

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇİĞ SÜT VE PEYNİRLERDE *BRUCELLA SPP.*'NİN
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER METODLARLA
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sevgi ERDOĞDU**

**Danışman
Doç. Dr. Seçil ABAY**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇİĞ SÜT VE PEYNİRLERDE *BRUCELLA* SPP.'NİN
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER METODLARLA
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sevgi ERDOĞDU**

**Danışman
Doç. Dr. Seçil ABAY**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Sevgi ERDOĞDU

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Çiğ Süt ve Peynirlerde *Brucella* spp’nin Konvansiyonel ve Moleküler Metodlarla Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Sevgi ERDOĞDU

Danışman

Doç. Dr. Seçil ABAY

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Fuat AYDIN

ONAY

Doç. Dr. Seçil ABAY danışmanlığında **Sevgi ERDOĞDU** tarafından hazırlanan “**Çiğ Süt ve Peynirlerde *Brucella* spp’nin Konvansiyonel ve Moleküler Metodlarla Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

/ / 2017

JÜRİ**İmza**

Danışman : Doç. Dr. Seçil ABAY

Üye : Prof. Dr. K. Serdar DİKER

Üye : Prof. Dr. Fuat AYDIN

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

/ / 2017

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fuat AYDIN'a, çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, özverili bir şekilde çalışmamda destek olan danışmanım Doç. Dr. Seçil ABAY' a, yardımlarından dolayı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY'a, tezimi TSY-11-3592 nolu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli aileme yürekten teşekkür ediyorum.

Sevgi ERDOĞDU

Kayseri, Ocak 2017

ÇİĞ SÜT VE PEYNİRLERDE *BRUCELLA* SPP’NİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER METOTLARLA ARAŞTIRILMASI

Sevgi ERDOĞDU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak 2017

Danışman: Doç. Dr. Seçil ABAY

KISA ÖZET

Bu çalışmada, Kayseri ilinde tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *Brucella* spp. varlığının konvansiyonel ve moleküler metotlarla araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla 100 adet çiğ süt, 100 adet taze beyaz peynir ve 100 adet salamura beyaz peyniri olmak üzere toplam 300 örnek *Brucella* spp. yönünden analiz edildi. İzolasyon için, Farrell yönteminden (Farrell Broth’da ön zenginleştirmeyi takiben Farrell agara ekim) yararlanıldı. İzolatların identifikasyonu için fenotipik testler ve moleküler metod (AMOS-PCR) kullanıldı.

Çalışma sonucunda; analiz edilen 100 süt örneğinin 1’i, 100 taze peynir örneğinin 2’si *Brucella* spp. yönünden pozitif saptanırken 100 adet salamura peynir örneğinde *Brucella* spp. tespit edilemedi. Elde edilen izolatların fenotipik identifikasyonu sonucunda süt örneğinden elde edilen 1 izolat, *B. abortus* biyotip 1, taze peynirden elde edilen 2 izolat *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Ayrıca izolatlar AMOS-PCR ile de tür ve biyotip düzeyinde doğrulandı.

Çalışmada, Kayseri şehir merkezindeki çeşitli satış alanlarında tüketime sunulan süt ve peynirlerde elde edilen *Brucella* spp. izolasyon oranları düşük olmasına rağmen enfeksiyonun şiddeti dikkate alındığında, *Brucella* türlerini içeren süt ve peynirlerin halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Peynir, süt, *Brucella*, AMOS-PCR

**INVESTIGATION OF *BRUCELLA* SPP. IN RAW MILK AND CHEESE BY
CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS**

Sevgi ERDOĞDU

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology

Master Thesis, January 2017

Supervisor: Associate Prof. Seçil ABAY

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the presence of *Brucella* spp. in cow raw milk and cheese served for consumption in Kayseri province by conventional and molecular methods.

For this purpose, A total of 300 samples consist of 100 raw milk, **100** fresh white cheese and 100 pickled white cheese were analyzed for *Brucella* spp. The Farrell method (following pre-enrichment in Farrell broth, culture was made in Farrell agar) was utilized for the isolation phenotypic tests and molecular method (AMOS-PCR) were used for the identification of isolates.

In conclusion, *Brucella* spp. could not be detected from 100 pickled cheese while 1 of the 100 milk samples and 2 of 100 fresh cheese samples examined were found to be positive for *Brucella* spp. One isolate from milk and two isolates from fresh cheese were identified as *B. abortus* biotype 1 and *B. melitensis* biotype 3 respectively with phenotypic tests. In addition, isolates were also confirmed at the species and biotype level by AMOS-PCR.

In this study, although the isolation rate of *Brucella* spp. obtained from milk and cheese served for consumption in Kayseri city center, is low, considering the severity of infection, milk and cheese that contained *Brucella* spp. constitute a potential risk for public health

Keywords: Cheese, milk, *Brucella*, AMOS-PCR

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Brusellozisin Tarihçesi	3
2.2. <i>Brucella</i> Türlerinin Taksonomisi	4
2.3. <i>Brucella</i> Türlerinin Morfolojisi.....	6
2.4. <i>Brucella</i> Türlerinin Kültür Özellikleri	7
2.5. <i>Brucella</i> Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri.....	7
2.6. <i>Brucella</i> Türlerinin Antijenik Özellikleri.....	10
2.7. <i>Brucella</i> Türlerinin Genomik Özellikleri	11
2.8. <i>Brucella</i> Türlerinin Patojenitesi	12
2.9. Brusellozisin Epidemiyolojisi	14
2.10. <i>Brucella</i> Türlerinin Direnç Özellikleri	17
2.11. İnsanlarda ve Hayvanlarda <i>Brusellozis</i>	18
2.12. Süt ve süt ürünlerinde <i>Brucella</i> spp.	19
2.13. <i>Brusellozis</i> 'in Teşhisi	20

2.13.1. Bakteriyolojik Teşhis.....	20
2.13.1.1. İzolasyon.....	20
2.13.1.2. İdentifikasyon	21
2.13.2. Serolojik Teşhis	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. GEREÇ.....	26
3.1.1. Örneklerin Toplanması.....	26
3.1.2. <i>Brucella</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	26
3.1.3. Standart Suş	30
3.1.4. Moleküler analizde kullanılan kimyasallar	30
3.2. YÖNTEM.....	31
3.2.1. <i>Brucella</i> spp.'nin İzolasyonu.....	31
3.2.1.1. Süt örneklerinin incelenmesi	31
3.2.1.2. Peynir Örneklerinin İncelenmesi	31
3.2.2. <i>Brucella</i> spp. İdentifikasyonu.....	32
3.2.2.1. Fenotipik Testler	32
3.2.2.2. <i>Brucella</i> spp. İzolatlarının AMOS-PCR Yöntemi ile İdentifikasyonu	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Fenotipik Testlerle İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları.....	35
4.1.1. Süt Örnekleri	35
4.1.2. Peynir Örnekleri	35
4.1.3. AMOS-PCR sonuçları	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
6. KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

DNA	: Deoksiribonükleik asit
CO₂	: Karbondioksit
H₂S	: Hidrojen sülfür
RTD	: Rutin test dilusyonu
TMP	: Trimetoprim
SMZ	: Sülfametoksazol
Ag	: Aglütinin
AMOS-PCR	: Abortus melitensis ovis suis-Polymerase chain reaction
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
PCR	: Polymerase chain reaction
TBE	: Tris borik asit EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
MRT	: Milk Ring Test
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
OIE	: Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı
Tb	: Tbilisi
Wb	: Weybridge
BK₂	: Berkeley
Iz₁	: İzatnagar
LPS	: Lipopolisakkarid
OMP	: Outher Membran Protein

IgM	: İmmunglobulin M
Mbp	: Mega baz çifti
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
RES	: Retikuloendothelial Sistem
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Brucella</i> genusunda yer alan türler ve biyovaryaların ayırıcı özellikleri (20).....	9
Tablo 2.2. <i>Brucella</i> türleri, biyovaryaları ve konakçıları (21)	17
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan Primerler ve Beklenen Bant Büyüklükleri.....	30
Tablo 4.1. Elde edilen <i>Brucella</i> izolatlarının fenotipik test sonuçları.....	35
Tablo 4.2. Süt ve peynir örneklerinden <i>Brucella</i> spp. izolasyon ve identifikasyon sonuçları.....	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1. Brusellanın makrofaj içine girişi ve replikasyonu:** Lipid tabakadan makrofaj içine giren brusellanın etrafı membran ile çevrilerek erken ‘brusella içeren vakuol’ (BİV) oluşur. Erken BİV geçici olarak erken endozom ile etkileştikten sonra iki farklı yol izleyebilir. Virulent suşlar endositik yoldan kaçarak replikatif yolu izler ve endoplazmik retikulum ile etkileşime girerek çoğalırlar. Mutant suşlar ise endositik yolda ilerler ve lizozom tarafından parçalanırlar (44) 13
- Şekil 2.2. *Brucella* spp.’lerin insan ve hayvanlarda bulaşması, yayılımı** 16
- Resim 3.1. Ön zenginleştirmeye tabi tutulan süt ve peynir örnekleri ile Farrell agar ve broth**..... 32
- Resim 4.1. *Brucella* spp. kolonilerinin A. Farrell agar ve B. Kanlı agardaki görünümü** 36
- Resim 4.2. *Brucella* izolatlarına ait AMOS-PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez (%1.5) görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder, 1: Pozitif Kontrol *B. melitensis* (731 bp) 2: Pozitif kontrol *B. abortus* (498 bp), 3-4: *B. melitensis* (taze peynir izolatu) 5: *B. abortus* (süt izolatu), 6: Negatif kontrol, steril distile su.** 37

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Brucellozis, sığır, koyun, keçi, domuz, koç vs. gibi hayvanlarda, özellikle, testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye yol açan kronik, bulaşıcı, nekrotik ve yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır. *Brucella* cinsindeki etkenler evcil hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olurlar (1). Enfeksiyon, hayvanlardan insanlara doğrudan temas, süt ve süt ürünlerinin taze olarak tüketilmesi, enfekte damlacıkların inhalasyonu ve bazen et tüketimi ile bulaşabilen bir enfeksiyon hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerde tamamen ortadan kaldırılmakla birlikte, hayvancılığın yoğun yapıldığı, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketiminin yaygın olduğu ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (1, 2).

İnsan brusellozu, veterinerler, çiftçiler, çobanlar, hayvan bakıcıları, süt ve peynir imalathanelerinde çalışanlar, kasaplar ve mezbaha işçilerinde görülen bir meslek hastalığı olarak da tanımlanmıştır (3, 4). İnsanlarda titreme ile yükselen ateş sonrası kas ve şiddetli eklem ağrıları ile seyreden, tüm vücudu etkileyen uzun süreli sistemik bir enfeksiyon meydana getirir (2, 3, 4). İnsanlarda fiziki yetersizlik, iş gücü kaybının yanı sıra tedavi ve hastane giderleri de önemli ekonomik kayba neden olmaktadır (4).

Brucella spp., Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedirler (5).

Brusellozis, dünyada özellikle Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, Batı Asya, Afrika ve Güney Amerika'da insanlarda endemiktir (6, 7). Kuzey Avrupa, Kanada, Kuzey Amerika ülkeleri, Güney Asya, Avustralya ve Yeni Zellanda gibi ülkelerde ise büyük oranda eradike edilmiştir (8).

Ülkemizde Brusellozisle mücadele için 1984 yılında uygulanmaya başlanan "Ulusal Brucella Kontrol ve Eradikasyon Projesi"'nin (aşılama, test ve kesim) 2010 yılında tamamlanmasını takiben, 2011 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yapılan ilk değerlendirmelerde sığırlarda hastalığın sürü prevalansı %7,8 (fert prevalansı %2,7), koyunlarda sürü prevalansı %22,5 (fert prevalansı %3,4) olarak belirlenmiştir. Bu projeye sürü prevalansının %1'in altına çekilemediği ve prevalansın yüksek olduğu saptanmıştır. Ülkemizde kitlesel aşılamanın en etkili eradikasyon yöntemi olabileceği, bu aşılamanın her yaştaki hayvana güvenilir olarak uygulama yolunun ise konjunktival yolla aşılama olacağına karar verilmiştir. Proje 2012 yılının başından itibaren sığırlar için 10 yıl, koyunlar için 6 yıl süreyle uygulamaya konulmuştur. Amaç, sürü prevalansının öncelikle %1'in altına çekilmesidir (4, 9).

Ayrıca aerosol haldeki *Brucella* spp.'lerin insanlar için son derece bulaşıcı olması ve enfektif dozunun çok düşük olması sebebiyle etken biyolojik savaş amaçları için potansiyel bir ajan olarak düşünülmektedir. Silah haline getirilmiş ilk biyolojik ajan, 1954 yılında ABD tarafından biyolojik-savaş programı kapsamında, *B. suis* olmuştur. Nitekim, *Brucella* türleri Risk grubu 3 organizma olarak sınıflandırılmıştır (10, 11).

Ülkemizde süt ve süt ürünleri (beyaz peynir, tereyağı, krema, kaymak, dondurma vb.) sevilerek tüketilmektedir. Yöresel taze peynir yapımı çiğ sütün 32-35°C'lere kadar ısıtılıp ve mayalanması ile sağlanır. Peynirin bu şekilde yapılması insanlar açısından gerek damak tadı gerekse maddi açıdan (ısıtma maliyeti, peynir randımanı) tercih nedenidir. Özellikle taze peynir, tereyağı ve krema gibi ürünler pastörize edilmemiş süttten üretildiği bölgelerde insanlar için infeksiyonun kaynağını oluşturur.

Bruselloz' un tanısında direkt ve indirek yöntemler kullanılmaktadır. İndirekt tanı için çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler hızlı, pratik ve az maliyetli olmasına rağmen, dezavantajları bazı durumlarda yanlış pozitif veya negatif sonuçlar vermeleridir (10). Ayrıca bazı durumlarda kesin tanı için birden fazla testin bir arada kullanılması gerekebilmektedir. *Brucella* spp.'nin izolasyonuna dayanan kültürel yoklamalar "Altın Standart" olarak kabul edilmekte ve her zaman geçerliliğini korumaktadır.

Bu çalışmada, Kayseri ilinde pazar, market ve şarküterilerde tüketime sunulan çiğ süt ve peynir örneklerinde *Brucella* spp. varlığının konvansiyonel kültür yöntemi ve moleküler yöntemle ile araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Brusellozisin Tarihçesi

Enfeksiyon, ilk olarak Hippocrates tarafından Akdeniz kıyılarında yaşayan insanlarda görülen semptomlarla ilgili olarak “humma” olarak tanımlanmıştır (12). 1800’lü yıllarda “Akdeniz humması”, “Malta humması”, “Gibraltar humması” ve “Kırım humması” gibi isimler almıştır. İngiliz askeri literatüründe “Kolordu Hastalığı” (Corps Disease) olarak ta isimlendirilmiştir (13, 14). Bunun yanı sıra klinik seyirdeki tipik ateşe göre “dalgalı humma (undulant fever)”, *B. melitensis*’in koyunlardan insanlara bulaşması nedeniyle “koyun hastalığı”, hastalığın hayvanlardan insanlara bulaşması nedeniyle de halk arasında “mal hastalığı” gibi isimler de alır (12, 14,15).

Hastalığın ilk bildirimi 1861 yılında Malta’da, İngiliz Ordusu’nda yardımcı cerrah olan J.A. Marston tarafından yapılmış ve Malta ateşi olarak adlandırılmıştır (13). Malta ateşinin kaynağını araştıran İngiliz ordusu hekimlerinden David Bruce, 1887 yılında hastalıktan ölmüş İngiliz askerlerinin dalak pulpalarından çok küçük kok şeklinde bakteriler izole etmiş ve bu bakterileri “*Micrococcus mellitensis*” olarak adlandırmıştır (13, 14). Danimarkalı veteriner hekim Bernard Laurits Fredrick Bang, 1897 yılında sığırlarda abortun nedeni olarak “*Bacillus abortus*” olarak tanımlanan ve üremeleri için CO₂’e gereksinim gösteren hücre içi bir mikroorganizmayı tespit etmiş ve oluşan enfeksiyonu 'Bang's Hastalığı' olarak isimlendirmiştir (1, 13, 16).

Malta Ateşi’nin etkeni “*Micrococcus melitensis*”, Bang's Hastalığı’nın etkeni ise ‘*Bacillus abortus*’ olarak tanımlanmış, iki hastalığın ilişkili olduğu o dönem için düşünülmemiştir. Yaklaşık 18 yıl sonra Zammit adlı araştırmacı 1905 yılında etkeni infekte keçi sütünden izole etmiş ve enfeksiyonun kaynağının keçi sütü olduğunu bildirmiştir (13). Amerikan mikrobiyolog Alice Evans 1918’de *Bacillus abortus* ile *Micrococcus melitensis*’in morfolojik ve biyokimyasal olarak yakın ilişkili olduklarını bildirmiştir. (14, 17). Traum adlı araştırmacı, 1914 yılında ABD’de prematüre doğan

domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden etkeni izole etmiş etkenin *B. abortus*'a benzerliğini belirtmiştir, ancak daha sonra bu etkenin *Brucella suis* olduğu belirlenmiştir. Meyer ve Shaw, 1920 yılında birbirine çok benzeyen bu üç etkenin, bu konuda ilk önemli çalışmayı yapan David Bruce'un onuruna ithafen *Brucella* genusu altında yeniden klasifiye edilmesini önermişlerdir (13,14).

Diğer *Brucella* türleri ise 1950'den sonra tanımlanmıştır. Simmons ve Hall, Avustralya'da, Buddle and Boyes ise Yeni Zelanda'da koçlarda epididimitisin etkeni olarak *B. ovis*'i izole etmişlerdir. (18). *Brucella canis* köpeklerin bulaşıcı abortus etkeni olarak Charmichael ve Brunner isimli araştırmacılar tarafından 1967 yılında izole ve identifiye edilmiştir (13, 19). *Brucella neotomae* ismi verilen *Brucella* türü ABD'nin Utah eyaletinde orman ratlarından izole edilmiştir (13, 14). Son yıllarda pek çok yeni *Brucella* türünün (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* ve *B. inopinata*) farklı kaynaklardan izole edildiği bildirilmiştir (20, 21).

