yapışmasını engeller, düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü azaltır, apoptozisi kontrol eder ve endotelial hücre bariyer fonksiyonunu devam ettirir ve nörotransmitter olarak görev yapar (74).

Birçok enfeksiyonda TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinler ile nitrik oksit (NO) gibi moleküllerin düzeylerinde artış olur (55, 70). Nitrik oksit organizmada nitrik oksit sentetaz (NOS) enziminin L-arginini katalize etmesi sonucu oluşur. NOS'un kalsiyuma bağlı olan iki izoformu genellikle endotel hücreleri ve beyinde bulunur (20). NOS'ın uyarılan (indüklenebilir) izoformu olan (iNOS) genellikle makrofajlarda bulunur ve dolayısıyla çeşitli yangısal hastalıklarda NO üretimi oldukça artar (59, 65). Yangısal durumlarda üretimleri artan ve sitokinlerin etkisiyle aktive olan ve uyarılabilir iNOS tarafından üretilen NO birincil savunma sistemi olarak kabul edilir (47, 71). Nitrik oksit'in antibakteriyel ve antimikrobiyal etkisi NO'nun kendisinden dolayı değil, NO'nun oksidasyonu sonucu şekillenen reaktif nitrojen metabolitlerinden biri olan peroksinitrit tarafından kaynaklanmaktadır (12).

Sonuç olarak, bakteri lipopolisakkaritleri, interferon gamma ya da yüksek konsantrasyonlarda lipopolisakkaritlerle uyarılan makrofajların iNOS aracılığıyla sentezlenen NO'nin bazı virüs, parazit, bakteri ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik veya sitostatik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (1, 8).

1.5. Oksidan ve Antioksidan Kapasite Dengesi

Oksidatif stres genel olarak hücresel düzeyde oksidan ve antioksidan düzeyleri arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır (58, 73). Peroksinitrit gibi reaksiyon yeteneği fazla olan moleküller organizmada antioksidan dengenin bozulmasına neden olur (24). Yangı durumunda fagositik hücrelerden salınan sitotoksik radikaller ve proinflamatuvar sitokinler (55) hücresel metabolik yolların inhibisyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olur (40). Hücresel oksidan durumun aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi sonucu aşılmasıyla oksidatif stresten ve lipid peroksidasyonundan dolayı hücre hasarı oluşabilir (24, 45). Metabolik ve fizyolojik süreçlerde organizmada meydana gelen bu zararlı ROT molekülleri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalarla uzaklaştırılır. Oksidanların arttığı ve antioksidanların azaldığı durumlarda, oksidan/antioksidan dengenin oksidan duruma daha yakın olduğu durumlarda organizma mevcut durumu tolere edemez ve sonuçta organizmada oksidatif stres kaynaklı yüzden fazla bozukluk meydana gelir. Oksidan maddeler elektron transportu, ksantin oksidaz, monoaminoksidaz gibi oksidaz enzimler aracılığıyla endojen olarak da oluşabilmektedir (2, 35, 85, 87). Serum veya plazmada çeşitli oksidan maddelerin konsantrasyonu ölçülebilmektedir. Bu ölçümler yoğun emek ve zaman kaybının yanısıra karmaşık teknikler gerektirmekte ve pahalı olmaktadır. Bu sebeple farklı oksidan maddeleri ayrı ayrı ölçmek pratik bir yaklaşım olarak görülmemektedir. Dolayısıyla örneklerde total antioksidan kapasiteyi (TAK) ölçmek oldukça pratik olduğu kadar sonuçların değerlendirilmesi bakımından da daha doğru bir yaklaşımdır (35).

Bu çalışmada aglütinasyon testleri ile *Brucella* seropozitif bulunan insan serum örneklerindeki antikor titreleri ile serum nitrik oksit konsantrasyonları ve toplam oksidan-antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması yoluyla hastalığın patogenezi ve klinik biyokimyasal bulguların izlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada belirlenmesi amaçlanan biyokimyasal parametrelerden nitrik oksit ile bruselloz arasında ilişki önceki çalışmalarda bildirilmiş olmasına rağmen, farklı titrelerdeki hastalarda bu parameterelerin nasıl değiştiği ve enfeksiyonun seyri hakkında literatürde bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yine benzer olarak serum total oksidan ve antioksidan kapasiteleri ile bruselloz arasındaki ilişkileri kapsayan çalışmalar yetersizdir. Çalışma kapsamındaki biyokimyasal parametrelerin bazı hematolojik bulgularla biraraya getirilerek hastalığın patogenizini de daha iyi anlamaya yardımcı olması beklenmektedir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Kan örnekleri

Çalışmanın materyalini 2007-2009 yıllarında Kars Devlet hastanesinin çeşitli polikliniklerine bruselloz-benzeri klinik belirtiler (ateş, artrit, eklem ağrısı, vb.) sebebiyle gelen hastalardan alınan kan örnekleri oluşturdu. Hastalardan venöz yoldan 4 ml. antikoagülsüz ve 2 ml. antikogulanlı tüplere alınan kan numuneleri 4000 rpm 8dk. santrifüj edilerek serumları ve plazmaları ayrıldı. Dört ml.'lik tüplerden ayrılan serumlarda derhal CRP, ALT ve AST analizleri otomatik olarak yapıldıktan sonra serolojik testlere devam edildi daha sonra bu numunelerden TAK, TOK ve NO çalışıldı. İki ml.'lik antikogulanlı tüplerde de plazmada hemogram analizleri eritrosit, trombosit ve lökosit sayılarına bakıldı.

2.2. Rose Bengal Pleyt Aglutinasyon Testi (RBPT)

Brucella şüpheli hastaların serum örnekleri ön tarama amacıyla RBPT (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü; (5) ile analiz edildi. Bu test antijeni S99 kökenli *Brucella abortus*'un Rose Bengal boyası ile boyanmasıyla hazırlanmaktadır (14). Rose Bengal testi için temiz bir fayans üzerine Sero-lam *Brucella* Rose Bengal Plate Test (Seromed- Türkiye) antijen kitinden bir damla antijen ve bir damla serum ilave edilerek yaklaşık iki dakika çevrilerek dilüsyon yapıldı. Bu süre içinde bakterilerin kümeleşerek aglütine olmaları testin pozitif olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Aglütinasyon oluşmazsa

negatif olarak değerlendirildi. Pozitif serum örnekleri antikor titrelerinin belirlenmesi ve testin teyit edilmesi amacıyla Standart Tüp Aglütinasyon Testi'ne (SAT) tabi tutuldu.

2.3. Serum Aglütinasyon Testi (SAT, WRIGHT)

Bu test nötral pH' da aglütine olan *Brucella* için spesifik olan IgM ve IgG'lerin invitro olarak saptanmasında kullanılmaktadır (5, 61). RBPT pozitif serum örnekleri dilüsyon yapılarak *Brucella* Aglütinasyon Testi antijeni (*B. abortus* S99, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Türkiye) kullanılarak titreleri belirlendi (5). Test edilecek serumlar ve antijen oda sıcaklığında (20-22°C) 'ye gelene kadar bekletildi. SAT testi gerçekleştirilirken serum dilüsyonu için 10 adet deney tüpü alındı. Birinci tüpe 0.8 ml. ikinci ve diğer tüplere 0.5 ml. % 0.5 fenollü fizyolojik tuzlu su (FFTS) konuldu. Birinci tüpteki FFTS üzerine 0.2 ml. muayene edilecek serum ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra birinci tüpten 0.5 ml. alındı ikinci tüpe konularak iyice karıştırıldı. Bu sulandırma ve karıştırma işlemi son tüpe kadar devam etti. Son tüpten 0.5 ml. alınıp dışarı atıldı. Her tüpe 0.5 ml. Pendik antijeni Tüp *Brucella* Tüp Aglütinasyon Antijeni olarak ilave edildi ve tüpler iyice karıştırıldı. Serum antijen karışım oranları 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 şeklinde değerlendirildi. Tüpler 18-24 saat 37°C 'de etüvde inkkübasyon edildikten sonra neticeler okundu.

