

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AFYON BÖLGESİNDE TOPLANAN SÜT VE PEYNİR
ÖRNEKLERİNDEN BRUCELLA TÜRLERİNİN SAPTANMASI**

Elif EREN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA

Tez No:

2004-030

2004- AFYON

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

.....
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunması Tarihi: 17 / 09 / 2004

İmza

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Reşit MISTIK

İmza

Yrd. Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA
Afyon Kocatepe Üniversitesi

İmza

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi

ÖNSÖZ

Karşılaştığım güçlüklerin çözümünde olduğu gibi; tez konumun yürütülmesinin her aşamasında bilgi ve desteğinden yararlandığım, tezimin yazılım aşamasında da büyük yardımlarını gördüğüm Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Zafer Çetinkaya'ya içten şükran duygularımı sunarım.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çalışmaya başladığım günden bu yana sürekli ilgi, destek ve teşviklerini gördüğüm Hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa Altındiş'e de teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim sürem boyunca maddi ve manevi desteğinin esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| Kısaltmalar | VII |
| Tablo ve Grafik listesi..... | VIII |
| Özet | 1 |
| Summary | 2 |
| 1. GİRİŞ | 3 |
| 1.1. Tarihçe | 4 |
| 1.2. Genel Özellikleri | 5 |
| 1.3. Antijenik Yapı | 7 |
| 1.4. Patogenez ve patoloji | 9 |
| 1.5. İmmunoloji | 10 |
| 1.6. Klinik Bulgular | 10 |
| 1.7. Brusellozun Klinik Formları | 12 |
| 1.7.1. Akut Bruselloz | 12 |
| 1.7.2. Subakut Bruselloz | 13 |
| 1.7.3. Kronik Bruselloz | 13 |
| 1.7.4. Asemptomatik –Subklinik Bruselloz | 13 |
| 1.7.5. Relaps-reinfeksiyon | 13 |
| 1.7.6. Fokal Bruselloz | 13 |
| 1.7.7. Osteoartiküler Tutulum | 14 |
| 1.8. Gastrointestinal Tutulum | 14 |
| 1.7.9. Sinir sistemi | 15 |
| 1.7.10. Ürogenital Sistem | 15 |
| 1.7.11. Deri ve Yumuşak Doku | 15 |
| 1.7.12. Kardiyovasküler Sistem | 16 |
| 1.7.13. Solunum Sistemi | 16 |
| 1.7.14. Hematolojik Tutulum | 16 |

| | |
|---|----|
| 1.7.15. Göz Tutulumu | 16 |
| 1.8. Tanı | 16 |
| 1.8.1 Bruselloz Tanısında İncelenecek Örnekler | 18 |
| 1.8.2. Kültür Yöntemleriyle Etkenin İzolasyonu | 19 |
| 1.8.3. İndirek Tanı Yöntemleri | 23 |
| 1.8.4. Moleküler Tanı | 28 |
| 1.8.5. Deney Hayvanlarına İnokülasyon | 31 |
| 1.8.6. Türkiye’de Brucella Kökenleri | 31 |
| 1.8.7. İdentifikasyon Yöntemleri | 32 |
| 1.9. Tedavi | 34 |
| 1.10. Epidemiyoloji | 37 |
| 1.10.1. Hastalığın Geçiş Yolları | 40 |
| 1.12. Korunma | 43 |
| 1.13. Dirençlilik | 45 |
| 1.14. Bağışıklık | 45 |
| 1.15. Prognoz | 46 |
| 2. MATERYAL VE METOT | 47 |
| 2.1. Kullanılan Besiyerleri | 48 |
| 2.1.1. Kanlı Agar | 48 |
| 2.1.2. Serum-Dekstroz Agar | 48 |
| 2.1.3. Brucella Agar | 48 |
| 2.1.4. Tiyoninli besiyerleri | 48 |
| 2.1.5. Fuksinli Besiyerleri | 49 |
| 2.1.6. Üre Agar | 49 |
| 2.2. Süt Kültürü | 49 |
| 2.3. Peynir Ekim Metodu | 49 |
| 2.4. Sütlerde Ring Testi | 50 |
| 2.5. Süt Serumuna ile Aglütinasyon Testi | 50 |
| 2.6. İdentifikasyon Metotları | 50 |
| 2.7. Gram Boyama Yöntemi | 51 |
| 2.8. Tip Tayininde Kullanılan Yöntemler | 51 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 3. BULGULAR | 54 |
| 4. TARTIŞMA | 61 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 67 |
| KAYNAKLAR | 69 |

KISALTMALAR

SDA: Serum Dekstroz Agar

BSA: Brucella Selektif Agar

SAT: Serum Aglütinasyon testi

ELISA: Enzyme Linked Immunaassay

RFLP-PCR: Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RES: Retikülo Endotelial Sistem

OMP: Outer Membran Protein

LPS: Lipopolisakkarit

S-LPS: Smooth- Lipopolisakkarit

R-LPS: Rough- Lipopolisakkarit

HS: Hot Saline

PMN: Polimorf Nüveli Lökositler

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

IFA: Immuno Floresan Tekniği

RIA: Radio Immuoassay

FPD: Floresan Polarizasyon Deneyi

2ME: 2-Merkaptoethanol

RB: Rose Bengal

CELISA: Competitive Enzyme Immunoassay

TABLO ve GRAFİK LİSTESİ:

Tablo 1. *Brucella* 'nın bazı türlerinin önemli özellikleri

Tablo 2. *Brucella* türleri ve biovarlarında dış membran proteinlerini kodlayan genlerin PCR-RFLP paternleri

Tablo 3. Sığırlardan izole edilen *Brucella* kökenleri

Tablo 4. İnsanlarda izole edilen *Brucella* kökenleri

Tablo 5 . *Brucella* türlerinin ayırıcı özellikleri

Tablo 6. Yıllar Göre Ülkemizde bruselloz vakaları ve ölüm oranları

Tablo 7. Türkiye'de Bruselloz

Tablo 8. Afyon'da Bruselloz

Tablo 9. Toplanan süt örneklerinin alındığı yer, işletmeler ve örnek sayıları.

Tablo 10. Süt ve Peynir Örneklerinden elde ettiğimiz *Brucella* türlerinin sayısı

Tablo 11. *Brucella* Suşlarının Biyotiplendirilmesi

Grafik 1. Sütlerde Yapılan Ring testindeki pozitiflik dereceleri ve pozitif örnek sayıları.

ÖZET

Afyon Bölgesinden Toplanan Süt ve Taze Peynir Örneklerinden *Brucella* Türlerinin Saptanması

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerle oluşan koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanların et, süt, idrar gibi vücut sıvıları, infekte süt ile hazırlanan süt

ürünleri ve hayvanların gebelik materyali aracılığı ile insanlara bulaşabilen; titreme ile yükselen ateş, kas ve büyük eklemlerde ağrı ile seyreden bir zoonozdur.

Zoonozlar toplum sağlığını ekonomik açıdanda etkileyen sorunlardan birisidir. Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de sayıları giderek artan zoonotik hastalıklar grubu içerisinde yer alan bruselloz eski bir tarihçesi olan ve hala güncelliğini koruyan bir hastalıktır. Ülkemiz gibi ekonomisi tarım ve hayvancılığa dayalı ülkelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır

Bu çalışmada Afyon yöresinden toplanan 100'er adet süt ve taze peynir örneğinden kültür yöntemleriyle *Brucella* türleri araştırılmıştır. Kültür yöntemleriyle süt örneklerinden 25 (%25) tanesinde *Brucella* türleri saptanmıştır. Bu 25 (%25) örnekten; 5 (%5) tanesinin *B.abortus*, diğer 20 (%20) örneğin ise *B. melitensis* olduğu tespit edilmiştir.

Sütlerde yapılan Ring testinde 35 (%35) örnekte pozitiflik bulunmuştur. Pozitif örneklerin 15 (%15) tanesi ineklerden alınan sütlerde, 20 (%20) tanesinde koyunlardan alınan sütlerdi. Yine sütlerde yapılan Whey-AT testi ile 15 (%15) örnekte pozitiflik bulunmuştur.

Toplanan taze peynir örneklerinin yalnız 2'sinde (%2) *Brucella spp.* üretilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Süt, Peynir, *Brucella*, Ring Testi

SUMMARY

Determining the *Brucella* Kinds Collected From Milk and Fresh Cheese Samples in Afyon Region

Brusellosis is a zoonose which forms with the types of *Brucella* bacterias and infects the people with the meat, milk, body fluid as urine of animals like sheep, goats, oxes, buffaloes, pigs and also with milk-products from infected milk and with the pregnancy material of animals; this progresses in muscles and big joints with trembling and high temperature.

Zoonoses are big problems of social health. Brusellosis which takes part in the group of zoonose illnesses in our country as well as in all the world, is a big disease that has an old history and protects its popularity. It causes great economical losses in countries whose economy depends on agriculture and stock-breeding as in our country.

Brucella spp. are studied in this work with cultural methods taken from 100 different milk and fresh cheese samples in Afyon. *Brucella spp.*'s are found out in 25 (25%) samples with the cultural methods. 5 (5%) samples are *B. abortus*, the other 20 (20%) samples *B. melitensis* from these 25 (25%) samples.

In Ring tests searched in milk, in 35 samples (35%) have a positiveness. These 15 (15%) are from cows, 20 (20%) are from sheep milk. However, with the Whey-AT tests 15 samples (15%) have positiveness. Too.

Keywords: Milk, Cheese, Brucella, Ring Test.

1.GİRİŞ

Brucella cinsi bakteriler ile oluşan ve Ondülan ateş, Malta Humması, Akdeniz Humması, Bang hastalığı gibi isimlerle bilinen bruselloz insan ve hayvanlarda ciddi klinik tablolara ve ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır (1).

İnsanda hastalık yapan dört türü vardır. *B.melitensis*, *B.suis*, *B.abortus* ve *B.canis*. Bu bakteriler esas olarak hayvanlarda genital organ, meme bezleri ve plasenta infeksiyonlarına yol açarlar. *B.abortus* sığırlarda, *B.canis* köpeklerde, *B.melitensis* ise koyun ve keçilerde hastalık oluşturur. Nükleik asit incelemeleri ile aslında bu dört türün *B.melitensis*'in biovarları olduğu anlaşılmıştır (1-4).

Brucella 'lar, insan ve birçok hayvan türünü infekte edebilen gram negatif, fakültatif intrasellüler bakterilerdir. Günümüzde özellikle patojenite ve konak seçimi göz önünde bulundurularak, 6 tür tanımlanmaktadır: *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.neotomae*, *B.ovis* ve *B.canis*. Dünyadaki en patojen *Brucella* türleri; insanlarda çok şiddetli infeksiyonlara yol açan ve koyun, keçi gibi hayvanlarda bruselloza neden olan *B.melitensis*, sığırlarda görülen brusellozun en önemli etkeni olan *B.abortus*, domuz brusellozunu oluşturan *B.suis* 'tir. Bu üç *Brucella* türü konaklarında düşüklere ve dolayısıyla büyük ekonomik kayıplara yol açarlar (1-3).

Zoonozlar toplum sağlığını etkileyen sorunlardan birisidir. Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de sayıları giderek artan zoonotik hastalıklar grubu içerisinde yer alan bruselloz eski bir tarihçesi olan ve hala güncelliğini koruyan bir hastalıktır. Ülkemiz gibi ekonomisi tarım ve hayvancılığa dayalı ülkelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (1).

Hastalık birçok organı tuttuğundan değişik klinik formlarda görülebilir. Klinik belirti ve bulgular çok çeşitlidir. Ateş, gece terlemesi ve eklem tutulumu olan kişilerde ilk akla gelmesi gereken hastalıklardandır (4-6).

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerle oluşan koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanların et, süt, idrar gibi vücut sıvıları, infekte süt ile hazırlanan süt ürünleri ve hayvanların gebelik materyali aracılığı ile insanlara bulaşabilen; titreme ile yükselen ateş, kas ve büyük eklemlerde ağrı ile seyreden bir zoonozdur (1-3).

Tüm infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi brusellozda da tanı etkenin direkt ve/veya indirekt yöntemlerle gösterilmesi esasına dayanır (1).

Bu çalışmada; Afyon yöresinden toplananan 100'er adet süt ve peynir örneğinden *Brucella* türlerinin izole edilmesi amaçlandı.

1.1.Tarihçe

Aristole'un (M.Ö. 382-322)'de domuzlarda ve koyunlardaki atıklardan bahsetmesi, 18.yüzyılın sonlarında Almanya'daki inek ve kısıraklardaki atıklara ilişkin değerlendirmeler ilk belgeler olup, 1804'te Leclainche ve Nocard atıkların bulaşıcı olduklarını, John Lawrence ise 1805 yılında ineklerde gebeliğin ilk dönemlerinde atıkların fazla olduğunu saptamışlardır (7).

David Bruce, Malta'da 1887 yılında genç bir askerin dalak pulpasından izole ettiği bakteriyi, deneysel olarak maymuna vermiş ve maymunda hastalığı meydana getirerek, bu etkene *Micrococcus melitensis* adını vermiştir. 1892'de Huges, bu etkeni *Streptococcus melitensis* olarak adlandırmıştır. 1886'da Nocard, atık yapan sığırlarda izole ettiği bu mikroorganizmalara *B. abortus* Bang adını vermiştir (7).

Bang ve Stribolt;1895'te fetal membranlardan ve uterus sıvılarından saf gram negatif *Bacillus*'u ayırarak bu organizmaların üreme için CO₂'e gereksinim duyduklarını ve ineklerde düşük yapan etkenin *B. abortus* olduğunu açıklamışlar ve bu etkene *Bacterium infectiosa Bang* (*Bacillus Bang*) adını vermişlerdir. Araştırmacılar, 1897 yılında etken izolasyonunu başarmışlar ve bunun saf kültürü ile sağlıklı hayvanlarda yeniden hastalığı meydana getirmişlerdir (7).

Mc Fedyan ve Stockman, 1909'da İngiltere'de bunu doğrulayıcı çalışmaları yapmışlardır. Zammit, ilk olarak 1905'te insanların keçi sütü ile infekte olduğunu ve keçilerin kan serumlarında bu etkene karşı özgül antikorların oluştuğunu bildirmiştir. Garcia ve İscara ilk olarak (1906), koyunlarda *Brucella* etkenini izole etmişlerdir. Domuzlarda bruselloz, ilk kez Macaristan'da Hutyra (1909) tarafından bildirilmiştir (7).

Mayer ve Show (1920), gerek insan gerekse sığır ve domuzdan izole edilen ve birbirine benzeyen bu üç etkenin aynı grupta toplanmasını ve bu konuda ilk önemli çalışmaları yapan İngiliz araştırmacı Dr. Bruce'un adına izafeten, bu grup bakterilere "*Brucella*" ve yaptığı hastalığa da "Bruselloz" adının verilmesini önermişlerdir (7).

B. ovis ise, ilk olarak Avusturalya'lı araştırmacı Gun (1942) tarafından incelenmiş, koçlardaki epididimite sebep olduğu ortaya atılmıştır. 1951'deki atıkların riketsiya bakterileri ile beraber olduğu bildirilmiş, 1952 yılında ilk izolasyon atık materyallerden ve koçların epididimitinden yapılmış ve ayrılan bu mikroorganizmanın *B. melitensis*'in bir mutanı olduğu düşünölmüştür (7).

B. canis, Aruner ve Carmichal (1967) tarafından, köpeklerin bulaşıcı düşük etkeni olarak izole ve identifiye edilmiştir (7).

Türkiye'de ilk bruselloz teşhisi, Golem ve Erdal tarafından bildirildiğine göre; Dr. Kural ve Akalın tarafından tedavi edilen bir askerin serumu ile serolojik olarak yapılmıştır (7).

Sığırlarda ilk olarak bruselloz, sığır ithali ile görölmeye başlanmıştır ve ilk izolasyon da Berke tarafından 1931 yılında yapılmıştır. Golem, 1943 yılında Türkiye'de insanlarda ve hayvanlarda bruselloz serolojik teşhisini ilk kez yapmıştır (7).

1.2.Genel Özellikleri

Filogenetik olarak *Brucella* cinsi, bakterilerin *Rhizobiaceae* grubuna aittir. Ayrıca *Proteobacteria* sınıfının α -2 alt sınıfı ile yakın olarak alakalıdır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, bilinen 6 *Brucella* türü arasında %90'dan daha fazla benzerliği ortaya koymaktadır (1).

Brucella'lar kok, kokobasil veya kısa çomaklar halinde olup hafif konveks ve uçları yuvarlaktır. Özellikle üreme sıvı besiyerlerinde 4-6'lık zincirler halindedir. Boyutları 0.5-0.7x0.6-1.5 μ civarındadır. Gram negatif, sporsuz ve hareketsizdirler, kirpik meydana getirmezler, aside dirençli değildir. Aerob şartlarda iyi ürerler, CO₂ ile üremeleri artırılır. Özellikle *B.abortus* ilk izolasyonda %5-10 CO₂'li ortama gereksinim duymaktadır (3,4-6).

Kolonileri küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, şebnem tanesine benzeyen, kaygan S şeklinindedir (7). Ekzotoksin meydana getirmezler. Küçük olduklarından, moleküler hareket nedeniyle yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). İlk izolasyonda S tipi koloni , eski kültürlerinde R tipi koloni oluşur (3,8).

Adi boyalarla kolayca boyanırlar. Modifiye Ziehl-Nelsen'de kırmızı görünürler. Optimal üreme ısı 37°C olmakla birlikte, 10-40°C'de de üreyebilirler. İnkübasyonda 2-3 gün sonra kolonileri görülebilir. Zengin besiyerlerinde düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak koloniler oluştururlar. Kolonileri hemolizsiz ve pigmentsizdir. *B.melitensis* ve *B.abortus*'un bazı kolonileri eski kültürlerde esmer renkte görülebilir. *B. ovis* ve *B. canis* kolonileri normal olarak, pürüzlü, R koloni şeklindedir. *Brucella* cinsindeki bakteriler katalaz ve oksidaz pozitifler. Karbonhidratlardan asit ya da gaz oluşturmazlar. Metil red, Voges-Proscauer negatifler. Ayrıca nitratları; nitritlere çevirirler (1,3,6,8).

Somatik A ve M antijeni ayrıca bir yüzeyel L zarf antijeni bulunur (9). Bakteri ısı ve dezenfektanlara duyarlıdır. *Brucella* bakterileri; 60°C'de ısıtılmakla 10 dakikada, %1 fenol eriyiğinde ise 15 dk'da ölürlür. Süt içinde 17 gün , tereyağında 142 gün canlı kaldığı, dondurmalarda 1 ay, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, çeşme suyunda 8°C'de 57 gün, 25°C'de ise 10 gün canlılığını koruduğu, insan idrarında en az 7 gün, hayvan dışkısında açıkta 100 gün canlı kaldığı bildirilmiştir (8). Sığır feçesinde 824 gün canlı kaldığı gösterilmiştir (1,3,8).

İlk izolasyonda oldukça yavaş üreyen bakterinin kolonileri 48 saat sonra görülebilir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen brucella besiyerleri; Serum Dekstroz Agar (SDA), Serum Patates İnfüzyon Agar, Trypticase Soy Triptase Agar ve Kanlı Agardır (3,8).

Brucella Türleri:

***B.melitensis*:** Koyun, keçi, sığır ve insanlarda bruselloza neden olur.

***B.abortus*:** Sığır, koyun, keçi, domuz ve insanlarda enzootik yavru atma hastalığı ve bruselloza neden olmaktadır.

***B.suis*:** Domuz, koyun ve keçilerde hastalık yaparlar. 4. biyotip *Brucella* rangifer ren geyiklerinde hastalık etkenidir (9).

***B.ovis*:** Koçlarda epididimit etkenidir.

***B.neotomae*:** *Neotoma lepida* adlı çöl faresinden izole edilmiştir. İnsanlarda ve evcil hayvanlarda hastalık yaptığı gözlenmiştir.

***B.canis*:** Köpeklerde ve insanlarda bruselloz yapar (9).

Tablo 1.*Brucella*'nın bazı türlerinin önemli özellikleri (9)

| TEST | B. melitensis | B. abortus | B. suis |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|----------------|
| 1/50.000'lik tiyonin'de üreme | + | - | + |
| 1/25.000'lik bazik füksinde üreme | + | + | - |
| 1/50.000'lik Metil Viole'de üreme | + | + | - |
| 1/100.000 lik Pironin'de üreme | + | + | - |
| Maltoz'dan asit oluşturma | - | - | + |
| Mannoz'dan asit oluşumu | - | + | + |
| Ramnoz'dan asit oluşumu | - | + | - |
| İnozitol'den asit oluşumu | - | + | - |
| Trehaloz'dan asit oluşumu | - | - | + |
| CO ₂ 'ye ihtiyaç | Yok | Var | Yok |
| H ₂ S oluşumu | 1 günde | 2 günde | 3-5 günde |
| Üreyi hidrolize etme | Değişken | 1-2 saat | 0-30 dakika |
| A antijeni bulunma oranı | Az | Çok | Çok |
| M antijeni bulunma oranı | Çok | Az | Az |
| L antijeni bulunması | Yok | Var | Yok |

1.3. Antijenik yapı:

B.melitensis, *B.abortus* ve *B.suis*, A (abortus) ve M (melitensis) olarak isimlendirilen, ısıya dayanıklı, aglütinasyon reaksiyonlarından sorumlu, yüzey antijenlerine sahiptirler (3,8,9,10).