Türkiye'de Malta ateşi ilk olarak 1915 yılında bildirilmiştir. İlk bruselloz hastası 1915 yılında İstanbul'da Kuleli Hastanesinde, Dr. Hüsamettin Kural ile Dr. Mahmut Sabit Akalın tarafından İstanbul Boğazı Muhafız erlerinden birinde tespit edildiği, kayıtlara girmiştir. İstanbul'da sığırlarda laboratuvar analizi ile brusellozu 1931 yılında ilk ortaya koyan Zühtü Berke olmuştur. Gölem tarafından 1943 yılında koyun ve keçilerde *Brucella* bakterileri izole edilmiştir. Bandırma'da merinos çiftliğinde 1944'te Köylüoğlu ve Aktan tarafından *Brucella mellitensis* saptanmıştır. Ankara'da ise insan ve sığırlarda brusella enfeksiyonunu ilk ortaya koyan Süreyya Tahsin Aygün olduğu belirtilmektedir (1, 13). *Brucella canis* enfeksiyonu ise ülkemizde serolojik olarak ilk defa 1984 yılında Diker, İstanbulluoğlu ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırma ile insanlarda *Brucella canis* enfeksiyonu Türkiye'de ilk kez bildirilmiştir (22).

2.2. *Brucella* Türlerinin Taksonomisi

Brucella türleri, "Rhizobiales" takımındaki Brucellaceae ailesinde Proteobacteria alfa 2 alt grubunda sınıflandırılır (23, 24). Brucellaceae ailesi *Brucella*, *Mycoplana* ve *Ochrobactrum* genuslarını içermektedir. Bu genus toprak organizmaları (örneğin *Ochrobactrum* spp.), bitki simbiyontları (örneğin *Rhizobium* spp.) ve fitopatojenler (örneğin *Agrobacterium* spp.) ile yakından ilişkilidir (15, 20). Bununla birlikte, son yıllarda bu aile içerisine katılan *Pseudochrobactrum*, *Daeguia* ve *Crabtreeella* genusları ile de yakın ilişkili olduğu saptanmıştır. *Brucella* cinsinin, bu genuslar içerisinde

genellikle çevreden izole edilen *Ochrobactrum* cinsi ile fenotipik ve genetik olarak çok daha yakın oldukları bildirilmiştir (20).

Brucella türleri, retikuloendotelial sistemin fakültatif intraselüler parazittir. *Brucella* genomu %57 G+C içeriğine sahip 2,1Mb ve 1,5 Mb iki adet kromozom içerir. *B. suis* biyovar 3 ise istisna olarak tek bir 3,1 Mb kromozoma sahiptir (23, 24, 25).

Bununla birlikte, konak spesifitesi, fenotipik özellikler, virulens çeşitliliği ve genotiplendirme verileri temelinde, *Brucella* genusunda *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis* ve *B.neotomae* olmak üzere 6 tür ve bu türlere ait 17 biyovarin klasik taksonomik planı, 2003 yılında onaylanmıştır (20, 25, 26). DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları; bilinen 6 *Brucella* türü arasında %90'dan fazla benzerliği ortaya koymaktadır (20, 23).

Son yıllarda çeşitli kaynaklardan izole edilen *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* ve *B. inopinata* gibi yeni tanımlanan türlerle beraber *Brucella* cinsinde yer alan tür sayısı 10'a ulaşmıştır (20, 21).

Fok (*Phoca vitulina*), yunuslar (*Tursiops truncates*, *Delphinus delphis*, *Lagenorhynchus acutus*, *Stenella coeruleoalba*), balina (*Balaenoptera acutorostrata*) ve diğer türler dahil çeşitli deniz memeli türlerinden de *Brucella* etkenleri izole edilmiştir (27). İlk olarak 1994 yılında İskoçya'da sığ su fokundan izole edilen *Brucella* etkeni, *B. maris* olarak adlandırılmış ve nomenklatüre eklenmiştir. Deniz memelilerinden izole edilen bu türler kara hayvanlarından izole edilen *Brucella* türlerinden fenotipik ve moleküler olarak farklılık göstermektedirler. *B. maris*, başlangıçta, tüm deniz memelilerine özgü bir suş olarak düşünülmüş ancak konakçı özgünlüğüne dayalı olarak iki veya daha fazla biyovara ayrıldığı bildirilmiştir. Son araştırmalara göre ise *B. maris*'in, iki tür içerdiği bildirilmiştir (28, 29).

Bunlar; *B. pinnipedia*, ayıbalığı, fok ve su samuru ve denizaslanı gibi yüzgeç ayaklılarda izole edilen türler olarak, *B. cetaceae* yunus, balina gibi deniz memelilerinden izole edilen türler olarak sınıflandırılmıştır (28, 29).

2008 yılında tarla farelerinde (*Microtus arvalis*) yeni bir tür olarak *B. microti* izole edilmiştir. (20, 21). Brusellozis semptomları görülen 71 yaşında yaşlı bir kadının meme implantından yeni bir *Brucella* türü izole edilmiştir (30). Bu tür *Brucella inopinata* olarak isimlendirilmiş olup, olarak konakçısı bilinmeyen (hayvan) tek türdür (21). Son

olarak 2014 yılında Whatmore ve ark yeni doğmuş 2 maymundan yeni bir *Brucella* türü izole etmişler ve tür adını *Brucella papii* sp. nov. olarak isimlendirildiğini bildirmişlerdir (31), aynı araştırmacı 2015 yılında ise beyaz bir ağaç kurbağasından (*Litoria caerulea*), atipik *Brucella* türü izole ettiğini bildirmiştir (32).

Brucella spp, bireylerde kronik enfeksiyon oluşturabilme ve belirli hayvan türlerine ait popülasyonlarda bulaşma bakımından güçlü bir konakçı tercihinine sahiptir. *B. abortus*'un ana konakçısı sığırdır; *B. melitensis*, koyun ve keçiler; *B. suis*, domuz; *B. canis*, köpekler; *B. ovis*, koyunlar; *B. neotomae*, kemirgenler (çöl fare) ve *B. suis*, domuza ek olarak ren geyiği ve tavşanlarda enfeksiyona neden olur. *B. suis*, konak-patojen ilişkileri ile en geniş konakçı yelpazesine sahiptir. Bununla birlikte, hemen hemen tüm *Brucella* türleri, tercih edilen konakçıları dışındaki memeli türlerinde enfeksiyona neden olabilir. Örneğin hem *B. melitensis* hem de *B. suis* sığır memelerinde kolonize olabilir ve bu nedenle inek sütünde saptanabilmektedirler (20, 21, 26, 27).

Her bir *Brucella* türünün de biyokimyasal ve fizyolojik özellikleriyle birbirlerinden ayrılabilen çeşitli biyotipleri vardır. *B. melitensis*'in 3 biyotipi, *B. abortus*'un 7 biyotipi, *B. suis*'in 5 biyotipi ve diğer türlerin ise birer biyotipleri vardır (10, 20).

Dünyada insanlarda görülen çok şiddetli *Brucella* enfeksiyonlarından genellikle *B. melitensis*, *B. abortus*, ve *B. suis* izole ve identifiye edilmiştir. *B. canis* insanlarda daha az oranda enfeksiyon oluştururken *B. ovis* ve *B. neotomae* insanlar için patojen değildir (15, 20, 27). Marine *Brucella* türleri insanlarda nörolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır (27, 29).

2.3. *Brucella* Türlerinin Morfolojisi

Brucella cinsi bakteriler; küçük ($0.5-0.7 \times 0.6-1.5 \mu\text{m}$), kok, kokobasil veya kısa basil şeklindedirler. Çoğunlukla ikişerli uç uca olan bu bakteriler bazen sıvı besiyerinde 3-5'li zincirler yapabilirler. Aerobiktirler, anaerob ortamlarda üreyemezler. *B. abortus* biyovar 1,2,3,4 ve *B. ovis* gibi bazı türler ilk izolasyonda üreme koşulları için %5-10 CO₂'ye ihtiyaç duyarlar (10, 24).

Gram negatif, flagellasız, sporsuz ve hareketsiz olan bu bakteriler (20, 24) küçük olduklarından moleküler hareket nedeniyle yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Organizmadan yeni ayrıldıklarında S tipi kolonilerde ince bir kapsüllerinin bulunduğu

saptanır. Pasajlarda ve R koloni şekillerinde bu kapsüller kaybolur. Basil şeklinde olanlar bazen düzensiz boyanma özelliği gösterirler (1, 33).

2.4. *Brucella* Türlerinin Kültür Özellikleri

Brucella türlerinin çoğu ilk izolasyonlarında besiyerinde yavaş ürerler. Laboratuvara adapte izolatlar nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzlarını içeren sentetik besiyerlerinde üremesine karşın çoğu *Brucella* türü, üreme için kan, serum veya doku ekstraktlarının eklendiği zengin kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyar (34). *Brucella* spp. özellikle ilk izolasyonda, çoklu amino asitler, tiyamin, biyotin, nikotinamid ve pantotenik asit içeren kompleks ortamlar gerektirir. Bununla birlikte, haemin (X faktörü) ve nikotinamid adenin dinükleotidi (V faktörü) gerekmemektedir (35). Ayrıca üreme için demir ve manganez içeren iz metalleri de gereklidir. Demir, sekestrasyonda kullanılan siderefor ve depolama görevi olan bakterioferritin için gereklidir (35). Çoğu *Brucella* türleri protein ve pepton içeren besiyerlerinde üremesi sırasında alkali ortamın oluşmasını sağlar. Oluşan alkali ortam bakterinin üremesini sınırlandırmasının yanı sıra eski kültürlerde kolonilerin etrafının yeşilimsi kahverengi renk almasını da sağlar. (34).

Optimal üreme sıcaklıkları 37 °C (20-40 °C arasında üreyebilirler) ve optimal pH 6.6-7.4 arasındadır. pH'nın 3.5 ve altına düştüğü durumlarda etken hızlıca ölür. Serum dekstroza agar veya diğer besiyerlerinde ekimden 48-72 saat sonra koloniler oluştururlar. Koloniler yuvarlak, küçük, saydam, konveks, şebnem tanesine benzeyen kaygan ve S tipindedir ancak LPS'nin O zincirlerinin kaybedilmesi ile koloniler disoasiyona uğrar, rough (R) ya da mukoid varyantlar oluşabilir. İlk izolasyonlarında *B. ovis* ve *B. canis*, R koloni oluştururlar (10, 36).

Brucella kolonileri nonhemolitik ve pigmentsizdir. *B. abortus* ve *B. melitensis*'in bazı türlerinin kolonileri eski kültürlerinde esmer renklidir (37). Üremesi için karbondioksit ihtiyacı duyan *B. abortus* ve *B. ovis* yarı katı besiyerinde yüzeyin birkaç milimetre altında disk oluşturacak şekilde ürer. Diğer türler ise yarı katı besiyerinin yüzeyinden dibine kadar homojen bulanıklık oluşturacak şekilde ürer (34).

2.5. *Brucella* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Brucella spp.'nin metabolizması oksidatif ve enerji çeşitli amino asit ve karbonhidrat substratlarının kullanılmasıyla üretilir. Birçok suş için D-eritritol tercih edilen bir enerji kaynağıdır. Tüm suşlar katalaz pozitif ve birçoğu oksidaz pozitif (oksidaz negatif

olan suşlar da bildirilmiştir). Çoğu aynı zamanda nitrat redüktaz üreterek nitratları nitritlere indirgerler. Kükürt içeren amino asitlerden H_2S üretimi, türler ve biyovarlar arasında değişir identifikasyonda önemlidir (10, 23, 24, 37). H_2S üretimi, *B.suis* 3-5 gün ve en fazla miktarda, *B.abortus* 2 gün ve az miktarda; *B.melitensis* ise en 1 gün süreyle ve en az miktarda gerçekleştirilir (38).

Karbonhidratlardan asit veya gaz oluşturmamakla beraber glikozu az miktarda kullanırlar. O- nitrofenol-B-D-galaktoz genellikle hidrolize edilmez. Proteolitik aktivite azdır. Sitrat tek karbon kaynağı değildir. Asit jelatini eritmezler ve indol oluşturmazlar. Asetil metil karbinol (Voges Proskauer) oluşturmazlar. Metil kırmızısı testi negatiftir. Üreaz aktivitesi değişken olup *B. suis* ve *B. canis* yüksek üreaz aktivitesine sahip olmasına karşın diğer türlerin bazılarında üreaz aktivitesi zayıftır. *B. ovis*'te ise üreaz aktivitesi yoktur. (24, 34)

Brucella spp.'nin identifikasyonunda ve biyotiplendirilmesinde fajlar sıklıkla kullanılmaktadır. S koloni oluşturan türleri için kullanılan fajlar, Tb (Tbilisi), Wb (Weybridge), BK₂ (Berkeley) ve Iz₁ (İzmitnagar) iken rough koloni oluşturan türler için R, R/O, R/C ve Iz₁ fajları kullanılır. Doğru biyotiplendirmenin yapılabilmesi için uygun fajların kullanılması gereklidir (35).

Biyokimyasal özellikleri, boya maddelerinin üremeleri üzerindeki etkileri antijen yapıları ve faj duyarlılıkları temel alınarak *Brucella* türlerinin biyovarları belirlenir (39).

Tablo 2.1. *Brucella* genusunda yer alan türler ve biyovaryların ayırıcı özellikleri (20)

Türler	Biovar	Üreaz	CO ₂ ihtiyacı	H ₂ S üretimi	Boyalı Besiyerinde Üreme		Monospesifik antiserum ile aglütinasyon			Rutin Test Dilusyonunda Faj ile lizis					
					Thionin ^a	Fuchsin ^a	A	M	R	Tb	Wb	Bk ₂	Fi	R/C	Tbx10 ⁴
<i>B. abortus</i>	1	(+) ^b	(+)	+	-	+	+	-	-	L	L	L	L	NL	L
	2	+	(+)	+	-	-	+	-	-	L	L	L	L	NL	L
	3 ^c	+	(+)	+	+	+ ^d	+	-	-	L	L	L	L	NL	L
	4	+	(+)	+	-	+	-	+	-	L	L	L	L	NL	L
	5	+	-	-	+	+	-	+	-	L	L	L	L	NL	L
	6 ^c	+	-	(+)	+	+	+	-	-	L	L	L	L	NL	L
	7	+	-	(+)	+	+	+	+	-	L	L	L	L	NL	L
	9	+	-	+	+	+	-	+	-	L	L	L	L	NL	L
<i>B. suis</i>	1	+	-	+	+	- ^e	+	-	-	NL	L	L	PL	NL	L
	2	+	-	-	+	-	+	-	-	NL	L	L	PL	NL	L
	3	+	-	-	+	+	+	-	-	NL	L	L	PL	NL	L
	4	+	-	-	+	(-)	+	+	-	NL	L	L	PL-L	NL	L
	5	+	-	-	+	-	-	+	-	NL	L	L	PL	NL	L
<i>B. melitensis</i>	1	+	-	-	+	+	-	+	-	NL	NL	L	NL	NL	NL
	2	+	-	-	+	+	+	-	-	NL	NL	L	NL	NL	NL
	3	+	-	-	+	+	+	+	-	NL	NL	L	NL	NL	NL
<i>B. ovis</i>		-	+	-	+	(+)	-	-	+	NL	NL	NL	NL	L	NL
<i>B. canis</i>		+	-	-	+	-	-	-	+	NL	NL	NL	NL	L	NL
<i>B. neotomae</i>		+	-	+	-	-	+	-	-	NL-PL	L	L	L	NL	L
Yeni Tanımlanan Türler															
<i>B. ceti</i>		+	(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	NL ^a	L ^β	L ^β	NL-PL	NL	
<i>B. pinnipedialis</i>		+	(+)	-	+	+	(+)	(-)	-	NL ^a	L ^β	L ^β	NL-PL	NL	
<i>B. microti</i>		+	-	-	+	+	-	+		NL	L		NL		L
<i>B. inopinata</i>		+	-	+	+	+	-	+ ^f		NL			NL		PL

Faj lizis: RTD= Rutin Test Dilusyonu, Tb= Tbilisi, Wb= Weybridge, Bk₂= Berkeley, Fi= Firenze, R/C= Rough suşlar, Tbx10⁴= RTDx10⁴,

L= confluent lizis, PL= parçalı lizis, NL= lizis yok, α= çoğu suşda lizis yok, β= çoğu suşda lizis, (+)= çoğu suş pozitif, (-)= çoğu suş negatif

^a konsantrasyon=1/50.000 w/v, ^b negatif olmasına rağmen çoğu suş pozitif, ^cBiyotip 3 ve 6'nın daha belirgin olarak farklılaşması için ek olarak 1/25 000 (w / v) tiyonin kullanılır.

Biovar 3 = +, biovar 6, ^d Bu biyotipin bazı suşları fuksin tarafından inhibe edilir. ^e Bazı izolatlar fuksine direnç gösterebilir. ^f zayıf aglütinasyon

2.6. *Brucella* Türlerinin Antijenik Özellikleri

Brucella hücre zarı 3 katmandan oluşur; en içteki tabaka sitoplazmik zar, ara tabaka, periferik sitoplazmik zar ve en dıştaki katman dış zardır. Dış zar, lipopolisakarid, protein ve fosfolipid tabakadan oluşur ve hücre duvarını oluşturmak için peptidoglikan tabakasına sıkıca bağlıdır. *Brucella*, lipopolisakarid yapısında (LPS) O-zincirinin varlığına veya yokluğuna göre smooth (S) ve rough (R) koloni oluşturma özelliği bakımından 2'ye ayrılır (40).