Bu yöntemle bulunan titreler 1/160 ve üzeri değerler pozitif olarak kabul edildi. Seropozitif numunelerden 1/160, 1/320 ve 1/640 olanlardan yirmişer adet olmak üzere toplam 60 pozitif örnek ve RBPT ile negatif sonuç veren 20 örnek kontrol amacıyla çalışma kapsamına dahil edildi. Titreler belirlendikten sonra ayrılan numuneler biyokimyasal analizler yapılana kadar - 20°C 'de derin dondurucuda saklandı. Her bir hastaya ait serumlarda biyokimyasal olarak nitrik oksit, toplam oksidan ve antioksidan kapasiteleri belirlendi.

2.4. Serum nitrik oksit düzeylerinin belirlenmesi

Nitrat, NO'in stabil bir ürünü olup akut gastroenterit, septik şok ve Bruselloz gibi bazı enfeksiyonlarda NO'in bir göstergesi olarak serum veya plazmada nitrat belirlenmektedir (1, 51). Serum örneklerindeki nitrik oksit düzeyleri Miranda ve ark.'nın (64) bildirdikleri şekliyle yapıldı.

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülür. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de ölçülür.

Deneyde kullanılan çözeltiler:

1. Çinko Sülfat (% 10),
2. Sodyum Hidroksit (0,3 M),
3. Vanadyum (III) Klorür (% 0,8),
4. 1 M HCl, Sülfanilamid (% 2),
5. NEDD (% 0,1),
6. Griess Ayıracı (50 ml % 0,1 NEDD ve 50 ml % 2 sülfanilamid eşit miktarda karıştırılarak),
7. Stok Nitrit Çözeltisi (1 mM),
8. Stok Nitrat Çözeltisi (1 mM),

Çalışma Standartları (1 mM'lık stok nitrit ve nitrat çözeltilerinden 200 – 100 – 50 – 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 μ M'lık çalışma standartları) 540 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

Deneyin yapılışı:

400 μ l serumun üzerine 200 μ l 0,3 M NaOH ilave edilerek vortekslendi ve 5 dakika beklendikten sonra 200 μ l % 10'luk ZnSO₄ eklenerek tekrar vortekslendi. Numuneler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki berrak sıvı analiz için ayrıldı.

Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Tüm kuyucuklara 100 µl VCl₃ konuldu. Hemen arkasından da 100 µl griess ayırıcı pipetlendi. 30 dakika 37 °C' de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Hemen arkasından da 100 µl griess ayırıcı pipetlendi. 30 dakika 37 °C'de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Kalibrasyon eğrisine bakılarak bulunan nitrat ve nitrit konsantrasyonları toplanacak ve nitrik oksit konsantrasyonu bulundu. Nitrik Oksit (µM) = Nitrat (µM) + Nitrit (µM)

2.5. Toplam oksidan ve antioksidan kapasite ölçümleri

Serum numunelerinde toplam antioksidan kapasite ve oksidan kapasite ticari kit (Rel Asssay Diagnostic, Türkiye) ile kolorimetrik (PowerWave XS, BioTek, Instruments, USA) olarak saptandı. Numunelerdeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azinobis (3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) radikalini renksiz ABTS formuna indirgedi. 660 nm'deki absorbans değişimi ile numunedeki toplam antioksidan düzeyi belirlendi. Numunedeki oksidanlar ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitledi. Oksidasyon tepkimesi ortamda bulunan güçlendirici moleküllerle uzatıldı. Ferrik iyon asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturdu. Toplam oksidan molekülleriyle ilişkin renk yoğunluğu 530 nm dalga boyunda ölçüldü. Toplam antioksidan kapasite için trolox, toplam oksidan kapasite için hidrojen peroksit standart olarak kullanıldı (35).

2.6. Serum ALT, AST Aktivitesi ve CRP Düzeylerinin Belirlenmesi

Serumdaki ALT, AST ve CRP analizleri Architect C8000 cihazıyla ve Abbott kiti kullanılarak yapıldı.

2.7. Hemogram Analizleri

Plazmada lokosit, eritrosit ve trombosit sayımı 'cell dyn 3700' cihazıyla ve Abbott kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

2.8. İstatistik Analizler

Veriler General Linear Model kullanılarak SAS programı (75) ile analiz edildi. İstatistik modelde yalın olarak her bir parametre bağımsız değişken olarak ayrı ayrı analiz edilerek *Brucella* antikor titreleri üzerine olan etkileri araştırıldı. Analiz sonunda farklılık bulunduğu kontrast prosedürü uygulanarak 1/160, 1/320, 1/640 titreleri negatif titrelerle karşılaştırılarak farklılık ayrıca belirlendi. Sonuçlar linear regresyon ortalamaları (least squares means) ve standart hata olarak bildirildi. *Brucella* antikor titreleri ile biyokimyasal ve hemogram parametreleri arasındaki korelasyon analizleri SAS programı (75) kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

Brucella antikor titrelerinin serum TOK konsantrasyonu üzerine etkisi bulunurken ($P<0,01$) *Brucella* antikor titreleri ile serum nitrik oksit, TAK, CRP, AST ve ALT değerleri arasında istatistiksel bir ilişki bulunamadı (Tablo 1). Ancak 1/640 titrede AST konsantrasyonu sayısal olarak yüksek bulunmuş olmasına rağmen istatistik olarak kısmen önemli bulundu ($P<0,07$).

Brucella antikor titrelerinin hematolojik bulgulara etkileri incelendiğinde *Brucella* antikor titrelerinin lökosit ($P<0,05$) eritrosit ($P<0,05$) sayılarını etkilerken trombosit sayıları üzerine etkileri bulunmadı (Tablo 2). 1/160 ve 1/320 titrelerinde eritrosit ve lökosit değerlerinde değişiklik görülmezken, 1/640 titrede lökosit sayılarının azaldığı, eritrosit sayılarının ise arttığı belirlendi.

Tablo 1. *Brucella* seronegatif, 1/160, 1/320, 1/640 titrelerdeki örneklerin NO, TAK, TOK, CRP, AST ve ALT seviyeleri (Linear regresyon ortalaması \pm standart hata).