B.abortus ve *B.suis*'de A antijeni fazla, M antijeni az, *B. melitensis*'de ise M antijeni fazla, A antijeni az miktarda bulunur. Bu miktarlar oran olarak ifade edildiğinde, *B.abortus* ve *B.suis*'de A'nın M'ye oranı 20/1 iken, *B.melitensis*'de bu oran 1/20'dir. Görüleceği gibi serolojik metotlar ile *B.melitensis*'i *B.abortus* ve *B.suis*'ten ayırt etmek olası görülememektedir (9).

Brucella'ların, ayrıca *Salmonella*'ların Vi antijenlerine benzeyen, L antijenleride gösterilmiştir. Daha çok *B.abortus* tiplerinde bulunmuş olan L antijeni, yeni izole edilen bakterilerde var olup, onların immün serumlarla aglütinasyonuna

engel olmaktadır. Bu olay, serumlar 100⁰C'de yarım saat ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadır(3-8).

Brucella cinsi bakteri antijenlerinin *Yersinia enterocolitica*, *Franciella tularensis* ve *Vibrio cholera* gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır. *Brucella*'ların antijen yapısında S-R koloni değişikliğine bağlı olarak farklılıklar bulunur. R kolonilerin bakterileri, tripaflavinin sudaki 1/1000 eriyiği ile cam üzerinde kümelenme özelliği gösterirler (3-8).

Ayrıca S-R koloni değişikliği en iyi Gliserol Dekstroz Agar'da dört gün üretildikten sonra üzerlerine önce amonyum oksalat-kristal viyole boyası damlatılıp, üstten oblik aydınlatma ile kolonilerin incelenmesi ile anlaşılır. Bu durumda S koloniler soluk sarı renkte görülürken, R kolonileri kırmızı renkte ve granüllü görünümde dirler. Bu koloni ayırımını antijen hazırlanması için S kolonilerinin seçiminde önemi vardır (8,9).

B. melitensis, *B.abortus*, *B.suis* türleri; majör yüzey antijeni olarak, O zinciri içeren smooth lipopolisakkarit (S-LPS) taşıdıklarında smooth (S), O zinciri bulunmayan rough lipopolisakkarit (R-LPS) varlığında ise rough suşlar (R) olarak ortaya çıkarlar. *B.ovis* ve *B.canis* majör yüzey antijeni olarak R-LPS taşıdıklarından dolayı R suşlardır (1,14,15).

En önemli virülans faktörü S-LPS'tir. S-LPS'nin yapısındaki O zinciri *Brucella* hücre yüzeyinin en önemli antijenik yapısını oluşturur. Ayrıca infekte vücutta antikor cevabı için immünodominant olup, günümüzde S *Brucella* suşları tarafından oluşturulan infeksiyonların serolojik tanısı için kullanılan testlerde major antijenik yapıdır (13,14).

Lipopolisakkaritlerin yanı sıra, *Brucella*'nın dış membranı major dış membran proteinleri tarafından (Outer Membrane Proteins-OMPs) oluşturulur. Mikroorganizmanın yüzeyinde koruyucu özelliğe sahip iki immunojenik fraksiyon bulunmaktadır: Sodyum Dodesil Sulfat Insolubl (SDS-I) hücre duvarı fraksiyonu ve sıcak tuzlu su (Hot saline= HS) ekstraktı (13).

B.abortus'un SDS-I fraksiyonu moleküler ağırlıkları 25-27 (Grup 3) ve 36-38 kDa (Grup 2) olan, ayrıca peptidoglikanla sıkıca bağlı iki büyük membran proteini tarafından oluşturulur. Grup 2 proteinleri porin proteinleri olarak adlandırılır.

B. melitensis'in SDS-I fraksiyonu yine peptidoglikanla sıkıca bağlı, 31-34 kDa (Grup 3) ağırlığında başka bir majör OMP içerir. Dış membran proteinlerinin immunojenik özellikleri zayıftır ve kendilerine karşı heterojen bir antikor cevabı oluşur. Bu türlerde asıl immunojenik cevap, S suşlarında SDS-I fraksiyon yapısının %1'den daha azını oluşturan S-LPS tarafından sağlanır (1).

B. ovis doğal olarak bir R patojen olup yüzeyinde O zinciri taşımaz. *B. ovis*'in HS eksraktı antijenik özelliğe sahiptir. Bu eksrat R-LPS ve Grup 3 proteinlerinin daha baskın olduğu major membran proteinleri tarafından oluşturulur. Grup 3 proteinlerinden özellikle 31-34 kDa ağırlığında olanlar, *B. ovis* infeksiyonlarında kuvvetli bir antikor yanıtı oluştururlar (1,13).

Major dış membran proteinlerinden 36-38 kDa ağırlığında olanlar Grup 2 porin proteinleri, 25-27 kDa ve 31-34 kDa ağırlığında olanlar Grup 3 proteini olarak isimlendirilirler ve immünojenik özellikleri azdır. Özellikle 31 kDa ağırlığındaki Grup 3 proteini, *B. ovis* infeksiyonlarında antikor yanıtından sorumlu olan dış membran proteini. Son zamanlarda 25-27 kDa'daki dış membran proteinlerinin *B. melitensis*, *B. abortus*, ve *B. suis*'in virulansında rol oynadığı da gösterilmiştir. Omp 25 genlerinin uzaklaştırıldığı mutant suşlar aşılama çalışmalarında kullanılmaktadır (1).

1.4. Patogenez ve Patoloji

Brucella ağız mukozasından girerse lenf yolları ile boğaz, bağırsak mukozasından geçerse mezenter lenf bezleri konjunktiva ve deriden girerse lenf nodüllerine yerleşir. Sonra ductus yolu ile kana ulaşarak bakteriyemi meydana getirirler ve lenf bezleri, karaciğer, kemik iliği ve diğer retikuloendoteliyal sistemde (RES), 0.2-2 mm çapında ufak nodül şeklinde foküsler yaparlar (3,8,16).

Brucella fakültatif intrasellüler bir patojen olup, konakçının fagositik hücreleri içinde çoğalabilir(10-13). Fagosit edilen bakterinin PMN'in intrasellüler öldürme mekanizmalarından nasıl kurtulduğu tam olarak anlaşılmamıştır(16).

Fagosit içindeki bakteriler aynı zamanda antikorlar ve çeşitli antibiyotiklerden de korunabilir. Fagozom adı verilen bu fagositler lenf bezleri, karaciğer, dalak, kemik iliği sinüzoidlerini doldururlar. Burada çatlayan fagositlerden

açığa çıkan bakteriler bu kez sinüzodlerin retikuloendotelyal hücreleri tarafından yutulur. Bunların harap olması ile artık bakterinin üremesi durur (3,12-14,16).

İnfeksiyonun bu patogeneze uygun olarak subakut ve kronik bir gidişi vardır. *Brucella* bakterilerine karşı tam olmayan kazanılmış immünite gelişir. Humoral immün cevap; serumdaki bakteriyolizin, presipitin ve aglütininlerle hücresele immünite kazanılmış immünite ile beraberdir (15,16).

Özellikle karaciger, dalak ve kemik iliğinde epiteloide hücreler, plazma hücreleri ve mononükleer hücrelerle çevrili granülomlar oluşur. Nonkazifiye olan bu granülomlar brusellozdaki karakteristik histopatolojik görünümü oluşturur (3,14,15).

1.5. İmmünoloji

Brusellozda hem humoral hem de hücresele immünite rol oynar. Humoral immünitenin oluşması reinfeksiyondan korunmayı sağlar. Bununla birlikte, brusellozun bakterisidal fazı hücresele immünitenin oluşmasıyla gerçekleşir (10).

Spesifik immün yanıt başlarken doku makrofajları ve kanda dolaşan monositler çoğalır. İnfeksiyon, T lenfositlerin toplanması ve makrofajların bakterisidal mekanizmalarını aktive edici lenfokin salgılanması ile kontrol altına alınır (3,8).

Hücresele immünitenin oluşması esnasında *Brucella*'nın protein antijenlerine karşı gecikmiş tip hipersensitivite gelişir. Gecikmiş tip hipersensitivite, infeksiyonu sınırlandıran doku granülomlarının oluşmasında önemlidir (10).

Bruselloza karşı humoral yanıt oluşurken önce IgM tipi antikorlar meydana gelir ve bunu 7-14 gün sonra IgG tipi antikorların oluşumu izler. Daha sonra her iki antikor titresi de yükselir. İyileşme döneminde IgG sınıfı antikorların titresi birkaç ay içerisinde düşer, buna karşılık düşük düzeyde IgM antikorları infeksiyonda birkaç yıl sonrada serumda bulunur. IgG tipi antikorların kalıcı olması ya da ikinci kez titrenin yükselmesi infeksiyonun devam ettiğini veya relapsı gösterir (10).

1.6.Klinik

Kuluçka süresi 1-3 hafta, arasında değişirse de, bazen 6 veya 7 haftayı bulmaktadır. Ateş yükselmesi, bazen titreme olabilmektedir. Hastalık gece terlemeleri, bitkinlik, daha çok diz, bel ve dirsek gibi klinik tablolar gösterebilir. Ateş özellikle *B. melitensis* infeksiyonlarında 10-15 gün 38⁰-39⁰C bazen daha uzun ateşsiz bir devreden sonra yeni bir dalga şeklinde tekrarlar(Ondülan tipte ateş). Geceleri ve sabaha karşı ateş düşmeleri ile birlikte terlemeler saptanır. Klinik olarak; subklinik, akut, subakut ve kronik bir seyir saptanır. Hastalık genellikle öğleden sonra artan halsizlik, iştahsızlık, myalji, artralji, ateş ve gece yarısından sonra artan bol terleme ile seyreder (17,18).

Akut vakalarda en sık rastlanan fizik muayene bulguları splenomegali, hepatomegali, lenfadenomegali ve omurga üzerine basmakla ağrı olmasıdır. Subakut vakalarda en belirgin belirtiler yorgunluk, sinirlilik, baş ve bel ağrısı, ondülan ateştir. Hastalık bir yıldan uzun sürdüğü takdirde hastalığın kronikleştiği kabul edilir (17,20).

Brusellozda merkezi sinir sistemi tutulması %2-5, endokard tutulumu %84, ürogenital sisteme yerleşme %2-40, karaciğer tutulumu %50, akciğer tutulumu %15-25, deri belirtileri %5, göz tutulumu sonucu oftalmopatiler, keratit, retinopati ve üveit gelişebilmektedir (17,18).

Değişik organ tutulumu ve geniş yelpazeli bir hastalık olan bruselloz tüm dünyada yaygın bir toplum sağlığı sorunudur. Gelişmekte olan ülkelerde yaygındır. Hayvanlarda temas derecesine bağlı olarak 20-40 yaş grubunda daha sık görülür (17,20).

Nadir olmakla beraber bruselloz kliniğinde psikiatrik bozukluklar, vaskülit, pnömoni, dermatit, döküntü, eritema nodosum, interstiyel nefrit, endokardit ve üveite rastlanmaktadır (17).

1.7. Brusellozun Klinik Formları

Bruselloz sistemik bir infeksiyon hastalığıdır. Hastalık bir çok organı tuttuğundan değişik klinik formlarda görülebilir. Klinik belirti ve bulgular çok çeşitlidir. Ateş, gece terlemesi ve eklem tutulumu olan kişilerde ilk akla gelmesi gereken hastalıklardandır (17,18).

Semptomların süresine göre brusellozun temelde üç farklı klinik formu vardır. Bunlar:

1. Akut
2. Subakut
3. Kronik

Bu klinik formların dışında asemptomatik, subklinik, fokal ya da komplikasyonlu, relaps veya reinfeksiyon şeklinde de görülebilir (3,17).

1.7.1. Akut Bruselloz: Hastalık belirtilerinin başlamasından sonraki sekiz haftalık süreye kadar olan dönemidir. Hastalık 2-3 haftalık bir inkübasyon süresi sonunda hafiften çok ağır seyirli toksik bir tabloya kadar değişik formlarda görülür. Hastaların yarısı ani başlangıç gösterir. Akut başlayan ağır seyirli bruselloz sepsis gibi değerlendirilebilir. Buna karşın hafif ve orta seyirli vakalar da influenza tablosuyla gelebilir. Bu vakalar da klinik olarak tanı koymak pek mümkün değildir (3,17).

Özellikle risk gruplarında yüksek ateş, terleme ve yaygın vücut ağrıları varlığında brusellozda ayırıcı tanı düşünülmelidir. Genellikle öğleden sonra yükselen intermittan veya remittan ateş görülür. Ateş; üşüme ve titreme ile yükselir, gece yarısından sonra bol terleme ile düşer ve 3-5 günlük ateşsiz dönemden sonra tekrar aynı ateş periyodu görülür. Ateş 7-10 günde yavaş yavaş düşer ve 3-5 günlük ateşsiz dönemden sonra tekrar aynı ateş periyodu görülür.

Tarif edilen bu ateş şekli, bruselloz için tipik ondülan ateş trasesi olarak tanımlanmakla birlikte, pratikte ondülan ateşe sık rastlanmamaktadır (3,17,18).

Çocuklarda ondülan ateş genellikle görülmez. Erişkinde ise uzun süre tedavisiz hastalığı olanlarda daha çok rastlanır. Bruselloz, hayvan plasentasındaki eritriole affinite gösterir. İnsanlarda ise eritriol miktarı azdır. Hayvanlarda spontan abortuslara sebep olabilir. İnsanlarda abortusa neden olsada bu diğer bakteriyel infeksiyonlardan daha sık değildir (18).

1.7.2. Subakut Bruselloz:

Subakut bruselloz 2 aydan 1 yıl süreye kadar olan hastalık dönemine denir. Akut bruselloz vakalarının tedavi edilmeyen bir kısmı subakut döneme geçebilir yada hastalık subakut şekilde başlayabilir. Orta derecede artrit ve epidimoorşit bu dönemde daha sık görülür (17,18).

1.7.3. Kronik Bruselloz:

Semptomların tanıdan sonra bir yıldan daha fazla sürmesidir. Belirtiler genellikle çok ağır değildir, semptomlar siliktir. Klinik tanı oldukça güçtür. Olguların %85'i asemptomatiktir. Relaps ve komplikasyonların olduğu dönemdir. Kronik form çocuklarda nadirdir. Erişkinlerde baş ağrısı, halsizlik, depresif ataklar, uykusuzluk, emosyonel labilite ile kronik yorgunluk sendromu sık görülür. Hafif lenfadenomegali vardır. Fizik bulgular akut veya subakut vakalardaki kadar zengin değildir (17,18). Kronik bruselloz dört şekilde ortaya çıkabilir;

1. Sinsi seyredebilir
2. Akut hastalık sonrası tekrarlayan relapslar
3. Kalıcı hastalık
4. Fokal organ tutulumları

1.7.4. Asemptomatik-Subklinik Bruselloz:

Hastaların subklinik, klinik bruselloz geçirme oranları değişir. Semptomsuz meslek hastalığı şeklinde yalnız serolojik olarak belirlenebilir. Çocuklarda bir kısım vaka asemptomatik seyirli olabilir (17,18).

1.7.5. Relaps-Reinfeksiyon:

Bruselloz tam tedavi edilmesine rağmen %5'in üzerinde relaps görülür. Genellikle hastalıktan 3-6 ay sonra gelişir. Tedavili veya tedavisiz iyileştikten sonra yeniden akut olarak başlar. Yüksek ateş veya daha şiddetli semptomlarla seyredebilir. Relaps ve reinfeksiyonun ayırt edilmesi zordur. Hastalarda humoral ve hücrel cevap olduğu halde oluşan antikorların koruyuculuğu yoktur (17,18).

1.7.6. Fokal Bruselloz:

Bruselloz lokal bir organı tutabilir. Fokal bruselloz; genellikle sistemik hastalığın belirli bir organda daha fazla yakınma ya da komplikasyonun göstergesidir. Akut bruselloz vakalarının dışında hemen her sistemi tutan fokal formuna rastlanabilir (17,18).

1.7.7. Osteoartiküler Tutulumu:

Brusellozun en sık görülen fokal formudur. Kemik ve eklem yakınmaları tüm brusellozlu hastaların %20-85'inde rastlanır. Eklem bulguları hastalığın 3. ve 4. haftasında en siktir. Spontan ağrı dışında hareketle de duyarlılık artar. Tedavi başladıktan sonra kısa süre içerisinde şikayetler azalır veya kaybolur. Artrit, spondilit, osteomyelit, tenosinovit ve bursit görülebilir. Osteoartiküler tutulumu olan hastaların %80'inde sakroileit veya spondilit vardır. Spondilit ileri yaşlarda, sakroileit daha çok gençlerde görülür. Spondilit genellikle hastalığın 1-2. ayında ortaya çıkar. En sık lomber ve torasik vertebraları tutar. Sırt ve bel ağrısı olan hastaların çoğunda sakroileit vardır. Periferal artrit siktir. Diz ve kalça eklemi en sık tutulur. Büyük eklemlerde süpüratif veya reaktif artropatiler görülebilir. Sinoviyal sıvıdan *Brucella* izole edilebilir. Osteomyelit nadirdir, en çok vertebralarda görülür ve spinal tüberkülozu taklit eder. Spinal brusellozda gereğinde cerrahi girişim uygulanabilir (17,18).

1.7.8. Gastrointestinal Sistem Tutulumu:

Vakaların %70'inden fazlasında gastrointestinal sistem tutulumu olur. İştahsızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma, diyare veya kabızlık olabilir. Akut veya kronik seyirli vakaların %30-60'da karaciğer fonksiyon testlerinde 1.5-2 kat artış vardır. Hastaların %15-60'ında yumuşak hassas hepatomegali bulunur. Nadir olarak hastalar kolesistit, pankreatit ve spontan bakteriyel peritonit gelişebilir. Akut ileit ve kolit tabloları bildirilmiştir. Karaciğer ya da dalak absesi varlığında cerrahi girişim gerekebilir. Karaciğerde granulomlarla seyredebilir. Safra akımını bozarak sarılığa sebep olabilir. Gastrointestinal tutulumu belirgin olanlar salmonellozla karışabilir (3,17,18).

1.7.9. Sinir Sistemi Tutulumu:

Nörolojik tutulum sıklığı %2-25 arasında bildirilmiştir. Meningosefalit, myelit, periferik nöropati, radükülit, nevrit yapabilir. Kronik hastalarda depresyon ve mental bozukluklar olabilir. Merkezi sinir sistemi tutulumu hastaların %2-5’de ortaya çıkar. Kendini genellikle meningosefalit şeklinde gösterir. *Brucella* menenjitinde, beyin omurilik sıvısının (BOS) tetkikinde çoğu lenfosit olan hücre artışı, proteinde artma, glikoz normal veya hafif düşüktür. BOS’tan izolasyonu zordur ancak spesifik antikorlar bulunur. BOS antikor seviyesi kandakinden daha düşüktür (17,18).

1.7.10. Ürogenital Sistem Tutulumu:

En sık rastlanılan ürogenital sistem tutulumu tek taraflı epididimoorşittir. İdrar kültürü genellikle negatiftir. Bruselloz oldukça seyrek olarak akut interstiyel nefrit, pyelonefrit, prostatit, fokal ve diffüz glomerülonefritler ve böbrek abselerine yol açabilir. Kadınlarda salpenjit, servisit, pelvik abse görülebilir. Böbrek parankiminde tüberküloza benzer granülamatoz lezyonlara ve kalsifikasyonlara neden olabilir (3,18).

1.7.11. Deri ve Yumuşak Doku Tutulumu:

Brusellozlu hastaların %5’inde cilt bulguları bulunabilir. Çoğu nonspesifik geçici olan eritema nodosum, eritem, peteşi, ürtiker, impetigo, raş, skarlatiniform döküntü ve kutanöz vaskülit tanımlanmıştır. Yumuşak doku ve subkutan abseler görülebilir. Lezyonlar genelde kaşıntısız, yüz avuç içi ve tabanlara yayılmıştır. Direk inokulasyon, hipersensivite, immünokomplekslere veya hematolojik komplikasyonlar sonucu gelişebilir. Hayvan bakıcıları ve veterinerlerde temas lezyonları şeklinde görülebilir (3,17).

1.7.12. Kardiyovasküler Sistem Tutulumu:

Hastaların %1-2’inde kardiyovasküler tutulum bildirilmiştir. Bruselloz sırasında endokardit, myokardit ve perikardit gelişebilir. Endokardit %2’den az vakada olur. Fokal brusellozun en sık ölüm nedenidir.

En sık aort sonra mitral kapak tutulur. Hastalarda uzun süreli ilaç tedavisinin yanında hemodinamik bozukluk varsa cerrahi girişimde gerekebilir. Perikardit endokarditin bir komplikasyonu yada primer perikardit şeklinde olabilir (3,17,18).

