

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



İSTANBUL'DAKİ SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN *BRUCELLA*
TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Riham Mohamed Hamid MOHAMED

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Gıda Güvenliği Programı

EKİM, 2020

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



İSTANBUL'DAKİ SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN *BRUCELLA*
TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Riham Mohamed Hamid MOHAMED
(Y1713.210001)

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Gıda Güvenliği Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ayla Ünver ALÇAY

EKİM, 2020

YEMİN METNİ

“İstanbul'daki süt ve süt ürünlerinden *Brucella* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu”olarak adlandırılan bu yüksek lisans tezinin akademik kurallara ve etik davranışlara uygun olarak kendim tarafından yazıldığını, faydalanan tüm materyallerin referans listesinde belirtilen kaynaklardan olduğunu beyan ederim.

Riham Mohammed Hamid MOHAMMED

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez konusunu seçerken isteklerimi de göz önünde bulundurarak bana rehberlik eden, çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen, bilimsel anlamda da bana yol gösteren değerli danışman hocam Dr. Öğr.Üyesi Ayla Ünver ALÇAY'a, laboratuvar çalışmalarımda bana destek oldukları için İstanbul Aydın Üniversitesi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca desteğini benden bir an olsun esirgemeyen, çalışmalarım boyunca tüm zorlukları benimle güğüsleyen, hayatımın her evresinde bana destek olan, her daim yanımda olan kıymetli dostum Hatice ALABAY'a, maddi ve manevi desteklerinden dolayı da sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

EKİM, 2020

RİHAM MOHAMED HAMİD MOHAMED

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
YEMİN METNİ	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe.....	1
1.2. Genel Özellikleri	3
1.2.1. Bakteri Türleri.....	4
1.2.2. Brucelloz	5
1.2.2.1. İnsanlarda Brucelloz.....	6
1.2.2.2. Hayvanlarda Brucelloz.....	6
1.2.3. Türkiye’de ve dünya’da Brucella.....	7
1.2.3.1. Türkiye’de Brucella prevalansı ile ilgili yapılan araştırmalar	8
1.2.3.2. Dünya’da süt ürünlerinde Brucella prevalansı ile ilgili yapılan araştırmalar	11
1.2.4. Canlı Kalma	12
1.2.5. Görünüm ve Boyanma Özellikleri	12
1.2.6. Değişik Ortamlardaki Yaşam Süreleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları	13
1.2.7. Üreme, Biyokimyasal ve Dirençlilik Özellikleri	13
1.2.8. Koloni morfoloji özellikleri	14
1.2.9. Üremeleri için gerekli besiyerleri ve özellikleri	15
1.2.10. Besiyerlerindeki kuluçka süreleri ve görünümleri	15
1.3. İmmünoloji	16
1.4. Klinik	17
1.5. Tedavi	18
1.6. Korunma	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Gereç.....	21
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	21
2.1.2. Kullanılan Malzemeler.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.1.3. Numune Alma	23
2.1.4. Kullanılan Besiyerleri - Besiyeri hazırlama.....	24
2.1.4.1. Brucella Selektif Agar	24
2.1.4.2. MacConkey Agar	25
2.1.4.3. Simmons Citrate Agar Besiyeri Hazırlama.....	25
2.1.4.4. Motility Test Medium	26
2.1.4.5. Urea Agar Base	26
2.1.5. Steril FTS Hazırlama	27

2.2. Yöntem	27
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	27
2.2.2. Gram Boyama	29
2.2.3. Süt Ring Testi	32
2.2.4. Biyokimyasal testler.....	32
2.2.4.1. Katalaz Testi.....	32
2.2.4.2. Oksidaz Testi.....	33
2.2.4.3. Üreaz Testi	33
2.2.4.4. Hareketlilik Testi.....	34
2.2.4.5. Kanlı Agar Ekim ve Hemoliz Testi.....	34
2.2.4.6. Sitrat testi	34
2.2.5. Aglutinasyon Reaksiyonu	36
2.2.6. İdentifikasyon ve Doğrulama.....	36
2.2.6.1. Kullanılan solüsyon ve besiyerleri:	36
2.2.6.2. Test Prosedürü.....	37
Brucella genus seviyesinde identifikasyon	37
Tür ve biyotip tanısında kullanılan yöntemler	38
3. BULGULAR	40
4. TARTIŞMA	42
5. SONUÇ.....	48