	NEGATİF n=20	1 / 160 n=20	1 / 320 n=20	1 / 640 n=20
NO	6.65 \pm 1.18 ^a	7.09 \pm 1.18 ^a	6.44 \pm 1.18 ^a	6.27 \pm 1.18 ^a
TAK	0.85 \pm 0.04 ^a	0.84 \pm 0.04 ^a	0.85 \pm 0.04 ^a	0.80 \pm 0.04 ^a
TOK	6.35 \pm 2.32 ^a	22.31 \pm 2.32 ^b	15.22 \pm 2.32 ^b	25.19 \pm 2.32 ^b
CRP	2.06 \pm 1.48 ^a	4.18 \pm 1.52 ^a	3.02 \pm 1.56 ^a	5.76 \pm 1.91 ^a
AST	26.47 \pm 7.60 ^a	25.59 \pm 7.79 ^{ab}	26.42 \pm 7.79 ^{ab}	47.44 \pm 8.24 ^{b (P<0.07)}
ALT	30.65 \pm 11.53 ^a	23.38 \pm 12.15 ^a	20.40 \pm 11.53 ^a	50.87 \pm 12.50 ^a

^{ab}Seronegatif grup ile 1/160, 1/320, 1/640 titre gruplarının ayrı ayrı karşılaştırmaları. Aynı satır içindeki farklı simgeler yapılan karşılaştırmalar sonucundaki farklılıkları göstermektedir ($P<0,01$).

Tablo 2. *Brucella* seronegatif, 1/160, 1/320, 1/640 titrelerdeki örneklerin hemogram sonuçları (Linear regresyon ortalaması \pm standart hata).

	NEGATİF	1 / 160	1 / 320	1 / 640
Lökosit	7.88 \pm 0.48 ^a	7.21 \pm 0.48 ^{ab}	7.49 \pm 0.48 ^{ab}	5.76 \pm 0.49 ^b
Eritrosit	4.94 \pm 0.13 ^a	5.20 \pm 0.13 ^{ab}	5.25 \pm 0.13 ^{ab}	5.50 \pm 0.14 ^b
Trombosit	285.40 \pm 18.77 ^a	254.10 \pm 18.77 ^a	281.95 \pm 18.77 ^a	247.16 \pm 19.26 ^a

^{ab}Seronegatif grup ile 1/160, 1/320, 1/640 titre gruplarının ayrı ayrı karşılaştırmaları. Aynı satır içindeki farklı simgeler yapılan karşılaştırmalar sonucundaki farklılıkları göstermektedir (P<0,05).

Brucella antikor titreleri ile TOK ($r=0,44$; $P<0,01$), AST ($r=0,23$; $P=0,05$) değerleri ve eritrosit sayısı arasında pozitif korelasyon ($r=0,32$; $P<0,01$) bulunurken lökosit sayısı arasında negatif korelasyon ($r= -0.32$; $P<0,01$) saptandı (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3. *Brucella* antikor titreleri ile NO, TAK, TOK, CRP, AST ve ALT seviyeleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları.

Titre	ile	NO	TAK	TOK	AST	ALT	CRP
Korelasyon							
r değeri		r=-0,04	r=-0,11	r=0,44	r=0,23	r=0,15	R=0,16
P değeri		P=0,72	P=0,35	P<0,01	P=0,05	P=0,21	P=0,18
Örnek sayısı		80	80	80	75	75	69
(n)							

Tablo 4. *Brucella* antikör titreleri ile hemogram sonuçları arasındaki korelasyon analizi sonuçları.

Titre ile Korelasyon	WBC	RBC	PLT
r değeri	R=-0,32	r=0,32	r=-0,13
P değeri	P<0,01	P<0,01	P=0,27
Örnek sayısı (n)	79	79	79

4. TARTIŞMA

Brusellozun ateş, eklem ağrısı, gece terlemesi, halsizlik, hepatomegali ve splenomegali (38) gibi hastalığa özgün olmayan belirtilerle seyrettiği için teşhisin laboratuvar yoklamaları ile desteklenmesi gerekir. Kültür, PCR ve seroloji gibi kesin tanı yöntemlerinin yanı sıra hastalığın seyri sırasında oluşan hematolojik ve biyokimyasal değişikliklerin de belirlenmesi ve bu bulguların öntanıda kullanılmasında büyük yarar vardır. Tansel ve ark. (81)'nın brusellozlu olgularda bazı hematolojik ve biyokimyasal değerlerin araştırıldığı bir çalışmada, standart tüp aglütinasyon testi veya kan kültürü ile tanısı konulan 40 bruselloz vakasında % 30'unda lökopeni, % 40'ında anemi, % 35'inde trombositopeni, % 90'ında eritrosit sedimentasyon hızında artış, % 82.52'sinde CRP pozitifliği, % 67.5 'inde AST, % 55 'inde ALT artışı tespit edilmiştir. Tansel ve ark. (81)'nin yaptıkları çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada *brucella* test titrelerin CRP, ALT ve AST konsantrasyonları üzerine etkisi bulunamadı. Ancak 1/640 titredeki vakaların AST konsantrasyonu sayısal olarak yüksek bulunmuş olmasına rağmen istatistiksel olarak kısmen önemli bulundu. Geyik ve ark.'nın (38) çalışmalarındaki klinik ve serolojik yöntemlerle bruselloz tanısı olan 154 hastaların % 7' sinde lökositoz, %25 ' inde lökopeni, % 28 ' inde anemi, % 38 ' inde ALT yüksekliği, % 39' unda AST yüksekliği, % 85 ' inde bruselloz aglütinasyon testi pozitif olarak belirlenmiştir. Özer ve ark. (83) aglütinasyon titresi ve kan kültürü ile tanısı konulan 33 bruselloz vakasında % 61' inde eritrositte artış, % 55 ' inde anemi, % 3 ' ünde lökopeni, % 6 'sında lökositoz, % 82'sinde CRP pozitifliği, % 42 'side ALT ve AST yüksekliğini bulmuşlardır. Rose Bengal testiyle pozitif olarak belirlenen 140 bruselloz vakasının % 86'sında SAT ile pozitif olarak belirlenen bir çalışmada, vakaların % 54'ünde lökosit sayısı normal değerdeyken, % 13 'ünde lökositoz, % 34 'ünde lökopeni, % 11'inde trombositopeni, % 14'ünde anemi, % 32'sinde ALT' nin yüksekliği bildirilmiştir (44). Bu çalışmada daha spesifik olarak 1/160 ve 1/320 titrelerde

eritrosit ve lökosit değerlerinde değişiklik görülmezken, 1/640 titrede lökopeni ve eritrositoz belirlendi, fakat bruselloz ile trombosit sayıları arasında bir etkileşim bulunamadı. Yine yapılan bu çalışmada zıt olarak ALT konsantrasyonlarında fark bulunamadı. Ancak 1/640 titrede AST konsantrasyonu sayısal olarak yüksek bulunmuş olmasına rağmen istatistiki olarak kısmen önemli bulundu ($P<0.07$). Benzer olarak *Brucella* antikor titreleri ile TOK, AST değerleri ve eritrosit sayısı arasında pozitif korelasyon bulunurken lökosit sayısı arasında negatif korelasyon saptandı.

Bir akut faz reaktanı olan ve en önemli görevi kompleman sistemlerle reaksiyona girerek vücudun immünolojik savunma mekanizmalarına yardımcı olmak olan CRP'nin serum düzeyi enfeksiyonlar, romatizmal ateş, romatoid artrit, kanser, tüberküloz gibi çoğu hastalıkta artmaktadır (56). Bu çalışmada artan *Brucella* antikor titrelerine paralel olarak serum CRP düzeylerinde de sayısal bir artış olmasına rağmen CRP düzeylerindeki bu artış istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Bu durumda *Brucella* enfeksiyonunun hastalarda kronik seyrettiği şeklinde yorumlanmıştır.