1.7.13. Solunum Sistemi Tutulumu:

İnhalasyonla veya bakteriyemi sonucu etken akciğere yerleşebilir. İnfluenza benzeri semptomlarla, kuru veya yaş öksürük olabilir. Öksürük her zaman akciğer tutulumunu göstermez. Bruselloza bağlı bronşit, pnömoni, hiler lenfadenopati, granülamatoz lezyonlar, plevral epanşman, pnömotoraks, ampiyem ve akciğer absesi bildirilmiştir (18).

1.7.14. Hematolojik Tutulumu:

Brusellozun hematolojik komplikasyonları hafif anemiden hipersplenizme bağlı pansitopeniye kadar geniş bir spektrum gösterir. Seyrek olarak hemolitik anemi ve dissemine intravasküler koagülasyon gelişebilir. Hastalarda burun kanamaları ve purpurik döküntüler olabilir. Lenfadenopati %10-20 vakada tespit edilir (17).

1.7.15. Göz Tutulumu:

Bruselloz gözün tüm tabakalarını tutabilir. Papillit, papilla ödemi, keratit, retinopati, nevrit, üveit yapabilir (3,17).

1.8. Tanı

Brucella cinsi bakterilerin hücre içi paraziti olması, insanlarda klasik belirtileri dışında her türlü hastalığı taklit etmesi, bakteri izolasyonundaki bazı güçlükler, son olarak tiplerin alışılmış serolojik ve fizyolojik yollarla birbirinden ayırmanın zorluğu, hastalığın klinik ve serolojik tanısında bazı güçlükleri beraberinde getirmektedir (3,8).

Rutin laboratuvar incelemelerinde; sıklıkla, anemi, lökopeni; lenfomonositoz, nadiren trombositopeni, hemolitik anemi, yaygın intravasküler koagülasyon, pansitopeni şeklinde hematolojik bozukluklar gözlenmektedir. Komplikasyonlu durumlarda lökositoz ve polimorf nüveli lökosit (PMN) egemenliği hakim olabilir

Karaciğerde sık yerleşim gösterdiklerinden karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler saptanabilir. İdrarda febril albüminüri, ürobilinojen artışı görülebilir (3,5,8).

Brucella cinsi genetik olarak benzerlik gösteren altı tür içermektedir. İnsan infeksiyonlarından *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* ve ender olarak da *B. canis* türleri izole edilmektedir. *B. ovis* ve *B. neotomae* diğerlerinden fenotipik farklılıkları olan ve insanlardan izole edilmeyen türlerdir (3,5,8).

Aerop, gram negatif kokobasiller olan *Brucella*'ların rezervuarı sığır, domuz, keçi, koyun, bizon geyik, köpek ve kurt gibi evcil ya da yabani memelilerdir (3). İnsan brusellozunun klinik belirtilerinin çeşitliliği ve çoğu kez sinsi seyretmesi ile klinik tanıda güçlükler neden olduğundan, kültürde etkenin kendisinin ya da moleküler yöntemlerle nükleik asitlerinin gösterilmesi ya da bakterinin antijenlerine karşı oluşan immün yanıtın saptanması gerekmektedir (7). Bakteriyolojik izolasyon temeline dayalı direkt yöntemler hemen her yerde kullanılan, ancak zor, zaman alıcı ve bakterinin laboratuvar çalışmaları sırasında solunum yoluyla kolayca bulaşma özelliğinden dolayı tehlikelidir (8,19,20).

Şarbon, veba, tularemi, Q ateşi etkenlerinin yanı sıra *Brucella* bakterileri de kolay bulaşmaları ve yaptığı hastalıkların çok çabuk yayılması nedeniyle terörist ülkelerinin kullanabileceği biyolojik saldırı araçları arasında sınıflandırılmışlardır (1,3,5,8,10).

Tanıda hastanın hikayesi, fiziki muayenesi, radyolojik bulgular ve laboratuvar verileri gereklidir. Kesin tanı mikrobiyolojik yöntemlerden elde edilen bulgular sonunda konulabilmektedir. Tanıda kullanılan tekniğin duyarlılığı genellikle örnek içerisinde bulunan mikroorganizmaların sayısına bağlıdır. Özgüllüğü ise; spesifik organizmanın mikroskopik olarak morfolojisinin diğer mikroorganizmalardan farklı olup olmamasına, antikor ya da genetik probun cins ya da türe özgü olup olmamasına bağlı olarak değişmektedir. Çok çeşitli ve diğer hastalıklarda da olan klinik belirtilere neden olan insan brusellozunun tanısında mikrobiyolojik yöntemlerden alınan sonuçlar ışığında bile zorluklar yaşanabilmektedir (3,5,8,9,19,20).

1.8.1. Bruselloz Tanısında İncelenecek Örnekler:

Brucella spp. kültürü yönünden incelenen örneklerin başında kan ve kemik iliği, daha az olarak da dalak ve karaciğer biyopsileri, abse, BOS, eklem, periton ve perikard sıvıları ve idrar örnekleri gelmektedir (3). Serolojik çalışmalar amacıyla en sık alınan örnek ise serumdur. Akut dönemde serolojik çalışmalar için serum örnekleri hastalığın başlangıcında; iyileşme döneminde ise akut dönemde 21 gün sonra alınması uygundur. Kültür için alınan bakteriyolojik örnekler en geç 2 saat içerisinde uygun besiyerlerine ekilmelidir. Eğer bu süre içerisinde ekimlerin yapılması mümkün olmayacaksa 4-10⁰C'de saklanması gerekmektedir (19,20).

Rutin laboratuvar incelemelerinde; sıklıkla, anemi, lökopeni; lenfomonositoz, nadiren trombositopeni, hemolitik anemi, yaygın intravasküler koagülasyon, pansitopeni şeklinde hematolojik bozukluklar gözlenmektedir. Komplike edilmiş durumlarda lökositoz ve segment egemenliği hakim olabilir. Karaciğerde sık yerleşim gösterdiklerinden karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler saptanabilir. İdrarda febril albüminüri, ürobilinojen artışı görülebilir (19).

Bruselloz tanısında kullanılan başlıca yöntemler:

1. Kültür Yöntemleriyle etkenin izolasyonu
2. İndirekt Tanı Yöntemleri
 - Tüp Aglütinasyon Testleri
 - Spot Test
 - Kompleman Birleştirme Testi
 - Brucellacapt Testi
 - Brucella Dipsitik Test
 - Hızlı Aglütinasyon Testleri
 - Enzyme Linked Immunosobent Assay (ELISA)
 - Immuno Floresan Tekniği (IFA)
 - Radioimmuno Assay (RIA)
 - Floresan Polarizasyon Deneyi (FPD)
 - Deri Testleri

- Opsonositofajik Test
- 3. Moleküler Yöntemlerle *Brucella* Antijenlerinin ve DNA'sının Aranması
- 4. Deney Hayvanlarına İnokülasyon

1.8.2. 1. Kültür Yöntemleriyle Etkenin İzolasyonu:

Fakültatif hücre içi paraziti olan *Brucella* bakterilerinin kültürden izolasyonu 7-21 gün arasında bir zamanı gerektirmektedir. Rutin kültürler bir hafta boyunca takip edilerek süre sonunda üreme saptanamaması halinde negatif sonuç bildirilir. Bu bakterilerin optimal ısı gereksinimleri 35⁰C dolaylarındadır. Özellikle *B. abortus*'un ilk izolasyonunda %10 CO₂ içeren atmosferik koşulların tercih edilmesi uygundur. Steril olmayan vucüt bölgelerinden alınan örneklerin kültürünün, kontamine flora bakterilerin üremesini engellemek için seçici besiyerlerinde yapılması uygun olmaktadır. Et ekstresi, triptoz, glikoz ve tuz içeren ortamlarda birçok türünün izole edilebilmesine rağmen bir çoğu da tiamin, niasin, nikotinik asit, biotin ve serum gibi maddelerin varlığında üreyebilmektedir. *Brucella*'ların üretiminde; %5 koyun Kanlı Agar, Triptoz Agar, Triptikaz Soy agar, Serumlu Dekstroz Agar, Gliserol Dekstroz Agar ve kan kültürü şişeleri kullanılan besiyerlerinden bazılarıdır (19).

Castaneda besiyeri olarak bilinen nonselektif bifazik besiyeri kan ve diğer vucüt sıvıları ya da süttten *Brucella* izolasyonunda tercih edilen besiyeridir. Tüm temel ortamlar *Brucella* bakterilerinin dışındaki organizmaların üremesini engellemek için antibiyotik ilave edilerek seçici hale getirilebilir. Bu amaçla, belirli oranlarda Polimiksin B, Basitrasin, Sikloheksimid, Nalidiksik asit, Nistatin, Vankomisin içeren antimikrobik komplekslerin kullanılması uygun olmaktadır (19, 22).

Brucella türlerinin direkt izolasyonu ve kültürü amacıyla genellikle katı besiyerleri tercih edilmektedir. Katı besiyerlerinin en önemli avantajlarından birisi gelişen bakteri kolonilerinin morfolojisinin incelenmesi ile tanıya katkı sağlamasıdır. Katı yüzeyde elde edilmiş kolonileri 1-2 mm çapında, nonhemolitik, şebnem tanesine benzer saydam, küçük kabarık, S tipi kolonilerdir. Yavaş üreyen bakterinin kolonileri 48 saat sonra gözle görülebilir büyüklüğe erişmektedir. Koloniler eskidikçe çapları büyür ve matlaşır. Gram boyamada çok küçük, zayıf boyanan gram negatif

kokobasiller şeklinde gözlenir. Gram morfolojisi *Franciella tularensis* ile benzerlik gösterir. Kolonilerine uygulanan oksidaz ve katalaz testlerinden pozitif sonuç alınır. Hareketsiz olan organizmalar nitrat redüksiyonu yapar. Christian Üre Agar'ında *B. suis* için bir saat, *B. abortus* ve *B. melitensis* için 24 saat içerisinde üreaz aktivitesi olumlu olarak saptanır (19, 20).

Kan Kültürü:

İnsan brusellozunda *Brucella*'lar en çok akut dönemde kan kültürü incelenmesi ile elde edilebilirler.

Kan kültüründe dikkat edilmesi gereken noktalar:

1. Bruselloz nedeniyle ortaya çıkan ateşin ikinci gününden sonra kan kültürlerinden olumlu sonuçlar alınabilmektedir. Olumlu sonuç elde edebilmek için farklı zamanlarda alınan birden fazla kan kültürünün yapılması uygundur (3).Yapılan kültürlerden alınan pozitif sonuçların oranı yöreden yöreye ve laboratuvaradan laboratuvara oldukça değişmektedir. Ateşin yüksek olduğu dönemde izolasyon sıklığı fazla ise de bunun dışında da sonuç alınabilir.
2. Kan aseptik koşullarda ya antikoagülanlı tüpe alınıp hemen laboratuvara gönderilip ekimi yapılmalı, ya da daha iyisi antikoagülanlı hazırlanmış besiyerlerini hasta başına götürerek doğrudan ekim yapılmalıdır.
3. Selektif olmayan sıvı besiyerleri kullanılır. Sıvı besiyerine (50-100 ml) fazlaca (5-10 ml) kan ekilmelidir. Ekimlerden birisi CO₂'li ortama konulmak üzere çift yapılmalıdır.
4. Sıvı ekimlerde ikinci günden itibaren 2-3 günde bir katı besiyerlerine aktarmalar yapılarak 37⁰C'de bekletilip koloni oluşup oluşmadığı izlenir. Bu aktarmalar da 2-3 hafta bekletilerek incelenmelidir.
5. *Castaneda* yöntemi bu bakımdan en pratik yöntem olup 120ml'lik dört köşe şişelerde kullanılacak besiyerinin agarlı katı şekli yatık olarak, ayrıca 20-30 ml aynı besiyerinin sıvı şeklini bulunduracak şekilde hazırlanırlar. Kan ekimi sıvı kısma yapılır. 2-3 günde bir kez

eğmek suretiyle katı besiyeri yüzeyine bulaştırılıp yine dik durumda 37⁰C’de bekletilerek koloni oluşması izlenir.

6. Koloniler küçük, konveks, düz yarısaydam (donuk) durdukça esmerleşen kolonilerdir (8,19,20).

Kan kültürleri sadece sıvı ortamlarda (buyyon kültürü) ya da bifazik ortamlarda yapılabilmektedir. Buyyonda yapılan kan kültürleri bir ay inkübe edilerek *Brucella* bakterilerinin izolasyon şansının artırılması amaçlanır. Castaneda tarafından geliştirilen aynı kan kültürü şişesine sıvı ve katı besiyerini içeren bifazik ortamlarda kültürü yapılır. Besiyerine kan örneği ekildikten sonra, katı ortam üzerine sıvı besiyerinin geçmesini sağlayacak şekilde şişe eğdirilerek kanın besiyerine yayılması sağlanır. Şişe dik pozisyonda etüvde inkübe edilir ve üç gün boyunca her gün incelenir. Katı kısımda koloni oluşumu halinde alt kültürler yapılır. Eğer koloni oluşmamışsa yine üç gün boyunca inkübasyona tabi tutularak yeniden incelenir bu yöntemle genellikle kültür bir hafta içinde pozitif sonuç verir, 15 günden sonra pozitif sonuç almak nadirdir. Ancak olumsuz sonuçlar 21 günden sonra rapor edilmelidir (5,8,19,20).

Bakterilerin izolasyon süresini kısaltmak amacıyla "Lizis Konsantrasyon Yöntemi" uygulanmaktadır. Bu yöntemde ozmotik basınçla kan hücreleri lize edilerek hücre içi bakterilerin açığa çıkması sağlanır. Santrifügasyonla yoğunlaştıran bakteri süspansiyonu agar içeren besiyerine ekilir(19,20).

Brucella bakterilerinin fagosit hücreler içinde yaşamaları ve retiküloendoteliyal sistem (RES)’de lokalize olması nedeniyle kemik iliği, karaciğer ve lenf nodüllerinden izolasyonu daha kolay olmaktadır. Brusellozlu olguların kan kültürlerinden izole edilemeyen bakterilerin, kemik iliği kültürlerinden %20 oranında izole edildiği bildirilmektedir. Bu değerlerin istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmektedir. Kemik iliği kültürlerinden pozitif sonuç alma süresi kan kültürüne oranla daha kısa olmaktadır. Bakterilerin kültürden izolasyonunu sınırlayan en önemli faktörlerin başında antibiyotik kullanımı gelmekte, antibiyotik kullananlardan kemik iliği kültürlerinin yapılması durumunda daha olumlu sonuçların alındığı bildirilmektedir. Bu nedenle, bruselloz kuşkusu olan olgulardan kan kültürü negatifliği durumunda kemik iliği kültürünün yapılması önerilmektedir (5,8,20).

Brucella bakterilerinin izolasyonunda kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla ticari otomatik kan kültür sistemlerinden de yararlanılmaktadır (19).

Otomatik Kan Kültür Sistemleri:

Otomatik kan kültür sistemleri ile 2 gün gibi kısa sürelerde üreme saptandığı bildirilmiştir. Bakteriyemi bütün hastalarda görülmediği için üreme saptanmayabilir.

Hemokültürün başarısız olduğu durumlarda kemik iliği kültürü önerilir. Gutozza ve ark.'na göre; antibiyotik kullanmışlarda kan kültürü ile %50 olan izolasyon oranı kemik iliği kültürlerinde %90, antibiyotik kullanmayanlarda kan kültürleri ile %75 olan izolasyon oranı kemik iliği kültürlerinde %92.5'e kadar yükselmektedir. Yine bu araştırmacılara göre kemik iliği kültürlerinde 4.32 gün olan üreme zamanı, kan kültürlerinde 6.65 gün olarak bulunmuştur (15,19).

Brusellozun kesin tanısında kan, kemik iliği kültürleri ile bakterinin üremesi esastır. Ekimler çift yapılarak birisi normal atmosfer koşullarında diğeri %5-10 CO₂'li atmosferde üretilmelidir. Kültür pozitiflikleri %3-90 arasında değişmektedir. Yurdumuzda öncelikli antibiyotik kullanımı nedeni ile kandaki bakteri sayısının az olmasından bu oran düşük bulunmaktadır (19).

İlk izolasyonlarda bakteriler yavaş ürediklerinden 30 gün bekletilmeden, kültürler olumsuz diye atılmamalıdır. *Brucella* bakterilerinin kolonilerine benzeyen kolonilerden saf kültür yapılmalı ve CO₂'e ihtiyacı, H₂S oluşturma, tiyonin ve bazik fuksin'li besiyerlerinde üremeleri gibi testler uygulanmalıdır. Monospesifik A, M ve R serumları ile aglütinasyonuna bakılarak tanı konulabilir (19-21).

Brucella'lar ayrıca komplikasyon gösteren olgularda; BOS, eklem sıvısı, periton, perikard sıvılarından ve idrardan izole edilebilir (19-21).

1.8.3. 2. İndirekt Tanı Yöntemleri

Bu yöntemler hastalığa neden olan mikroorganizma ya da bu mikroorganizmanın antijenlerine organizmanın verdiği bağışık yanıt sonucu oluşan antikor ve otoantikorların serolojik olarak belirlenmesi; antijenlere karşı organizmada ortaya çıkan aşırı duyarlılığın (allerji) "deri testleri" ile araştırılması ile yapılan tanı yöntemleridir. Bruselloz tanısında kullanılan serolojik testlerde kolera, tularemi ve

yersinyoza karşı aşılantmışlarda ya da bu hastalıkları olan kişilerde ve ayrıca *E. coli* O:157 ve O:116, *Salmonella* (Kaufmann- White grup N), *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Yersinia enterocolitica* serotip O:9 ile çapraz reaksiyonlar alınabilmektedir (19-21).

Bruselloz tanısında sıklıkla kullanılan serolojik yöntemlerle antikor aranmasına dayanan indirekt tanı yöntemleri aşağıda verilmiştir:

a. Tüp Aglütinasyon Testleri:

Brusellozun tanısında kullanılan standart serolojik test, Standart Tüp Aglütinasyon (STA) testidir. Bu test ilk kez Wright tarafından 1897 yılında uygulanmıştır. Bu testin dezavantajı yoğun emek gerektirmesi ve diğer gram negatif bakterilere karşı oluşan antikorlarla çapraz reaksiyon vermesidir (19-21).

Farklı immunoglobülinlerin saptanması amacıyla 2- merkaptoetanol (2ME) testi ve Dithiothreitol testleri geliştirilmiştir. Bu testler IgM pentamerinin disülfid bağlarının indirgenmesini temel alan testlerdir. Serum 2ME ya da Dithiothreitol muamele edildiğinde IgG molekülleri etkilenmez fakat IgM molekülleri aglütinasyon yapma yeteneklerinin kaybeder. STA aglütinasyon yapan antikorların (IgG ve IgM) total miktarını belirlerken, 2ME testi bu maddeye dirençli olan IgG'nin tespitinde kullanılabilir. IgG antikorları aktif infeksiyonun bir göstergesi olmasından dolayı önemlidir (3,5,8,19-21).

STA testi 1/160 ya da daha yukarı titrelerde pozitif ise 2ME testinden genellikle pozitif sonuç alınmaktadır (3,5).

STA'da aglütinasyon vermeyen antikorları tespit etmek (blokan antikorların etkisini engellemek) için Coombs antiglobulin testi uygulanır. Coombs testinde sulandırımara anti-human gamaglobulini ilave edilir. Daha sonra bağlanmamış globulinler yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Test tüpleri yeniden inkübe edilir. STA'da alınan pozitiflik oranı ile karşılaştırıldığında bu test sonucu pozitif sulandırım oranında STA testine göre 4 kat gibi bir artış gözlenirse test sonucu pozitif olarak değerlendirilir. Brusellozda blokan antikorlar çok olduğu için bu teste pek fazla gereksinim duyulmamaktadır. Serum aglütinasyon testlerinin IgM, IgA ve

IgG antikorlarını birlikte tespit etme avantajı olmasına rağmen özellikle düşük titrelerde tanıdaki spesifitesi düşüktür. Serumun düşük sulandırımalarında ‘‘prezon olayı’’ ortaya çıkmakta ve aglütinasyon maskelenebilmektedir. Bu durumda STA testi yüksek dilüsyonla tekrar edilmelidir. Dilüsyon fazla olduğunda antikor konsantrasyonu azalarak aglütinasyon için optimum konsantrasyona ulaştığında aglütinasyon oluşabilecektir (3,5,8,10,19,20).

b. Spot Test (tam kan kullanılarak yapılan lam aglütinasyon deneyi):

Özellikle kitle taramalarında yoğun *Brucella* bakteri süspansiyonundan özel olarak hazırlanmış antijenin bir damlası üzerine parmak ucundan alınan bir damla tam kan damlatıldığında olumlu olgularda aglütinasyon görülür (8).

c. Kompleman Birleştirme Testi:

Hastalığın ileri evrelerinde ya da kronik hastalıkta predominant olan IgG antikorlarının tanısında önemli olmaktadır, fakat antikomplementer aktivitenin ortaya çıkması, kompleman gibi kararsız reaktiflerin kullanılması, hastalığın başlangıç dönemlerinde kompleman fiksasyonuna yanıtın tespit edilmesindeki yetersizlik ve teknik gereksinimler gerektirmesi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir (3,8,19).

d. Brucelacapt Testi:

İmmuncapture-aglütinasyon tekniği temelinde insan brusellozunun tanısı için yeni bir test olan Brucelacapt testi Orduna ve Ark.(5) tarafından geliştirilmiş ve başlangıç serumlarından Brucelacapt ve CB test pozitif olduğu gösterilmiştir (4,20).

e.Brucella Dipsitik Test:

Brucella spesifik IgM antikorlarının araştırılması için basit dipstik kiti geliştirilmiştir. Dipstik ısıya dirençli antijen santrifügasyon ile hücre kalıntılarının kaldırılmasını takiben 95⁰C'de ısıtılmış su ile yıkanmış *B. abortus* 119-2 sıvı kültürü bit nitroselluloz banda belli bir çizgi olarak uygulanmıştır. Bir internal kontrol için bir anti-human IgM antikorları ayrı bir çizgi olarak nitroselluloza kaplayarak uygulanmıştır. Bruselloz şüpheli fakat RB negatif hastalardan alınan serumlarda spesifite %98.6 bulunmuştur (19-21).

f. ELISA ve RIA:

Standart Tüp Aglütinasyon (SAT) şüpheli olduğunda ELISA ve RIA kullanılabilir. RIA, kompleks, zahmetli ve radyasyon tehlikesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaz.