LPS'nin hidrofilik kısmı O-zincir antijenini içerir (yalnızca smooth *Brucella*'da bulunur). *B. abortus* biovar 1 gibi türler A epitopunu (96 ila 100 glikosil altbirimi boyutunda dallanmamış bir homopolimer 1,2-bağlı 4,6-dideoksi-4-formamido-D-mannopiranozun, perosamin) taşıırken M epitopunu taşıyan *Brucella* hücrelerinde (*B. melitensis* biovar 1 gibi) O-antijeni, dört 1,2 ve bir 1,3-bağlı perosamin kalıntısından oluşan doğrusal bir pentasakkarit birimi içerir. *Brucella* türlerinin S suşlarında yer alan perosamin homopolimer O zinciri, ayırt edici LPS yapısını oluşturup, *Brucella*'nın tanımlayıcı bir özelliğidir (36).

Dış zardaki protein dış zar proteinleri (OMP, outer membran protein) olarak adlandırılır. *Brucella* OMP'leri, *Brucella*'nın makrofajlarda hayatta kalması ile ilişkili olup çok kuvvetli antijenik özelliğe sahiptir. *Brucella* OMP'lerinin üç ailesi tespit edilmiştir: OMP2 ailesi, OMP25/OMP31 ailesi ve bu ikisinin dışında bulunan tüm OMP'leri kapsar. İlk 2 aile yaygın olarak incelenmiş ve başlıca *Brucella* virulensi ile ilgili koruyucu antikorlar ve antijenleri içermektedir. Bu OMP'ler üzerinde yapılan araştırmalar, *Brucella* antijenlerinin; T hücreleri aracılığı ile makrofajların canlılığını uyaran ve önleyen mekanizmayı ortaya çıkararak güvenli ve etkili *Brucella* aşılarının geliştirilebilmesine katkı sağlayacağı bildirilmiştir (40).

İki önemli *Brucella* türü için; 1932'de, *B. abortus* (A dominant) ile ilişkili A antijeni ve *B. melitensis* (M dominant) ile ilişkili M antijeni olmak üzere iki farklı antijen tespit edildi. Daha sonra, *Brucella*'nın iki türünde de A ve M epitoplarının, S-LPS'nin O yan zincir polisakariti üzerinde yer aldığı gösterilmiştir. Ayrıca O-zincirindeki A ve M epitoplarının miktarları farklıdır (10, 35).

Bu epitoplar R koloni oluşturan (O-polisakkarit bulunmayan) türlerde yoktur. S-LPS, immünodominant epitopdur ve brüseloz için serolojik testlerin çoğunda kullanılan antijendir. S-LPS'nin yapısı, serolojik testlerde benzer 0 zincirine sahip diğer bakteriler (*Francisella tularensis*, *Escherichia coli* 0:157, *Xanthomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica* 0:9) ile çapraz reaksiyonların oluşmasına neden olmaktadır (10, 35).

Bazı suşlarda ayrıca yüzeyel L zarf antijeni varlığı ortaya konmuştur. Daha çok *B. abortus* türünde bulunan bu L antijeni yeni izole edilen bakterilerde var olup, onların immün serumlarla aglütinasyonuna engel olmakta, 100°C'de yarım saat ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadır. Bu özelliği ile *Salmonella*'lardaki Vi antijenine benzerlik göstermektedir (37).

Brucella türlerinin tanımlanmış bir ekzotoksini yoktur, endotoksini de diğer gram negatif bakterilerin endotoksinleri kadar toksik değildir. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkarid (LPS) tabakanın endotoksin aktivitesi bulunur. Özellikle LPS tabakada yer alan O polisakkarid zinciri bakteri virulansında önemli yer tutar. Enterobakterlerden çok daha zayıf toksik olmakla birlikte makrofaj degradasyonuna ve bağışık yanıtı direnci çok daha kuvvetli özelliktedir. O zinciri üzerinde bulunan üç epitop (A, M ve C) tür/biyovara bağlı olarak farklılık gösterir (24).

Brucella etkenleri, insan vücuduna girdikten kısa bir süre sonra, polimorfonükleer lökositler ve aktive makrofajlar etkenin olduğu bölgeye göç eder. Humoral (kompleman aracılıklı) ve hücre aracılı immün yanıtlar, *Brucella* organizmalarının ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. *Brucella* aslında hücrel patojendir, etkenin ortadan kaldırılmasında ve hücrel immün yanıt büyük rol oynamaktadır. Bakteriyel invazyonun erken safhasında, bakterinin ekstraselüler eliminasyonu, komplement ve immünglobulin M (IgM) tarafından gerçekleştirilir. *Brucella* bakterileri, başlangıçta IgM olan spesifik antikorların üretimini indükleyebilen antijenlere sahiptir, birkaç gün sonra IgG ve IgA antikorları saptanabilir (35).

2.7. *Brucella* Türlerinin Genomik Özellikleri

Tüm *Brucella* türlerinde replikasyon ve metabolik fonksiyonlar için temel genlerin bulunduğu 2.1 ve 1.2 mega baz çifti (Mbp) boyutunda iki sirküler kromozom vardır.

DNA daki Guanin/Sitozin (G+C) oranı *Brucella* türlerinde oldukça (%55-58) yakındır (41).

DNA-DNA hibridizasyonu, *Brucella*'nın bilinen türleri arasında ayırt edilemediğini göstermesine rağmen, kromozomal DNA'nın (restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası) elektroforetik analizinde, türler arasında belirgin farklılıklar olduğu saptanmıştır. Genom haritası ile bu farklılıklar belirlenmiştir. *Brucella* için ortalama genom boyutu yaklaşık 3.5×10^6 baz çiftidir. Kromozom boyutunda ve düzenindeki küçük varyasyonlar, türler ve biyovarlar arasında büyük oranda delesyonlar, eklemeler ve ters dönüşümlerle ilgilidir. Bu farklılıklar, türler ve biyovarlar için tutarlıdır. *Brucella suis* biovar 3; 3.2×10^6 baz çiftli tek bir geniş kromozom içerir. *Brucella*'lar arasında genetik değişimin tespit edilememesinin sebebi, bakteride korunan hücre içi bir yapının var olması ile açıklanmaktadır. Bu bilgiye dayanarak *brucella* içinde plasmid veya lizojenik faj eksikliği de bildirilmiştir (42).

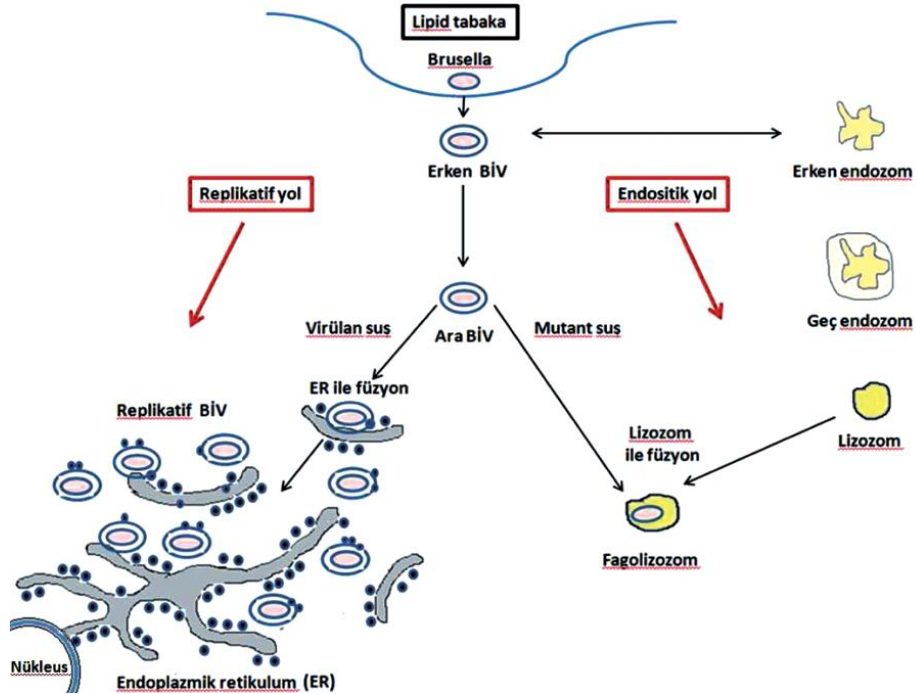
Laboratuvar çalışmalarında, *Brucella*'da ekstra kromozomal DNA tespit edilememiştir. Ancak son yapılan çalışmalarda birçok suşta küçük bir plazmitin çoklu kopyaları saptanmış, işlevi belirlenememiştir. *Brucella* izolatlarında plasmid ile kodlanmış antibiyotik direnci henüz bildirilmemiştir. Bununla birlikte, plazmidlerle doğal olarak *B. abortus*'a direnç aktarımı gözlenmemesine rağmen deneysel koşullar altında *Escherichia coli*'den elde edilen plazmidlerle antibiyotik direnç aktarımı sağlanmıştır (35).

2.8. *Brucella* Türlerinin Patojenitesi

Brucella güçlü doku tropizmi gösterir ve makrofajların, dendritik hücrelerin ve plasental trofoblastların vakuelleri içinde replike olur. Bununla birlikte, patojen mikrogliya, fibroblastlar, epitel hücreleri ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli memeli hücre tiplerinde çoğalma kabiliyetine sahiptir. *Brucella*'nın hücre içi yaşamı doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtlarına maruz kalmayı sınırlar, etkeni bazı antibiyotiklerin etkilerinden kurtarır (43). Virulent suşlarda fagozom-lizozom füzyonunu engelleyen spesifik mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte, *brucella* virulans faktörleri arasında yer alan iki komponentli BvrR/BvrS sistemi ve virB tip IV sekresyon sisteminin fagozom-lizozom füzyonunu engellediği gösterilmiştir (44). Fagozomun asidifikasyonu, VirB tip IV

salgılama sistemi de dahil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerinin ekspresyonunu uyarır.

VirB sistemi, efektör proteinleri konakçı hücre içine yer değiştirir ve bu yer değiştirmenin de hücre içi çoğalma için konakçı hücre biyolojisini uyardığı bildirilmektedir. Ayrıca *brucella*, *legionella* da dahil olmak üzere diğer bazı hücre içi patojenler tarafından kullanılan bir taktik olarak endoplazmik retikülümün çıkış yerlerinde membran vesiküllerini yakalayarak, çoğaltma vakuolünü oluşturur (15). Tipik etkenin enfekte konakçılardaki patolojisinde üç farklı aşama görülür. Birinci aşamada, klinik semptomlar görülmeden önce inkubasyon periyodu belirgindir. İkinci aşamada, patojenin konakçı dokusunu istila edip yayılması ile akut faz gelişir. Üçüncü aşamada, ise ciddi organ hasarı ve konakçı hücrenin ölümüyle kronik faz oluşur (43). Bütün bu mekanizmalara rağmen, makrofajlar *brucella* bakterilerini öldürmede etkili olabilmektedir. Makrofajlara giren virulent *B. abortus* suşlarının ilk birkaç saatte %80-90'ı öldürülmekte, kalan dirençli bakteriler ise makrofaj içinde yaşamaya devam etmektedir (44).



Şekil 2.1. Brusellanın makrofaj içine girişi ve replikasyonu: Lipid tabakadan makrofaj içine giren brusellanın etrafı membran ile çevrilerek erken 'brusella içeren vakuol' (BİV) oluşur. Erken BİV geçici olarak erken endozom ile etkileştikten sonra iki farklı yol izleyebilir. Virulent suşlar endositik yoldan kaçarak replikatif yolu izler ve endoplazmik retikulum ile etkileşime girerek çoğalırlar. Mutant suşlar ise endositik yolda ilerler ve lizozom tarafından parçalanırlar (44)

2.9. Brusellozisin Epidemiyolojisi

Brusellozis, dünyanın pek çok yerinde yaygın zoonotik bir hastalıktır. Özellikle Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, Arap Yarımadası, Orta ve Güney Amerika, Asya ve Afrika'da yaygındır. Dünyada resmi olarak brusellozun eradike edildiği sadece 17 ülke vardır, ancak seyahat nedeniyle insanlar arasında endemik ülkelerde bile vakalar yaşanmaktadır. Endemik bölgelerde hastalık, cinsiyet farkı gözetmeksizin tüm yaş gruplarını etkilemektedir (35). Türkiye’de Brusellozis, eradike edilememiş ve halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. İnsan brusellozunun her vakası hayvansal kökenlidir ve bu nedenle hastalığın kontrolü öncelikle veteriner sahada sağlanmalıdır (15).

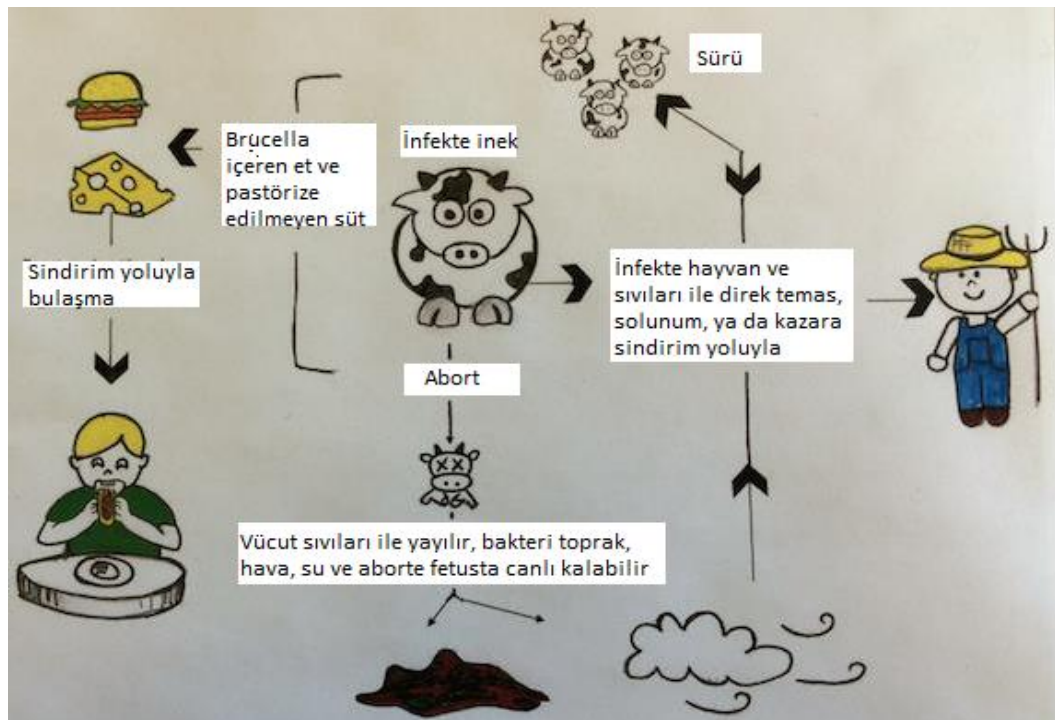
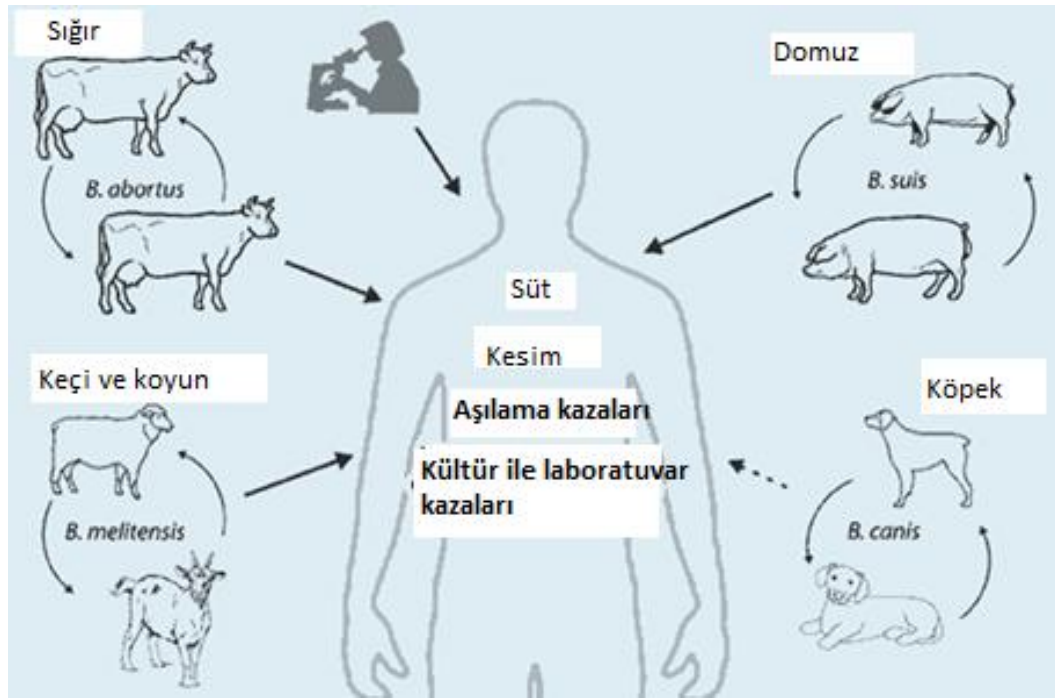
Brusellaların türlerine göre epidemiyolojileri ve hastalık yapma potansiyelleri farklıdır. *Brucella melitensis*, keçi, koyun ve deve; *B. abortus* sığır; *B. suis* domuz ve *B. canis* köpekte infeksiyon oluşturmalarının yanı sıra, bu dört *Brucella* türü insan brusellozisinin etiyolojisinde rol oynarlar. *B. melitensis* insan brusellozunun en yaygın, invaziv ve patojenik nedenidir. Bu türü sırası ile *B. suis* ve *B. abortus* takip etmektedir. Bu üç tür aynı zamanda CDC’nin potansiyel biyolojik silahlar listesinde de yer almaktadır (45). *B. canis* ise insanlarda çok nadirdir (10).

Hastalığın inkübasyon periyodu gebelik, maruz kalınan mikroorganizma sayısı, yaş gibi faktörlerden etkilenmekle birlikte, deneysel araştırmalarla 53-251 gün arasında bildirilmiştir. Etkenin yayılımı temel olarak enfekte ineklerin yavru atımı veya doğumu sonrası enfekte fötüs, fötal membranlar, uterus salgıları ve sütleri aracılığıyla olmaktadır. Sütle saçılım aralıklı olarak uzun süre devam eder. Evcil hayvanlarda bulaşma sindirim sistemi, çiftleşme, memelerin kontaminasyonu, deri ve konjunktivaların direkt teması sonucu oluşur. Son yıllarda *Brucella* vektör ve rezervuarları üzerinde yürütülen araştırmalar değişik familyalara bağlı vahşi hayvanlar, artropodlar, kemiriciler ve etçillerin hastalığın yayılmasında rol oynadığını ortaya koymuştur (41).