Mehli ve ark. (61) çalışmalarında, brusellozda standart tüp aglütinasyon titreleri ve Rose Bengal testi sonuçlarının biyokimyasal parametrelerle ilişkisindeki sonuçlarda; Rose Bengal testi ile 85 vakanın 11'inde % 13 negatif bulunmuş, vakaların % 62 'sinde C- reaktif protein (CRP), % 31'inde alanin aminotransferaz (ALT), %32'inde aspart aminotransferaz (AST) yüksek olup, %15'inde lökositoz, %7'inde loköpeni, %35'inde anemi ve %12'inde trombositopeni bulunmuştur. C-Reaktif Protein (CRP) bulunan serum örneklerinde *Brucella* antikorunun araştırıldığı bir çalışmada 52 serum örneğinde CRP pozitif, ASO negatif bulunduğu bildirilmiştir (52). Bayraktar ve ark.(11), brusellozlu hastaların serumunda istatistiksel olarak CRP düzeylerini yüksek saptamışlardır. Brusellozlu hastalardaki yüksek CRP düzeyini aktif inflamasyona bağlamışlar ve serum CRP düzeylerinin izlenmesinin, *Brucella* enfeksiyonu olan hastaların tanı ve takibinde yol gösterici olabileceği kanısına varmışlardır. Bu çalışmada seronegatif bireyler ile *Brucella* antikor titreleri yüksek bireyler CRP bakımından karşılaştırıldığında, *Brucella* antikor titreleri arttıkça serum CRP değerlerinde de sayısal bir artış olmasına rağmen istatistiki

olarak önemli bir artış olmaması çalışmadaki hastalarda akut bir bruselloz enfeksiyonu olmadığını düşündürmektedir.

Nitrik oksit organizmada birçok biyolojik fonksiyonları düzenleyen ve yangı sürecinde de önemli görevleri olan bir moleküldür (4). Nitrik oksit antibakteriyel etkisinin yanı sıra immunopatolojik mekanizmalar aracılığıyla konağın immun cevabını etkileyebilmektedir (8). *B. abortus* ve *B. melitensis* ile ratlarda yapılan deneysel enfeksiyonlarda NO düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (57). Nitrik oksit *Brucella*'nın hücre içinde öldürülmesinde önemli bir moleküldür, fakat bu molekülün aşırı üretimi konak için zararlı olabilir. İnsanlarda in vitro deney sonuçlarına göre NO'nun tahrip edici etkisini gösterememesi *Brucella* enfeksiyonunun kronik seyretmesinden kaynaklandığı ortaya atılmış ve in vitro ortamda *Brucella* ile infekte insan makrofajlarında NO yeteri kadar yüksek konsantrasyonlarda sentezlenmediği bildirilmekle birlikte bu sonucun insanlarda bruselloz'un kontrolünde nitrik oksitin rolü olamayacağı anlamına gelebileceği olarak yorumlanmıştır (43). Ancak rat bruselloz modelinde, NO konsantrasyonunun karaciğer ve dalakta önemli olarak arttığı buna karşın plazmada ki konsantrasyonlarında değişim olmadığı bildirilmiştir (31). Bu bağlamda *Brucella*'nın yerleştiği dalak ve karaciğer dokularında NO üretimindeki bu önemli artışın bu patojenin kontrolü için önemli olabileceği ortaya atılmıştır (31). Bu çalışmada serum NO düzeyinde seronegatif ve seropozitif bireyler arasında anlamlı bir farkın belirlenememiş olması ratlarda olduğu gibi insanlarda da NO'nun anti-brusella özelliğinin sistemik olarak serumda değil dokularda daha önemli olabileceğini düşündürmektedir. Benzer olarak insanlarda akut ve kronik seyreden bruselloz vakaları ile sağlıklı bireylerde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada plazmada NO indikatörü olarak ölçülen toplam nitrit düzeylerinin değişmediği bildirilmiştir (53). Bu açıdan ileriki çalışmalarda spesifik dokularda NO düzeyi veya NO ekspresyonu serum düzeyi ile beraber analiz edilmelidir.

Yapılan bu çalışmada kan örnekleri kliniklere *Brucella* taraması amacı yerine farklı şikayetler ve özellikle romatoid artrit şikayetiyle gelen hastalardan toplanmıştır. Bu durum hastalarda akut brusellozdan ziyade kronik enfeksiyonun var olduğu ihtimalini uyandırmaktadır. Bu çalışmada farklı *Brucella* antikor titreleri ile serum NO konsantrasyonları arasında bir ilişki bulunamadığı gibi *Brucella* pozitif hastalarda da serum nitrik oksit konsantrasyonlarında bir artış belirlenememiştir.

Benzer olarak, Savaş ve ark. (76) NO ile *Brucella* serum aglütinasyon testi (SAT), AST, ALT, ateş, terleme ve eklem ağrısı arasında anlamlı bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir. Fakat brusellozlu hastalardaki serum NO düzeyinin sağlıklı bireylere göre yüksek olduğunu bildirilmiştir (51, 76). Buna karşın, akut gastroenterit bulunan hastalarda NO düzeyinin arttığı, pnömoni ve üriner enfeksiyon bulunan hastalarda ise NO düzeyinin normal sınırlarda kaldığı bildirilmiştir (1). Ahreen ve ark (1) yaptığı çalışmada pnömoni ve üriner sistem enfeksiyonu bulunan hastalarda NO düzeyinin normal sınırlarda seyretmesi ve yapılan bu çalışmada da *Brucella* seropozitif hastalarda da serum nitrik oksit konsantrasyonlarında bir artış belirlenmemiş olması, kronikleşen enfeksiyonlarda nitrik oksitin artmamış olabileceğini ve kronik yangıların teşhisinde de nitrik oksit konsantrasyonlarının yeterli olamayabileceğini göstermektedir. Yapılan bu çalışmada olguların kronik seyirli olma ihtimali ve hastaların başka şikayetlerle birlikte bulunmaları NO, TAK ve TOK düzeylerinin neden etkilenmediğini kısmen açıklayabilmektedir. Ayrıca *Brucella* etkenlerinin polimorfo lökositler tarafından hücre içi imha edilme olayından nasıl kurtulduklarının mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Bu bağlamda *Brucellae* etkenleri polimorf lökositler tarafından hücre içinde NO sentez mekanizmalarını ve sonuçta da ROT üretimini engelleyerek lökositlerin içinde yaşayabilme yeteneği kazanabiliyor olabileceğini ve dolayısıyla hücre içinde NO sentez mekanizmalarının engellenmesiyle de serum NO konsantrasyonlarında artış olamayacağı sonucunu ortaya koymaktadır.