ELISA testi; hızlı, yüksek duyarlıklılı, spesifik ve Brusella spesifik IgG, IgM, IgA antikorlarını kan ve BOS'da tanımlamaktadır; SAT'dan farklı olarak immünoglobülinlerin farklı sınıflarını ve titrelerini tayin etmek mümkündür. Yine de anti-globülin karakterine, kullanılan testin tipine bağlı olarak değişik sonuçlar ve farklı raporlar vardır. ELISA *Brucella* tanısında kullanılan en hassas ve hızlı testdir. ELISA ile yalancı pozitif sonuç solid fazda uygun antijen kullanılmadığı zaman (*B.abortus*'da Smut LPS'i ile bovin IgM'in non spesifik bağlandığı için) görülür (5,19,20).

Brusellozun seyrinin belirlenmesinde özgül antikorların aranması hekime hastasına uygulayacağı tedavide yol gösterici olmaktadır. Hastalığın başlangıcında IgM antikorları, üçüncü haftadan sonra da özgül IgG antikorları serumda saptanabilir düzeylere çıkmaktadır. ELISA yöntemi, *Brucella* akut ve kronik bruselloz tanısında Ig sınıflarının profilini veren hızlı, duyarlı ve özgül güvenilir bir yöntemdir. Brusellozda tarama testi olarak kullanılabilceği bildirilen, serolojik tanıda seçenek

yöntemlerden biridir. Yanlış pozitif ELISA sonuçları *B. abortus* lipopolisakkariti ile bovine IgM'lerinin nonspesifik bağlanması sonucu ortaya çıkmaktadır (5,19-21).

Yeni geliştirilen ELISA testleriyle de tanıda duyarlılık ve özgüllük artırılmaya çalışılmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen ' ' competitive enzyme immunoassay (CELISA)'in özgüllüğü %96.5-100; duyarlılığı ise %94.8-100 arasında bulunmuştur. CELISA'da infeksiyon bölgelerinden elde edilen çoklu *Brucella* türlerine karşı tek tek oluşan monoklonal antikorlar aranabilmektedir. Bu teste kullanılan monoklonal antikorlar bakteriye ait smooth lipopolisakkarit (S-LPS) için özgüdür. CELISA S-LPS'nin O polisakkaritine karşı oluşan özgül M antikorlarının aranması esasına dayanan bir testtir. M antikorları, çapraz reaksiyon veren antikorlarla yarışır (5,19,20).

g. Floresan Polarizasyon Deneyi (FPD):

Bu deneyin esası florokrom ile işaretli çözelti içindeki az miktardaki bir çözünür antijen ile antikoruyla kompleks oluşturmuş antijen molekülü arasında rotasyonel farklılıklara dayanmaktadır.

Küçük molekül, hızlı bir şekilde döner ve ışık hızla depolarize olur. Daha büyük olan kompleks molekül ise daha yavaş döner ve ışığın depolarizasyonu yavaşlar. FPD reaksiyona girmeyen reaktiflerin ortamdan uzaklaştırmasını gerektirmeyen bu nedenle hızlı, taşınabilir ekipmanla yapılabilen laboratuvar ve sahada uygulanabilir olan homojen bir deneydir. FPD deneyinin sığır, domuz, koyun keçi ve bizon gibi hayvan brusellozunun serolojik tanısında uygun olduğu kabul edilmektedir (19,20).

h. Deri Testleri:

Geç tip aşırı duyarlılık testleri Bruselloz tanısında yardımcı olmakta, özellikle geviş getiren hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlara uygulanan bu testlerde antijen olarak öldürülmüş *Brucella* bakterileri, saflaştırılmış bakterilerin 21 günlük kültür süzüntüleri ve ticari olarak hazırlanmış saflaştırılmış rekombinant bakteri

proteinleri kullanılmaktadır. Testte kullanılan antijenlerin lipopolisakkarit içermemesi gerekir. Aksi halde diğer Gram negatif bakteri infeksiyonlarında çapraz reaksiyonlar alınması nedeniyle testin tanısal değeri olmaz. Brusellin alerjik deri testleri tarama testi ya da tamamlayıcı test olarak yararlı olmaktadır. Brusellozun alerjik tanısında en sık kullanılan test "Brucellergen" deri testidir. Brucellergen bir nükleoprotein kompleksi olup deri içine şırınga edildikten sonra 24 saat içerisinde şırınga yerinde kızarıklık, ödem ve sertlik meydana gelmesi durumunda kişinin *Brucella* bakterilerine karşı aşırı duyarlı olduğuna karar verilir(19).

Günümüzde *Brucella* grubu bakterilerin tüm türlerinin, bir çok küçük karakteristiklerle birbirinden ayrılan, bir çok biyotipin bulunduğu bilinmektedir (19).

1. Oponositofajik Test:

Brucella infeksiyonlarının serolojik tanısında, oponositofajik testten de faydalanılır. Bu test hasta serumundaki fagositozu kolaylaştıran ve opsonin adı verilen antikorların ortaya çıkarılabilmesi için kullanılan bir testtir. Tanı; hasta, lökosit ve bakteri süspansiyonunun birbirleri ile karıştırılmasından sonra 15 dakika, 37⁰C'de inkübe edilmesi ve buradan hazırlanarak Giemsa ile boyanan preparatın incelenmesi ile konur. Bir lökosit tarafından fagosite edilen ortalama bakteri sayısı, fagositik endeksi verir. Bu sayı 6, 10 veya daha fazla olursa test pozitifdir (19,20).

Bruselloz tanısında kullanılan serolojik test ne olursa olsun, konunun başka bir önemli yanı sıra, antijenin hazırlandığı bakteri türüdür,. Ülkemizde en sık görülen etken *B. melitensis* olduğundan, bizdeki antijenler *B. melitensis* suşlarından hazırlanmaktadır. Bu konunun serojik testin negatif olduğu durumlarda hatırlanması gerekir (19).

Brucella tür ve tiplerin ayrımında gereken incelemeler:

1. Üremek için oksijen gereksinimi
2. Bakterinin H₂S üretimi
3. Boyalar karşısında üreme ve boya inhibisyon deneyleri
4. Üreaz etkinliği
5. Monospesifik serumlarla aglütinasyon

6. Tb-Tbilisi fajına karşılık duyarlılık deneyi
7. Diethyldithiocarbamate (DEDTC) testleri (3,5,8,9).

Tüm identifikasyon testleri mükemmel bir şekilde yapılacak olursa hangi biyotip olduğu ortaya konulabilir. Konvansiyonel testlere paralel, fajlara duyarlılık testleri de suşların sınıflandırılmalarında büyük kolaylıklar sağlar. Bununla beraber, şüpheli durumlarda suş hakkında kesin karar verebilmek için, Oksidatif-Metabolik Test çok önem taşıyan bir testtir (7,10).

Günümüzde halen kullanılmakta olan Klasik Biyokimyasal İdentifikasyon Yöntemleri Huddleson (1929) tarafından açıklanmıştır (7,10).

1.8.4. 3. Moleküler Tanı

Bruselloz zoonotik bir hastalık olduğu için yaşayan ajanların ellere bulaşması laboratuvar çalışanları için risktir. DNA teknolojisi kullanılarak tanı yapılabilir. PCR temeline dayanan kitler geliştirilmiştir ve *Brucella spp.*'nin hızlı tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu tanı çalışmaları dışında allerjik testlerde kullanılabilir (19,-25).

Birçok PCR temelli deney, *Brucella*'nın tanısında diagnostik kapasiteyi geliştirmiştir. PCR, yüksek özgüllük ve duyarlılık gösterir (Akut ve kronik hastalıklarda). Hızlı tanı ve standardizasyon özellikleri göstermektedir. İnsan *Brucella* tanısında PCR kan kültür tekniklerinden daha duyarlı ve konvansiyonel serolojik testlerinden daha özgüldür. Ana genetik hedef olarak brusella BCSP-31 geni 16S-23S ribozomal RNA operonu kullanılmaktadır (20,25).

Yapılan bir çalışmada; 3 farklı PCR metodu karşılaştırılmış ve çalışmada brusella DNA'sının 3 primer çifti ile insan DNA'sını etkilediği bulunmuştur. Bu 3 primer çifti 3 farklı segment içermektedir;

1. Bir gen 31-kDa *B.abortus* antijenini kodlar (primer B4/B5)
2. *B.abortus*'u 16S-RNA dizisi (primer F4-R2)
3. Dış membran proteinini kodlayan (OMP-2) bir gen (SPR/SPL)

Deneyler göstermiştir ki *Brucella* DNA –2'sinin saptanmasında duyarlılıkları farklılık göstermiştir. F4/R2 ve B4/B5 insan DNA'sında etkili bulunmuş primer SPF/SPR ise etkisiz olarak bulunmuştur. Son yıllarda Brusellozun hızlı tanısında

kemik iliği aspirasyonu ve periferik kan örnekleri ile PCR çalışmaları çok olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Yalnız bu çalışmaların antibiyotik kullanımından önce yapılması gerekmektedir (19,20,23).

DNA teknolojisi *Brucella spp.*'nin çabuk tanımlanmasında kullanılmaktadır. Pahalı olan bu teknik ülkemizde yaygın olarak kullanılmamaktadır (19,22).

Bu tanı çalışmaları dışında alerjik testlerde kullanılabilir. Brucellergen adı verilen antijen bakteri nukleoproteinlerinden hazırlanır. 48 saatlik bakteri kültürü filitratlarından hazırlanan abortin ve mellitin testleride kullanılabilir. Hastalıkta oluşan IgG antikor seviyesini gösterir (22,24).

Brucella'lar iki kromozoma sahip olup, bu da üç rRNA operonu içeren kromozomal bölgelerin değişik düzenlemeleri ile açıklanmaktadır. Kromozomlarda bulunan genlerin en önemlileri özellikle major dış membran proteinlerini kodlayanlar olup, *Brucella* türlerinin ve biovarlarının belirlemede açık bir rol oynamaktadırlar. Örneğin; 36-38 kDa ağırlığındaki major porin dış membran proteinleri (Grup 2) *omp2* lokusunda kodlanmaktadır. Bu lokus birbiriyle çok yakın benzerlik gösteren (>% 85) *omp2a* ve *omp2b* genlerini içermektedir. Benzerlik oranları %34 olan diğer iki *Brucella* geninden; *omp25*; 25-27 kDa; *omp31*, 31 -34 kDa ağırlığındaki (Grup 3) dış membran proteinlerini kodlamaktadır. *Brucella* türleri ve biovarlarında, dış membran proteinlerinin kodlayan genlerin PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) paternleri Tablo 2'de gösterilmiştir (19,20).

Tablo 2. *Brucella* türleri ve biovarlarında dış membran proteinlerini kodlayan genlerin PCR-RFLP paternleri (26).

| Brucella spp. | Biovar | omp2a | omp2b | omp25 | omp31 |
|---------------|--------|-------|---------|-------|-------|
| B melitensis | 1 | B, C | B, D, E | B | A |
| | 2 | B | E | B | A |
| | 3 | B | B, D, E | B | A |
| | R | B, C | B | B | A |
| B. abortus | 1 | A | A | A | - |
| | 2 | A | A | A | - |
| | 3 | B | B | A | - |
| | 4 | A | B | A | - |
| | 5 | B | B | A | - |
| | 6 | B | B | A | - |
| | 9 | B | B | A | - |
| | R | A | A, C | A | - |
| B. suis | 1 | D | B | A | A |
| | 2 | E | F | A | B,C |
| | 3 | D | G | A | A |
| | 4 | D | G | A | A |
| | 5 | F | B | A | A |
| B. ovis | - | G | H, I, J | C | D |
| B.canis | - | D | G | A | E, F |
| B. neotomae | - | H | K | A | A |

R: Rough suşlar.

Her büyük harf, bir gen için kullanılan restriksiyon enzimi ile aynı paterni göstermektedir. Tek bir gen için aynı harf restriksiyon paternini yansıtırken, diğer bir gen için aynı paterni göstermez.

1.8.5. 4. Deney Hayvanlarına İnokülasyon

Elde edilen kültürler ve kontamine olmayan marazi maddeler intraperitoneal, kontamine olan materyal ise, deri altı ve kas içi olarak enjekte edilir, her örnek için en az iki kobay kullanılır (7,10).

Süt ve idrar santrifüj edildikten sonra dip tortu fizyolojik tuzlu su ile sulandırılıp, 0,5ml miktarında verilir. Organlardan yapılan emülsiyondan 0,5-1ml enjekte edilir(7,10,19,20).

Peynirden yapılan süspansiyondan ise 0,5ml enjekte edilir. İnokülasyon yapılan kobaylardan birisi 3 hafta diğeri 6 hafta sonra öldürülür. Kobay öldürülmeden önce serolojik yoklamalar için kalpten kan alınır, otopsilerinde lenf yumrularında büyüme, epididimit, testislerde apse ve eklemlerin şişmesi... vb. tesbit edilir. Karaciğer, dalak, böbrek uterus, kemik iliği gibi lezyonlarda özel besi yerlerine ekimler yapılır. Etken izolasyonuna gidilir (7,1019,20).

1.8.6. Türkiye’de Brucella Kökenleri

Brucella cinsi içinde *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B.canis* ve *B. neotomae* olmak üzere 6 tür tespit edilmiştir. *B. melitensis*’in 3, *B. abortus*’un 6 ve *B. suis*’in 5 biyotipi bulunmaktadır. *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae* türlerinde ise herhangi bir biyotip bildirilmemiştir (27).

B. melitensis’in mevcut 3 biyotipinden, biyotip 1 Latin Amerika, İspanya, Portekiz ve Malta’da en yaygın olarak görülen biyotiptir. İtalya ve Yunanistan’da en fazla biyotip 2 yaygındır. Biyotip 3 en yaygın olarak Fransa ve Kuzey Afrika’da görülmektedir ancak İspanya, Yunanistan ve Türkiye’de de bildirilmektedir. Batı ve Orta Asya’da biyotip 2 ve 3 en yaygın biyotiplerdir. Ancak Suudi Arabistan, Kuveyt, İran ve Irak’ta her üç biyotip de yaygın olarak bulunmaktadır (27).

B. abortus biyotip 1 dünya genelinde sığırlardan en sık izole edilen biyotiptir. Biyotip 1,2 ve 4 Kuzey ve Güney Amerika'da en sık görülen biyotiplerdir. Biyotip 3 ve 6 Afrika ve bazı Asya ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir. Biyotip 5 ve 9 nadir olarak görülmektedir (27).

Türkiye'de standart metotlara göre *Brucella* izolatlarının identifikasyonları son yıllarda ele alınmıştır. Aşağıda Tablo.3 ve Tablo.4'de sığır ve insanlardan izole edilen brucella kökenleri verilmiştir.

Tablo 3. Sığırlardan izole edilen *Brucella* kökenleri (27).

| <i>Brucella</i> kökeni | İzolat sayısı | Oran (%) |
|-----------------------------|---------------|---|
| <i>B. abortus</i> biyotip 3 | 35 | 100 |
| <i>B. melitensis</i> spp. | - | S19 ve Rev1 aşısı Suşlarına rastlanılmadı. |
| Toplam | 35 | |

Tablo 4. İnsanlarda izole edilen *Brucella* kökenleri (27).

| <i>Brucella</i> kökeni | İzolat sayısı | Oran (%) |
|--------------------------------|---------------|--------------------|
| <i>B. melitensis</i> biyotip 3 | 115 | 89.8 |
| <i>B. melitensis</i> biyotip 1 | 12 | 9.3 |
| <i>B. abortus</i> biyotip ? | 1 | Atipik izolat 0.78 |
| Toplam | 128 | |

1.8.7. İdentifikasyon Yöntemleri

Tür idenfikasyonu başlıca iki ana yöntemle tayin edilir. Bunlar fajlarla lizis ve monometrik metotlarla izolatin 14 çeşit amino asit ve karbonhidrat substanslarının oksidasyon ile metabolize etme kabiliyetlerinin incelenmesidir (27).

Oksidatif metabolik testler zaman alıcı, yetişmiş elemana ihtiyaç gösteren ve pahalı testler olduğundan ancak referans laboratuvarlarında taksonomik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır. Rusya'nın Tbilisi eyaletinde izole edilip Tbilisi (Tb) adı verilen faj son derece stabil olduğundan referans faj olarak tür tayininde geniş çapta kullanılmaktadır. Tb fajı rutin test dilüsyonunda (RTD) yani tam bir lizisin görüldüğü minimal faj konsantrasyonunda sadece smooth *B. abortus* kültürlerini lize eder. R/C fajı rough tür ve suşlar için referans fajdır. *Brucella* kültürlerinin tür tanısında ilişkin özellikleri tabloda gösterilmiştir (27,28).

İzole edilen suşların tür ve biyotip tanısında kültürün koloni morfolojisi son derece önemlidir. Her zaman non-smooth koloni yapısına sahip *B. ovis* ve *B. canis* dışında diğer türler taze olarak izole edildiklerinde genellikle smooth koloni yapısına sahiptir. Non-smooth kültürleri monospesifik A ve M serumları ve smooth *Brucella* fajları ile tiplendirmek için smooth koloniler seçilmesi gerekmektedir. *Brucella* cinsi mikroorganizmalarda dissosiasyon değişik metotlarla saptanmaktadır. Bunlardan en basit olanı %0.1'lik akriflavin solusyonunda kolonilerin emulsifiye edilmeleridir. S koloniler homojen bir emülsiyon gösterirlerken, non-smooth koloniler derhal aglütine olurlar (26-28).

Bir diğer metot da kolonilerin kristal viole boya solusyonu ile boyanmalıdır. S koloniler bu metotla boya almazlar buna karşın, dissosiyasyon koloniler kırmızı ve morun çeşitli nüansları ile boyanırlar ve yüzeyleri radikal çatlaklar gösterir. Dissosiasyon kontrolünde koloniler ayrıca stereoskopik mikroskopta, 45⁰C açı ile oblik ışıkta incelenirler. S koloniler oblik ışıkta mavi-yeşil reflü verirler, dissosiyasyon koloniler ise donuk sarı bir renk gösterirler (27,28).

Brucella türlerinin biyotip düzeyindeki identifikasyonları başlıca 4 ana test ile yapılmaktadır. Bunlar CO₂ gereksinimi, hidrojen sülfid (H₂S) üretimi, bazik fuksin ve tiyonin boyaları ile inhibisyonuna duyarlılık ve monospesifik A, M ve R serumları ile aglütinasyondur. *Brucella* cinsine ait türlerin biyotip seviyesindeki ayırıcı özellikleri aşağıda Tablo 5'de gösterilmiştir.(27,28).

Tablo 5. Brucella türlerinin ayırıcı özellikleri (27)

| Tür | Koloni Morf. | Serum ihtiyacı | Fajlarla lizis | | | Oksidaz | Üreaz |
|----------------------|--------------|----------------|----------------|-----------------------|-----|---------|-------|
| | | | Tb | R/C | | | |
| | | | RTD | 10 ⁴ x RTD | RTD | | |
| <i>B. melitensis</i> | Smooth | - | - | - | - | + | + |
| <i>B. abortus</i> | Smooth | - ^a | + | + | - | - | + |
| <i>B. suis</i> | Smooth | - | - | + | - | + | + |
| <i>B. netomae</i> | Smooth | - | - | + | - | - | + |
| <i>B. ovis</i> | Rough | + | - | - | + | - | - |
| <i>B. canis</i> | Rough | - | - | - | + | + | + |

^aBrucella abortus biyotip 2 seruma ihtiyaç gösterir.

Tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme ve Tbilisi faj tiplendirmesi:

Sonuçlar, inkübasyon periyodunun sonunda üreme ve lizis durumlarına göre değerlendirilmektedir (27,28).