Brusellozis insanlara, enfekte hayvanlardan, enfekte hayvanların sütleri, bu sütlerden hazırlanan krema, tereyağ, taze peynir, dondurma gibi ürünlerden ve bu hayvanların atık materyallerinden bulaşmaktadır. İnsana bulaşma, enfekte hayvanların pastörize edilmeyen ürünlerinin tüketilmesi, enfekte hayvanlarla direkt temas ya da sekresyonlarına deri yolu ya da konjunktival yolla temas yolları ile olur.

Süt, bruselloz bulaşımından temel sorumlu besindir. Bunun dışında farklı taze peynir ürünleri özellikle keçi ve koyun peynirleri bulaşmadan ikinci sorumlu besinlerdir. Brusella bakterileri bu ürünlerde 20 gün ile 3 ay arasında değişen sürelerde yaşayabilmektedir. Et ürünleri bruselloz için çok nadiren kaynak oluşturlar. Bu durumun çiğ et tüketim oranlarının düşük olmasının yanında kas dokusu içindeki mikroorganizma sayısının çok düşük olması ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (21, 46).

Çiftçi, veteriner, laboratuvar çalışanları, et ve süt endüstrisinde çalışanlar gibi risk grubunda yer alan insanlarda meslek hastalığı olarak da gözlenmektedir (3). Enfeksiyonun kişiden kişiye bulaşması ile ilgili vakalar bildirilmiştir (47) ancak çok nadirdir. İnsanlarda Brusellozis, enfekte sıvıların aerosol inhalasyonu ile solunum mukozasından etkenin girmesine bağlı olarak da gelişebilir. Laboratuvar kaynaklı olarak, çalışanlarda enfeksiyon bildirilmiştir (48). Laboratuvarda kültürlerin koklanması, açık alanda çalışma, eldiven, maske ve gözlük gibi koruyucu ekipman kullanılmaması veya ağızdan pipetleme sırasında canlı brucella süspansiyonlarının ağza alınması gibi nedenlerle etkene maruz kalınabilmektedir (49). Laboratuvarla ilişkili enfeksiyonlar, bildirilen bruselloz vakalarının % 2'sini oluşturmaktadır Bu veri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında brusella enfeksiyonu alma riskinin yüksek olduğunu göstermektedir. Etkene kazara mazur kalma durumunda çalışanların bulunduğu yere ve bakteri miktarına bağlı olarak enfeksiyon oranının % 30 ila % 100 arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir (48). Ayrıca hayvanların aşılması ya da sağaltımı sırasında bulaşma oluşabilmektedir (3).



Şekil 2.2. *Brucella* spp.'lerin insan ve hayvanlarda bulaşması, yayılımı

Tablo 2.2. *Brucella* türleri, biyovarları ve konakçıları (21)

<i>Brucella</i> Türleri	Biyovarları	Rezervuar	İnsan için patojenitesi
<i>B. melitensis</i>	1–3	Keçi, Koyun	Yüksek
<i>B. abortus</i>	1–6, 9	Sığır	Yüksek
<i>B. suis</i>	1–3	Domuz	Yüksek
	2	Yaban domuzu, tavşan	Yok ^a
	4	ren geyiği	Yüksek
	5	kemirgenler	Yok
<i>B. neotomae</i>	-	Çöl faresi	Yok
<i>B. ovis</i>	-	Koç	Yok
<i>B. canis</i>	-	Köpek	Orta
<i>B. ceti</i>	-	Su memelileri	Bilinmiyor ^b
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Yüzgeç ayaklılar	Bilinmiyor ^b
<i>B. microti</i>	-	Çöl faresi, tilki	Bilinmiyor
<i>B. inopinata</i>	-	Bilinmiyor	Yüksek

^a Fransa’da immün sistemi baskılanmış bir avcıda *B. suis* biyovar 2 enfeksiyonu bildirilmiştir

^b Etkenin İngiltere’de bir insanda laboratuvar kontaminasyonu bildirilmiştir. Enfeksiyonun hangi deniz memelisinden kaynaklandığı tespit edilemese de iki doğal kazanılmış vaka bildirilmiştir.

2.10. *Brucella* Türlerinin Direnç Özellikleri

Brucella türleri, hipoklorit çözeltileri, %70 etanol, izopropanol, iyodoforlar, fenolik dezenfektanlar, formaldehit, glutaraldehit ve ksilen gibi en yaygın olarak bulunan dezenfektanlar tarafından kolayca öldürülür. Bununla birlikte, organik madde ve düşük sıcaklıklar dezenfektanların etkinliğini azaltır. *Brucella*’yı kontamine yüzeylerde yok ettiği bildirilen dezenfektanlar arasında %2.5 sodyum hipoklorit, kuaterner amonyum bileşikleri,% 2-3 sodyum hidroksit,%20 taze sönmüş kireç süspansiyonu veya %2 formaldehit solüsyonu (hepsi bir saat boyunca test edilmiştir) yer almaktadır. Kontamine deride etanol, izopropanol, iyodoforlar, fenoller veya seyreltilmiş hipoklorit çözeltileri kullanılabilir, ancak alkil kuaterner amonyum bileşikleri bu amaç için önerilmemektedir. Kirli ekipman üzerinde *Brucella* türlerini yok etmek için [121 ° C (250 ° F) nemli ısı en az 15 dakika] otoklav kullanılmaktadır. Bu organizmalar ayrıca kuru ısı ile [320-338 ° F (160-170 ° C) en az 1 saat boyunca] de inaktive edilebilirler. İnaktivasyonda kaynatma 10 dakika genellikle sıvılar için etkilidir. *Brucella* türleri gama ışınlanması ile de inaktive edilebilir (50).

2.11. İnsanlarda ve Hayvanlarda *Brusellozis*

Bruselloz sığır, koyun, keçi, domuz, köpek gibi evcil hayvanlar ile yabani hayvanların özellikle genital sistemini etkileyen kronik seyirli, bulaşıcı, zoonotik karakterde bir hastalıktır. Hastalık dişilerde yavru atımı, plasenta retensiyonu, vajinal akıntı, infertilite, embriyonik ve neonatal ölümler ile seyrederken, erkeklerde epididimitis, orşitis, tek ya da çift taraflı testis atrofisi, sperm anomalileri ve infertiliteye neden olmaktadır. Köpeklerde lenfadenopati, hepatopati, splenomegali, uveitis ve discospondilitis de gözlenebilir. Atlarda hastalığın tipik klinik bulguları granülomatöz supraspinöz veya supraatlantal bursa lezyonları olup bazı olgularda asemptomatik bir seyir görülebilir (27, 41). Hayvanlarda enfeksiyona neden olan *Brucella* türleri Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Bakteriler aborte plasenta ve fetüs dokularında çok yüksek yoğunlukta üreyebilir veya doku ve sıvılar 10^{10} bakteri/g bakteri içerebilir. Enfekte hayvanlar, hayatlarının geri kalanında *Brucella* taşıyıcısı olmalarına rağmen yalnızca bir kez abort yapabilirler. Bu süre zarfında görünüşte doğum, normal şekillenmesine rağmen salgıları ve sütleri ile beraber çok sayıda mikroorganizmayı etrafa saçarlar (15, 45). Bu nedenle, insanda görülen enfeksiyon, çiğ süt, krema ve peynir gibi süt ürünlerinin tüketilmesi veya özellikle doğum sırasında enfekte hayvanlara direkt temas ile ortaya çıkabilir. Pastörizasyon, Türkiye'nin birçok bölgesinde kent nüfusunu etkili bir şekilde korur; ancak hayvan sahipleri ve aileleri çoğu kez çiğ süt içmekle enfekte hayvanlarla doğrudan temasta bulunmaları sebebiyle risk altındadır (15).

İnsanlarda brusellozun inkübasyon periyodu normalde 1-3 hafta olmakla birlikte, enfeksiyon belirtileri göstermeden önce birkaç ay olabilir. *B. melitensis* akut enfeksiyon ile ilişkili iken, diğer türlerle olan enfeksiyonlar genellikle subakut ve uzun sürelidir. Brusellozun en yaygın semptomları, vücut ısısının sabah 37 °C'den öğleden sonra 40 °C'ye kadar değişebilen dalgalı yükselmesi; kendine özgü kokusu olan gece terlemesi, titreme ve halsizlik. Ayrıca yaygın semptomlar arasında halsizlik, uykusuzluk, anoreksiya, baş ağrısı, eklem ağrısı, kabızlık, sinirlilik ve depresyon vardır. Brusellozda, komplikasyonlar ve iç organ tutulumu da görülür.

Semptomları enfeksiyon bölgesine bağlı olarak çok çeşitlilik gösterebilir ve ensefalit, menenjit, spondilit, artrit, endokardit, orşit ve prostatiti içerir. Genellikle gebeliğin birinci ve ikinci trimestrindeki spontan abort, *Brucella* ile enfekte olan gebelerde

görülür. Nadir görülen komplikasyon olmasına rağmen, *Brucella* endokarditi (olguların <% 2'si) en sık *B. melitensis* enfeksiyonu ile ilişkilidir ve en ciddi komplikasyondur. Bu türün oluşturduğu Brusellozis kaynaklı ölümlerin en az% 80'ini oluşturmaktadır. Akut faz sırasında uygun tedavinin olmaması çeşitli dokularda brucella lokalizasyonuna neden olabilir, organları etkileyebilir ve tedavisi çok zor olan subakut veya kronik hastalığa neden olabilir. Brusellozun belirtileri genellikle enterik ateş, sıtma, romatizmal ateş, tüberküloz, kolesistit, tromboflebit, mantar enfeksiyonu, otoimmün hastalık ve tümörler gibi diğer hastalıklarla karıştırılabilir (45).

2.12. Süt ve süt ürünlerinde *Brucella* spp.

Enfekte sığır, koyun, keçi, manda, yak, deve ve ren geyiği sütleri çok sayıda *Brucella* organizması içerebilir. Bu sütlerden yapılan krema veya peynir gibi ürünlerin tüketilmesi ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca taze süttten hazırlanan yumuşak peynirler, de çok sayıda *Brucella* organizması içerir. Bu tür ürünlerin işlenmemiş süttten hazırlanması kesinlikle önerilmemektedir. Yerel bölgelerde bunu uygulamak zor olsa bile, peynir tüketime sunulmadan önce altı ay saklanmalıdır. Sert peynirler laktik asit fermentasyonu sonucu asitlenme nedeniyle genellikle daha az tehlikeli olabilirler. Peynir yapımı sırasında bırakılan pastörize edilmemiş peynir altı suyu, hayvanları infekte edebilir. Peynir yapımında kullanılan bu kaplar kullanmadan önce dezenfekte edilmezse, diğer malzemeleri taşımak için kullanılan kapları da kirletebilir. Peynir yapımında kullanılan rennet, *Brucella* ile enfekte hayvanların midelerinden hazırlanırsa, enfeksiyon kaynağı olabilir. Tereyağı, ekşi süt, ekşi krema ve yoğurt da asitlendirme işlemlerine tabi tutulur. Asit ortamı bakterilerin güvenilir şekilde öldürülmesi için pH 3,5'in altına düşmesini sağlayarak *Brucella* içeriğini büyük ölçüde azaltmaktadır (35, 51).

Özellikle enfekte süttten hazırlanan dondurma farklı kaynaklardan gelen sütlerin harmanlanmasıyla yapıldığı için tehlikeli olabilir. *Brucella*, 37 °C'de muhafaza edilen taze pastörize edilmemiş sütte ve 8 °C'de muhafaza edilen sütte 48 saate kadar birkaç saat hayatta kalabilir. Dondurma üretimi sırasında süt veya kremanın dondurulması *Brucella* bakterilerini öldürmez (51).

Bu amaçla kullanılan bütün süt ve krema ısıl işleminden geçirilmelidir. Kaynatma veya yüksek sıcaklık (pastörizasyon) *Brucella*'yı sütte öldürmektedir. Brusellozisin bulunduğu bölgelerde üretilen tüm sütlerin pastörize edilmesi gerekir. Pastörize etme

imkanı bulunmadığı durumlarda süt, minimum 80-85 ° C sıcaklığa ısıtılmalı ve sıcaklık en az birkaç dakika boyunca bu seviyede tutulmalı veya kaynatılmalıdır (51).

2.13. *Brusellozis*'in Teşhisi

Brusellozun kesin tanısı klinik örneklerden bakterinin izolasyonu ile konulur (Altın standart). İnsanlarda *Brucella* spp. hastalığın evresine ve tutulum yerine göre vücut sıvılarından ve doku biyopsi örneklerden izole edilebilir. Ancak, bruselloz esas olarak retikuloendotelial sistemi (RES) tutan bir enfeksiyon olduğu için kan ve kemik iliği kültür için tercih edilecek klinik örneklerdir. Kan kültürü, protokolünün standardize edilmiş olması, diğer örneklerle göre daha kolay alınması, tekrar edilebilirliğinin yüksek olması ve günümüzde otomatize kan kültür sistemlerinin varlığı nedeniyle en çok tercih edilen yöntemdir (10).

Hayvanlarda gözlenen yavru atımı, epididimitis ve orşitis gibi bulgular hastalığın klinik olarak tanımlanması için yeterli değildir. Bu gibi belirtiler trikomoniasis, vibriosis, leptospirosis, listeriosis, enfeksiyöz bovine rinotrakeitis ve çeşitli mikotik enfeksiyonlarda da görülebilir. Kesin tanı laboratuvar incelemeleri ile gerçekleştirilir. Bakteriyolojik tanı için atık yavru, yavru zarları, plasenta, süt, vajinal akıntı, sperma eklem sıvısı, dalak, meme ve genital sisteme ait lenf nodülleri gibi örnekler değerlendirilebilir. Hastalığın serolojik tanısı için ise kan ve süt serumu örneği incelenir (41).

2.13.1. Bakteriyolojik Teşhis

2.13.1.1. İzolasyon

Brucella spp. kültürü için kanlı agar, çikolata agar, triptikaz soy agar ve serum dekstroza agar kullanılmaktadır. Bazı suşlar, bazal besiyerine üreme için rutin olarak eklenen sığır veya at serumu (% 2-% 5) gerektirebilir. Ekim yapılmış petripler, hem aerob hem de % 5 ila % 10 CO₂'de 35° C ila 37° C'de inkübe edilmelidir. Bakterinin klinik örneklerden ilk izolasyonunda petride pigmentsiz ve hemolitik olmayan kolonilerin görünür hale gelmesi birkaç gün hatta bir hafta sürebilir. Koloniler *S. Brucella* suşları için konveks, yuvarlak, yarı şeffaf ve 0,5 mm ila 1 mm çapındadır (52).

Bakterinin koloni morfolojisi, antijenik özellikleri, faj duyarlılığı ve virulensi, bakteri kültür süresinin uzun olması (dört günden fazla olması) ve pasajlanmasına bağlı olarak değişebilir. Böylece *Brucella* kolonileri R forma dönüşür, donuk, kuru, sarımsı-beyaz

granüler görünümle daha az dışbükey ve daha opak olarak gözlenir. Ayrıca buyyon kültüründe ön zenginleştirme ve düzenli aralıklarla pasaj ile kombine edildiğinde bakterinin klinik örneklerden izolasyon oranı daha yüksek olabilir. Çeşitli teknik iyileştirmelerle kültür yöntemlerinin hassasiyeti giderek arttırılmıştır (52). Farrell ve ark (53)'nın geliştirdiği besiyeri *Brucella* spp.'nin izolasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Aynı zamanda özellikle beşeri hekimlikte Bruselloz tanısında kan kültür sistemleri manuel ve otomatize olmak üzere iki bölümde incelenmektedir. Manuel kan kültür sistemleri besiyerinin içeriğine göre sadece sıvı besiyeri (monofazik) ve katı ve sıvı besiyerlerini bir arada içeren kültür şişeleri (bifazik) olarak ayrılmaktadır. Günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında “3. kuşak yarı-otomatik sürekli takip kan kültürü sistemleri” kullanılmaktadır (10).

2.13.1.2. İdentifikasyon

***Brucella* spp.'nin Fenotipik Yöntemlerle İdentifikasyonu**

Brucella izolatlarının tür ve biyotip seviyesinde fenotipik yöntemlerle tanımlanması için koloni morfolojisi, Gram ve Stamp boyama yöntemleri ile mikroskopik morfoloji, oksidaz, katalaz ve hareket testi, H₂S üretimi, üreaz aktivitesi, *Brucella*'ya özel anti serum ile aglütinasyon ve faj duyarlılık testleri kullanılır (Tablo 2. 1). Şüpheli *Brucella* izolatlarının, türler ve biyovar olarak kesin tanımlanması için referans laboratuvara gönderilmesi epidemiyolojik çalışmalar açısından daha yararlıdır (1, 39, 51).

***Brucella* spp.'nin Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu**

Son yıllarda alternatif olarak 16S-23S rRNA, BCPS31 ve omp 2a genleri ve genus spesifik insertion sekansları IS 711 (IS650)'na ait primerler kullanılarak da *Brucella* spp.'nin, PCR yöntemi ile identifikasyon yapılmaktadır. Kandaki *Brucella* etkenlerinin doğrudan tespiti için PCR tabanlı analizler yapılmaktadır (51).

Moleküler tanı için klinik, gıda (süt, peynir vb) ve çevresel örnekler kullanılabilir. İnsanlarda kan, doku örnekleri (kemik iliği vb), idrar, BOS (beyin omurilik sıvısı) ve diğer vücut sıvıları PCR için uygun klinik örneklerdir. Bruselloz tanısında kan ve serum örnekleri, olguların akut evrede başvurması ve örneklerin kolay alınması nedeniyle en fazla tercih edilen klinik örneklerdir (10).