Brusellozis için bildirilen en yaygın hemotolojik bozukluklardan olan lökopeniye (3) bu çalışmada da rastlanılmıştır. *Brucella* antikör titrelerinin hemogram değerlerine olan etkileri incelendiğinde 1/640 titrede lökosit sayılarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Fakat, bruselloz için bildirilen yaygın hematolojik bozukluklardan bir diğeri olan anemi (3) bu çalışmada belirlenmemiş, aksine 1/640 titrede eritrosit sayılarının arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada literatür bilgilerine uyum sağlamayan bu eritrosit sayılarındaki artışın, çalışmanın gerçekleştirildiği bölgenin coğrafik özellikler ve bireysel farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

ROT bir çok durumda metabolik ve fizyolojik işlemler sırasında üretilmekte ve hücre içi özellikle *Brucella* gibi makrofaj içi mikroorganizmaların yok

edilmesinde önemli bir görev üstlenmektedir. Zararlı oksidatif reaksiyonların organizmaya zararlı etkisini ortadan kaldırmak için enzimatik veya enzimatik olmayan bir çok mekanizma mevcuttur. Bazı hastalıklarda oksidanların artması ve antioksidanların azalmasının engellenemediği durumlarda bir çok bozukluk meydana gelmektedir. Bu bozuklukların telafi edilmesinde antioksidan moleküllerin büyük önemi vardır. Bu çalışmada TOK değerinin artmasıyla beraber TAK değerlerinin düşme olmadan sabit kalması gözlemlenmiştir. Bu durum antioksidan sisteminin immun mekanizmaların bir parçası olarak hastalıkta etkin olduğunu göstermektedir. Zorunlu makrofaj içi bir bakteri enfeksiyonunun patogenezinde böyle bir bulgu doğal bir sonuç olarak kabul edilebilir. Bruselloz patogenezinde ve oluşturduğu patolojik değişikliklerde doku tahribatı ile ilgili herhangi bir bildiri mevcut değildir. Brusellozda doku hasarının bulunmaması çalışma sonuçlarında TAK değerlerinin düşmeksizin sabit kalmasıyla açıklanabilir. Ayrıca insanlarda akut ve kronik seyreden bruselloz vakaları ile sağlıklı bireylerde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, akut seyirli bruselloz vakalarında bir antioksidant enzim olan süperoksit dismutazın (SOD) lökositlerdeki aktivitesinin tedavi öncesinde düşük olduğu ve tedavi süresince artarak sonunda sağlıklı bireylerdeki seviyeye ulaştığı bildirilmiş ve bruselloz tedavisinde klasik antibiyotik tedavisine ek olarak bir antioksidan ajan kullanılmasının yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceği önerilmiştir (53).

Enfeksiyondan yedi gün sonra *Brucella*'nın plazmada, karaciğer ve dalakta lipid peroksidasyonunu önemli derecede (3-5 kat) uyardığı bildirilmiştir (31). Ayrıca ratlarda *Brucella*'nın bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesini karaciğer ve dalakta önemli olarak azalttığı, yine rat bruselloz modelinde *B. melitensis* enfeksiyonunun oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonu in vivo olarak inflamatuvar sistemi etkilemeden uyardığı bildirilmiştir (31). Buna karşın ratlarda deneysel *B. melitensis* enfeksiyonunun antioksidan enzim aktivitelerini etkilenmeksizin membran lipidlerinde peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (62). Yine ratlarda *B. melitensis* enfeksiyonunun antioksidan savunma sistemi aktivitesini azalttığı ve lipid peroksidasyonunu uyardığı bildirilmiştir (32). Astım hastalığı olan hastalarda TAK ve TOK düzeyleri kontrol gruptakilerine göre yüksek bulunduğu bildirilmiştir (28). Astımlı hastalarda TOK ile beraber TAK'ın da artmış olması olguların ciddi olarak oksidatif strese maruz kaldıklarını göstermektedir (29). Biondi ve ark. (16) serum

oksidatif stres parametrelerinden hidroperoksit ve TAK düzeylerinin hızlı ve rutin bir test olarak primer ve sekonder Raynaud hastalığının teşhisinde kullanılabileceğini, antioksidan moleküllerin verilmesi yoluyla yapılan tedavilerin stratejisinin oluşturulmasında kullanılabileceğini bildirmiştir (16). Karakoç ve ark. (54) ankylosing spondylitis (AS) hastalarında, sağlıklara göre plazma TOK düzeyi ve oksidatif indeks düzeyleri yüksekken plazma TAK düzeyinin düşük olmasının oksidan ve antioksidan parametreleriyle hastalık aktivitesi arasında önemli bir ilişki bulunamamasının, artan oksidan ve azalan antioksidan kapasitelerinin hastalığın patogeneziyle ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada da *Brucella* seropozitif bireylerde TOK düzeyindeki artış ve TAK düzeyindeki değişmezliğin brusellozun patogenezinde oksidan sisteminin aktive olduğunu ve bunu zararlı etlilerini ortadan kaldırmak için antioksidan sistemin de etkin olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında analiz edilen parametrelerin brusellozun teşhis ve takibinde yardımcı göstergeler olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu sonuçların hastalığın patogenezisini daha iyi anlamaya yardımcı olması beklenmektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada *Brucella* antikor titrelerinin artışına paralel olarak serum TOK değerlerinde artış bulunurken TAK değerlerinin sabit olarak seyrettiği belirlenmiştir. Bu durum antioksidan sisteminin immun mekanizmaların bir parçası olarak hastalıkta etkin olduğunu göstermektedir. Zorunlu makrofaj içi bir bakteri enfeksiyonunun patogenezinde böyle bir bulgu doğal bir sonuç olarak kabul edilebilir. Brusellozda doku hasarının bulunmaması çalışma sonuçlarında TAK değerlerinin düşmeksizin sabit kalmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, titrelere paralel olarak nitrik oksit, CRP, AST ve ALT değerlerinde değişim bulunamadı. Bununla birlikte 1/640 titrede AST konsantrasyonu sayısal olarak yüksek bulunmuş olmasına rağmen istatistik olarak kısmen önemli bulundu.

Brucella antikor titrelerinin hemogram değerlerine olan etkileri incelendiğinde 1/160 ve 1/320 titrelerinde eritrosit ve lökosit değerlerinde değişiklik görülmezken, 1/640 titrede lökosit sayılarının azaldığı, eritrosit sayılarının ise arttığı belirlendi. Buna karşın *Brucella* antikor titrelerinin trombosit sayıları üzerine etkileri bulunmadı.

Brucella antikor titreleri ile TOK, AST konsantrasyonları ve eritrosit sayısı arasında pozitif korelasyon bulunurken lökosit sayısı arasında negatif korelasyon saptandı.

Bu çalışmada farklı *Brucella* antikor titreleri ile serum nitrik oksit konsantrasyonları arasında bir ilişki belirlenemediği gibi *Brucella* pozitif hastalarda da serum nitrik oksit konsantrasyonlarında bir artış belirlenememiştir. Bu bulgu *Brucella* etkenlerinin polimorf lökositler tarafından hücre içinde NO sentez mekanizmalarını ve sonuçta da ROS üretimini engelleyerek lökositlerin içinde yaşayabilme yeteneği kazanabiliyor olabileceğini ve dolayısıyla hücre içinde NO sentez mekanizmalarının engellenmesiyle de plazma NO konsantrasyonlarında artış olamayacağı sonucunu ortaya koymaktadır. Polikliniklere farklı şikayetler ve

Özellikle romatoid artrit Şikayetiyle gelen hastalardan numune alınması hastalarda akut bruselloz'dan ziyade başka kronik enfeksiyonun var olduğu ihtimalini uyandırmaktadır. Bu sonuçta bruselloz teŐhisini desteklemek veya patogenezi ortaya çıkarmak için yalnız baŐına biyokimyasal olarak serumda NO analizinin yeterli olamayabileceğini, TOK, TAK ve antioksidant enzim aktiviteleri analizleriyle desteklenmesi gerektiğini ve diğer bir çok enfeksiyon veya yangı etkenlerinden etkilenebileceğini göstermektedir.