A ve M monospesifik anti-serumlar ile aglütinasyon

Reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre okunarak değerlendirilmektedir. Aşı suşlarından ayırımında çeşitli testler kullanılmaktadır. *B. abortus* S19 aşı suşu virulent saha suşundan CO₂'e bağımlı olmaması, 2µg/ml tiyonin mavisinde ürememesi ve 5 IU penisilin/ml'de inhibe olması ile ayrılır. *B. melitensis* Rev 1 aşı suşu, saha suşundan 20µg/ml bazik fuksin ve tiyoninde ürememesi, 2.5 µg/ml streptomisin konsantrasyonunda inhibe oluşu ile ayrılmaktadır (27,28).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü bünyesinde kurulan "Ulusal Brucellosis Komitesi" ülke genelinde hastalığın epidemiyolojik verilere kaynak olabilecek biyotip haritasının çıkarılması için, Türkiye genelinde izole edilen *Brucella spp.* izolatlarının biyotiplendirilmesi için

Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne gönderilmesine karar vermiştir. (28).

1.9. Tedavi

Brusellozda tedavi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün de önerdiği şekilde ikili, bazı durumlarda da üçlü kombine antibiyotik uygulanması şeklindedir. Tek antibiyotik kullanımının tedavi başarısızlığına yol açma nedenleri; hızlı direnç gelişimi ve bakterinin intrasellüler olarak çoğalabilmesi nedeniyle tek ilacın yetersiz kalarak relapsa yol açmasıdır (3-9).

1981 yılında DSÖ tarafından bruselloz tedavisi; tetrasiklin 2 gr/gün, oral (6 saat ara ile 500mg) 6 hafta + streptomisin 1gr/gün, IM (total 20 gr olacak şekilde) 3 hafta süreyle kullanılması şeklinde önerilmiştir (3,8,9).

1986'da ise, uzun etkili bir tetrasiklin türevi olan doksisiklinin 200mg/gün (12 saat aara ile 100 mg) + rifampisin tek doz 600-900 mg/gün kombine olarak 6 hafta uygulanması önerildi (3,8,9,16).

Doksisiklin + rifampisin kombinasyonu ile doksisiklin + streptomisin kombinasyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada her iki rejimin de 45 gün uygulandığında eşdeğer etkinlikte olduğu saptanmış; ancak spondiliti olan hastalarda doksisiklin + streptomisin kombinasyonu daha etkili bulunmuştur (3,5).

Streptomisin kullanılan kombinasyonda streptomisine bağlı ototoksisite, rifampisin kullanılan kombinasyonda ise rifampisine bağlı hepatoksisite açısından hastalar yakından takip edilmelidir (3,5,8,16).

8 yaşın üzerindeki çocuklarda; oral doksisiklin (5mg/kg/gün) veya oksitetrasiklin (30 mg/kg/gün) 3 hafta süre ile + gentamisin, IM (5mg/kg/gün) ilk 5 gün kombine tedavisinin verilmesi önerilir (5,8,16).

8 yaşın altındaki çocuklarda; TMP/SMZ (Trimetoprim/Sulfometoksazol) 3 hafta süreyle + gentamisin ilk 5 gün verilmesi önerilmiştir. Tetrasiklini tolere edemeyen kişilerde veya gebelerde (TMP/SMX + rifampisin veya TMP/SMZ + gentamisin kombinasyonları önerilebilir (3,16).

Bruselloza bağlı menenjit, endokardit gibi komplikasyonların tedavisi özel durumlardır ve tedavide kullanılacak rejimler konusunda görüş birliği yoktur. Çoğu

araştırmacı, içerisinde doksisisiklinin bulunduğu ikili veya ulü kombinasyonların, hastanın verdiği cevap dikkate alınarak 6-9 ay gibi uzun süre uygulanmasını önermektedir. Doksisisiklin kan-beyin bariyerini, diğer tetrasiklinlerle kıyaslandığında daha iyi geçer ve TMP/SMZ veya rifampisin ile kombine edilerek brusella menenjitisi veya endokarditinde kullanılabilir. Brusella menenjitisi tedavisindeü, bakterinin duyarlı olduğu belirlenen III. kuşak sefalosporinler, beyin-omurilik sıvısına iyi geçebilmeleri nedeniyle tercih edilirler. Bazı brusella endokarditi vakaları, antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilebilmekle birlikte, çoğu vaka medikal tedaviye ilaveten cerrahi girişimi de gerektirir (8,16).

İn vitro çalışmalar florokinolonların brusella bakterilerine etkili olduğunu göstermekle birlikte, bu ajanlar tek kullanıldıklarında yüksek oranda relaps saptanmıştır (3,16).

Bruselloz tedavisinde, antimikrobiyal tedaviye ilaveten hastanın semptomlarına yönelik olarak anlajezik ve antiinflamatuvar ilaçlardan da yararlanılabilir. Kortikosteroidler nörobruselloz vakalarında, antimikrobiyal tedavinin yanında beyin ödemi gidermek, yapışıklıkları gidermek veya önlemek amacıyla önerilebilir (3,8,16).

Antibiyotikler *Brucella* mikroorganizmalarına karşı etkilidir. Fakat hastalığın tedavisi güç olabilir. *Brucella* etkenleri hücre içinde bulduklarından (tüberküloz hastalığının etkeni *Mycobacterium tuberculosis* gibi) birden fazla antibiyotiğin uzun süre (en az 6 hafta) uygulanmasını gerektirir. Ayrıca bakterilerin vücutta nereye gizlendiklerinin bilinmemesi ve kemik iliği gibi yerlerde de enfeksiyon oluşturması nedeniyle uzun süreli bir tedavi uygulanır. Kısa süreli tedavi enfeksiyonun nüksetmesine neden olmaktadır. Tedaviye başlama zamanı ve hastalığın şiddetine bağlı olarak iyileşme birkaç hafta ile birkaç ay arasınada değişebilir. Ölüm aronı düşüktür (3,5,8,16).

Bilimsel açıdan önemli ve göz önünde bulundurulması gereken diğer bir konu ilaçlara direnç ihtimalidir. *Brucella* etkenlerinin antibiyotiklere dirençli suşlarının olduğu bildirilmiştir. Bruselloz tedavisi için yaygın olarak kullanılan antibiyotikler (Rifampicin ve streptomycin gibi) aynı zamanda tüberküloz tedavisinde de kullanılmaktadır. Patojenik *Mycobactrium tuberculosis* suşlarına karşı çoklu ilaç

direncine sahip suşların mevcudiyeti bruselloz tedavisi için tüberküloz tedavisinde kullanılmaya alternatif bir tedavi problemini ortaya çıkarmaktadır (1,3,5,8,16)).

Tedavide kombine antimikrobiyal kullanımı gereklidir; doksasilin 2x100 mg+ rifampisin 1x600 mg, 6 hafta kullanılır. Artrit gibi fokal infeksiyon varlığında tedavi 10 hafta gibi uzun tutulmalıdır. Rifampisin yerine streptomisin (1g/gün, IM., 21 gün) 'de kullanılabilir (8,16).

Relapslarda ilk uygulanan protokol, hasta yedi yaştan küçük ise üç hafta ko-trimaksazol+5 gün gentamisin veya rifampisin+ ko-trimaksazol, kronik olgularda ek levamizol, gebelerde rifampisin veya gentamisin+(doğum Öncesi değil ise) ko-trimaksazol 4-6 hafta, nörobrusellozda beyin omurilik sıvısı (BOS) bulguları düzelinceye kadar /6 hafta-6ay) rifampisin+3.kuşak sefalosporin, endokarditte 6 aylık üçlü (doksisklin+streptomisin+rifampisin+ 3. kuşak sefalosporin) tedavisine ek olarak kapak relasmanı ve artritte ise uzun süreli üçlü tedavi ve gereğinde antienflamatuvar ilaçlar uygulanmalıdır (3,5,16).

1.10. Epidemiyoloji

Ülkemizde Bruselloz, morbiditesi oldukça yüksek olmasına karşın mortalitesi çok düşük bir infeksiyon hastalığıdır (1,5,10). Yıllara göre ülkemizdeki bruselloz vakaları ve ölüm oranları Tablo 6.da gösterilmiştir .

Tablo 6. Yıllara Göre Ülkemizde Bruselloz vakaları ve ölüm oranları (10)

| YILLAR | VAKA SAYISI | ÖLÜM (%) |
|-----------|-------------|----------|
| 1970-1980 | 909 | 3(0,3) |
| 1981-1990 | 17,920 | 8(0,04) |
| 1991-1993 | 17,650 | 6(0,03) |

Her yaş grubunda görülen ancak 0-4 yaşta nadir olan brusellozun ülkemizde 1970-1995 yılları arasında bildirilen olgu sayısı aşağıdaki Tablo 7'da gösterilmiştir(1).

Tablo 7. Türkiye’de Bruselloz (1970-1995) (1)

| YILLAR | Bildirilen olgu sayısı |
|-----------|------------------------|
| 1970-1980 | 909 |
| 1981-1990 | 17920 |
| 1991 | 4658 |
| 1992 | 6197 |
| 1993 | 6795 |
| 1994 | 8363 |
| 1995 | 8184 |

Bu tablodan ülkemizde bruselloz olgularının arttığı kanısı uyanmaktadır ancak dünya literatüründeki istatistiklerin de gösterdiği gibi ülkemizde de olgu sayısının artması hastalığın yaygınlaşması şeklinde yorumlanmamakta, bu durum hastalığın daha iyi bilinip daha iyi tanı konulduğunu göstermektedir(1).

Afyon yöresinde hayvancılığın yaygın olarak yapılması nedeniyle bruselloz yaygın olarak görülmektedir. Afyon İl Sağlık Müdürlüğü raporlarına göre 1999-2003 yılları arasında bildirilmiş bruselloz vakaları Tablo 8’da verilmiştir.

Tablo 8. Afyon’da Bruselloz (1999-2003)

| Yıllar | Bildirilen Olgu Sayısı |
|--------|------------------------|
| 1999 | 170 |
| 2000 | 200 |
| 2001 | 323 |
| 2002 | 259 |
| 2003 | 148 |

Bruselloz insan ve hayvanlarda önemli derecede morbiditeye neden olan bir antropozoonozdur (3,5,8,10,16). İnsan brusellozu, 1861’de Martson tarafından Malta

Adası'nda rapor edilmiştir. Hastalık etkeni ilk kez 1886'da Bruce tarafından Malta humması nedeniyle ölen hastaların dalak pulpasından izole edilmiş ve "Micrococcus melitensis" olarak adlandırılmıştır. Zammit, Horrocks ve Kennedy, bu tipik mikrokoku Malta keçilerinin kan, süt ve idrarında göstererek, bruselloz rezervuarının keçiler olduğunu ortaya koymuş ve o dönemde pastörize edilmemiş keçi sütünün tüketimi önlenerek hastalık insidansında dramatik azalma sağlanmıştır (16,28-33).

Bang 1895'te sığırlardan *B. abortus*'u, Traum 1914'te domuzlardan *B. suis*'i, Carmichael 1966'da köpeklerden *B. canis*'i izole etmiştir. *B. ovis* 1953'te koyunlardan, *B. neotomae* 1957'de koçlardan izole edilmiştir (10,34,38).

Bazı gelişmiş ülkelerde bruselloz hayvanlar arasında tamamen eradike edilmiş olmakla birlikte, ülkemizde oldukça yaygın bir hastalıktır. Özellikle İç Anadolu, Doğu Anadolu, Güney Doğu Anadolu bölgelerimizde hayvanlarda yaygındır. Kırsal kesimde *B. melitensis*, büyük şehirlerde *B. abortus* infeksiyonuna daha sık rastlanır. Ülkemizde *B. suis* infeksiyonuna rastlanamamıştır (10,18,19,28).

Türkiye'de belli yakınması olmayan ve risk grubu oluşturmayan kişilerde %5.8-14.4 oranında, risk grubu olan kasaplar arasında %2-14 ve çiftçiler arasında %1.8-25 oranında seropozitiflik saptanmıştır (30-34).

Brucella bakterilerinden *B. melitensis* esas olarak koyun, keçi ve develerde; *B. abortus* sığır, manda, develerde; *B. suis* ren geyiği ve domuzlarda hastalık yapar. Primer olarak köpeklerde hastalık yapıp nadiren insan infeksiyonlarına neden olan *B. canis*'e ait birkaç olgu Bursa ilimizden bildirilmiştir(24-28).

Bruselloz, insanlarda çeşitli yollardan bulaşır. Ülkemizde en sık bulaş sindirim yolu ve direkt temasla olmaktadır. Sindirim yolu ile bulaş, çiğ süttten yapılan peynir, krema ve yağlarla olur. Kırsal kesimde sütler pastörize edilmemekte ve kaynatılmadan peynir yapılmaktadır. Hastalığın yoğurt ile bulaşması ise mümkün değildir. Bunun nedeni kaynatma ve maya nedeniyle oluşan asidik ortamdır (20,31,38).

Direkt temas diğer bir bulaşma yoludur. Hasta hayvanın sütü, idrarı, genital akıntısı ve gebelik ürünü çok sayıda bakteri içerir. Bu materyallerin direkt temas ve inhalasyonu yoluyla hastalık bulaşabilir. Bu nedenle Bruselloz veteriner hekim, teknisyen, laboratuvar çalışanları, çiftçi, kasap, mezbaha çalışanları ve süt

endüstrisinde çalışanlar için mesleki risk oluşturmaktadır. Bakteri deri ve konjunktiva yolu ile bulaşabileceği gibi, özellikle laboratuvar çalışanları için aerosol halinde bulunan bakterinin inhalasyon yolu ile bulaşıcılığı yüksektir (27).

Brusellozun kişiden bulaşması nadir olmakla birlikte mümkündür. Orşitli hastaların spermelerinden izole edilen bakterinin cinsel temas yolu ile geçtiği bildirilmiştir. Brusellozun kemik iliği transplantasyonu ile, ayrıca mastitli anneden süt yolu ile bulaştığı gösterilmiştir. Anne sütü dışında da gebelik esnasında ya da perinatal bulaşabileceği gösterilmiştir. Bütün bu bulaş yollarının dışında; plasental ekstratlar ve fetal hücreler kullanılarak hazırlanan kozmetik ürünleri ile bulaşan birkaç bruselloz olgusu Fransa'da bir güzellik salonundan bildirilmiştir. Brusellozun hayvanlar arasında yayılımında; hayvan çıkartıları ve gebelik materyali yolu ile (27,29).

1.10.1. Hastalığın Geçiş Yolları

İnfeksiyon başlıca şu yollardan bulaşır:

1. Ağız yolu ile
2. Temas
3. İnhalasyon
4. İnokülasyon
5. Cinsel temas

1. Ağız yolu ile:

Herhangi bir işleme tabi tutulmamış sığır, koyun, keçi sütü ve etten elde edilen ürünlerin tüketimi ile enfeksiyon alınır. Kaymakta bakteri sayılıdır. Yağ damlacıkları yüzeye çıkarken *Brucella*'ları birlikte çıkartırlar yağ daha çok ekşimiş süttten yapıldığı için, oluşan asitten mikroorganizmalar ölür, dolayısıyla yağ ile oluşacak enfeksiyon oranı daha azdır. Dondurmada bu oran önem taşır (1,8,10,16).

Olgunlaşmamış peynir ile *Brucella* geçişi nadirdir. Ancak yeni ve kaynatılmamış ve 60°C'de ısıtılmamış çiğ süttten yapılmış peynirler iyi bir enfeksiyon kaynağıdır. İncelenmemiş veya iyi örtülmemiş etler, gereği gibi hazırlanmamış salam,

kontamine hayvan idrar ve dışkılarıyla bulaşmış çiğ sebzeler, hayvan çıkartıları kirlenmiş sular da infeksiyon kaynağını oluşturur (1,5,8,16,20,33).

Yapılan araştırmalarda *Brucella* bakterilerinin çeşme suyunda 37 gün, donma derecesinde 2.5 yıl, peynirde 2 ay, 0 dercedeki dondurmada 1 ay, toprak ve meralarda 3 ay canlı kaldıklarını göstermiştir (1).

Kara sinekler 24 saat taşıyıcı kalmışlardır. Brusella 60 derecede 10 dakika da ölürler. Et pişirilerek yendiğinden infeksiyonun naklinde rolü yoktur. Memleketimizde çiğ köfte yeme adeti nedeniyle etle geçiş olasıdır (1,3,5,8,10,16,19).

Ağız yolu ile geçişte mide asiti asiditesi bir koruma oluşturursa da, asit azlığı veya anti-asitle tedavi infeksiyonu kolaylaştırır (1).

2. Temas yolu:

Hasta hayvanların düşük materyali, vaginal akıntı, idrar ve diğer çıkartıları temas sonucu hastalığın bulaşma olasılığı yüksektir. İnfekte materyalin zedelenmiş deriye teması bulaşma şansını daha da artırır. Bir deneysel araştırmada iyice kazınmış kobay derisine temas yolu ile enfeksiyon bulaşma şansı %90 iken, hafif zedelenmiş deride bu oran %30 olarak saptanmıştır (1,3,5).

ABD’de hastalık %90 enfekte materyalle temas yolu ile oluşmaktadır. Bu hayvanlarda direk teması olan veteriner, çiftçi, kasap, çoban, mezbaha ve depo işçileri, et endüstrisinde çalışanlar daha çok hastalığı alırlar. Bunlar da bruselloz meslek hastalığıdır. Temas yolu ile bulaşmada en çok eller rol oynamaktadır. El dışında; deri, mukoza ve konjunktiva yolu ile infeksiyon alınabilir. Erzurum’da yapılan 341 kişilik bir çalışmada Çelebi ve arkadaşları hastalığı et kombinasi işçileri arasında yaygın olarak bulmuşlardır (1-5).

Lübnan’da 1995’te yapılan 597 kişilik çalışmada, kasaplarda %54, çiftçilerde %35, veterinerlerde %1, laboratuvar çalışanlarında ise %8 oranında seropozitiflik bulmuşlardır (1,5).

3. İnhalasyon:

Ağıl tozları, hayvan taşıyan vagon, kamyon, bulaşık toprak, mezbaha ve çiftlik civarı, laboratuvar tozlarının inhalasyonu ile veya konjuktivaya temasla infeksiyon alınabilir (1).

4. İnokulasyon:

Brucella'larla çalışanlarda kaza inokulasyonları olur. Hatta hayvanlara S19 suşu ile aşı yaparken kaza neticesi iğneyi kendine batıranlarda ağır infeksiyonlar meydana gelmiştir. S19 zayıflatılmış bir suş olmakla birlikte göze sıçraması, el ve parmaklara iğnenin batması ile infeksiyon meydana gelebilir (1,33).

Virulan suşlarla çalışan laboratuvarlarda ekim esnasında veya pipetleme ile bulaşık materyali çekişlerinde kaza inokulasyonları olmuştur (1,31-33).

5. Cinsel temas :

Coitus'la hastalık alınabileceği bir kısım yazarlar tarafından bildirilmiştir. Kadın sütü, vaginal flora ve insan sperminden *Brucella* izole edilmiştir. Glans penis yolu ile maymunlar infekte edilmiştir (33).

Kan nakli ile hastalık geçebilir. *Brucella*'lar 6 aya kadar kanda canlı kalırlar. Acil kan transfüzyonlarında bu durum göz önünde bulundurulmalıdır (33,35).

İnsanlara *Brucella*'nın geçişi ve dünyanın değişik yerlerinde prevalansı yerel beslenme adetlerine, krema, tereyağ ve peynir gibi süt ürünlerini imal yöntemleri, sosyal adetler, hayvan çiftlikleri türü, bölgede bulunan *Brucella* türleri, yörenin iklim koşulları, kişisel ve yöresel hijyen şartlarına bağlıdır. Çevre sanitasyonu özellikle inhalasyon ve temas yolu geçişlerinin önlenmesinde önemli rol oynar (35).

Çeşitli epidemiyolojik özelliklere göre *Brucella* olgularının dağılımı şöyle sıralanabilir:

b) Coğrafi Dağılımı: Bruselloz hemen dünyanın her yerinde yaygındır. Rezervuar hayvanların dağılımına göre insan brusellozunda değişik dağılım gösterir. Amerika, İngiltere, Orta ve Kuzey Avrupa, Güney Afrika ve Japonya'da *B. abortus*,

keçi yetiştiriciliğinin yaygın olduğu sup-tropikal bölgelerde *B. melitensis* daha siktir (33-37).

c) Yaş ve Cinsine Göre Dağılımı: Bruselloz her yaş ve cinsine görülmesine rağmen, hayvanlarla temasın sıklığına bağlı olarak bazı gruplarda daha sık görülür (37).

Çocuklar düşünülenin aksine büyükler kadar hastalığa duyarlıdır. Çiğ süt içme, peynir yeme ve hayvanlarla direkt temas sonucu çocuklar infekte olurlar. Erkekler hayvanlarla daha çok temas etmeleri sonucu daha sık hastalanırlar. Ülkemizde yapılan araştırmalarda erkek ve kadında hastalık oranı birbirine eşit bulunmuştur. Amerika'da ise erkeklerdeki hastalık oranı kadınların 3 katıdır. Yine hayvanlarla temas derecesine bağlı olarak 20-40 yaş grubunda hastalık daha sık görülür (37).

d) Mesleklere Göre Dağılımı: Veteriner hekimler, hayvan yetiştiricileri, mezbaha işçileri, et endüstrisinde çalışanlar, süt ve süt ürünleri satan ve imal edenlerde *Brucella* incelemesi yapan laboratuvar personeli daha sık hastalanır (36,38).

e) Mevsimlere Göre Dağılımı: Bruselloz her mevsimde görülmekte ise de bahar ve yaz aylarında, hayvanların doğurganlık mevsimleri olması ve abortusların olması nedeniyle çevrenin kontamine olması, hayvanlarla temasın artması, süt ürünlerinin tüketilmesinin artması ile hastalık daha fazla görülür. Öte yandan zaman zaman hastalığın hayvanlar arasında salgın halini alması insanlarda da hastalığın yüksek oranda görülmesine neden olur (36,44).