Bu şekilde herhangi bir test rutin laboratuvar testlerine dahil edilmeden önce, duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirlik için geçerliliği onaylanmalıdır. Bununla birlikte, geleneksel kan kültürlerinin yerini alıp alayamayacağına karar vermeden önce daha fazla uygulama yapılması gereklidir (51).

AMOS-PCR

Klasik olarak, *Brucella* spp. idenfikasyonu kültürel ve fenotipik testlere (biyotiplendirme) dayanır. Biyotiplendirmede, en iyi şekilde optimize edilmiş ve ticari olmayan reaktifler kullanılır. Aynı zamanda deneyimli personel, biyolojik korumanın sağlandığı güvenli bir ortam gerektirir ve zaman alıcıdır. İlk PCR tespit yöntemleri 16S rRNA ve bcp31 genlerine dayanıyordu. 16S rRNA'ya dayanan PCR yöntemleri, tüm *Brucella* türlerinde ortak olan bir DNA parçasını çoğaltır, ancak yakından ilişkili *Ochrobactrum* üyeleri ile çapraz reaksiyona girer. *Brucella* türlerini tanımlamak için RecA, omp2 veya 16S-23S genlerine ait dizilerde kullanılmaktadır. IS711 (GenBank accession no. M94960) genetic insertion sequence elementi, ayrıca IS6501 olarak da bilinirdi. IS711, klasik olarak *Brucella* tür ve biyovaryalarının moleküler karakterizasyonu için bakterinin genomlarında içerdiği IS711 kopyalarının sayısı ve dağılımı temel alınarak kullanılan elementtir. IS711'in kullanıldığı moleküler yöntemler, klasik *Brucella* tür idenfikasyonunu sağladığı (*B. canis* hariç) ve bir dereceye kadar da biyovar spesifik olduğu için tutarlı ve türlere özeldir. Böylece, IS711 elementi, *Brucella*'daki kısıtlı oluşumu ve çok sayıda kopyanın varlığı nedeniyle genel tanımlama amaçları için tercih edilen hedef gen haline geldi ve klinik örneklerde de doğrudan test yapılmasını sağlar (54).

AMOS PCR, *Brucella* türlerinin idenfikasyonu için kullanılan en popüler PCR analizlerinden biridir. Bu yöntem, *Brucella* kromozomunda yerleşen IS711 sekansının türe özgü lokalizasyondan kaynaklanan polimorfizm üzerine kuruludur ve *B. abortus*'u (biyovar 1, 2, ve 4), *B. melitensis*'i (biovar 1, 2 ve 3), *B. ovis*'i ve *B. suis*'i (biovar 1) identifiye edebilmektedir. Son zamanlarda *B. abortus* S19 ve RB51 aşı suşları gibi ek suşlarının da tanımlanabilmesi ve türlerin tanımlanma performansı artırılması için metoda yeni spesifik primerler eklenerek metod modifiye edilmiştir (54, 55).

2.13.2. Serolojik Teşhis

Bruselloz ilk kez 1897'de Wright ve Smith tarafından serolojik bir testle basit bir tüp aglütinasyon testi kullanılarak teşhis edildi. Ardından, testin doğruluğunu artırmak için tüp aglütinasyon testinde ve çeşitli testlerde değişiklikler yapılmıştır. *Brucella* spp.'nin ilk izolasyonundan bu yana, 100 yıldan fazla süre içerisinde, tanıda çok sayıda serolojik test kullanılmıştır. Bugüne kadar geliştirilen testler % 100 doğru sonuç verdiği söylenemez. Genellikle serolojik tanı, yüksek sensitiviteye sahip bir tarama testi ve takiben doğrulayıcı spesifitesi yüksek bir testi içeren bir dizi serolojik testle yapılır. Brusellozisin serolojik teşhisi için standart tüp aglütinasyon testleri (SAT) (2-merkaptotanol veya ditiotreitol gibi ilave indirgeyici ajanlar ile SAT, glikoproteinleri çöktürmek için rivanol ilaveli SAT, IgM'yi azaltmak için etilen diamin tetraasetik asit ilavesi ile SAT, Aglütinasyonu artırmak için antiglobulin içeren SAT ve milk ring testi), komplement fiksasyon testi, pasif hemaglütinasyon testi, floresan antikor tekniği, ve ELISA gibi pek çok serolojik test kullanılmaktadır (1, 10, 56)

Bu arada, serolojik testlerin sonucunu etkilemeyen bir aşı kullanımı ve primer bağlanma testlerinin geçerliliği ve yaygın kullanımı, tanıyı daha kolay hale getirirken, mükemmel serolojik bir test hala geliştirilmemiştir. Bağışık yanıtın farklı fonksiyonlarını içeren birkaç test kullanımı, enfeksiyonun doğru teşhisi konusundaki problemlerin çözümü için önem arz etmektedir (56).

2.14. Korunma ve Kontrol

Gelişmiş dünyada, hayvansal bruselloz kontrolü, etkili hastalık gözetimi ve hayvan hareketi kontrolü ile birleşince, aşılama, test-ve-kesim programları ve sucuk pastörizasyonu ile insan brusellozunun kombinasyonu yoluyla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Ancak gelişmekte olan ülkelerde, test taraması sırasında hayvanları kesilen çiftçileri kısıtlı kaynaklardan dolayı test ve katliam kontrolü mümkün değildir. *Brucella* türlerine mesleki maruziyet önemli bir bulaşma şekli olarak görülebilirken, enfekte olmuş hayvanların süt ürünlerinin tüketimi, enfeksiyonun endemik görülmediği ülkelerde bile önemli bir bulaşma yoludur. Gelişmiş ülkelerde, hayvansal brusellozu; kontrolü, aşılama, test-ve-kesim programları etkili hastalık gözetimi ve hayvan hareketi kontrolü kombinasyonları ile başarılı şekilde kontrol altına alınmıştır.

Gelişmekte olan ülkelerde ise test ve kesim ile enfeksiyonun kontrolü neredeyse hiç uygulanamamaktadır. Çünkü enfeksiyon taramasında hayvanları kesilen çiftçilere sınırlı kaynaklar nedeniyle tazminat ödemesi yapılamamaktadır (21, 54).

Başarılı eradikasyon programları her zaman için pahalı, uzun ve zordur. Bunun sebebi uygun olmayan sürü yönetim koşullarıdır (yoğun yetiştirme, yaylacılık ve birkaç hayvan türünün bir arada bulunması vb.). Çoğu zaman, belirgin altyapı sorunları ve ağır koşulları olan ülkelerde yer alan endemik bölgelerde mevcut aşılarda etkin kullanımı, yeterli veterinerlik hizmetleri gerektirir. Mükemmel bir aşı uygulaması Brusellozisin kontrol ve eradikasyonunu kolaylaştırabilir (54)

Araştırmacılara göre mükemmel bruselloz aşısı şunları yapabilmelidir: a. sağlam ve yaşam boyu süren bağışıklığı tetiklemeli; b. belirli bir konakçıya özgü olmayan *Brucella* türlerinden kaynaklanan enfeksiyona karşı korumalı; c. hayvanın fizyolojik durumuna zarar vermemeli d. tek bir dozda etkili olmalı; (serolojik teşhis testlerine karışmamalı (yanlış negatif-pozitiflik durumu oluşturmamalı); e. insanlar için virulent olmamalı veya antibiyotiklere karşı direnç taşımamalı; f. çevreye yayılmamalı g. tutarlı olmalı h. uygun fiyatlı olmalıdır. Sınırlamalarına rağmen, *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev.1 gibi zayıflatılmış suşlar bazı gelişmiş ülkelerde brusellozun eradikasyonunda başarıyla kullanılmıştır. Ancak eradikasyon programlarında bu aşılarda kullanımı sonrası serolojik testlerde hayvanların enfekte ya da aşıları olduğu belirlenememiştir (21, 54).

Smooth *Brucella* türlerinde (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) bulunan lipopolysaccharide (S-LPS) enfeksiyonlarda en önemli antijen olup serolojik olarak O polisakkariti taşımaları sebebiyle immunodominant epitoplardır (54). O-polisakkarit, *Brucella*'nın virulensi için önemlidir ve R mutantları fazla zayıflatıldığı durumlarda yetersiz korumaya neden olabilir. R aşılı hayvanların O-polisakkarit'e karşı antikor geliştirdikleri bilinmektedir (21).

B. melitensis Rev1 suşu, insan için oldukça bulaşıcı olmasına rağmen, konjunktival yolla standart dozda uygulandığında, koyun brusellozunun kontrolü için mevcut olan en iyi aşıdır. Bununla birlikte, Rev1 aşısı gebe hayvanlara uygulandığında virulensi yüksek olduğu için abortlara sebep olur (45). Endemik bölgelerde hayvanlar, virulent S koloni oluşturan *Brucella*'ya maruz kaldığında sağlıklı aşılanmış hayvanlar, enfekte olanlardan S-LPS testleri kullanılarak ile ayırt edilmesi zor olabilir.

Bazı serolojik testlerde çekirdek epitoplara (S ve R-LPS tarafından paylaşılan) maruz kalınmasından dolayı R aşılarının etkinliği sınırlıdır. Smooth *Brucella* antijenleri, rose bengal ve komplement fiksasyon testlerinde kullanılır ve R'ye spesifik antikorlar saptanamaz (21). Yeni R, *B. melitensis* aşılarının sahada değerlendirilmesi gerektiği bildirilmektedir. Yalnızca aşılama, Brusellozisin eradikasyonunu sağlayamaz çünkü *Brucella* aşıları tarafından oluşturulan bağışıklık kesin değildir ve enfeksiyonun artışı engelleyemez. Bu nedenle aşı politikası iyi bir sürü yönetimi ile birleştirildiğinde başarı şansı daha yüksektir. (45).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada, Kayseri ilinde bulunan pazar, market ve şarküterilerde tüketime sunulan 100 adet çiğ inek sütü, 100 adet taze beyaz peynir ve 100 adet salamura beyaz peyniri olmak üzere toplam 300 örnek materyal olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan süt ve peynir örnekleri 2012 yılında Mayıs-Haziran ayları içerisinde alındı.

Süt örnekleri 50'şer ml, peynir örnekleri ise steril bistüri ve pens yardımıyla yaklaşık 100 gram olacak şekilde, steril plastik kaplara alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Analizler yapılncaya kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı.

3.1.2. *Brucella* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Brucella izolasyonunda ve identifikasyonunda kullanılan besiyerleri aşağıda verilmiştir:

Brucella Broth Base (Himedia M.348)

İçindekiler	Miktar g/l
Pancreatic Digest Of Casein	10.0
Peptic Digest of Animal Tissue	10.0
Dextrose	1.0
Yeast Extract	2.0
Sodium Chloride	5.0
Sodium Bisulfite	0.1
pH 7.0±0.2	

Hazırlanışı: Brucella broth base'den 28 gr tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü, otoklavda 121°C' de 15 dakika (dk) steril edildi.

Brucella Selective Supplement (Oxoid SR0083A)

İçindekiler	Her bir vial 500 ml besiyeri için kullanılır.
Polymixin B	2.500 IU
Bacitracin	12.500 IU
Cycloheximide	50.0 mg
Nalidixic acid	2.5 mg
Nystatin	50.000 IU
Vancomycin	10 mg

Hazırlanışı: Bir vial supplement içerisine, 5 ml steril distile su ve 5 ml metanol ilave edilerek 37°C' de 10-15 dk inkübe edildi. Her bir vial 500 ml besiyeri için kullanıldı.

At Serumı (Oxoid SR 35) - Glikoz (Merck 1.083461000) çözeltisi

İnaktive edilen (56 °C'de 30 dk) 100 ml at serumuna, 20 g glikoz ilave edilerek çözündürüldü. Hazırlanan at serumu-glikoz çözeltisi 25 µm'lik enjektör filtresinden (Minisart® NY25 Syringe Filters) geçirilerek steril edildi.

Farrell Broth'un Hazırlanışı

Farrell broth, brucella broth base besiyerine at serumu-glikoz çözeltisi ve brucella selektif supplement ilavesi ile hazırlandı. Bu amaçla hazırlanan ve steril edilen (121 °C'de 15 dk) 500 ml Brucella broth base besiyeri 50 °C' ye kadar soğutuldu. 25 ml at serumu-glikoz çözeltisi ve 1 vial brucella selective supplement eklendi. İyice karıştırıldı Kullanılincaya kadar buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edildi (53, 57).

Brucella Medium Base (Himedia M.1638)

İçindekiler	Miktar g/l
Peptone	10.0
Meat extract	5.0
Glucose	10.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0

pH 7.0±0.2

Hazırlanışı: Brucella agar base'den 22,5 g tartılarak, 500 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Otoklavda 121 °C' de 15 dk steril edildi.

At Serumu (Oxoid SR 35)

İnaktive edilen 100 ml at serumu (56 C°'de 30 dk) kullanıldı.

Farrell Agar'ın Hazırlanışı:

Farrell agar, brucella medium base, inaktive at serumu ve brucella selektif supplement ilavesi ile hazırlandı. Bu amaçla hazırlanan ve steril edilen (121 °C'de 15 dk) 500 ml brucella medium base 50 °C' ye kadar soğutuldu. İçerisine 35 ml (%7) inaktif at serumu ve 1 vial brucella selective supplement (Oxoid SR0083A) eklendi. İyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri 20'şer ml olacak şekilde steril petrilere dağıtıldı (53).

Blood Agar Base No:2 (Oxoid, CM271 B, İngiltere)

İçindekiler	Miktar g/l
Proteose pepton	15.0
Liver digest	2.5
Yeast extract	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	12.0

pH 7.4 ± 0.2

Hazırlanışı: Blood agar base besiyerinden 40 g tartıldı ve 1 litre su içerisinde çözündürüldü. pH 7.4 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edildikten sonra 50°C 'ye soğutuldu ve üzerine %7 steril defibrine koyun kanı eklendi. Besiyeri her biri 20 ml olacak şekilde petrilere döküldü ve donmaya bırakıldı. Kullanılincaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Oksidaz Test

Ticari Bactident Oxidase (Merck, 113300, Almanya) test kiti kullanıldı

Katalaz Test

Hydogen Peroxide (H_2O_2) (Merck, 107209, Almanya)

Hazırlanışı: Ticari % 30'luk hidrojen peroksitten 3 ml alınarak 27 ml distile su ile karıştırıldı ve % 3'lük H_2O_2 solusyonu hazırlandı.

Mikroaerobik Ortam Kitleri

Brucella spp.'lerin üretilmesi için aerob ortamın yanında gerekli mikroaerobik ortamı sağlamak için, anaerobik jarlar (Merck, M116387, Almanya) ve mikroaerobik ortam sağlayıcı ticari gaz kitleri (Thermo Scientific™, CN0025A, USA) kullanıldı.

Thioninli Besiyeri

1/100000, 1/50000 ve 1/25000 oranında thionin içeren besiyerleri

Thionin besiyeri için 3 adet 100 ml *Brucella* agar hazırlandı, otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edildi. 50°C 'ye kadar soğutuldu. Birinci besiyeri içerisine 5 ml at serumu, 1 g glikoz ve 1 ml thionin (saf sudaki %0.1'lik solüsyon), ikincisine 5 ml at serumu, 1 g glikoz ve 2 ml thionin (saf sudaki %0.1'lik solüsyon) ve üçüncüsüne 5 ml at serumu, 1 g glikoz ve 4 ml thionin (saf sudaki %0.1'lik solüsyon) ilave edilerek karıştırıldı ve petrilere döküldü. Petrilerin üzerine thionin oranları (1/100000, 1/50000 ve 1/25000) kaydedildi. Boya tolerans testlerinde kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı (39).

Fuchsinli Besiyeri

Fuchsin besiyeri için 2 adet 100 ml *Brucella* agar hazırlandı, otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edildi. 50°C 'ye kadar soğutuldu. Birinci besiyeri içerisine 5 ml at serumu, 1 g glikoz ve 1 ml fuchsin (saf sudaki %0.1'lik solüsyon) ve ikincisine 5 ml at serumu, 1 g glikoz ve 2ml fuchsin (saf sudaki %0.1'lik solüsyon) ilave edilerek karıştırıldı ve

petrilere döküldü. Petrilerin üzerine fuchsin oranları (1/100000 ve 1/50000) kaydedildi. Boya tolerans testlerinde kullanılmak üzere +4 °C 'de saklandı (39).

3.1.3. Standart Suş

Brucella spp.'nin izolasyonu, izolatların fenotipik testler ve moleküler analiz ile identifikasyonu aşamalarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan *B. melitensis* ve *B. abortus* saha suşları (koyun ve sığır abort vakalarından izole edilen ve PCR ile tanımlanan) kullanıldı.

3.1.4. Moleküler analizde kullanılan kimyasallar

DNA Ekstraksiyon Kiti

Brucella izolatlarından DNA izolasyonunda, MoBio Ultra Clean™ Microbial DNA (Mo Bio Laboratories, 12224-250 ABD) ekstraksiyon kiti kullanıldı.

Primerler

Çalışmada AMOS-PCR analizinde kullanılan primerler Tablo 3.1.'de verildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan Primerler ve Beklenen Bant Büyüklükleri

Primer	Sequence 5'-3'	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
IS711	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT		
<i>B. melitensis</i>	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA	731	Bricker ve Halling, 1994 (55)
<i>B. abortus</i>	GAC GAA CGG ATT TTT TCC ATT CCC	498	
<i>B. ovis</i>	CGG GTT CTG GCA CCA TCG TCG	976	

Tris-Borik asit-EDTA Solusyonu (Thermo Scientific B52, ABD)

Hazırlanışı: Tris-Borik asit-EDTA hazır stok solüsyonundan 50 ml alınarak distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve 0.5xTBE olarak kullanıldı.

Agaroz (HyAgarose LE, Vivantis, Malezya)

AMOS-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla ile %1.5 agaroz jel kullanıldı.