6. ÖZET

Bu çalışmada *Brucella* seropozitif olan insan serumlarındaki antikor titreleri ile serum nitrik oksit (NO) konsantrasyonları ve toplam oksidan-antioksidan kapasitelerinin (TOK-TAK), serum CRP, AST, ALT ve hematolojik bulguların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma 2007-2009 yıllarında Kars Devlet Hastanesine ateş, artrit, eklem ağrısı gibi belirtiler sebebiyle gelen hastalardan alınan kan örneklerinde *Brucella* bakımından seropozitif numunelerden titreleri 1/160, 1/320 ve 1/640 olanlardan yirmişer adet olmak üzere 60 örnek ve negatif olan 20 örnekte analizler yapıldı. *Brucella* antikor titrelerinin serum TOK konsantrasyonu üzerine etkisi bulunurken ($P<0,01$) bu titreler ile serum NO, TAK, CRP, AST ve ALT değerleri arasında bir ilişki bulunamadı. Ancak 1/640 titrede AST konsantrasyonu sayısal olarak yüksek bulundu ($P<0,07$). *Brucella* antikor titreleri lökosit ($P<0,05$) eritrosit ($P<0,05$) sayılarını etkilerken, bunların trombosit sayıları üzerine etkileri bulunmadı. 1/160 ve 1/320 titrelerde eritrosit ve lökosit değerlerinde değişiklik görülmezken, 1/640 titrede lökosit sayılarının azaldığı, eritrosit sayılarının ise arttığı belirlendi. *Brucella* antikor titreleri ile TOK ($r=0,44$; $P<0,01$), AST ($r=0,23$; $P=0,05$) değerleri ve eritrosit sayısı arasında pozitif korelasyon ($r=0,32$; $P<0,01$) bulunurken, lökosit sayısı arasında negatif korelasyon ($r= -0,32$; $P<0,01$) saptandı. *Brucella* antikor titreleri ile serum NO konsantrasyonları arasında bir ilişki belirlenemediği gibi *Brucella* negatif ve pozitif serumlarda NO konsantrasyonlarında bir fark belirlenemedi. Bu sonuç NO'nun anti-*Brucella* özelliğinin sistemik olarak değil dokularda daha önemli olabileceğini ve *Brucella* etkenlerinin makrofajlarda yaşayabilmesi için NO sentezini baskılayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca TAK değerlerinin azalmaması antioksidan sistemin immun mekanizmaların bir parçası olarak etkin olduğunu göstermektedir. Çalışma sonuçlarının brusellozun klinik değerlendirilmesinde ve hastalığın patogenizini daha iyi anlamaya yardımcı olması beklenmektedir.

7. ABSTRACT

In this study, it is aimed to compare serum nitric oxide (NO) concentrations and total oxidant-antioxidant capacities (TOC-TAC), serum CRP, AST, ALT and hematological findings with respect to *Brucella* seropositive human serums antibody titers. Analyses were performed in blood samples collected from patients with complaints of fever, arthritis, joint pain etc., between 2007 and 2009 at Kars State Hospital. Further analyses were done in twenty *Brucella* seropositive samples from each titers (1/160, 1/320 and 1/640) as sixty samples in total, and in twenty negative samples. While significant ($P<0,01$) effect of *Brucella* antibody titers on serum TOC concentration was detected, no relationship was found between those titers and serum NO, TAC, CRP, AST and ALT values. However, AST concentration was numerically higher at 1/640 titer ($P<0,07$). *Brucella* antibody titers affected leucocyte ($P<0,05$) and erythrocyte ($P<0,05$) numbers; whereas, no effect of those titers on trombocyte numbers were observed. While no changes in erithrocyte and leucocyte numbers at 1/160 and 1/320 titers, decrease in leucocyte and increase in erythrocyte numbers were determined at 1/640 titer. There was a positive correlation between *Brucella* antibody titers and TOC ($r=0,44$; $P<0,01$), AST ($r=0,23$; $P=0,05$) values and eritrocyte numbers ($r=0,32$; $P<0,01$); whereas, there was a negative correlation between *Brucella* antibody titers and leukocyte numbers ($r=-0,32$; $P<0,01$). Neither relationship was found between *Brucella* antibody titers and serum NO concentrations, nor difference was detected between *Brucella* negative and positive serums for serum NO concentrations. This result may imply that anti-*Brucella* property of NO could be important at tissue level rather than systemic level, and *Brucella* microorganisms could suppress NO synthesis in macrophages to survive. Moreover, no decrease in TAC values reveal that antioxidant system could be active as part of immun mechanisms. Better clinical evaluation and understaning of pathogenesis of brucellosis are expected with these obtained results.

8. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında İznik'te doğdum. İlk öğrenimimi İznik Boyalıca Kasabasında, ortaokul ve lise öğrenimimi Bursa'da tamamladım. 1993 yılında Marmara Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulunda 1997 yılında 'Hemşire' ünvanı alarak mezun oldum. 1998-2001 yılları arasında Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nde Cerrahi ve Yoğun Bakım, Reanimasyon, Kulak Burun Boğaz ve Plastik Cerrahi Birimlerinde Hemşire olarak görev yaptım. 2001-2003 yıllarında İznik Devlet Hastanesi'nde Cerrahi bölüm sorumlusu ve Eğitim Hemşiresi ünvanı ile çalıştım. 2004 yılında Gemlik Umurbey Celal Bayar Sağlık Meslek Lisesine 'Öğretmen' olarak atandım. 2005 yılında Kars Serhat Sağlık Meslek Lisesi'nde göreve başladım. 2007 yılında Kars ilinde İlkyardım Formatör Eğitimci olarak görev yaptım. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım. Evli ve iki çocuk annesiyim.

9. LİTERATÜR LİSTESİ

1. **Ahreen, C., Jungersten, L., Sandberg, T.:** Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in patients with acute infectious diseases. *Scand. J. Infect. Dis.* 31:405-407,1999.
2. **Akkuş, İ.:** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya, 2005.
3. **Al-Eissa, Y., AL-Nasser, M.:** Hematological manifestations of childhood brucellosis. *Infection.* 21: 23-26, 1993.
4. **Al-sadoni, H., Ferro, A.:** S-nitrosothiols: A class of nitric oxide-donor drugs. *Clin. Sci.* 98: 507-520, 2000.
5. **Anon.:** www. Hematoloji-onkoloji.com Prof. Dr. Mustafa Çetin, 2009.
6. **Anon.:** Vikipedi özgür ansiklopedisi, 2009.
7. **Anon.:** Joint FAO/WHO, Expert Committee on Bruselloz, Geneva WHO/Technical Report, 6th Report Series, No: 740, 1986.
8. **Akaike, T., Maeda, H.:** Nitric oxide and virus infection. *Immunology.* 101: 300-308, 2000.
9. **Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Karaman, M., Akbay, Ö., Ilgar, A., İzgür, M., Diker, K.S.:** Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı, Medisan Ankara, 1997.
10. **Badur, S.:** Bruselloz'da serolojik tanı ve seroepidemioloji. *Klinik Derg.* 3: 17-20, 1990.
11. **Bayraktar, M., Bayraktar, N., Bayındır, Y., Durmaz, R.:** Brusellozlu Hastalarda Serum C-Reaktif Protein, Demir ve Ferritin Düzeylerinin Tanı ve İzlemdeki Değeri. *Ankem Derg.* 19: 61-63, 2005.