1.12. Korunma

İnsanlarda brusellozun önlenmesi, evcil hayvanlarda brusellozun kontrolü ve eradikasyonuna bağlıdır. Bu açıdan veteriner hekimlerin doktorlarla işbirliği halinde çalışması önem taşır. *Brucella* bakterisi ile infekte olmamış süt danaları *B. abortus* 19 suşu, süt kuzuları *B. melitensis* Rev 1 suşu aşısı ile aşılanır. Özellikle kırsal kesimde yaşayan halk bilinçlendirilmeli, çiğ süttten peynir ve yağ yapımı önlenmelidir. Sütün pastörize edilerek tüketilmesi, peynirlerin salamura yapılıp teneke üzerinde ve satış

yerlerinde yapılış tarihlerinin belirtilmesi, infeksiyonun epidemik olduğu yörelerde kaşar ve tulum peynirinin tüketilmesi önerilir (35,38).

Hastalığın temas yoluyla bulaşını önlemek için; mezbaha işçileri, veterinerler, hayvan sağlık memurları, hayvan bakıcıları, et paketleyicilerinin, hayvanların atıkları ile temas etmemeleri ve eldiven giymeleri önerilmektedir (33,34).

Pastörize olmamış ve iyice kaynatılmamış süt ve böyle sütlerden yapılan peynir, krema, dondurma gibi süt ürünleri tüketilmemelidir. Pastörize edilip edilmediği bilinmeyen süt ve süt ürünleri yenilip içilmemelidir (33-36)).

Hayvan yetiştiricileri yavru atan hayvanların tüm atıkları ile atıkların temas ettiği yem ve altlıkları çıplak el ile dokunmadan imha etmelidir. Atıklar çevreye atılmamalı, özellikle kedi ve köpeklere verilmemelidir. Ahır ve ağıllarda dezenfeksiyon yapılmalıdır. Yavru atımı görüldüğünde hemen bir veteriner hekime haber verilmeli ve hastalığın teşhisi konulduktan sonra hayvanlar mutlak aşılatılmalıdır (35).

Ayrıca koruyucu olarak genç hayvanların aşılatılmasına önem verilmelidir. Çünkü insanlarda brusellozun önlenmesi hastalığın hayvanlarda kontrol ve eradikasyonuna bağlıdır. Yapılan tüm çalışmalara rağmen insanlarda kullanılabilecek bir aşı henüz bulunamamıştır (33-35).

İnsanların brusellozdan korunması; doğrudan doğruya özellikle koyun, keçi, sığır ve domuz gibi evcil hayvanların kontrolü ve eradikasyonu ile ilgilidir. Hayvanlar, özellikle sığırlar arasındaki brusellozun kontrolü için dünya FAO/WHO eksperler komitesi birbirine bağlı üç program önermektedir:

1. Hayvanları hastalıktan korumak
2. Testler ile hasta hayvanların belirlenip, kesilmesi,
3. 4-8 aylık dişi danaların S19 aşısı ile aşılanmaları. Bu öneriler doğrultusunda Ülkemizde 1983 yılında Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından 26 yılda gerçekleşmesi planlanan ve Türkiye'ye 218 milyarlık bir katkıda bulunacak “ **Türkiye Brucellosis Mücadele Projesi**” hazırlanmış ve çalışmalara başlamıştır.

Koyun ve keçilerin bağışıklanmasında *B. melitensis*'in suş Rev1 kullanılmaktadır.

Brusellozdan korunmak için alınması gereken önlemleri şu şekilde sıralayabiliriz:

- Risk altındaki personelin (mezbaha işçileri, et paketleyicileri, laborantlar, veterinerler ve hayvan bakıcıları) eldiven, tüm kollarını örten giysiler giymeleri, gözlük takmaları,
- Güzellik enstitülerinde kullanılan plasentaların sağlıklı sığırlardan elde edilmesi,
- *Brucella* bakterilerine kümes hayvanları da duyarlı olduğundan, özellikle, hasta olan kümes hayvanının kesiminde önlem alınması ve yumurtaların çiğ yenmemesi,
- Sütlerin pastörizasyonu,
- Taze peynir ve krema yağı imalatının önlenmesi,
- Taze peynir yapımında son peynirlerin yeterince tuzlanması ve en az iki ay bekletildikten sonra yenmesi (Her peynir tenekesinin üzerinde mayalanma tarihlerinin bulunma zorunluluğunun getirilmesi),
- Etlerin iyice pişirilmeden yenmemesi,
- Endemik bölgelerde hayvan idrarı ile kirlenmiş sebzelerden de bulaş olabileceği düşünülmeli ve sebzelerin dezenfekte edildikten sonra veya pişirilerek tüketilmesine çalışılması,
- Bruselloz şüpheli kişilerin cinsel teması yasaklanmalı,
- Son olarak bruselloz olgularının mutlaka Sağlık Bakanlığı'na ihbar edilerek o bölgenin bruselloz yönünden geniş incelenmesinin yapılması sağlanmalıdır (1,33,35).

1.13. Dirençlilik

Brucella bakterileri 60°C'de ısıtılmakla ve 10 dakikada fenol eriyiğinde ölürlür. Süt içinde 17 gün yaşadığı, tereyağında 142 gün canlı kaldığı, dondurmalarda 1 ay, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, çeşme suyunda 8°C'de 57 gün, 25°C'de ise 10 gün canlılığını koruduğu, insan idrarında en az 7 gün, hayvan dışkısında açıkta 100 gün,

ahırların duvar ve döşemesinde 4 ay canlı kaldığı bildirilmiştir. Pastörizasyon esnasında çabuk ölmelerinin epidemiyolojik değeri vardır (16).

1.14. Bağışıklık:

Hastalıktan sonra kısmi bir bağışıklık oluşur. Kazanılan bu bağışıklık, nisbidir. Çünkü tekrarlar sık görülür ve bağışıklık kanda antikorlarının bulunması ile sağlanmaz.

Mevcut bilgiler etkili bağışıklığın, hücresel tipte bağışıklık olduğunu düşündürmektedir. Çünkü *Brucella* infeksiyonu gecikmiş tipte bir hipersensitivite oluşturmaktadır (16).

1.15. Prognoz:

Bruselloz hafif seyreden ve ölüm oranı düşük olan bir hastalıktır. Fakat uzun sürdüğü ve vücut direncini kırarak sekonder infeksiyonlara sebep olduğundan, önemli bir hastalık olarak ele alınmalıdır (16).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Afyon merkez ve köylerinden topladığımız 100'er adet süt ve peynir örneği Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına soğuk zincirle getirilerek ekimleri yapıldı.

Toplanan peynir ve sütlerin 25 tanesi inek, 75 tanesi koyunlardan alınmıştır.

Süt örnekleri hayvanların meme başları sabunlu bez ve alkol ile temizlendikten sonra ilk sağım dışarı atılmak suretiyle vidalı kapaklı tüplere 10 cc süt alınıp soğuk zincirle laboratuvara getirildi. Toplanan taze peynir örnekleri etilen oksitte steril edilmiş ziplog poşetlere alınıp yine soğuk zincir ile laboratuvara getirildi. Toplanan örnekler bekletilmeden çift ekimleri yapıldı.

Kullanılan Besiyerleri:

Kanlı Agar

Serum Dekstroz Agar (SDA)

Brucella Agar

Brucella Selektif Agar

Tiyoninli Besiyeri

Bazik Fuksinli Besiyeri

Chrystensen Üre Agar

Antibiyotikli Besiyerleri:

Serum Dextrose Agar (SDA)

Basitrasin (Merck 1.06992) 25000 IU/l

Cycloheximide (Merck 1.023238) 100 mg/l

Polymiksin B sulfat (Merck 1.06994) 6000 IU/l

Ethyl Violet 1,25 mg/l

Steril tuzlu su:

NaCl 8,5 g

Distile su 1000 ml karıştırılarak, 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandı.

Antijen ve Kontrol Serumları:

Brucella sütlerde ring testi ve (Milk Ring Test= MRT) ve tüp aglütinasyon test antijenleri, pozitif ve negatif kontrol serumları ile monospesifik anti-serumları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Kontrol Suşları:

Çalışmamızda kontrol suşu olarak *B. melitensis* ve *B. abortus* saha suşları kullanıldı.

Serum:

Atlardan alınan kanların serumu ayrıldıktan sonra, filtreden geçirilerek sterilize edildi, steril tüplere 20 mL dağıtılarak 37⁰C'de 2 gün bırakılarak kontaminasyon yönünden kontrolü yapıldı.

2.1. Kullanılan Besiyerleri**2.1.2. Kanlı Agar (Merck 1.10886)****2.1.3. Serum-Dextrose Agar (SDA)**

Brucella antikorlarını ihtiva etmeyen ve 56⁰C'de 30 dakika inaktive edilmiş at serumunun 5 ml'si için 1 gr saf dekstroz konuldu ve eritildi ve filtreden geçirilerek steril şişelere taksim edildi ve buzdolabında saklandı.

2.1.3.Brucella Agar(Merck 1.10490)

Dehidre besiyeri 41g/L konsantrasyonda distile su içinde eritildi ve otoklavda 121 C⁰de 15 dakikada sterilize edildi. Besiyeri sarımsı kahve renklidir. Brucella Selektif Agar hazırlamak için sterilize edilmiş 50⁰C 'a soğutulan besiyerine her biri filtre ile sterilize edilmiş 25000 IU/L , Basitrasin (Merck 1.06992), 6000 IU/L Polymyxin B sulfat (1.06994), 100 mg/L Cycloheximide ve 1.25mg/L ethylviolet ilave edilip karıştırıldı ve petri kutularına döküldü. İnkübasyonun %10 CO₂ atmosferinde yapıldı. Brucella bu besiyerinde 2-7 mm çapında soluk amber renkli, nemli ve hafif opalesent ve saydamımsı koloni yapar.

2.1.4. Thioninli Besiyerleri:

1:100.000, 1: 50.000, 1:25.000 oranlarında bu boyayı içeren plak besiyerlerinin hazırlamak için içlerinde 100 mL Brucella Agar bulunan üç balon joje alındı. Besiyerleri ısıtılarak eritildi ve 48⁰C'de tutulurken birinci balona tiyonin saf sudaki %0.1'lik eriyiğinden 1mL, ikinci balona 2 mL ve üçüncü balona 4 mL eklendi ve karıştırıldı ve hemen plaklara döküldü.

2.1.5. Fuchsinli Besiyerleri:

1.100.000 ve 1:50.000 yoğunluklarında hazırlamak için aynı şekilde içlerinde 100 ml *Brucella* Agar bulunan iki balona 48⁰C'de tutularak %0.1'lik fuchsin eriyiğinden birinci balona 1 mL, ikinci balona 2 mL eklendi, karıştırılıp plaklara döküldü.

Besiyerleri hazırlandıktan sonra *Brucella* bakterilerinden plak yüzeylerine çizgi ekimler yapıldı. Ekimler çift olarak yapıldı ve çift ekimlerden birisi %10 CO₂'li ortamda, diğeri normal atmosferde 37⁰C'de inkübe edildi. Üremelerinin olup olmadığına 48 saat sonra bakıldı.

2.1.6. Üre Agar (Oxoid CM53):

2,4 g besiyeri 95 ml distile su ile iyice karıştırılıp, karışımın iyice erimesi için 2 saat kaynatıldı. 121⁰C'de 15 dakika otoklavlandı. Sıcaklığı 50⁰C'ye ulaştığında 2 cc üre hazırlanan besiyerine eklenip, steril cam tüplere 4-5 mL döküldü.

2.2. Süt Kültürü:

Toplanan süt örneklerinin 25 tanesi *Brucella* şüpheli ineklerden, 75 tanesi yine *Brucella* şüpheli koyunlardan alınmıştır. Laboratuara gelen, süt örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki krema ile sediment karışımından öze ile Kanlı Agar, *Brucella* Agar ve SDA besiyerlerine ekim yapıldı, ekimler çift yapıp biri aerob ortamda diğeri %10 CO₂'li ortamda 3-5 gün süreyle 37⁰C'de inkübasyona bırakıldı.

2.3. Peynir Ekim Metodu:

Steril ziplog poşetlerde laboratuvara getirilen peynir örnekleri 5'er gr tartılarak üzerine 25 ml 45-50⁰C'lik steril fizyolojik tuzlu su ile stenomaherde (karıştırıcı) homojenize bir şekilde ezildi. Hazırlanan bu homojen karışımdan Kanlı Agar, *Brucella* Agar ve SDA besiyerlerine 0.1 ml ekim yapıldı. Peynir örneklerinde de ekimler çift yapıp biri aerob diğeri %10 CO₂'li ortamda 3-5 gün üremeye bırakıldı.

2.4. Sütlerde Ring Testi:

Bu çalışmada hayvancılığın ve süt inekçiliğinin yaygın olarak yapıldığı Afyon il merkezi ve köylerinden toplanan 100 süt örneği materyal olarak kullanılmıştır. Önce *B. abortus* Ring test antijeni (Biosystems Costabrava Co. Barcelona, Spain) kullanılarak lamda aglütinasyon testi yapılmıştır.

Her bir süt örneğinde 0.08, 0.04, 0.02,0.01 ve 0.005 mL alınıp, üzerine bırakılan birer damla antijen ile ileri geri hareket ettirilerek karışması sağlanmış, 1 dakika içinde oluşan reaksiyon gözlenmiştir. Şüpheli ve pozitif reaksiyon veren sütlerle tüpte aglütinasyon testi yapılmıştır. Ayrıca süt örnekleri iyice karıştırılarak 11x100 mm'lik test tüplerine konulmuş üzerine tetrazoliumla boyanmış *B. abortus* antijeninden (Ring Antijeni) 0.03 mL damlatılıp hafifçe karıştırılmıştır. İyice karışıp karışmadığı kontrol edildikten sonra tüpler 37⁰C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

Krema tabakası koyu renkli ve kremanın altındaki süt, beyaz veya beyaza çok yakınsa test (+) pozitif, krema tabakası beyaz, süt koyu renkli veya krema tabakası sütle aynı renkte ise test (-) olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca krema halkası ve sütteki renk değişimlerine göre ++, +++, +++++ pozitif olarak derecelendirilmiştir.

Laktasyonun ilk ve son zamanlarında alınan sütler ile az yağlı, homojenize, donmuş bayat ve mastitli hayvanların sütleri testin sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği gerekçesiyle kabul edilmemiştir.

2.5. Süt Serumu ile Aglütinasyon (Whey-AT) Testi:

Toplanan süt örneklerinin serumları ayrılarak, süt serumlarının 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 ve 1:80 dilüsyonları hazırlandı ve üzerlerine 0.5êr ml *Brucella* tüp antijeni ilave edilerek 1:10'dan 1:160'a kadar dilüsyonları hazırlandı. Tüpler 37⁰C'de 24 saat inkübe edildi. Serum antijen karışımlarında 1:40 ve üzeri pozitif olarak değerlendirildi. Alt titrelerde pozitif olan örnekler ise şüpheli olarak kabul edildi.

2.6. İdentifikasyon Metotları:

Brucella kolonileri genellikle besiyerine ekim yapıldıktan sonra, üçüncü günde görülür hale gelmeye başlarlar. Genellikle petri üzerinde tek koloni görülür, bu nedenle petriler ışık kaynağına tutulduğunda ve besiyeri içerisinden incelendiği

zaman, koloniler ince şeffaf, sarı bal rengindedir. Daha sonra genişlerler, renkleri daha koyu kahverengiye çalar; ama yine yarı şeffaftırlar. Üstten bakıldığı zaman koloni dışbükey ve inci gibi beyazdır. Etil violet ile boyanmış besiyerlerinde hafifçe renklidir. Ekimin dördüncü günü negatif olarak kabul edilen kültürler sekizinci ve onuncu gün incelenmek üzere tekrar inkübe edildi. Sekiz ve onuncu gün sonunda üremesi olmayan kültürler negatif kabul edildi.

Etüvden 4. günde çıkarılan petrielerde üreyen mikroorganizmaların meydana getirdiği kolonilerin morfolojik yapıları incelendi. Şüpheli kolonilerden öze ile, bir lam üzerinde, anti-brucella serumu ile aglütinasyon testi uygulandı.

Lam üzerine, bir damla anti-brucella serumu ve küçük bir miktar koloniden alınarak, iyice karıştırıldı. *Brucella* kolonilerinde hemen bir aglütinasyon görüldü.

Brucella bakterilerinin morfolojisini daha iyi incelemek için Gram boyama yöntemi ile boyanan preparatlar 100x'lük immersiyon objektifde incelendi. Gram negatif kokobasiller görünümde bakteriler görüldü.

2.7. Gram Boyama Yöntemi:

Hazırlanan preparatlar havada kurumaya bırakıldıktan sonra alevde tespit edildi. Öncelikle lamın her tarafını kaplayacak şekilde Kriystal violet damlatılıp 1 dakika bekletilen preparat daha sonra çeşme suyunda yıkanmıştır. Preparat üzerine lügol damlatılarak yine 1 dakika bekletildi ve yine çeşme suyunda yıkandı. Yıkanan preparat üzerine alkol damlatılarak 30 saniye bekletilip yıkandı. Son olarak basic fuksin damlatılıp yine 30 saniye bekletildi ve yıkandı. Kurumaya bırakılan preparatlar mikroskopta incelendi. *Brucella* şüpheli kolonilerden hazırladığımız preparatlar da *Brucella* bakterisi yanında özellikle *Proteus spp.* ve *Pseudomonas spp.*'ler mikroskopta görüldü. Bunların yanında diğer gram negatif birçok çiğ süt ve taze peynirde bulunan flora elemanları da gözlemlendi.

2.8. Tip Tayininde Kullanılan Yöntemler:

İzole ettiğimiz *Brucella* grubu bakterilerin tip tayininde , rutin klasik standart yöntemler kullanıldı.

1. CO₂ gereksinimi

2. Hidrojen Sülfür Üretimi (H₂S):

Petride üreyen suşlara ait kolonilerden iğne uçlu öze ile tek koloni alınarak yatık SDA agara ekim yapıldı. Kurşun asetatlı kağıt besiyerine kesinlikle temas etmeyecek şekilde tüple tıpa arasına sıkıtılarak yerleştirildi.

H₂S kağıtlı tüpler 37⁰C’de inkübe edilen örnekler ilk 2-3 saatte ve daha sonraki saatlerdeki kararma süreleri kontrol edildi ve kararma zamanları kaydedildi.

3. Boyalarla Birlikte Üreme

Brucella Selective Agar ve SDA’daki *Brucella* şüpheli kolonilerden Fuksinli ve Tiyoninli besiyerlerine birbirine paralel çizgi ekimler yapıldı. Petriler %10 CO₂’li ve aerob koşullarda 3-5 gün süreyle inkübe edildi. Sonuçlar üreme durumuna göre değerlendirildi.

Her boya testi yapılırken, mutlaka referans suşlarla paralel çalışılarak, kontrol yapılmalı, bu çalışmada da bu hususlara dikkat edildi.

4. Üreaz Deneyi

Üre Agara *Brucella* kolonilerinden iğne öze ile tek koloni alınarak çizgi ekim yapıldı. 37⁰C’de inkübe edildi, birer saat aralıklarla besiyerindeki renk değişimi olup olmadığı kontrol edildi.

5. Monospesifik Antiserumlarla Aglütinasyon

Bu amaçla Weybridge’den temin edilen, monospesifik *B. melitensis* ve *B. abortus* antiserumları kullanıldı.test yapılırken, her serum dilüsyonundan bir damla bir lam üzerine damlatıldı. Test edilecek kültürden çok küçük bir miktar bir öze yardımıyla alınıp her biri damla üzerine konuldu. Süspansiyonların her birinin aşağı yukarı aynı miktarda olmasına ve çok yoğun olmamasına özen gösterildi. Reaksiyon sonuçları 1 dakika içerisinde değerlendirildi.

6. *Brucella* Fajları ile Duyarlılık Testleri

Tip tayininde kullanılan *Brucella* Fajı: Tblisi'dir.

Test edilecek kültürlerin, yatık agarda kültürleri hazırlandı. Kültürlerin 10 milyar bakteri/mL olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. SDA'lı petrilere steril bir swap batırılarak, soldan sağa doğru sürülerek ekim yapıldı. Tblisi fajının 10^1 - 10^2 - 10^4 RTD'ları kullanıldı. Her damlası 0,02 ml, olacak şekilde ayarlanmış pastör pipetleri ile her çizgi üzerine, değişik konsantrasyonlardan birer damla damlatıldı. Damlalar iyice emildikten sonra, petriler CO₂'li ve aerobik ortamda olmak üzere etüve konuldu. 37⁰C'de, 4 gün beklendi, üreme lizis durumlarına göre değerlendirildi.