Hazırlanışı: Yoğunluğu % 1.5 olan jel hazırlamak amacıyla agarozdan 0.75 gr tartılarak, 50 ml 0.5xTBE'de çözündürüldü. Mikrodalga fırında eritildi ve yaklaşık

50°C'ye soğutuldu. İçerisine 3 µl ethidium bromide (Gerbu 1341, GmbH, Almanya) eklendi ve elektroforez tankına dökülerek kullanıma uygun hale getirildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. *Brucella* spp.'nin İzolasyonu

3.2.1.1. Süt örneklerinin incelenmesi

Süt örnekleri 6000-7000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstteki kaymak tabakası uzaklaştırıldı. Alt kısımda yer alan süt örneğinden 5'er ml alınarak ön zenginleştirme amacıyla içerisinde 45 ml Farrell broth bulunan iki tüpe bek alevi yanında ilave edildi. Tüpler 37°C de 5 gün süreyle biri aerob, diğeri ise mikroaerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresince tüpler her gün karıştırıldı. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan tüpler karıştırıldıktan sonra tüplerin her birinden 0.1 ml alınarak Farrell agara ekimleri yapıldı. Ekim yapılan petriyer ilk izolasyonda kullanılan atmosferde (ön zenginleştirme inkübasyonu aerob- Farrell agarda inkübasyon aerob; ön zenginleştirme inkübasyonu % 5-10 CO₂'li ortamda - farrell agarda inkübasyon % 5-10 CO₂'li ortamda) 37°C'de 3-5 gün süreyle inkübe edildi. Süre sonunda etüvden çıkarılan petriyer *Brucella* spp. yönünden incelendi. *Brucella* şüpheli kolonilerden 3 tane seçilerek kanlı agara pasajlandı ve şüpheli kolonilerin saf kültürleri elde edildi.

3.2.1.2. Peynir Örneklerinin İncelenmesi

Her bir peynir örneğinin farklı bölgelerinden yaklaşık 10 gram alındı. Steril filtreli stomacher poşetlerine konuldu. Üzerine 90 ml steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ilave edildi ve stomacherde orta hızda 3 dk karıştırılarak homojen hale getirildi. Ön zenginleştirme amacıyla içerisinde 90 ml Farrell broth bulunan iki stomacher poşeti alındı. Homojen hale getirilmiş peynir örneğinden 10 ml alınarak bu poşetlere bek alevi yanında ilave edildi. Stomacher poşetlerinin ağızları lastik ile gevşek olarak kapatıldı. Ekim yapılan stomacher poşetleri, 37°C de 5 gün süreyle biri aerob, diğeri ise mikroaerob (Thermo Scientific™, CN0025A, USA) ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresince ekim yapılan poşetler yavaşça karıştırıldı. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan poşetler karıştırıldıktan sonra her birinden 0.1 ml alınarak Farrell agara ekim yapıldı. Ekim yapılan petriyer ilk izolasyonda kullanılan atmosferde (ön zenginleştirme inkübasyonu aerob- farrell agarda inkübasyon aerob; ön zenginleştirme inkübasyonu % 5-10 CO₂'li ortamda- farrell agarda inkübasyon % 5-10 CO₂'li ortamda) 37°C'de 3-5

gün süreyle inkube edildi. Süre sonunda etüvden çıkarılan petrilere *Brucella* spp. yönünden incelendi. *Brucella* şüpheli kolonilerden 3 tane seçilerek kanlı agar pasajlandı ve saf kültürleri elde edildi.



Resim 3.1. Ön zenginleştirmeye tabi tutulan süt ve peynir örnekleri ile Farrell agar ve broth

3.2.2. *Brucella* spp. İdentifikasyonu

Makroskopik morfolojilerine göre *Brucella* şüpheli kolonilerden elde edilen saf kültürlerin identifikasyonu için Gram boyama, katalaz, oksidaz, hareket, CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, üreaz aktivitesi, boya tolerans testleri, monospesifik serumlarla aglutinasyon gibi fenotipik testler kullanıldı.

3.2.2.1. Fenotipik Testler

Gram Boyama

Kanlı agardan alınan şüpheli koloniler, lam üzerine damlatılan bir damla serum fizyolojik tuzlu su içinde homojenize edildi. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez alevden geçirilerek tespit işlemi gerçekleştirildi. Preparat kristal moru çözeltisi (GBL 5026/01) ile 2-3 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Daha sonra lugol çözeltisi (GBL 5026/02) ile 1-2 dakika boyandı. Boya dökülerek distile su ile yıkandı. Preparatın üzerine damla damla denatüre alkol çözeltisi (GBL 5026/03) damlatılarak dekolarizasyon işlemi gerçekleştirildi. Distile su ile yıkandı ve preparat safranin çözeltisi (GBL 5026/03) ile 30 saniye boyandı. Preparat distile su ile yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifte incelendi (39).

Katalaz Testi

Hidrojen peroksit (H_2O_2)'in % 3'lük solüsyonundan bir damla temiz lam üzerine damlatıldı. Bir öze dolusu alınan koloni lam üzerindeki H_2O_2 ile karıştırıldı. Kısa sürede kabarcık şeklinde gaz oluşması, pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (1).

Oksidaz Testi

Ticari Bactident Oxidase (Merck, 113300, Almanya) kiti kullanıldı. Kağıt şeridi üzerine üretilen saf ve taze kültürden öze ile bir koloni alınarak sürüldü. Şeritte 1-2 dk sonrasında mavi-mor rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi. Açık sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirildi (58).

Hareket Muayenesi

Temiz bir lam üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su damlatıldı. Şüpheli izolattan bir koloni alınarak suda homojenize edildi. Üzerine lamel kapatılarak hazırlanan preparat immersiyon objektifinde incelendi. Hareket muayenesinde bakterinin hareketsiz ya da titreşim halinde gözlenmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Hemoliz Testi

Farrell agar'da izole edilen *Brucella* şüpheli kolonilerden kanlı agara tek koloni düşecek şekilde ekim yapılarak saf kültürleri elde edildi. 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda oluşan kolonilerde hemoliz oluşumunun gözlenmemesi, hemoliz negatif olarak değerlendirildi.

Thionin ve Fuchsin Boya İnhibisyon Testi

Elde edilen izolatlardan çeşitli oranlarda boya içeren besiyerlerine ekim yapıldı. 37°C'de 48 saat süreyle aerob ve mikroaerob inkübasyona kaldırıldı. Inkübasyon sonunda petrillerdeki üreme durumu kaydedildi ve sonuçlar Tablo 2.1.'e göre değerlendirildi.

Monospesifik Antiserumlarla Aglütinasyon

Elde edilen izolatlar, *Brucella* A ve M antiserumları ile lam aglütinasyon testine tabi tutuldu.

3.2.2.2. *Brucella* spp. İzolatlarının AMOS-PCR Yöntemi ile İdentifikasyonu

Genomik DNA Ekstraksiyonu

Brucella spp izolatlarından DNA ekstraksiyonu için ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı. DNA ekstraksiyonu, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

AMOS-PCR Analizi

Süt ve peynir örneklerinden izole edilen ve fenotipik testlerle identifiye edilen *Brucella* spp. izolatları, AMOS-PCR ile moleküler analize tabi tutuldu (55).

PCR karışımının hazırlanması:

PCR işlemi, toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. PCR karışımı için, 10xPCR buffer (Applied Biosystems N8080129), 1.5 mM MgCl₂ (ThermoFisher, R0971), her bir dNTP (Fermentas R0241)'den 0.25mM, IS711 primerinden 1 µM olmak üzere, diğer primerlerden (Tablo 3.1.) 0.2'şer µM ve 1U taq DNA polimeraz (ThermoFisher EPO402) enzimi kullanıldı. Karışımın üzerine 5 µl ekstrakte edilmiş hedef DNA ilave edildi. PCR'de kullanılan amplifikasyon koşulları aşağıda verilmiştir.

Amplifikasyon koşulları:

95 °C	1.15 dk	35 siklus	denatürasyon
55.5 °C	2 dk		primer bağlanması
72 °C	2 dk		primer uzaması
72°C	5 dk		final uzama

Elektroforez ve amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri, etidium bromide ilave edilmiş (3µl/50ml), %1.5'lik agaroz jelde; 120 volt gerilimde 500 amperde 60 dk, elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dokümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntüldü. Bu test sonunda *Brucella* türleri; elde edilen bant büyüklükleri ile beklenen bant büyüklükleri karşılaştırılarak tanımlanmışlardır (Tablo 3.1.).

4. BULGULAR

4.1. Fenotipik Testlerle İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

4.1.1. Süt Örnekleri

Çalışmada incelenen 100 adet çiğ inek sütü örneğinin 1 (%1)'i *Brucella* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu izolat fenotipik testlerle *B. abortus* biyotip 1 olarak tanımlandı (Tablo 4.1, Tablo 4.2)

4.1.2. Peynir Örnekleri

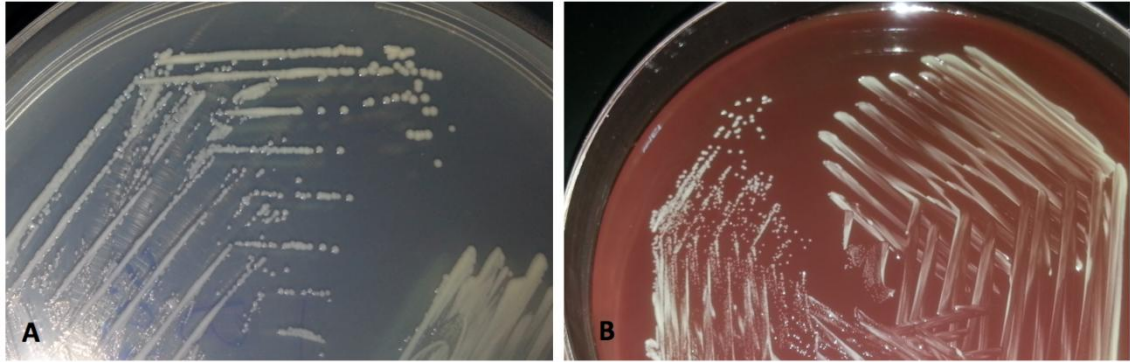
İncelenen 100 adet taze peynir örneğinin 2 (%2)'si *Brucella* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu izolatların her 2'si de fenotipik testlerle *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Salamura peynir örneklerinden ise *Brucella* spp. izole edilemedi (Tablo 4.1, Tablo 4.2)

İzolatların fenotipik özellikleri ile ilgili detaylı sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Elde edilen *Brucella* izolatlarının fenotipik test sonuçları

Tür	Kaynak	Biyotip	CO ₂ ihtivacı	H ₂ S üretimi	Üreaz aktivitesi	Boyalarda Üreme					Aglütinasyon		Tb fajı ile lizis (RTD)
						Thionin			Fuchsin		Anti A	Anti M	
						a	b	c	b	c			
<i>B. abortus</i>	Süt	1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. melitensis</i>	Taze peynir	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. melitensis</i>	Taze peynir	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

a= 1/25000 b= 1/50000 c=1/100000
A=monospesifik abortus serumu M= Monospesifik melitensis serumu RTD= Rutin Test Dilusyonu



Resim 4.1. *Brucella* spp. kolonilerinin A. Farrell agar ve B. Kanlı agardaki görünümü

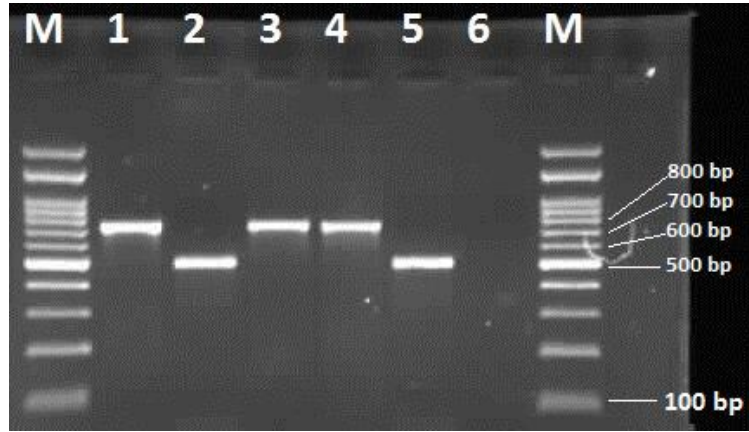
Tablo 4.2. Süt ve peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyon ve identifikasyon sonuçları

Kaynak	Örnek sayısı	<i>Brucella</i> spp. pozitif örnek sayısı	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>
Süt	100	1	+	-
Taze peynir	100	2	-	+
Salamura peynir	100	-	-	-

4.1.3. AMOS-PCR sonuçları

Sütten izole edilen ve fenotipik testlerle identifiye edilen 1 adet *B. abortus* izolatu, yapılan AMOS-PCR sonucunda 498 bp de bant verdi. AMOS-PCR analizi *B. abortus*'un 1, 2 ve 4 biyotiplerini (498 bp) saptamaktadır. Bu izolat *B. abortus* biyotip 1, 2 ve 4 pozitif olarak belirlendi (Resim 4.1.).

Taze peynir örneğinden izole edilen ve fenotipik testlerle identifiye edilen 2 adet *B. melitensis* izolatu, AMOS-PCR analizi sonucunda 731 bp de bant verdi. AMOS-PCR, *B. melitensis*'in 3 biyotipini de saptamakta olup bu izolatlar moleküler analizle *B. melitensis* biyotip 1, 2 ve 3 pozitif olarak belirlendi. (Resim 4.1.) Böylece fenotipik testler ile identifiye edilen izolatlar moleküler analiz ile de doğrulandı.



Resim 4.2. *Brucella* izolatlarına ait AMOS-PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez (%1.5) görüntüsü
M: 100 bp DNA Ladder, 1: Pozitif Kontrol *B. melitensis* (731 bp) 2: Pozitif kontrol *B. abortus* (498 bp), 3-4: *B. melitensis* (taze peynir izolatu) 5: *B. abortus* (süt izolatu), 6: Negatif kontrol, steril distile su.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Brucellozis, zoonotik bir infeksiyon olup insan ve hayvanlarda *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan subakut veya kronik seyirli bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre her yıl 500.000'den fazla insan Brucellozis vakası bildirilmektedir (59, 60). İnsanlarda Brucellozis, kontamine süt, işlem görmemiş süt ve süt ürünleri, çiğ veya yeterli pişirilmemiş etlerin tüketimi ile oluşabileceği gibi infekte hayvanlar, hayvan karkasları ve atık materyalleri ile direkt temas yoluyla da meydana gelmektedir (61, 62).

Brucella etkenlerinin insanlara bulaşmasında, infekte hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin çiğ olarak tüketilmesi, özellikle çiğ süttten yapılan ve olgunlaşmadan tüketime sunulan taze beyaz peynirlerin önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde süt örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Kasımoğlu ve ark. (63) Kırıkkale'de yaptıkları çalışmada 35 adet çiğ süt ve 35 inek sütü örneğinden, Türütoğlu ve ark. (64) Burdur bölgesinde toplanan inek (404 adet) ve koyun sütü (226 adet) örneklerinden ve Karadal ve ark. (65) Niğde ilinde satışa sunulan 100 adet koyun ve keçi sütünden *Brucella* spp. izolasyonu yapamadıklarını bildirmişlerdir.

Abdelkareem (66) Trakya bölgesinde 75 sığır sütü örneğinin 3 (%4)'ünde *Brucella* spp. izole etmiş ve izolatların 2'sini *B. abortus*, 1'ini ise *B. melitensis* olarak adlandırmıştır. Aydın (67) Mersin ilinde 240 çiğ inek sütü örneğinden 1(%0.42)'inde *B. melitensis* biyovar 1 izole ettiğini, 122 çiğ koyun sütü ve 95 çiğ keçi sütünden ise *Brucella* spp. üretemediğini bildirmiştir.

Gülbaz (68) Kars yöresinde 215 adet çiğ süt örneğinden 4(%1.86)'ünü *B. abortus* yönünden pozitif bulmuştur. Kaynak-Onurdağ ve ark. (69), Edirne'den topladıkları 99

inek sütünün %2,2 sini moleküler ve fenotipik yöntemlerle *Brucella* spp yönünden pozitif bulduklarını bildirmişlerdir.

Yukarıda bildirilen bu çalışmalarda sütte *Brucella* izolasyonunun ya yapılamadığı ya da izolasyon oranının düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak çalışmamızda Kayseri çevresinde pazar, market ve şarküteride satışa sunulan çiğ inek süt örneklerinden düşük oranda (%1) *Brucella* spp. izolasyonu yapılmıştır ve bu izolat *B. abortus* biyotip 1 olarak fenotipik ve moleküler yöntemle identifiye edilmiştir.

Yurdumuzda *Brucella* spp. nin izolasyonu ve moleküler identifikasyonuna yönelik araştırmalar da bulunmaktadır. Çelebi (70) tarafından Kars yöresinde 2009 yılında yapılan bir çalışmada 250 inek sütü örneğinin 11(%4.4)'inden *B. abortus* biyotip 3 izole edildiği bildirilmiştir. Yine Kars yöresinde Büyük ve Şahin (71), 265 süt örneğinin 41(%15.47)'inden *Brucella* izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir. Erdenliğ Gürbilek ve ark. (72), Şanlıurfa'da 68 inek sütü örneğinin 15(%22.05)'inden *B. abortus* biyotip 3 izole ettiklerini bildirmişlerdir. Eren (73), Afyon bölgesinde 100 süt örneğinin 25 (%25)'inde konvansiyonel yöntemlerle *Brucella* spp izole ettiğini ve bu izolatların fenotipik testlerle 20 (%80)'sinin *B. melitensis*, 5 (%20)'sinin *B. abortus* olarak identifiye ettiğini bildirmiştir. Bu araştırmalarda ise süt örneklerinde *Brucella* spp. izolasyon oranlarının yüksek olduğu görülmektedir (4.4-%25). Bu yüksek izolasyon oranları; süt örneklerinin Brucellosis'li ya da bu enfeksiyonu geçiren hayvanlardan alınmasına ve sütün içerdiği bakteri sayısına bağlı olabilir. Çalışmamızda, kullanılan süt örnekleri direk olarak hayvanlardan alınmamış olup bir tankta ya da bir kapta toplanmış olan farklı hayvanların sütlerini içeren ve satışa sunulan örneklerdir. Çalışmamızda izolasyon oranının düşük olmasının başka bir sebebi, etkenin süt içerisinde dilüe olmasına bağlanabilir. Ayrıca çalışmalarda izolasyon sonuçlarının farklılık göstermesinde; etkenin izolasyonunda kullanılan besiyerleri, kullanılan üreme koşulları ve etkenin fenotipik tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal aktivitelerin değerlendirilmesi (subjektif olması) etkilidir.