KISALTMALAR

MRT	: Süt Ring Testi
BSA	: Brucella Selective Agar
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
SDA	: Serum Dekstroz Agar
IM	: Kas İçi
TMP/SMZ	: Trimetoprim/Sulfometoksazol
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
LPS	: Lipopolisakarit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Mm	: Mikrometre
pH	: Hidrojen Gücü
Spp	: Subspecies
CO₂	: Karbondioksit
ONPG	: o-Nitrophenyl-Beta-D-galactopiranoside
ELISA	: Enzyme-linked immusorbent analizi
RTD	: Fajların rutin test dilüsyonunun
H₂S	: Hidrojen sülfür
°C	: Santigrat derece

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1.1: Kullanılan cihazların listesi.....	21
Çizelge 2.1.2: Kullanılan malzeme listesi.....	23
Çizelge 2.1.3: Alınan numuneler.....	24
Çizelge 2.1.4: İzole edilmiş Brucella spp.'nin biyokimyasal testleri.....	28

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Brucella türlerinin filogenetik ilişkisi	3
Şekil 1.1.2: Türkiye’de son yıllarda Brucelloz vakaları	8
Şekil 2.1.1: Kullanılan cihazlar	22
Şekil 2.1.2: Fuksin eklenmiş Brucella selektif agar	25
Şekil 2.1.3: MacConkey agar	25
Şekil 2.1.4: Sitrat ve hareket testi	26
Şekil 2.1.5: Urea agar base	27
Şekil 2.2.1: Numuna hazırlama	29
Şekil 2.2.2: Gram boyama	30
Şekil 2.2.3: TC. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Control Enstitüsü tarafından fotoğraflanan Brucella kolonileri	30
Şekil 2.2.4: Brucella izolasyon ve identifikasyon	31
Şekil 2.2.5: Süt ring testi	32
Şekil 2.2.6: Üreaz testi ve kanlı agara ekim	33
Şekil 2.2.7: Şüpheli kolonilerden kanlı agara ekim ve hemoliz testi	34
Şekil 2.2.8: Katalaz, üreaz ve oksidaz testleri	35
Şekil 2.2.9: Aglütinasyon reaksiyonu	39
Şekil 2.2.10: Şüpheli numunelerin Pendik Labaratuar tarafından gönderilen sonuç raporu	41

İSTANBUL'DAKİ SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN *BRUCELLA* TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

ÖZET

Genellikle enfekte hayvanlara doğrudan temas ile ya da kontamine çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi yoluyla insanlara bulaşabilen Bruselloz büyük ölçüde ekonomik kayıplara yol açabilen halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından tehlikeli bir hastalıktır. Bu nedenle bu hastalığın gıdalarda ve özellikle süt ve süt ürünlerinde tanımlanması oldukça önemlidir. Bu çalışmada İstanbul/Beylikdüzü semtinden alınan toplam 100 adet süt ve süt ürünü (çiğ süt (25 adet), peynir (45 adet), tereyağı (15 adet) ve kaymak (15 adet)) *Brucella* spp. varlığını araştırmak amaçlanmıştır. Örneklerden *Brucella* spp. izolasyon ve identifikasyonu için, kültür, biyokimyasal testler, süt ring testi, aglütinasyon reaksiyonu testleri kullanılmıştır. Süt ring testinde 4 adet pozitif bulunmuştur. Yüz adet numuneden izole edilen şüpheli kolonilerden biyokimyasal testler ve aglütinasyon testleriyle son olarak beş adedi belirlenmiş, ancak İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde yapılan doğrulamada hiçbiri *Brucella* spp. olarak identifiye edilmemiştir.