3. BULGULAR

Toplanan süt numunelerinin 25(%25)'inde *Brucella* bakterisi retilenmiŒtir. Bölgemizde değişik merkezlerden toplanan toplam 100 süt rneğinde *Brucella* antikorlarının varlığı kültür yöntemleriyle (%25), ve sütlerde serolojik bir yöntem olan Ring testi (%35) ile saptanmıŒtır.

Tablo 9. Toplanan süt örneklerinin alındığı yer, iŒletmeler ve örnek sayıları.

| İŒletme/Köy/Kasaba | rnek Türü | Koyun/İnek | rnek Sayısı |
|------------------------------------|-------------|------------|------------------------------------|
| Salar Kasabası | Süt | Koyun | 8 |
| Slmenli | Süt | İnek | 4 |
| Ataköy | Süt | Koyun | 20 |
| Nuribey Kasabası | Süt | Koyun | 22 |
| Ataköy | Süt | İnek | 6 |
| zel Bir Hayvan retim iftliği | Süt | İnek | 15 |
| Farklı Marketler | Süt | Koyun | 25 |
| Farklı Marketler | Taze penir | Koyun | 50 |
| Farklı Marketler | Taze peynir | İnek | 50 |
| TOPLAM | | | 100 adet süt ve 100 adet peynir |

Bu alıŒmada toplanan süt rnekleri Kanlı Agar, *Brucella* Agar, SDA ve BSA besiyerlerinin her birine çift ekimleri yapılmıŒ ve bu ekimlerde biri aerob ortamda diğeri ise %10 CO₂'li ortamda 37⁰C'de 3-5 gün inkübe edilmiŒtir.

Kanlı Agar ve *Brucella* Agara ekilen sütlerde *Brucella* kolonilerinin yanında çiğ süt florasındaki diğer bakterilerin de ürediği gzlenmiŒtir. *Brucella* dıŒındaki bakterilerin üremesinin en fazla olduğu besiyerinin SDA ve *Brucella* Selektif Agar (BSA) olduğunu gözlemledik.

Kanlı Agar, *Brucella* Agar, BSA ve SDA'ya ekimleri yapılan süt örneklerinden Kanlı Agar'da yalnız 1 (%1) tanesinde *Brucella* Œpheli koloni gözlendi. Bu kolonilerin *Brucella* anti-serumu ile aglütine olduğu görüldü. Ancak Kanlı Agarda saf *Brucella* kolonilerinin diğer flora elemanları ile karıŒmıŒ olduğu gözlendi.

Brucella Agarda 10 (%10) *Brucella* spp. üretebildik. Brucella Selektif Agar (BSA)'da 23 (%23), SDA'da ise 25 (%25) *Brucella* spp. üretebildik. Üreyen bu kolonilerin Brucella anti-serumu ile aglutine oldukları gözlemlenmiştir.

Brucella Agar, Brucella Selektif Agar (BSA) ve SDA besiyerinde ekilen örneklerin kolonileri 4 günde gözle görülür hale geldi. Koloniler incelendiğinde 2-3 mm çapında yuvarlak, düz kenarlı, şeffaf, sarı bal renginde, şebnem tanesine benzeyen koloniler gözlemlendi. Koloniler üstten bakıldığında bombeli, inci beyazlığında görüldü. Kolonilerin S tipi oldukları belirlendi. İzolasyonu yapılan ve smooth oldukları belirlenen *Brucella* kolonilerinin türlerinin belirlemek amacıyla yapılan testler aşağıda belirtilmiştir.

Bu çalışmada kullandığımız katı *Brucella* besiyerlerinden Brucella Agar ve kanlı Agara oranla SDA besiyerinde ve Brucella Selektif Agarda daha fazla *Brucella* bakterisi üretilmiştir. Bu çalışma sonucunda *Brucella* bakterilerinin en iyi Serum-Dextroz Agar (SDA) ve Brucella Selektif Agarda ürettiği saptanmıştır.

Özellikle Brucella Selektif Agarda *Brucella* dışında herhangi bir bakteri ürememiştir. Yine SDA'da *Brucella* dışındaki bakterilerden hiçbirisi ürememiştir.

Tür ayırımında aşağıdaki yöntemler izlenmiştir:

1. Karbondioksit Gereksinimi:

Süt örneklerinin yalnız 5 (%5)'in % 10 CO₂'li ortamda ürettiği gözlemlendi. Diğer 20 (%20) örneğin CO₂'li ortamda üremediği kaydedildi. Peynir örneklerinden hiçbirisinde %10 CO₂'li ortamda üreme saptanamamıştır. Ancak aerob ortamda (SDA besiyerine ekilmiş) inkübe edilen 2 (%2) örnekte üreme gözlemlenmiştir.

B. abortus'ların %10 CO₂'li ortamda ürettiği, *B. melitensis*'in %10 CO₂'li ortamda üremediği aerob ortamda ürettiği gözlemlendi.

2. H₂S Üretimi:

Süt örneklerinden alınan *Brucella* spp. kolonilerinin sadece 5 (%5) tanesi kurşun asetatlı kağıdı 1-2 saatte kararttığı gözlemlendi, diğer 20 süt örneğinden alınan kolonilerin kurşun asetatlı kağıtta ilk 1-2 saatte kararırma meydana getirmediği ancak bazılarında saatler sonra çok az miktarda bir kararırma meydana geldiği gözlemlendi.

Peynir örneklerinden elde ettiğimiz 2 (%2) örnekten alınan *Brucella spp.* kolonilerinden ikisinde de H₂S oluşumu gözlenmedi. H₂S oluşumu gözlenmeyen bu bakterilerin *B. melitensis* olduğuna karar verildi.

1-2 saat sonunda süt örneklerinden yapılan ekimlerde H₂S oluşturan 5 (%5) örneğin *B. abortus* , H₂S oluşturmayan 20 (%20) adet örneğin ise *B. melitensis* olduğuna karar verildi.

3. Boyalarla Birlikte Üreme:

Süt örneklerinden elde ettiğimiz 25 (%25) adet *Brucella spp.* kolonilerinden hem bazik fuksinli besiyerine hem de tiyoinli besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda basik fuksinli besiyerininin 1/25.000, 1/50.000 ve 1/100.000'lik konsantrasyonlarının tümünde üreme sadece 5 (%5) örnekte saptanabilmiştir. Diğer 20 adet örneğin ise bazik fuksinin 1/25.000 konsantrasyonunda üremediği ancak diğer iki konsantrasyonda ürettiği saptanmıştır. Tiyoinli besiyerinde 20 (% 20) tane örnekte üreme saptanabilmiştir. Peynir örneklerinden 2 (%2) adet *Brucella spp.* olarak saptadığımız örneklerin yine bazik fuksinin 1/25.000 konsantrasyonda ürettiği ancak diğer konsantrasyonlarda üremediği saptanmıştır. Tiyoinli besiyerinde 2 örnekte de üreme saptanmıştır.

Bazik fuksinin tüm konsantrasyonlarında üreyen 5 (%5) adet süt örneğinin, *B. abortus*, bazik fuksinin 1/25,000 konsantrasyonunda üremeyen, 1/50,000 ve 1/100,000'lik konsantrasyonlarda üreyen ve tiyoinli besiyerinde üreyen 20 (%20) adet örneğin ise *B. melitensis* olduğuna karar verildi. Yine basik fuksinin ilk konsantrasyonunda üreyen diğer iki konsantrasyonunda üremeyen peynirden izole ettiğimiz örneklerin *B. melitensis* olduğuna tiyoinde de üremesiyle karar verdik.

4. Üreaz Deneyi:

Üre Agara ekimleri yapılan 37⁰C'de inkübe ettiğimiz; süttten izole edilmiş olan 25 adet örnekten yalnız 5 (%5)'inde 2-3 saat sonunda pembe renk oluştuğu gözlemlendi. 24 saat sonunda incelenen diğer 20 örnekten sadece 1-2'sinde pembe renk oluşumu gözlenmemiştir; diğerlerinde pembe renk 24 saat sonra gözlemlenmiştir. Peynir örneklerinden izole etmiş olduğumuz 2 (%2) suşlardan yapılan ekimlerde ise üre

agarda ilk 2-3 saatte renk değişimi gözlenmemiştir. 24 saat sonunda da fenol kırmızısı renginde değişim gözlenmiştir.

Fenol kırmızısının değişme zamanları kaydedildi. 2-3 saatten sonra pembe renk oluşturanlar *B. abortus* daha uzun zamanlarda ve değişik sürelerde pembe renk oluşturanların ise *B. melitensis* olduğuna karar verildi.

5. Monospesifik Antiserumlarla Aglutinasyon

B. abortus anti serumu ile süttten izole edilen 5 (%5) suşun, *B. melitensis* antiserumu ile 20 (%20) suşun aglutinasyon verdiği saptandı. Peynir örneklerinden izole edilen 2 (%2) adet suşun ise *B. melitensis* antiserumu ile aglutinasyon olduğu gözlendi. Bu sonuçlar diğer yöntemlerle yaptığımız tespitleri de doğrulamış olmaktadır.

Tablo 10. Süt ve Peynir Örneklerinden elde ettiğimiz *Brucella* türlerinin sayısı

| | Tür | Süt | Peynir |
|--------|----------------------|-----|--------|
| | <i>B. abortus</i> | 5 | - |
| | <i>B. melitensis</i> | 20 | 2 |
| TOPLAM | - | 25 | 2 |

6. *Brucella* Faj Duyarlılık Testi

Süt ve peynir örneklerinden tespit edilen 13 *Brucella* suşunda biyotiplendirme yapılmıştır. Biyotiplendirme Pendik Merkez Veteriner Araştırma Enstitüsü ile beraber yapılmıştır. Bu suşlardan 5 tanesinin Faj Tbilisi'nin, 10¹ RTD, 10² RTD ve 10⁴ RTD'larda lize olduğu saptanmıştır. Diğer 8 suşun ise Tbilisi fajının 10¹ RTD, 10² RTD ve 10⁴ RTD'larda lize olmadığı saptanmıştır.

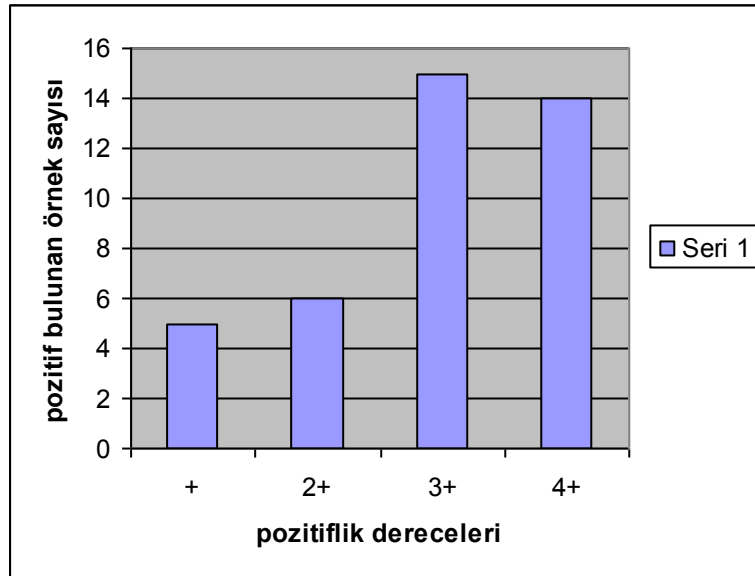
Tablo 11. Brucella Suşlarının Biyotiplendirilmesi

| SUŞ NO | BASİK FUKSİN | TİYONİN | CO ₂ | H ₂ S | Tbilisi faj lisiz | A | M | BİYOTİP |
|--------|-----------------|---------|-----------------|------------------|----------------------|---|---|----------------------------|
| 19 | + | + | - | - | - | + | + | B.melitensis biyotip 3 |
| 42 | + | + | - | - | - | + | + | B. melitensis biyotip 3 |
| 61 | + | + | - | - | - | + | + | B. melitensis biyotip 3 |
| 75 | + | + | - | - | - | + | + | B.melitensis biyotip 3 |
| 84 | + | + | - | - | - | + | + | B.melitensis biyotip 3 |
| 12 | + | + | - | - | - | + | + | B.melitensis biyotip 3 |
| 8 | + | + | - | - | - | + | + | B.melitensis biyotip 3 |
| 60 | + | + | - | - | - | + | + | B. melitensis biyotip 3 |
| 56 | + | + | + | + | + | + | - | B. abortus biyotip 3 |
| 53 | + | + | + | + | + | + | - | B. abortus biyotip 3 |
| 71 | + | + | + | + | + | + | - | B. abortus biyotip 3 |
| 15 | + | + | + | + | + | + | - | B. abortus biyotip 3 |
| 5 | + | + | + | + | + | + | + | B. abortus biyotip 3 |

Sütlerde Ring Testi:

Afyon merkez ve köylerinden toplamış olduğumuz 100 adet süt örneğinde yapılan bu testte 35 (%35) örnekte pozitiflik saptanmıştır. Pozitiflik; +, 2 +, 3 + ve 4 + olarak değerlendirilmiştir. Saptanan 35 (%35) örnekten 5 tanesi +, 6 tanesi ++, 15 tanesi +++, 14 tanesi de 4 + olarak bulunmuştur. Bu örneklerin 15 tanesi ineklerden almış olduğumuz sütlerden, 20 tanesi de koyunlardan almış olduğumuz sütlerdendir.

Grafik 1. Sütlerde Yapılan Ring testindeki pozitiflik dereceleri ve pozitif örnek sayıları.



Lamda pozitif sonuç veren sütlerin tamamında, tüpte yapılan Ring testinde de pozitif reaksiyon alınmıştır. Kültürde üreyen *Brucella* kolonilerinden hazırlanan gram preparatta gram negatif *Brucella* bakterileri gözlenmiştir. Ring testini pozitif bulduğumuz inek ve koyunlardan alınan kan örneklerinde Rose Bengal testi de pozitif olarak bulunmuştur. Wright aglütinasyon testinde ise 20 ise örnek, 1/160 ve üzeri titrelerde pozitif olarak bulunmuştur. Diğer 15 örneğin; 10 tanesinde 1/160 titrede pozitif bulundu, 5 örnek ise 1/80 ve daha az titrelerde pozitif olarak saptanmıştır.

Biz bu çalışmada Whey-AT testi ile topladığımız 100 adet süt örneğinin 15'ini (%15) pozitif olarak belirledik. Toplanan süt örneğinin 5 (%5)'inde şüpheli olarak belirledik.

4. TARTIŞMA

Birçok gelişmiş ülkede az görülen bir hastalık olan bruselloz, ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde ve hayvancılık bölgelerinde hala önemini korumaktadır. Mortalitesi düşük olmasına rağmen, morbiditesi yüksek olan bu zoonotik hastalık ülkemizde 1991-1993 yılları arasında 17000 kişide saptanmıştır. Hayvanlarda üretim kaybı ve düşüklere, insanlarda iş gücü kaybına neden olması ile ekonomik zarara yol açmaktadır (1,5).

Diğer tüm infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi brusellozda da kesin tanı kültür ile konulur. Ancak her zaman etkeni üretmek mümkün değildir. Süt ve peynir ile yapılan birçok çalışmada *Brucella spp.*'ler süttten daha kolay izole edilmiştir (5,19).

Tanıda zaman zaman güçlüklerle karşılaşılması, hastalığın kronikleşebilme yeteneğinde olması ve pek çok hastalıkla benzer bulgular göstermesi nedeniyle kesin tanısı önem kazanmaktadır(1,5).

Taze peynirin infeksiyon kaynağı olduğu ülkelerin başında Akdeniz ülkeleri, Fransa, İtalya, Yunanistan ve Orta Asya ülkeleri gelmektedir. Bunun nedenini günümüzde dahi halen bazı yörelerde çiğ süt içiminin devam etmesine ve peynir yapımında da pastörize ya da pişmiş sütlerin henüz yaygın olarak kullanılmamasına bağlayabiliriz (19,37,41).

Mendez Martinez C. (40), ve ark. pastörize olmayan keçi peynirlerinden yapmış oldukları çalışmada %10 oranında *Brucella* saptadıklarını bildirmişlerdir. Roberts D. (61), keçi sütlerinde Ring testi ile pozitiflik tespit edemediğini belirtmiştir.

Parlakgöl D. (29), İstanbul piyasasındaki peynirlerden yapmış olduğu çalışma da *Brucella* bakterisi üretememiştir. Ancak *Listeria spp.* üretebildiklerini bildirmiştir. Güllüce M. (41), ve ark. Erzurum bölgesinden temin ettikleri peynir örneklerinde *Brucella* antijenlerini ELISA yöntemiyle araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada 120 beyaz peynir, 10 çivil peyniri ve 52 lor peyniri örneğini kullanmışlardır. Beyaz peynir örneklerinin 26'sında (%21.66), *B. abortus* antijeni saptadıklarını bildirmişlerdir. Diğer iki peynir örneğinde ise *B. abortus* antijeni saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Ünel S. (42), Balıkesir yöresi beyaz peynirlerinde %16 oranında *Brucella* saptamışlardır. Mert A. (43), Ankara yöresinde pazarlanan taze beyaz peynirlerde % 19.3 , Tunçbilek M. (44), yine Ankara piyasasından toplanan peynirlerde %5.2 oranında *Brucella* saptamışlardır.

Ayaz Y. (45); ve ark. ise Ankara'da çeşitli marketlerden topladığı beyaz peynirlerden *Brucella* izole edemediğini belirtmektedir. Sert S. (46), ve ark. Erzurum piyasasından topladıkları 30 adet beyaz peynir örneğinin hiçbirisinden *Brucella* izole edemediğini kaydetmişlerdir.

Biz çalışmamızda toplamış olduğumuz peynir örneklerinden 2 (%2) tane *B. melitensis* üretebildik. Peynir örneklerinden çalışmamızda oldukça düşük bir aranda *Brucella* türlerinin izole edebildik. Bakteriyolojik yöntemlerle peynirden yapılan pek çok çalışmada da *Brucella* türleri izole edilememiştir. Ancak özellikle ELISA yöntemiyle peynirden *Brucella* izole edilebilmiştir. Bu sonuçlar ve bizim elde ettiğimiz sonuçlardan *Brucella* türlerinin peynirden daha zor izole edilebildiği veya bekletilen peynirler de *Brucella* bakterilerinin öldüğü kararına vardık.

Hem bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda, hem de daha önce yapılmış çalışmalarda, peynir örneklerinde *Brucella* saptanması, ülkemizde halen geleneksel usullerle ve çiğ süttten peynir yapımının devam ettiğini göstermektedir. Nitekim ülkemizde ve hayvancılığın yaygın olarak yapıldığı Afyon yöresinde köy ve mandıra peynirlerinin büyük bir kısmının çiğ süttten ve ilkel şartlarda yapıldığı belirtilmektedir. Çiğ süttten yapılan peynirlerin en az 90 günlük olgunlaşma dönemini tamamlamadan tüketime verilmemesi gerektiği de belirtilmiştir (41).

Brucella türleri ile infekte edilmiş hayvanların laktasyon dönemindeki süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile her yıl binlerce insan hastalığa yakalanmakta ve sonuçta hastalık insanlarda iş gücü kaybına neden olmaktadır. Ülkemizde bildirim yetersizlikleri ve subklinik olguların varlığı nedeniyle gerçek bruselloz insidansı saptanamamakla birlikte, *Brucella* spesifik antikor taşıyan 1.750.000 bireyin olduğu sanılmaktadır (1,5,19). İspanya'da 1996 yılında pastörize edilmemiş peynir tüketimine bağlı bir *B. melitensis* epidemisi bildirilmiştir (40).

Tantillo G. (25), ve ark. süt ve peynir örneklerinden direk yöntemler ve PCR yöntemiyle %46 oranında *Brucella spp.* elde ettiklerini bildirmişlerdir. Redkar

R.(50), ve ark. Real-Time PCR yöntemiyle *Brucella* türlerini elde ettiklerini bildirmektedir.

Leal Klevezas D. S. (39), ve ark. infekte hayvanlardan aldıkları kan ve süt örneklerinden kültür yöntemleri ve Single-Step PCR ile yapmış oldukları çalışmada toplam 22 süt örneğinde %14, *Brucella* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kültür yöntemiyle %10 *Brucella* üretebildiklerini bildirmişlerdir. PCR yöntemiyle ise %17 oranında *Brucella* tespit etmişlerdir.

Afyon ve civarında hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı merkezlerde besiciler, kasaplar ile süt toplayıcısı ve süt ürünleri imalethanelerinde çalışan toplam 320 kişide Rose Bengal ve Wright aglütinasyon yöntemi ile *Brucella* antikor titresinin araştırıldığı bir çalışmada, besicilerde %13.27, kasaplarda %8.57, süt ürünleri çalışanlarında da %15.68 *Brucella* aglütinlerinin saptandığı bildirilmiştir (52).