Dünyanın birçok yerinde yapılan çalışmaların ise daha çok seropozitif hayvanlardan alınan süt örneklerinde *Brucella* izolasyonuna yönelik olduğu görülmektedir (74-81).

Zowghi ve ark. (74), seropozitif ve seronegatif ineklerden almış oldukları 6472 süt örneğinin 397 (%6.13)'sinden *B. abortus* izole etmişler ve seropozitif hayvanlarda daha yüksek *B. abortus* izolasyon oranı (%17.03) bildirmişlerdir. Seropozitif ineklerden

alınan süt örneklerinde; Langoni ve ark. (75) 49 süt örneğinin 15(%30.6)'inden *Brucella abortus*, Abdalla ve Hamid (76) 147 süt örneğinin 11(%7,5)'inden *B. abortus* (fenotipik yöntemlerle), İbrahim ve ark. (77), 302 süt örneğinin 105'inden (%34.8) *Brucella* spp., Shahzad ve ark (78) 84 sütün 5 (5.95)'inden *Brucella* spp. (fenotipik ve moleküler yöntemlerle), Maymona ve ark. (79) 10 inek sütü örneğinin 2'sinden *B. melitensis* biyotip 3, Mugizi ve ark. (80) 207 süt örneğinin 11(%5.3)'inden *B. abortus*'un 3 farklı (1, 3 ve 7) biyotipini ve Rodriguez ve ark. (81) 25 inek sütünün 9(%36)'undan *B. abortus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmalarda seropozitif hayvanlara ait süt örneklerinde *Brucella* spp. izolasyon oranlarının yüksek olması; etkenin enfekte ve hastalığı geçiren hayvanların %80'inde lenf nodüllerine kolonize olması ve laktasyon boyunca kronik yada aralıklı olarak etkenin sütle saçılımına bağlanabilir (82).

Dünyada ve ülkemizde hayvanlardan alınan süt örneklerinde *Brucella* izolasyonu ve direk PCR yönteminin bir arada kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (82-86).

Hamdy ve Amin (82) 52 seropozitif inek sütünün 24(%46,15)'ünden *B. abortus* izole ettiklerini, 29 (%55.76) süttten ise direk PCR ile *Brucella* DNA'sını saptadıklarını rapor etmişlerdir. Ebrahimi ve ark. (83), 360 keçi sütünün 12'sinden *B. melitensis* üretmişler ve direk PCR ile 10 örneği *B. melitensis* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Süttten direk DNA ekstraksiyonu sonrası yapılan PCR ile Terzi ve ark. (84), 70 çiğ süt örneğinin 5(%7,1)'ini, Ning ve ark. (85) 55 inek süt örneğinin (seropozitif hayvanlara ait) 25'ini *Brucella* DNA'sı yönünden pozitif saptamışlardır. Arasoğlu ve ark. (86) ise 334 inek sütü örneğinin (seropozitif hayvanlara ait) iki tip *Brucella abortus* spesifik gen primeri kullanarak, sırasıyla 273(%81,7)'nde ve 317(%94,9)'sinde *Brucella* DNA'sı saptadıklarını bildirmişlerdir.

PCR, örneklerde canlı ya da ölü bakteri DNA'sını saptamaya yönelik bir yöntemdir. Bakteriyel hedef DNA'nın izolasyonunda, gıda bileşenlerinin (protein, yağ ve kalsiyum iyonları) inhibitör etkisi, ekstraksiyonun etkinliğini azaltabilir (87). Bu nedenle, çalışmalarda PCR metodunda kullanılan ekstraksiyon prosedürlerine göre elde edilen sonuçlar da farklılık gösterebilmektedir.

Yine yurdumuzda sütlerde *Brucella* antikor varlığının çeşitli serolojik testlerle (milk ring test (MRT), süt Whey aglütinasyon testi ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay

(ELISA) araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sütlerde *Brucella* antikor varlığının %15.6 ila %65.59 arasında değişen oranlarda saptandığı bildirilmiştir (84, 88-91)

Koyun ve keçiler *B. melitensis*'in, sığır ise *B. abortus*'un ana konakçılarıdır. Özellikle infekte hayvanların sütleri yüksek miktarda etken içerir. Beyaz peynirin ham maddesi sütlerdir. Bu şekilde *Brucella* etkenlerini içeren ve pastörize edilmeyen peynirler insanlar için önemli bir infeksiyon kaynağıdır.

Bu çalışmada, 100 taze peynir örneğinin 2'si (%2) *Brucella* spp. varlığı yönünden pozitif olarak belirlendi. Bu izolatların fenotipik testlerle identifikasyonunda *B. melitensis* biyotip 3 olduğu saptandı ve moleküler yöntemle ile de *B. melitensis* (biyotip 1,2 ve 3) olduğu doğrulandı. Yüz adet salamura peynir örneğinden ise *Brucella* spp. izole edilemedi.

Ülkemizin farklı bölgelerinde çeşitli peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sert ve Kıvanç (92) Erzurum ilinde yaptığı çalışmada tüketime sunulan 24 adet civil ve 18 adet taze lor peyniri örneğinden, Ayaz (59) Ankara'da yapmış olduğu bir çalışmada beyaz peynirlerden, Tunçbilek (93) marketlerde satılan, (imal tarihi ile orijini bilinmeyen peynirlerden alınan) 34 peynir örneğinden, Parlakgöl ve Yıldırıncı (94) İstanbul'un semt pazarlarından aldıkları 30 beyaz peynir, 30 tulum peyniri ve 30 lor peynirinden, Yıldırıncı (95) İstanbul ilinde 50 değişik tulum peyniri örneğinden, Serpe ve ark. (96) 100 adet yumuşak tuzsuz beyaz peynir ve 150 adet yumuşak peynir (mozzarella)'den, Türütöğlu ve ark. (64) Burdur ili semt pazarında satılan 114 beyaz peynir örneğinden, Urçar (97) Erzurum bölgesinde 50 adet peyaz peynir ve 50 adet civil peynirden, Gülbaz (68) 50 adet taze peynirden, Urhan (98) 50 adet peynirden, Karadal ve ark. (65) Niğde ilinde satışa sunulan 50 koyun ve keçi peynirinden *Brucella* spp. izolasyonu yapamadıklarını bildirmişlerdir.

Dünyada bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda ülkemizdeki çalışmalara benzer olarak Miyashiro ve ark. (99), Brezilya'da 192 peynir örneğinden, Di Giannatale ve ark. (100) İtalya'da 315 mozzarella peynirinden, *Brucella* spp. izolasyonu yapamadıklarını bildirmişlerdir. *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamasının nedeni; alınan peynir örneklerinin yapıldığı sütün kaynağı, etkenin sütteki kontaminasyon seviyesi, peynir üretim süreçlerindeki değişiklikler, üretim şartları, peynirin olgunlaşma süresine bağlı

olabilir. Ayrıca alınan peynir numunesinde rastgele örnekleme yapıldığı için bakterinin bu kısımlarda bulunmaması da başka bir faktör olarak düşünülebilir.

Dünyada ve yurdumuzda peynir örneklerinden *Brucella* spp.'nin saptandığı çalışmalarda ise farklı izolasyon oranları bildirilmiştir. Eren (73) Afyon bölgesinden topladığı 100 adet taze peynir örneğinin 2'sinde (%2), *Brucella* spp. izole ettiğini bildirmiştir. Akbarmehr (101) İran da 1000 adet peynir örneğinin 22 (%2.2)'sinden *Brucella* spp. (%0.7'si *B. melitensis* ve %1.5'i *B. abortus*) izole etmiştir. Patır ve Dinçoğlu (102) Elazığ'da tüketime sunulan 30 adet taze beyaz peynirin, 1(%3.33)'inde ve 55 adet tulum peynirinin 1(%1.81)'inde *Brucella* spp. varlığını saptamışlardır. Elde ettikleri izolatların *B. abortus* ve *B. melitensis* olduğunu bildirmişlerdir. Tunçbilek (93) Ankara'da kurulan semt pazarlarında satılan 66 beyaz peynir örneğinin 4 (% 6.06),'ünden *Brucella* spp. izole etmiş ve fenotipik yöntemlerle izolatların 3(%75)'ünü *B. mellitensis* 1(%25)'ini *B. abortus* olarak tanımlamıştır.

Namın (103) İstanbul iline bağlı değişik semtlerin halk pazarlarından topladığı 120 beyaz peynir örneğinin 8(%6,66)'inden *Brucella* spp. izole etmiş ve izolatların 5'(%62,5)'ini *B. abortus* ve 3 (37,5)'ünü *B. mellitensis* olarak saptamıştır. Akcan (104) Burdur ilinde yapmış olduğu çalışmada incelenen 100 adet peynir örneğinin 7 (%7)'sinden *Brucella* spp. izole etmiş ve izolatların 5(%10) 'ini *B. abortus* ve 2(% 4) 'sini *B. melitensis* olarak saptamıştır. Acedo ve ark. (105) 335 adet Meksika beyaz peynirinden (yumuşak) 25 (%7.46)'inde *Brucella* izole etmişlerdir. İzolatların 21'i *B. abortus* olarak tanımlamışlardır. Abbas and Talei (106) 100 yumuşak peynir örneğinin 8'ini *Brucella* yönünden pozitif olarak saptamışlar ve izolatların 5'ini *B. melitensis*, 3'ünü *B. abortus* olarak tanımlamışlardır. Alim ve Tomul (107) 2003 yılında, Sivas'ta topladıkları 42 peynir örneğinin 3'ünde (%7.1) ve 2004 yılında topladıkları 47 peynir örneğinin 4'ünde (%8.5) *Brucella* spp.'yi izole etmişlerdir. Ataş ve ark. (108) Sivas'ta açıkta satışa sunulan 135 adet taze beyaz peynir örneğinin 8 (%5.9)'inde *Brucella* spp. izole etmiş ve izolatların 4 (% 2.9)'ünü *B. melitensis*, 4 (% 2.9)'ünü ise *B. abortus* olarak adlandırmışlardır. Kara ve Akkaya (109), Afyon bölgesinde 100 adet taze peynir ve 50 adet afyon tulum peynir örneğinden sırasıyla %9 (%2 *B. abortus*, %7 *B. melitensis*) ve %6 (%2 *B. abortus*, %4 *B. melitensis*) oranında *Brucella* spp. izole etmişler ve 50 adet koyun tulum peynirinden ise *Brucella* spp. izole edemediklerini bildirmişlerdir. Buğdaycı (110) Kayseri'de 100 adet taze beyaz peynir örneğinin (çiğ

sütlerden yapılmış) 13 (% 13)'ünü *Brucella* yönünden pozitif saptamış, izolatların 12 (% 92,3)'sini *B. mellitensis*, 1(% 7,7)'ini *B. abortus* olarak tanımlamıştır. Ünel (111) Balıkesir bölgesinde yaptığı çalışmada beyaz peynir örneklerinden %16 oranında *Brucella* spp. izole etmiştir.

Sancak ve ark. (112) Van'da 40 adet taze otlu peynir örneğinin 7 (%17.5)'sinden *Brucella* izole etmişler ve bu izolatların 6(%85.7)'sının *B. mellitensis*, 1(%14.3)'inin *B. abortus* olduğunu bildirmişlerdir. Mert (113) Ankara'da 150 beyaz peynir örneğinin 29(%19.33)'undan *Brucella* izole etmiştir ve izolatların 26(% 90)'sını *B. mellitensis* 3(% 10)'ünü *B. abortus* olduğunu saptamıştır. Kalender ve ark. (114) tarafından Elazığ, Erzincan ve Tunceli illerinden toplanan 78 taze tulum peyniri örneğinin 16(%20,5)'sından *Brucella* spp. izole edilmiş; izolatların 13(%81.3)'ü *B. mellitensis*, 3(%18,7)'ü de *B. abortus* olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmalarda çeşitli peynirlerden *Brucella* spp. izolasyon oranları %2-20.5 arasında farklılık göstermektedir. Çalışmamızda taze peynir örneklerinden %2 oranında *B. melitensis* izole edilmiştir. Çalışmamızın bulguları Eren (73), Akbarmehr (101), ve Patır ve Dinçoğlu (102)'nin bulguları ile uyumlu iken diğer çalışmalarda (93, 103-114) bulgularımızdan daha yüksek izolasyon oranları bildirilmiştir. Yüksek izolasyon oranları, peynir yapımında çok miktarda etken içeren sütlerin hammadde olarak kullanılmasına bağlı olabilir. Şöyle ki; Ülkemizde yöresel taze peynir yapımı çiğ sütün 32-35°C'lere kadar ısıtılıp ve mayalanması ile sağlanır. Peynirin bu şekilde yapılması insanlar açısından gerek damak tadı gerekse maddi açıdan (ısıtma maliyeti, peynir randımanı) tercih nedenidir. Yüksek düzeyde *Brucella* etkeni içeren sütler yeterli ısıtım işlemine tabi tutulmadığı için peynirde *Brucella* spp.'nin kaynağını oluşturmaktadır. Hasta hayvanların bulunduğu bölgelerde sütle bakteri saçılımı yüksek olabileceği için analiz edilen peynir örneklerinde *Brucella* spp. varlığı da o oranda artabilmektedir. Yine peynir örneklerinin rastgele alınması, kullanılan izolasyon yöntemleri, peynirlerin olgunlaşma süreleri gibi faktörlerde bu izolasyon oranları üzerinde etkilidir. Ayrıca bildirilen çalışmalarda peynir örneklerinden *B. melitensis*'in daha yüksek oranda izole edildiği görülmekte olup bu çalışmada da taze peynir örneklerinden elde edilen iki izolat *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır.

Süt örneklerinde olduğu gibi peynir örneklerinden de direk PCR tekniği ile *Brucella* spp. DNA'sı saptanmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. PCR yöntemi kullanarak,

Öngör ve ark. (115) 40 adet beyaz peynir örneğinin 2 (%5)'sini, Miyashiro ve ark. (99), Brezilya'da 192 peynirden 37'sini, Silva ve ark. (116) Brezilya'da çalışmada 66 peynir (çiğ süt kaynaklı) örneklerinin 14(%21.21)'ünü, Tantillo ve ark. (117) 46 koyun ve keçi peynirinin %46'sını *Brucella* spp. yönünden pozitif saptamışlardır.

Bu çalışmalarda direk *Brucella* DNA'sı saptanmakta olup bu DNA'ların canlı ya da ölü *Brucella* bakterisine ait olup olmadığı bilinmemektedir. Bu örneklerden bakteri izole edilmediği sürece peynirin canlı *Brucella* bakterisi ile kontamine olduğu söylenemez. Bu sebeble bakteri izolasyonuna dayanan kültürel yoklama her zaman geçerliliğini korumaktadır.

Çalışmamızda salamura peynirlerden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamıştır. Salamura peynirde *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızla uyumlu olarak Ataş ve ark. (108) market ve şarküterilerden alınan 120 adet salamura beyaz peynir örneğinde *Brucella* spp. izole edemediklerini bildirmişlerdir. *Brucella* etkenlerinin % 20 tuz içeren salamurada çiğ süttten yapılmış peynirde 35-40 gün (12°C'de) yaşayabildiği rapor edilmiştir (118). Peynirin salamurada içerisine homojen tuz geçişinin sağlanması, salamura içerisinde kalış süresi gibi faktörlerin de *Brucella* izolasyonunun yapılamamasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Türk Gıda kodeksine göre; çiğ süttten yapılan peynirde koagulaz pozitif stafilokokların varlığı ile ilgili ve çiğ süt veya pastörizasyondan daha az sıcaklık uygulanmış süttten üretilen tereyağ ve krema için de *E. coli* varlığı ile ilgili düzenleme mevcuttur. Ancak peynirlerde *Brucella* bakterilerinin varlığının araştırılmasına ilişkin herhangi bir düzenleme bulunmamaktadır. Sadece Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No:2015/6)'nde yer alan iki madde bulunmaktadır. Madde 5. b bendi: peynire işlenecek süt, çiğ olarak peynire işlenebileceği gibi termizasyon, pastörizasyon veya daha yüksek sıcaklıklarda uygulanan bir ısıl işlemde sonra da peynire işlenebilir. c bendi; çiğ süttten veya termizasyon işlemi uygulanan süttlerden üretilen ve telemesi haşlanmamış peynirler taze olarak piyasaya arz edilemez. Bu peynirler üretimden sonra en az 4 ay uygun koşullarda olgunlaştırıldıktan sonra piyasaya arz edilir (119). Bu sebeble piyasaya sürülen peynirlerin *Brucella* etkenleri yönünden herhangi bir kontrol mekanizmasına tabi tutulmadığı görülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen *Brucella* izolasyon oranları düşük olmasına rağmen etkeni içeren bu süt ve peynirlerin tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir. Ülkemizde insanlarda 2000-2005 yılları arasında 90000 (her yıl yaklaşık 15000) *Brucella* vakası bildirilmiş ve bununla birlikte, bu sayının gerçeği yansıtmadığı da belirtilmiştir. Çünkü tescilli kayıt dışı vakaların tahmini oranı 1:30 civarındadır (15). İnsanlarda *Brucella* vakalarının hayvansal kaynaklı olduğu bilinmektedir. Gerek insanlarda gerekse hayvanlarda Brucellozisin eradikasyonu için temel olarak hayvanların aşılması ve kontrol programlarının başarılı bir şekilde uygulanması, özellikle beşeri ve veteriner hekimlerin güçlü bir işbirliğini zorunlu kılmaktadır. Çiğ süt ve peynirlerin tüketimden önce *Brucella* içermemesi konusunda yeterli yasal düzenlemelerin de yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Akay Ö, İzgür M, Diker SK, Kahraman M, Ilgaz A. Özel Mikrobiyoloji. Ankara Medisan Yayınevi 1997; 26: 110-125
2. Çelebi S, Hacımustafaoğlu MK. Brucellozis Derleme. Güncel Pediatri 2004; 2: 39-43
3. Çelebi S. Brusellozun epidemiyolojisi. Ankem Derg 2003; 17(3): 340-343
4. Gezgen C, Şeker E. Brusellozis: Güncel Yaklaşımlar. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi 2014;12(1): 28-66
5. Lopes LB, Nicolino R, Haddad JPA. Brucellosis risk factors and prevalence: A review. The Open Veterinary Science Journal 2010; 4: 72-84
6. Büyükcangaz E, Şen A. The first isolation of *Brucella melitensis* from bovine aborted fetus in Turkey. J Biol Environ Sci 2007; 1(3): 139-142
7. Evirgen Ö, Köksaldı Motor V. Brucellosis. J Exp Clin Med 2012; 29: 149-154
8. Anonymous. (1997). FAO / OIE / WHO Animal Health Yearbook 1995-1997, FAO Animal Production and Health Series, FAO, Rome, Italy.
9. www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Genelgeler/BRUCELLA.pdf (erişim tarihi: 10.11.2016) Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (GTHB) 2012. Genelge no: 2012/03. Brusellanın konjunktival aşısı ile kontrol ve eradikasyonu projesi
10. Kılıç S. Bruselloz: Mikrobiyolojik tanısı. Türkiye Klinikleri, J Infect Dis-Special Topics 2012; 5(1): 46-66