Hiçbir örnekte *Brucella* spp. tesbit edilmemiş olması nedeniyle, İstanbul/Beylikdüzü semtinde rastgele örnekleme ile seçilen, süt ve ürünlerinin *Brucella* yönünden güvenilir olduğu ve halk sağlığı açısından bir tehdit oluşturmadığı söylenebilir. Daha önce Türkiye'de yapılmış çok sayıda araştırmada süt ve süt ürünlerinde düşük de olsa *Brucella* tespit edilmiş olması dikkate alındığında, enfeksiyonun ciddiyeti açısından, daha fazla numune alınarak araştırmanın genişletilmesi ve araştırmalara devam edilmesi faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Brucella* spp., Çiğ süt, Peynir, Kaymak, Tereyağı

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *BRUCELLA* SPECIES FROM MILK AND DAIRY PRODUCTS IN ISTANBUL

ABSTRACT

Brucellosis, which can be transmitted to humans by direct contact with infected animals or by consuming contaminated raw milk and dairy products, is a dangerous disease in terms of public health and food safety that can lead to economic losses. For this reason, it is of vital importance to define this disease in food, especially milk and dairy products. In this study, it was aimed to investigate the presence of *Brucella* spp. in 100 milk and dairy products (raw milk (25 samples), cheese (45 samples), butter (15 samples) and cream (15 samples)) taken from Istanbul / Beylikdüzü district. Culture, biochemical tests, milk ring test, agglutination reaction tests were used for *Brucella* spp. isolation and identification from samples. 4 positives were found in the milk ring test. Finally, five of the suspicious colonies isolated from 100 samples were determined by biochemical tests and agglutination tests, but none of them were identified as *Brucella* spp. in the verification performed by the Istanbul Pendik Veterinary Control Institute.

Since *Brucella* spp. had not been detected in any of the samples, it can be said that milk and its products selected by random sampling in Istanbul / Beylikdüzü district are safe in terms of *Brucella* and do not pose a threat to public health. The fact that *Brucella* had been detected, even by a small margin, in milk and dairy products in numerous researches previously conducted in Turkey calls for the continuation and expansion of research by taking more samples, which proves useful taking into account the severity of the infection.

Keywords: *Brucella* spp., Raw milk, Cheese, Cream, Butter

1. GİRİŞ

Brucelloz, Akdeniz humması, Malta ateşi olarak da isimlendirilen zoonotik bir enfeksiyondur. Hastalık etkeni ilk kez 1887 yılında Dr. Sir David Bruce tarafından Malta adasında, bir İngiliz askerinin dalağından izole edilmiştir. *Brucella*, *Brucellaceae* familyasında, gram negatif, kokoid formlu, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, aerob, katalaz, oksidaz ve nitrat pozitif, zoonotik özellikle bir bakteridir. *Brucella* 37°C'da (20-40 °C aralığında) ve pH 5,8-8,7 arasında optimal ürerken buzdolabı sıcaklığında üreyemez ve yine düşük pH değerlerinde hızla inaktive olur (Erol ve ark., 2011; Thakur ve ark., 2012).

Brucellozu önlemek için enfekte olduğu bilinen hayvanlardan elde edilen pastörize olmayan süt ve süt ürünlerini tüketmemek; enfekte hayvanlarla temas etmemek, eldiven veya maske kullanmak gibi uygulanabilecek basit ama faydalı önlemler enfeksiyon riskini azaltır. Yeni endemik bölgelerin ve ulusal sınırların ötesinde önemli derece eradikasyon programlarının teşhis edilmesi gerekmektedir, çünkü çalışmalar yakın gelecekte hastalığın ilerlemesinde ciddi bir artış olacağını ve problemin her yıl daha şiddetli büyüdüğünü ortaya koymuştur (Arasoğlu ve ark., 2013).

1.1. Tarihçe

Zoonozlar halk sağlığına etki eden problemlerden biridir. Dünyanın tamamında olduğu gibi Türkiye'de de sayıları gittikçe yükselen zoonotik hastalıklar kümesi içinde mevcut olan Brucelloz kadim bir tarihçesi bulunan ve halen güncelliğini korumakta olan bir enfeksiyondur. Türkiye ile ziraat ve hayvancılığa önemli ülkelerde büyük maddi zararlara sebebiyet vermektedir (Cengiz, 2007).