Biz yapmış olduğumuz çalışmada *Brucella* şüpheli aldığımız 25 sığır süt örneğinin yalnız 5'sinden *B. abortus* elde edildi. Bu hayvanlardan alınan kan örneklerinin 15'in de Rose Bengal'i pozitif saptadık. Diğer 75 koyun sütünün 20'inde kültürde *B. melitensis* ayırtabildik. Kültürde peynirden *B. abortus*'un oldukça güç ürettiği kanaatine vardık. Süt örneklerinden yalnız 5 tanesinde *B. abortus* izole edebildik.

Bu oranların normal popülasyona göre yüksek olması infekte gıdalar yanında direkt temasla da (düşük materyali, hayvanın genital akıntısı ya da idrarın hasarlı ciltle teması yoluyla) bulaşın yaygın olması ile açıklanabilir. Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda farklı merkezlerde çoğunlukla risk grublarında bruselloz sıklığı %5.6-25.0 arasında bildirilmiştir olup, sonuçlar ülkemizde brusellozun yaygınlığının bir diğer göstergesidir (41,45,47).

Uraz G. (47) ve ark. farklı yörelerden topladıkları çiğ süt örneklerinden Ring testi ile *Brucella* varlığını araştırmışlar ve toplanan 211 süt örneğinin 32'sinde (%15.16)*Brucella* varlığını tespit etmişlerdir. Bu 32 süt örneğinin 27'sinin işletmelere ait süt örneklerinden, 5 tanesinin de sokak sütü örneği olduğunu bildirmişlerdir. Uraz G. (47), yapmış olduğu bu çalışmada *Brucella* tespit edilen süt

örneklerinin yörelere göre grublandığında en yoğun 11 örnekle Burdur, 10 örnekle de Ankara ve çevresinin bulunduğunu bildirmektedir.

Altındış M. (48), ve ark. Afyon yöresinden toplanan süt örneklerinde Ring testi ile *Brucella* varlığını araştırmışlardır. Özellikle Emirdağı-Soğukkuyu'dan alınan süt örneklerinde (%5) pozitiflik saptadıklarını belirtmektedirler.

Altun B. (49), ve ark. Ankara'da satılan sütlerden yapmış oldukları çalışmada 300 süt örneğinden çalışma yapmışlar ancak *Brucella* bakterisini izole edemediklerini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz oranlar diğer çalışmalarla benzer oranlardadır, aynı zamanda yapılan birçok çalışmada *Brucella* izole edilemezken biz çalışmamızda hem kültür yöntemleriyle hemde sütlerde Ring testi ile *Brucella* türlerini izole edebildik. Özellikle peynir örneklerinden diğer çalışmalarda olduğu bizim çalışmamızda da *Brucella spp.* daha zor üretilmiştir; ancak pek çok çalışmada peynirden *Brucella spp.* izole edilememiştir. Biz çalışmamızda peynir örneklerinden %2 oranında *B. melitensis* izole ettik.

Adıgüzel A. (53), Erzurum'a bağlı 20 yerleşim biriminden rastgele 560 süt örneği toplanmış ve *B. abortus*'a spesifik antikorların varlığını ELISA ile değerlendirmiştir. Sonuçta bunlardan 96'sinin (%17) pozitif olarak bulunduğunu belirtmiştir.

Topladığımız 100 adet süt örneğinin 25 (%25)'inden *Brucella spp.*'leri üretebildik. Bu 25 süt örneğinin 5 tanesini *B. abortus*, 20 tanesini de *B. melitensis* olarak elde ettik. Ayrıca topladığımız sütlerden yaptığımız Ring testi ile de 35 adet örnekte pozitiflik saptadık. Bu bulgular ışığında çalışmamızda yüksek oranda *Brucella* içeren örneğin olduğu görünse de, hem aynı yöntemlerle yapılmış olan çalışmaların azlığı ve örnekleme iyi yapılamamış olması, böyle bir genelleme yapılmasını güçleştirmektedir.

Bruselloz sistemik bir hastalık olup insanda birçok organ ve dokuları etkilemektedir. Mikroorganizma vücuda giriş yerinden lenfatik yayılımla regional lenf nodüllerine, duktus torasikusa ve oradan da kan yoluyla kemik iliği, karaciğer, dalak ve diğer organlara ulaşır (54).

Günümüzde hala büyük bir problem olarak karşımıza çıkmakta olan bruselloz insidansı ülkeden ülkeye farklı oranlarda bildirilmekte , hatta onyedide eradike edildiği iddia edilmektedir. Ancak buna rağmen *B. abortus*'un oluşturduğu sığıır brusellozu çok yaygın olma özelliğini korumakta ve *B. melitensis*'in etkeni olduğu koyun ve keçi brusellozu ise insandaki en ciddi klinik tablo oluşturma özelliğini devam ettirmektedir (56,57).

Brucella'nın zor üreyen bir bakteri olduğu ve spesifik kültürlerde daha üreme gözleneceği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da sonuçlar bu doğrultuda bulunmuştur (58).

Türütoğlu H. (59), ve ark. Burdur yöresinden topladıkları süt örneklerinden bakteriyolojik yöntemlerle *Brucella* izole edemediklerini, fakat Ring testi ve Whey-aglütinasyon testi ile inek sütlerinde Ring testi ile 12 örnekte (%3), koyun sütlerinde yine Ring testi ile 40 inekte (%17.7) pozitiflik saptadıklarını belirtmişlerdir. Whey-aglütinasyon testi ile inek ve koyun süt örneklerinin sırasıyla 9'unda (%2.2) ve 31'inde (%13.7) pozitiflik belirlediklerini bildirmişlerdir.

Kenar B. (60), sütlerde Ring testi ile Konya, Kayseri, Niğde ve Nevşehir illerinden aldığı inek sütü örneklerinde sırasıyla %13,93, %0,92, %24,15 ve %3 oranlarında pozitiflik saptadığını bildirmiştir.

Güllüce M. (61) ve ark. Kars yöresinde yapmış oldukları çalışmada sütlerde Ring testi ile %56,32, ELISA ile ise %65,59 olarak pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir. Yine; Nada H.S. (62), 20 koyun sütü örneğinde % 20, 50 keçi sütünde % 12 oranında pozitiflik saptadığını bildirmiştir. Tunçer G. (63) İzmir civarından toplanan 19 çiğ süt örneğinden Ring testi ile 7 örnekte pozitiflik saptadığını belirtmiştir.

Yapılan pek çok çalışmada *Brucella* türlerinin izole edilememe nedeni; toplanan süt örneklerinin öncelikle laktasyonun ilk haftalarında alınmaması, örneklerin rastgele toplanması, bunların yanında farklı zamanlarda alınmaması ve örneklerin toplandığı hayvanların farklı meme loblarından alınmamasına bağlanmıştır. Türütoğlu H. (59), yapmış olduğu çalışmada *Brucella* izole etmemesini de bu nedenlere bağlamaktadır. Biz yapmış olduğumuz çalışmalarda

bunlara dikkat ederek örneklerimizi topladık ve *Brucella* türlerini izole edebildik.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bruselloz, insanlarda fiziki yetersizliğe ve dolayısı ile iş gücü kayıplarına neden olmaktadır. Birçok sistemde tutulumu olmasından dolayı oldukça güç tedavi edilen bu hastalık öncelikle infekte hayvan ürünlerinden insanlara bulaşmaktadır. Özellikle süt ve peynir gibi temel gıdalardan insanlara bulaş oldukça yüksek oranlardadır.

Sonuçlar:

Yapmış olduğumuz bu çalışmada toplamış olduğumuz taze peynir örneklerinden yalnız 2 (%2)'sinde *Brucella spp.* üretilmiştir. Ancak toplanan süt örneklerinden 25 (%25)'inden *Brucella* izole edebildik.

Sütlerde Ring testi ile 35 (%35) örnekte pozitiflik saptadık.

Whey-AT ile 15 (%15) süt örneği pozitif olarak belirlendi. Yine bu testle 5 (%5) örnekte şüpheli olarak bulundu.

Yaptığımız bu çalışmada *Brucella*'nın en iyi SDA ve BSA'da ürettiği kararına vardık. Kanlı Agar'da yalnız 1 (%1) *Brucella* şüpheli koloni gözlemlendi. *Brucella* türlerinin SDA ve BSA'da üremelerinin nedeninin; bu besiyerleri içinde olan *Brucella* dışındaki bakterilerin üremelerini baskılamak için kullandığımız basitrasın, polimiksin B ve sikloheksimid gibi antibiyotiklerden kaynaklandığı kararına vardık. Çünkü özellikle Kanlı Agar'da saf *Brucella* kolonisi elde edemedik.

Öneriler:

Bruselloz daha çok besin yolu ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığı olduğuna göre belirli risk gruplarında daha çok görülmesinden dolayı meslek hastalığı olarak da kabul edilmektedir. Ancak son zamanlarda infekte besin tüketen tüm kesimleri de etkilediğinden hastalığın toplumsal bir önemi vardır. Korunma yöntemleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Öncelikle hastalığın bulaş yolları konusunda halkın bilgilendirilmesi gerekmektedir. Taze peynirlerin yeterince tuzlanması ve en az 2 ay bekletildikten sonra tüketilmesi önerilmeli, ayrıca sütlerin pastörizasyonu sağlanmalıdır. Açık satılan sütlerin ve sokak sütçülerinin denetimi yapılmalı, Enfeksiyonun epidemik olduğu yörelerde kaşar ve tulum peynirinin tüketilmesi, etlerin iyice pişirildikten sonra yenmesi önerilmelidir.

2. Ailede bruselloz tanısı almış kişi dışındaki diğer bireylerin de tarama testlerinden geçmeleri gerekmektedir.
3. Risk altındaki personel eldiven gözlük kullanmalı, kolları örten giysiler giymelidir. Güzellik enstitülerinde ürün hazırlamada ‘‘sağlıklı’’ sığır plasentası kullanılmasına özen gösterilmelidir. Endemik bölgelerde hayvan idrarları ile kirlenmiş sebzelerin iyice yıkanmadan yenmemesine dikkat edilmelidir.
4. Brusellozlu bireylerde cinsel ilişki yasaklanmalı veya önlem alınmalı, Brusellozlu olguların Sağlık Bakanlığı’na ihbarı kesinlikle yapılmalıdır.
5. İnsanların brusellozdan korunmasında ve hastalığın eradikasyonunda, hayvanların periyodik kontrolü de gerekmektedir. *Brucella* bakterisi ile infekte olmuş süt danaları *B. abortus* 19 suşu, süt kuzuları *B. melitensis* Rev 1 suşu ile aşılanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Çelebi S. (2003) Brusellozun epidemiyolojisi. *Ankem Dergisi* cilt:17 sayı:3, 340-343.
2. Akdeniz H., Buzgan T., Karahocagil MK., Demiröz AP.(1999) Hayvancılıkla uğraşan bir ailede *B. melitensis*'e bağlı aile içi bruselloz, 9. *Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Program Özet Kitabı* s.227 p.210, Antalya.
3. Sözen TH., Topçu AW., Söyletir G., Doğanay M. (2002) et.al. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri*. 636-647.
4. Sönmez E., Seçkin Y., Bayındır Y. (2000) Brucella endokarditi, *İnfeksiyon Dergisi* 14:277.
5. Orduna A. Almaraz, Prado A, et al. (2000) Evaluation of immunocapture-Agglutination test (brucellacapt) for serodiagnosis of Human brucellosis. *J Clin Mic.* 38:4000-5(8).
6. Sırmatel F. (2001) Brusellosis. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*. 33-35.
7. Çoker A. (1992) Türkiye'de izole edilen *Brucella* suşlarının bazı *Brucella* fajları ile tiplendirilmesi. Doktora tezi. İstanbul Üniversitesi.
8. Bilgehan H. (2000) Klinik Mikrobiyoloji. Barış yayınları Fakülteler Kitabevi 181-205.
9. Arda M. (2000) Klinik Mikrobiyoloji. Genişletilmiş 2. Baskı Medisan Yayınları.
10. Özkurt Z. (1998) Bruselloz tanısında *Brucella* aglütinasyon testi, kan ve kemik iliği kültürlerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Atatürk Üniv.
11. Ergönül O., Ç4elikbaş A., Tezeren D et. al. (2004) Analysis of risk factors for laboratory- acquired *Brucella* infections. *J Hospital Infection*. **56 (3)**: 223-7.
12. Kasım RA., Araj GF., Afeiche NE., Tabbarah ZA. (2004) *Brucella* infection in total hip replacement: case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. 36(1): 65-67.

13. Cloeckaert A., Jacques I., Linet JN., Duray G. (1995) Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/C mice, *J Med Microbiol* 42:200.
14. Cloeckaert A., Vizcaino N., Paquet JY. et. al. (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella spp.* past, present and future. *Vet Microbiol* 90:229.
15. Teixeira-Games AP., Cloeckaert A., Zygmunt MS. (2000) Characterization of heat, oxidative and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 68:2954.
16. Ustaçelebi Ş. (1999) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi 571-577.
17. Geyik F. M. (2003) Brusellozun Klinik Formları. *Klinik Dergisi*. 30 Mart-3 Nisan İstanbul Kongresi. 209-210.
18. Ertek M. (2003) Bruselloz: Klinik formları ve özellikleri. *Ankem Dergisi* **17(3)**:333-335.
19. Aktaş O. (2003) Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. *Ankem Dergisi* 17(3):336-339.
20. Yaylı G. (2003) Brusellozun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. *Klinik Dergisi*. 30 Mart-3 Nisan İstanbul Kongresi Kongre Kitabı. 211-213.
21. Bilgehan H. (2002) Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi 475-478.
22. Young EJ., Mendel GL., Bennett JE., Dolin R. (2000) *Brucella* species. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone. Philadelphia (3);2386-93.
23. Young EJ (1991) Serologic diagnosis of human brucellosis: An analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev. Infec. Dis.* 13:359-72.
24. Memish ZA., Balkhy HH. (2004) Brucellosis and international travel. *J Travel Med.* **11(1)**:49-55.

25. Tantillo G., Di Pinto A., Vergara A. et. al. (2001) Polymerase chain reaction for the direct detection of brucella spp. in milk and cheese. *J Food Prot Feb*; 64 (2): 164-7.
26. Altoparlak Ü. (2003) Brusellozun etiyojisi. *Ankem Dergisi*. 17(3): 330-332.
27. Erdenliğ S. (2003) Türkiye’de Brucella kökenleri. 30 Mart-3 Nisan İstanbul Kongresi. *Klimik Dergisi Kongre Kitabı*. 214-216.
28. Erdenliğ S., Ően A. (2000) Koyun atıkşlarından izole edilen *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.* **31(2)**, 31-42.
29. Palakgöl D. (1991) *Brucella* bakterilerinin peyn,rden ayrılması için balıklı besiyeri geliştirilmesi ve İstanbul piyasasında satılan peynirlerde *Brucella* ve *Listeria* bakterilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniv. Cerrahpařa Tıp Fakóltesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
30. Demir P., Yüksel Ö., Çapar Y., Cesur S. et. al. (2003) Bruselloza bağlı endokardit olgusu. *İnfeksiyon Dergisi*. **17(2)**:219-221.
31. Özdemir D., Albayrak F., Cesur S., Gönenli B. et. al. (2003) Bir nörobruselloz olgusu. *İnfeksiyon Dergisi*. **17(4)**:499-501.
32. Delrue RM., Lestarte P., Tibor A. et al. (2004) *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-sc screens. *FEMS Microbiol Lett. Fed.* 9; 231(1):1-12.
33. Celli J., Garvel JP.(2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol Feb*; **7(1)**:93-97.
34. Marianelli C., La Rosa G., Ciuchini F., et. al. (2003) Genetic diversty at alk B locus in *Brucella abortus*. *J Vet Med Infect Dis Vet Public Health. Dec*; **50(10)**:494-499.
35. Thakur SD., Kumar R., Thapliyal DC. (2002) Human brucellosis: review of an under-diagnosed animal tarnsmitted disease. *J Commun Dis. Dec*; **34(4)**:287-301.
36. Peled N., David Y., Yaqupsy P. (2004) In Batrtholin’s Gland Abscess caused by *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol Feb*; **42(2)**:917-918.

37. Baykam N., Esener H., Ergonul O. et. al. (2004) vitro antimicrobiol susceptibility of *Brucella* species. *Int J Antimicrob Agents*. Apr;23(4):405-407.
38. Castaneda-Roldan EI., Avelino-Flores F., Dall'Agnol M. et. al. (2004) Adherence of *Brucella* human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol*. May; **6(5)**:435-445.
39. Leal-Klevezas D.S., Martinez I., Merino A. et. al. (1995) Single-Step PCR for detection of *Brucella spp.* from blood and milk of infected animals. *Journals of Clinical Microbolgy*, **Vol.(33)**: 12-3087-3090.
40. Mendez Martinez C., Paez J Immenez A., cortes Blanco M. et. al. (2002) Brucellosis outbreak due to unpasturized raw goat cheese in Andaluca (Spain), *Eurosurveillance* **Vol. (8)**: 7-8.
41. Güllüce M., Adıgüzel A., Algur Ö.F. (2003) Erzurum bölgesinden temin edilen çeşitli peynir örneklerinde *Brucella* antijenlerinin ELISA ile saptanması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* **33**:356-360.
42. Ünel S., Williams CF., Stablefort AW. (1968) Balıkesir bölgesinde süt, krema imalethane ve köylü beyaz peynirleinde *Brucella melitensis*'in kalma süresi. *Pendik Mikrob Enst. Derg.* 2:67.
43. Mert A. (1984): Ankara yöresinde pazarlanan taze peynirlerde *Brucella*'ların varlığı üzerinde araştırmalar. *Doktora tezi*. Ankara üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
44. Tunçbilek M. (1992): Ankara piyasasında satılan taze peynirlerin brusellozis riski yönünden incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniv., Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
45. Ayaz Y. (1986) Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde brusellozis etmenlerinin araştırılması. *Etlik Vet. Mikrob Enst. Derg.* 5:109.
46. Sert S., Kıvanç M. (1985) Taze çivil ve lor peynirleri üzerinde mikrobiyolojik çalışmalar. Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi, Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü 5:287.
47. Uraz G., Yücel N. (1998) Çiğ süt örneklerinde Ring testi ile *Brucella* varlığının araştırılması. **11(2)**.

48. Altındış M., Kenar B. (2000) Afyon yöresinden toplanan süt örneklerinde *Brucella* varlığının Ring testi ile araştırılması. Afyon Kocatepe Üniv. *Kocatepe Tıp Derg.*
49. Altun B., Besler T., Ünal S. (2002) Ankara'da satılan sütlerin değerlendirilmesi. Hacettepe Üniv. Tıp Fakültesi. Hed **11(2)** :51.
50. Redkar R., Rose S., Bricker B., Delvecchio V. (2000) Real-Time detection of *Brucella abortus* , *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes* 15.43-52.
51. Sümer H., Sümer Z., Alim A. et. al. (2003) Serprevelance of *Brucella* in an elderly population in Mid. Anatolia, *J health Popul Nutr* **Vol:21**. p. 4.
52. Altındış M. (2000) Afyon bölgesi besicilerinde, kasaplarda, süt ürünleri toplayıcısı ve imalethanelerde çalışanlarda bruselloz seropozitifliği. *Ankem Derg.* 14(No:2): 227.
53. Adıgüzel A. (2001) Erzuruma bağlı bazı köylerden toplanan sütlerde *Brucella abortus* natikorlarının araştırılması. Atatürk Üniv.Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi. Erzurum.
54. Hall WH., Kern RM., Klein D. et al. (1990) Modern chemoterahy for brucellosis in humans. *Rev Infect Dis.* 12:1060-7.
55. Rijpens P.N., Jannes G., Asbroeck MV. et. al. (1996) Direct detection of *Brucella spp.* in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Applied and Enviromental Microbiology*, **62(5)**: 1683-1688.
56. Özsan K. (2000) Brusellozun tarihçe etiyolojisi, *Bruselloz Simpozyumu* kitabı. S. 21, Ankara.
57. Sırmatel F. (2001) X. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Kongre kitabı. S.33, Adana.
58. Aygen B., Sümerkan B., Kardaş Y. (1995) et al. 183 olgunun değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi*8:13-16.
59. Türütoğlu H., Mutluer B., Uysal Y. (2003) Burdur yöresinde toplanan sütlerin *Brucella* infeksiyonu yönünden araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci* 27, 1003-1009.

60. Kenar B.(1990) Konya, Nevşehir ve Kayseri illerinde koyun ve sığır brusellozisinin Ser-survey epidemiyolojik araştırılması. *Veterinarium*. 1: 34-37.
61. Güllüce M., Leloğlu N. (1996) Kars ve çevresinde süt sığırlarında, *Brucella abortus* karşı oluşan antikorların ELISA ve MRT ile saptanması, sonuçların karşılaştırılması. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 20: 251-255.
62. Nada H.S. (1994) Comparative Studies between field and serological tests used for diagnosis of ovine and caprine brucellosis. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 24: 174-175.
63. Tunçer G., Gökten D. (1994) İzmir civarından toplanan çiğ sütlerde *Brucella* antikorunun bulunma sıklığı. *Turk. Mikrobiyol. Cem. Derg.* 24:174-175.