11. Doğanay GD, Doğanay M. *Brucella* as a potential agent of bioterrorism. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2013; 8(1): 27-33
12. Hughes ML. Mediterranean, Malta or undulant fever. London: Macmillan and Co 1897
13. Doğanay M. Tarihçe ve Nomenklatür. Türkiye Klinikleri, J Inf Dis-Special Topics 2012; 5(1): 1-7
14. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Front Microbiol 2014; 5: 1-18
15. Yumuk Z, O'Callaghan D. Brucellosis in Turkey an overview. Int J Infect Dis 2012; 16(4): e228-35
16. Bang B. The etiology of epizootic abortion. J Comp Path Therap 1897; 10: 125-161
17. Evans AC. Further studies on bacterium abortus and related bacteria: a comparison of bacterium abortus with bacterium bronchisepticus and with the organism that causes Malta fever. J Infect Dis 1918; 22: 580-593
18. Buddle MB, Boyes BW. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. Aust Vet J 1953; 29:145-153
19. Carmichael LE, Bruner DW. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. Cornell Vet 1968; 58: 579-592
20. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009; 9(6): 1168-84
21. Godfroid J, Scholz HC, Barbier T et al. Brucellosis at the animal ecosystem human interface at the beginning of the 21st century. Prev Vet Medicine 2011; 102: 118-131.
22. Diker S, İstanbulluoğlu E, Ayhan H, Soysal G. Bursa bölgesindeki insanlarda *Brucella canis* infeksiyonları üzerinde serolojik bir inceleme. Mikrobiyol Bul 1984; 18(4): 203-207
23. Altoparlak Ü. Brusellozun etiyolojisi. Ankem Derg 2003; 17(3): 330-332
24. Aydemir SŞ. Etken. Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics 2012; 5(1): 8-10
25. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol 2010; 5(6): 859-866
26. Glynn MK, Lynn TV. Brucellosis. J Am Vet Med Assoc 2008; 233(6): 900-908

27. Xavier MN, Costa EA, Paixão TA, Lima Santos R. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc Rural* 2009; 39(7): 2252-2260
28. Nymo IH, Tryland M, Godfroid J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Vet Res* 2011, 42; 93: 1-13
29. CFSPH. (the Center for Food Security & Public Health); IICAB (Institute for International Cooperation in Animal Biologics). (2009). *Brucellosis in Marine Mammals*. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_marine.pdf (erişim tarihi: 28.11.2016)
30. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, et al. *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010; 60(4): 801-808
31. Whatmore AM, Davison N, Cloeckert A, et al. *Brucella papii* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64:4120-4128
32. Whatmore AM, Dale EJ, Stubberfield E, et al. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Reports* 2015
33. Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(7): 833-45
34. Garrity GM, Bell JA, Limberger RJ. Family III. *Brucellaceae*, In: Brenner DJ, Kreig NR, Staley JT (eds), *Bergey's manual of systemic bacteriology* 2nd ed. vol. 2. New York, Springer Science Media Inc, 2005: p. 370–386
35. Madkour M. *Madkour's Brucellosis*. 2nd ed. Germany: Springer. 2001: p. 1-306
36. Banai M, Corbel M. Taxonomy of *Brucella*. *The Open Veterinary Science Journal* 2010; 4: 85-101
37. Cengiz AT, Dolapçı Gİ. *Brucella*'ların özellikleri ve brucellozda tanı yöntemleri. *Ank Üni Tıp Fak Mecm* 1997; 50(1): 41-46
38. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/943103200.pdf> (erişim tarihi: 21/11/2016).
39. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 2. Baskı, İzmir, 1995; -478
40. Zheng WY, Wang Y, Zhang ZC, Yan F. Immunological characteristics of outer membrane protein omp31 of goat *Brucella* and its monoclonal antibody. *Genet Mol Res* 2015; 14 (4): 11965-11974

41. Otlu S. Hayvanlarda Bruselloz Derleme. *Turkiye Klinikleri J Infect Dis-Special Topics* 2012; 5(1): 99-106
42. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* 2005; 98(6): 1270-81
43. De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions. *Am J Pathol* 2015; 185(6): 1505-17.
44. Bodur H. Patogenez Derleme. *Turkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics* 2012; 5(1): 15-23.
45. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4): 392-8.
46. Yamazhan T. Epidemiyoloji. Derleme. *Turkiye Klinikleri J Infect Dis-Special Topics* 2012; 5(1): 11-14
47. Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 1991; 337: 14–15.
48. Fiori PL, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 2005-6.
49. Yakupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism.. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8): p1180-1185.
50. CFSPH. (the Center for Food Security & Public Health); IICAB (Institute for International Cooperation in Animal Biologics). (2009). Canine Brucellosis: *Brucella canis*. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf (erişim tarihi 08.12.2016)
51. Corbel, MJ, Banai M. *Brucella*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Publisher: John Wiley & Sons 2015; 1–30.
52. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2013; 32 (1): 177-188
53. Farrell ID. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci* 1974; 16(3): 280–286.
54. Cloeckaert A, Zygmunt MS. *Brucella* Chapter 13 In: Labbe RG, Garcia S. (eds) *Guide to Foodborne Pathogens*, 2nd Edition. 2014. Wiley-Blackwell

55. Bricker, BJ, Halling, SM: Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 & 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2660-2666.
56. Nielsen K, Yu Wl. Serological diagnosis of Brucellosis. Contributions, Sec Biol Med Sci 2010; 31(1): 65–89
57. Farrell ID, Robertson L. A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of brucellae from milk. J Appl Bacteriol 1972; 35(4):625–630.)
58. Halkman K. Ed: Başak A. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Anonymus Matbaacılık Ltd. Şti Ankara 2005.
59. Ayaz Y. Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde brucellosis etmenlerinin araştırılması. Etlik Vet Mikrob Enst Derg 1986; 5: 109
60. Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Morata P. Chapter 3 Polymerase Chain Reaction: A Powerful New Approach for the Diagnosis of Human Brucellosis In: López-Goñiz I, Moriyón I. (eds), *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience, Norfolk, UK, 2004: pp. 53-68
61. Díaz Aparicio E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. Rev Sci Tech 2013;32(1):43-51, 53-60
62. Liu D. Chapter 23 *Brucella* In: Al Dahouk S, Nöckler K, Tomaso H. (eds), *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. CRC press, Newyork USA, 2009; pp. 317-330
63. Kasımoğlu A. Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kırıkkale. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2002; 109(7): 324-6
64. Türütoğlu H, Mutluer B, Uysal Y. Burdur bölgesinden toplanan süt ve peynirlerin *Brucella* enfeksiyonu yönünden incelenmesi. Tübitak VHAK-100-V-007 Burdur Tübitak Araştırma Projesi 2001; 1-36
65. Karadal F, Ertas Onmaz N, Bağcı C, Yıldırım Y, Al S, Abay S. Niğde ilinde satışa sunulan koyun-keçi sütü ve peynirlerinde *Brucella melitensis* ve biyotiplerinin araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2016; 13(2): 101-108
66. Abdelkareem AA. Trakya yöresinde yetiştirilen sığırların sütlerinden *Brucella* türlerinin varlığını bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılmalı olarak

- araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul 2008
67. Aydın E. Süt ve süt ürünlerinde *Brucella* cinsi bakterilerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin 2007
 68. Gülbaz G. Kars yöresinde satışa sunulan çiğ süt, peynir ve tereyağında *Brucella* türlerinin izolasyonu identifikasyonu ve moleküler tekniklerle belirlenmesi. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars 2011
 69. Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sen B. Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. Journal of Dairy Science 2016; 99(5): 3351–3357
 70. Çelebi Ö. Kars yöresinde atık yapmış inek sürülerinden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler tanımlanması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars 2009.
 71. Büyük F, Şahin M. Kars yöresinde atık yapan ineklerin çeşitli örneklerinden *Brucella* etkenlerinin kültürel ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve olguların epidemiyolojik analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 17 2011 ;(5): 809-816
 72. Erdenliğ Gürbilek S, Tel OY, Keskin O. Brusellozis şüpheli sürülerdeki ineklerden alınan klinik örneklerden *Brucella* spp tanısı için PCR ve bakteriyolojik kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. Harran Üniv Vet Fak Derg 2015;4(2): 48-52
 73. Eren E. Afyon bölgesinde toplanan süt ve peynir örneklerinden *Brucella* türlerinin saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon 2004
 74. Zowghi E, Ebadi A, Mohseni B. Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1990; 9(4): 1175-1178
 75. Langoni H, Ichihara SM, Silva AV. Isolation of *Brucella* spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. Braz J Vet Res Anim Sci 2000; 37(6):0-0
 76. Abdalla A, Hamid M. E. Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. Trop Anim Health Prod 2012; 44: 1151-1155

77. Ibrahim AK, AbdelAll AA, Amin AS. Long-term diagnostic studies for detection of *Brucella* spp. in milk samples. Glob Vet 2012; 8 (1): 54-61
78. Shahzad A, Qurban A, Falk M, et al. Isolation and identification of bovine *Brucella* isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. Trop Anim Health Prod 2014; 46: 73-78
79. Maymona AM, Mohamed TS, Abdulwahab YA, Musa TM, Phenotypic characterization of *Brucella melitensis* isolated from livestock in Abu Dhabi Emirate. Afr J Microbiol Res 2014; 8(39): 3523-3528
80. Mugizi DR, Muradrasoli S, Boqvist S, et al. Isolation and molecular characterization of *Brucella* isolates in cattle milk in Uganda. BioMed Res Int 2015: 1-9.
81. Rodríguez-Hidalgo RI, Contreras-Zamora J, Benitez Ortiz W, et al. Circulating strains of *Brucella abortus* in cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province - Ecuador. Front Public Health 2015; 3: 1-5
82. Hamdy MER, Amin AS. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J 2002; 163: 299-305
83. Ebrahimi A, Milan JSK, Mahzoonieh MR, Khaksar K. Shedding rates and seroprevalence of *Brucella melitensis* in lactating goats of Shahrekord, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014; 7(3): e9394
84. Terzi G, Büyüktanır Ö, Genç O, Gücükoğlu A, Yurdusev N. Detection of *Brucella* antibody and DNA in cow milk by ELISA and PCR methods. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2010; 16 (Suppl-A): 47-52
85. Ning P, Guo K, Xu L, et al. Short communication: evaluation of *Brucella* infection of cows by PCR detection of *Brucella* DNA in raw milk. J Dairy Sci 2012; 95(9): 4863-4867
86. Arasoğlu T, Güllüce M, Özkan H, Adıgüzel A, Şahin F. PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey. Turk J Med Sci 2013; 43: 501-508
87. Yetilmezer E. Sığır sütlerinde *Brucella* ve *Listeria* tanısı için PCR optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara 2010.
88. Uraz G, Yücel N. Çiğ süt örneklerinde ring testi ile *Brucella* varlığının araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 1998; 11(2): 393-401

89. Güllüce M, Leloğlu N. Kars ve çevresinde süt sığırlarında *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve MRT ile saptanması, sonuçlarının karşılaştırılması. Turk J Vet Anim Sci 1996; 20: 251- 255
90. Adıgüzel A, Güllüce M, Algur ÖF. Erzurum'a bağlı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde *Brucella abortus* antikorlarının ELISA ile araştırılması. Enfeksiyon Dergisi 2004; 18(2) :187-191
91. Terzi G. Samsun bölgesinden toplanan sütlerde milk ring test ve aglütinasyon testi ile *Brucella* antikorunun araştırılması. TAF Prev Med Bull 2006; 5 (3): 196-200
92. Sert S, Kıvanç M. Erzurum piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kaliteleri üzerine bir araştırma. Atatürk Üniv Zir Fak Derg 1984; 15(3-4): 79-89.
93. Tunçbilek M. Ankara piyasasında satılan taze beyaz peynirlerin Brucellosis riski yönünden incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, 1992
94. Parlakgöl D. *Brucella* ve *Listeria* bakterilerini peynirden ayırabilmek için balıklı besiyerinin geliştirilmesi ve İstanbul'da satılan peynirlerde bu bakterilerin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1993; 23(4) :239-243
95. Yıldırıncı G. İstanbul piyasasında satışa sunulan tulum peynirlerinde *Brucella* etkenlerinin mevcudiyeti üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul 1993
96. Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzzo A, Fenizia D. Single step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J. Dairy Research 1999; 66: 313-317
97. Urçar S. Erzurum ili piyasasında tüketime sunulan bazı peynirlerde *Brucella* spp. varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2011
98. Urhan G. Ankara'da çeşitli kaynaklardan satın alınan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalite kontrolü üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2012

99. Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, et al. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). Braz J Microbiol 2007; 38(1):17-22
100. Di Giannatale E, Alessiani A, Prencipe V, et al. Polymerase chain reaction and bacteriological comparative analysis of raw milk samples and buffalo mozzarella produced and marketed in Caserta in the Campania region of Italy. Vet Ital 2009; 45(3): 437-42
101. Akbarmehr J. The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. Afr J Microbiol Res 2011;5(12):1500-1503
102. Patır B, Dinçoğlu HA. Elazığ'da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde *Brucella* spp'nin varlığı üzerine araştırmalar. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2001;15(1): 15-22
103. Namin AS. İstanbul'da bazı semt pazarlarından toplanan beyaz peynir örneklerinde *Brucella* bakterilerinin aranması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul 1990
104. Akcan A.S. Burdur yöresinde tüketime sunulan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. varlığı. Yüksek Lisans Tezi, Konya Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya 2009
105. Acedo E, Diaz ME, Leon AB. Incidence of *Brucella* spp. in raw milk and fresh regional cheese. Aliment 1997; 281: 57-60
106. Abbas BA, Talei AB. Isolation, identification and biotyping of *brucella* spp. from milk product at basrah province. Bas J Vet Res 2010; 9(1):152-162
107. Alim A, Tomul DZ. Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satılan taze peynirlerin *Brucella* yönünden araştırılması. Mikrobiyol Bul 2005; 39(2): 219-223
108. Ataş M, Poyraz Ö, Alim A, Ataş AD, Çelik A. Sivas il merkezinde satışa sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin *Brucella* bakterileri yönünden incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg 2007; 64(2): 9-14
109. Kara R, Akkaya L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarahisar, Turkey. British Journal of Dairy Sciences 2013; 3(1): 5-8

110. Buğdaycı K. Kayseri ilinde çiğ sütlerden yapılan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. aranması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul 2003
111. Ünel S, Williams CF, Stableforth AW. Balıkesir bölgesinde süt krema imalathane ve köylü beyaz peynirlerinde *Brucella melitensis*'in kalma süresi. Pendik Mikrob Enst Derg 1968; 2: 67
112. Sancak YC, Boynukara B, Yardımcı H. Van otlu peynirlerinde *Brucella*'ların varlığı ve dayanma süresinin saptanması. Veterinarium 1993; 4(1): 1-3
113. Mert A. Ankara yöresinde pazarlanan taze peynirlerde *Brucella*'ların varlığı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara 1984
114. Kalender H, Özcan C, Arslan N. Taze tulum peynirlerinden *Brucella* izolasyonu. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31(3-4): 184-186
115. Öngör H, Çetinkaya B, Karahan M, Bulut H. Evaluation of immunomagnetic separation–polymerase chain reaction in direct detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from cheese samples. Foodborne Pathog Dis 2006; 3: 245-50
116. Silva J, De Moraes CM, Silva CL, et al. *Brucella abortus* detected in cheese from the Amazon region: differentiation of a vaccine strain (B19) from the field strain in the states of Pará, Amapá and Rondônia, Brazil Pesq Vet Bras 2016; 36(8): 705-710
117. Tantillo G, Di Pinto, A, Vergara, A, Buonavoglia C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. J Food Protect 2001; 64(2): 164-167
118. Plommet M, Fensterbank R, Vassal L, et al. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk Le Lait, INRA Editions 1988; 68 (2): 115-120
119. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6) <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.20523&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=peynir> (erişim tarihi: 08.12.2016)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sevgi ERDOĞDU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 05/12/1986, Kayseri

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 5535367109

e-mail: sevgi-erdogdu@hotmail.com

Yazışma Adresi: Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

KIRŞEHİR/Merkez

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	ERÜ Fen Fakültesi	2009
Yüksek Lisans	ERÜ Sağlık Bil. Ens.	2017

YABANCI DİL

İngilizce, Arapça

İŞ DENEYİMLERİ

2013	Hakkari Yüksekova Devlet Hastanesi	Biyolog
2014-Halen	Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Biyolog