12. **Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A.:** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1620-1624, 1990.
13. **Bilgehan, H.:** Brucella. *Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları.* 157-168, 1992.
14. **Bilgehan, H.:** Brucella. In: Bilgehan H ed. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri infeksiyonları.* 10. baskı, Bornova, İzmir, 210-211, 2000.
15. **Bilgin, M., Gün, H.:** Bruselloz' un serolojik tanısında Elisa, Standart Tüp Aglütinasyon ve Rose-Bengal plate testlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg.* 5: 171-173, 1991.
16. **Biondi, R., Coaccioli, S., Lattanzi, S., Puxeddu, A., Papini, A.:** Oxidant/antioxidant status in patients with Raynaud's disease. *Clinica Terapeutica.* 159: 77-81, 2008.
17. **Bithell, T.C.:** Miscellaneous form of thrombocytopeni. 1363. In: Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J. et al. (Eds.): *Wintrobe's Clinical Hematology.* 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
18. **Blasco, J.M., Garin-Bastuji, B., Marin, C.M., Gerbier, G., Fanlo, J., Jimenez de Bagues, M.P., Cau, C.:** Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of brucella melitensis infection in sheep and goats. *Vet. Rec.* 134: 415-420, 1994.
19. **Blasco, J.M., Marin, C., Jimenez de B., M.P., Barberan, M., Hernandez, A., Molina, L., Velasco, J., Diaz, R., Moriyon, I.:** Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing Brucella melitensis infection in sheep, *J. Clin. Microbiol.* 32: 1835-1840, 1994.
20. **Bredt, D.S., Snyder, S.H.:** Nitric oxide: a physiological messenger molecule, *Annu. Rev. Biochem.* 63: 175-195, 1994.
21. **Bumin, M.A.:** Bruselloz' un serolojik tanısında Rose Bengal testinin önemi. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 45: 1-8, 1998.

- 22. Bush, P.A., Gonzales, N.E., Griscavage, J.M., Ignarro, L.J.:** Nitric oxide synthase from cerebellum catalyses the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citruline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 960-966, 1992.
- 23. Bülent, B.:** Brucella Laboratuvar Tanısı. In: Ustaçelebi Ş. ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, 571-577, 1999.
- 24. Castaneda-Roldan, E.I. , Ouahrani-Bettache,S., Saldana,Z., Avelino,F., Rendon, M.A., Chaiyotwittayakun, A., Erksine, R.J., Bartlett, P.C., Herd, T.H., Sears, P.M., Harmont, R.J.:** The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 60–67, 2002.
- 25. Chanarin, I., Harrisingh, D., Tidmarsh, E., Skacel, P.O.:** Significance of lymphocytosis in adults. *Lancet.* 2: 897-899, 1984.
- 26. Cengiz, A.T.:** Brusellozda korunma ve tedavi. In: Prof. Dr. A. Kemal Özsan *Tıp Günleri-1 Bruselloz Simpozyumu Kitabı*, Ankara, 57-67, 2000.
- 27. Colmenero, J.D., Reguera, J.M.:** Fernandez Nebra, Cabnera Franguale F. Osteoarticular Complications of brucellosis. *An. Rheum. Dis.* 50:23-26, 1991.
- 28. Çağatay, A.A., Küçüköğlü, S., Berk, H., Özsüt, H., Ereksöy, H., Dilmener, M., Çalangu, S.:** Otuzaltı bruselloz olgusunun değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi.* 15: 19-21, 2002.
- 29. Çakmak, A., Zeyrek, D., Ataş, A., Çelik, H., Aksoy, N., Erel, O.:** Serum prolidase activity and oxidative status in patients with bronchial asthma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 23: 132-138, 2009.
- 30. Dhar, R., Lastimoza, J.L., Hira, P.R.:** A modified indirect fluorescent antibody test for the diagnosis of Bruselloz. *Diagn. Microbial. Infect. Dis.* 11: 189-194, 1988.
- 31. Erdogan, S., Celik, S., Aslantas, O., Kontas, T., Ocak, S.:** Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis*-induced lipid peroxidation and stimulate

- IL-10 transcription in rats. *Research in Veterinary Science*. 82: 181–186, 2007.
- 32. Erdogan, S., Aslantas, O., Celik, S., Atik, E.:** The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Research in Veterinary Science*. 84: 18–25, 2004.
- 33. El, S., Ural, S., Kaptan, F., Müftüoğlu, I., Çoşkun, N.A.:** Bruselloz tedavisinde siprofloksasin/rifampisin kombinasyonunun etkinliğinin ve güvenilirliğinin doksisisiklin/rifampisin kombinasyonunki ile karşılaştırılması. Prospektif bir çalışma. *Klinik Dergisi*. 11: 89-91, 1998.
- 34. Erdenabaatar, J., Sugar, S., Yondondorj, A., Nagabayashi, T., Syuto, B., Watarai, M., Makino, S., Shirahata, T.:** Serological Differentiation Brucelle-Vaccinated and Infected Domesticated Animals by the Agar Gel Immunodiffusion Test Using *Brucella* Polysaccharide in Mongolia. *J. Vet. Med. Sci*. 64: 839-841, 2002.
- 35. Erel, O.:** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem*. 38: 1103-1111, 2005.
- 36. Ficapal, A., Alonso- Urmenata, B., Velasco, J., Moriyon, I., Blasco, J.M.:** Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Vet. Rec*. 137: 145-147, 1995.
- 37. Garin, B., Trap, D., Gaumont, R.:** Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine Bruselloz, *Vet. Rec*. 117: 444-445, 1985.
- 38. Geyik, M.F., Kökoğlu, Ö.F., Hoşoğlu, S., Ayaz, C.:** Brusellozlu 154 Hastanın Değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*. 29:1-2, 2002.
- 39. Godfroid, J.:** Bruselloz in wildlife. *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz*. 21: 277-286, 2002.
- 40. Goff, W.L., Johnson, W.C., Wyatt, C.R., Cluff, C.W.:** Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-

- dependent nitric oxide production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55: 45-62, 1996.
41. **Gotuzzo, E., Carrillo, C.:** Brucella. 183-185. In: Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., Blacklov, N.R., (Eds.): *Infectious Diseases*, 2. baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998.
42. **Göktaş, P., Sümer, S., Oktay, G., Göktaş, S.:** Bruselloz tanısında iki testin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 21: 199-203, 1991.
43. **Gross, A., Bertholet, S., Mauel, J., Dornand, J.:** Impairment of Brucella growth in human macrophagic cells that produce nitric oxide. *Microbial Pathogenesis.* 36: 75-82, 2004.
44. **Gül, H.C., Coşkun, Ö., Turhan, V., Beşirbellioğlu, B.A., Bilgetürk, A., Erdem, H., Avcı, İ.Y., Görenek, L., Eyigün, C.P.:** Bruselloz: 140 olgunun geriye dönük olarak irdelenmesi. *TSK. Kor. Hek. Bült.* 6: 249-252, 2007.
45. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.:** Free radicals, other reactive species and disease. 617-783. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press., Oxford, 1999.
46. **Huber, J.D., Nicoletti, P.:** Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring test whit isolation rate of Brucella abortus from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1529-1531, 1986.
47. **Huie, R.E., Padmaja, S.:** The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18: 195-199, 1993.
48. **İyisan, A.S.:** Ergin Koyunlarda, Düşük Doz Brucella melitensis REV-1 aşısı ile aşılama sonucu oluşan antikörlerin çeşitli reaksiyonlarla saptanması. *Pendik Vet. Mikrobiol Derg.* 23: 175-185, 1992.
49. **İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Düzgün, S.G., Ersoy, Y., Eskiizmirli, S., Güler, L., Gündüz, K., Işık, N., İçyeroğlu, A.K., Kalendar, H., Karaman, Z., Küçükayan, U., Özcan, C., Seyitoğlu, Ş., Tuna, İ., Tunca, T., Üstünakın, K., Yurtalan, S.:** Türkiye’ de sığır ve koyunlarda brusellozin seroepidemiolojisi. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.* 31: 21-75, 2000.

- 50. Jimenez de Bagües, M.P., Marin, C.M., Blasco, J.M., Moriyon, I., Gamazo, C.:** An ELISA with Brucella lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B.mellitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. mellitensis* strain Rev 1 vaccination. *Vet. Microbiol.* 30: 233-241, 1992.
- 51. Kandemir, Ö., Eskandari, G., Çamdeviren, H., Şahin, E., Kaya, A., Atik, U.:** Plasma malondialdehyde and nitrate levels in patients with Brusellosz. *Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi*, 4:405-409, 2002.
- 52. Karabiber, N., Emekdaş, G., Kocabeyoğlu, Ö.:** Brucellada CRP bulunan serum örneklerinde Brucella antikoru araştırılması. *Sağlık Derg.* 64: 1-4, 1992.
- 53. Karabulut, A.B., Sonmez, E., Bayindir, Y.:** Effect of the treatment of brucellosis on leukocyte superoxide dismutase activity and plasma nitric oxide level. *Ann Clin Biochem.* 42: 130-132, 2005.
- 54. Karakoç, M., Altındağ, O., Keles, H., Soran, N., Selek, S.:** Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology International.* 27:1131-1134, 2007.
- 55. Knnapen, A.M., Nehls, P., Borm, J.A.:** Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 234-240, 1999.
- 56. Li, J.J., Wang, H.R., Huang, C.X., Xue, J.L., Li, G.S.:** Enhanced inflammatory response of blood monocytes C-reactive protein in patients with unstable angina. *Clin. Chim. Acta.* 352: 127-133, 2005.
- 57. Lopez-Urrutia, L., Alonso, A., Nieto, M.L., Bayon, Y., Orduna, A., Crespo, M.S.:** Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infection and Immunity.* 68:1740-1745, 2000.
- 58. Lykkesfeldt, J., Svendsen, O.:** Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* 173: 502–511, 2007.
- 59. MacMicking, J., Lee, Q., Nathan, C.:** Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323–350, 1997.

60. **Mac Millan, A.P., Cockrem, D.S.:** Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. Res. Vet. Sci. 38: 288-291, 1985.
61. **Mehli, M., Karshgil, T., Gayyurhan, E.D., Özgür Akın, F.E.:** Brusellozda standart tüp aglütinasyon titreleri ve Rose Bengal testi sonuçlarının biyokimyasal parametrelerle ilişkisi. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg. 38: 16-22, 2008.
62. **Melek, I.M., Erdogan, S., Celik, S., Aslantas, O., Duman, T.:** Evaluation of oxidative stress and inflammation in long term *Brucella melitensis* infection. Mol. Cell. Biochem. 293, 203–209, 2006.
63. **Mete, K.** Veteriner hekimlik yönünden Bruselloza yaklaşım. Bruselloz Klimik Dergisi. 3: 16, 1990.
64. **Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A.:** A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide. 5: 62-71, 2001.
65. **Moilanen, E., Vapaatalo, H.:** Nitric oxide in inflammation and immune responses. Ann. Med. 27: 359-367, 1995.
66. **Morris, S.M., Billiar, T.R.:** New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. Am. J. Physiol. 266:E829-E839, 1994.
67. **Moyer, N.P., Holcomp, L.A., Hausler, W.J.:** *Brucella* In: Manuel of Clinical Microbiology. 457-462, 1991.
68. **Nicoletti, R.:** Further evaluation of serologic test procedures used to diagnose Bruselloz. Am. J. Vet. Res. 30: 1811, 1969.
69. **Nielsen, K., Gall, D., Lin, M., Massangill, C., Samartino, L., Perez, B., Coats, M., Hennager, S., Dajer, A., Nicoletti, P., Thomas, F.:** Diagnosis of bovine Bruselloz using a homogeneous fluorescence polarization assay. Vet. Immunopathol. 66: 321-329, 1998.

- 70. Notebaerta, S., Demon, D., Bergheb, T.V., Vandenabeeleb, P., Meyera, E.** Inflammatory mediators in Escherichia coli-induced mastitis in mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 551-565, 2008.
- 71. Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K., Maeda, H.:** Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 342: 261-274, 1997.
- 72. Rahaley, R. S., Dennis, S.M., Smeltzer, M.S.:** Comparison of enzymelinked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. *Vet. Rec.* 113: 467-470, 1983.
- 73. Richter-Landsberg, C., Vollgraf, U.:** Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp. Cell. Res.* 244: 218-229, 1998.
- 74. Rosselli, M., Keller, P.J., Dubey, R.K.:** Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reprod. Update.* 4:3-24, 1998.
- 75. SAS Institute Inc.:** SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1990.
- 76. Savaş, L., Önlü, Y., Savaş, N., Polat, G., Aslan, G.:** Bruselloz hastalarında serum nitrik oksit ve malondialdehit düzeyleri. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 25:478-482, 2005.
- 77. Saz, J.V., Beltran, M., Diaz, A., Agulla, A., Merino, F.J., Villasante, P.A., Velasco, A.C.:** Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bruselloz. *European J. Clin. Microbiol.* 6: 71-74, 1987.
- 78. Sözen, T.H.:** Bruselloz. 636-642. In: Willke Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. (Eds.): *İnfeksiyon Hastalıkları Mikrobiyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevi, 2002.
- 79. Şemsettin, U.:** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, 571-577, 1999.

- 80. Tamanini, C., Basini, G., Grasselli, F., M. Tirelli.:** Nitric oxide and the ovary. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl.2):E1-E7, 2003.
- 81. Tansel, Ö., Yavuz, M., Kuloğlu, F., Akata, F.:** Trakya Üniversitesi Hastanesine başvuran 40 Bruselloz olgusunun değerlendirilmesi. *İnfek. Derg.* 17:1-4, 2003.
- 82. Türütoğlu, H., Mutluer, B., Uysal, Y.:** Burdur yöresinde toplanan sütlerin *Brucella* infeksiyonu yönünden araştırılması. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* 27: 1003-1009, 2003.
- 83. Özer, S., Oltan, N., Gencer, S.:** Bruselloz: 33 olgunun değerlendirilmesi. *Klimik Derg.* 11: 82-84, 1998.
- 84. Wu, G., Morris, S.M.:** Arginine metabolism:nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336:1-17, 1998.
- 85. Yanik, M., Erel, O., Kati, M.:** The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica.* 16: 200-203, 2004.
- 86. Yardımcı, H., Esendal, Ö.M., Küçükayan, U., Erdemoğlu, A.:** Koyun brusellozisin serolojik teşhisinde Dithiothreitol ve EDTA'nın kullanılması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 42: 241-245, 1995.
- 87. Yeni, E., Gulum, M., Selek, S., Erel, O., Unal, D., Verit, A., Savas, M.:** Comparison of oxidative/antioxidative status of penile corpus cavernosum blood and peripheral venous blood. *Int. J. Impot. Res.* 17:19-22, 2005.
- 88. Young, E.J.:** *Brucella*-species. 2386-2393. In: Mondel, G.L., Bennett, J.E., Dolin R. (Eds.): *Principles and Practice of Infectious Disease.* Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.
- 89. Yüce, A., Çavuş, S.A.:** Türkiye'de Bruselloz: Genel bakış. *Klimik Derg.* 19: 87-97, 2006.