Türkiye'de yapılan araştırmalar *Brucella*'nın geniş bir sahada gözlemlendiğini söylemektedir. Bu vaziyet ülkemizde *Brucella* ile alakalı olarak farkındalığın artırılmasına ihtiyaç duyulduğunun kanıtıdır. Bu hastalık genel olarak ölüme sebebiyet vermemektedir. Fakat yavru atmaya sebep oluşu ve dolayısıyla süt verimliliğini

olumsuz etkileyişi, kısırlığa yol açışının yanı sıra damızlık kıymetinin kaybına neden olması onu ahır hayvanlarının en önemli hastalıkları arasına koyar.

Bakterinin hücre içi yerleşimi sebebiyle uzun süre antibiyotik uygulanması gerekli olup, uygulanmadığı durumda sağaltım başarısızlıkları ve nüksetmeleri görülmektedir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015; Kara, 2011).

İnsan Brucelloz 'unun ilk doğru identifikasyonunu *Marston* isimli bir cerrah yapmıştır. Etken olan ajan ise 1886 yılında *Bruce* tarafından Malta Hummasından vefat eden askerlerin dalaklarından *Micrococcus melitensis* olarak tespit edilmiştir (Madkour, 2001). 1905'te Zamiit keçileri *Brucella* 'nın kaynağı olduğunu keşfetmiş ve pastörize edilmemiş keçi sütlerinin tüketilmesine engel olarak orduda askerlerde gözlemlenen bulaşma ve ölümlerde yüksek ivmeli bir yavaşlama sağlamıştır. 1914'te Traum tarafından *B. suis* domuzlardan izole edilmiştir. 1996'da Carmichael tarafından kanişlerde ve onların eğiticilerinde salgın olarak *B. canis* tanımlanmıştır (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015; Kara, 2011).

1994'te İngiliz ve Amerikan araştırmalar birbirilerinden müstakil bir biçimde İskoç sahillerinde yaşayan deniz memelilerinin cesetlerinden ve Kaliforniya'da bulunan bir yunus balığından daha evvel bir örneğine şahit olunmamış bir *Brucella* izole edilmiş, bu izolatların ayırıcı şekilleri, boya duyarlılıkları ve faj duyarlılıklarının aynı olduğu tespit edilmiş olup bu tür *B. maris* olarak isimlendirilmiştir. Ek olarak Sibiry'a da geyiklerden *B. rangiferi* adında bir çeşit daha izole edilmiştir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015; Kara, 2011).

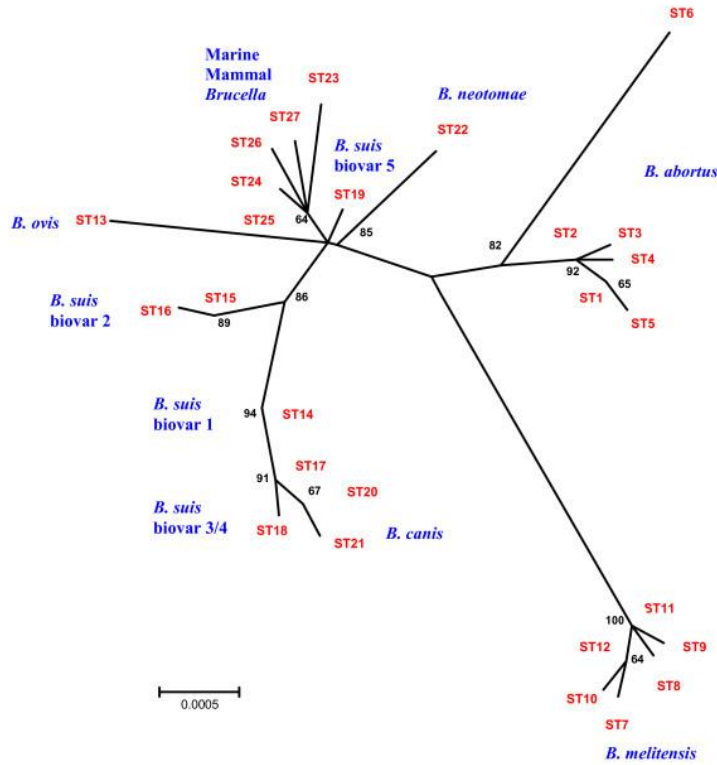
Brucelloz (B. melitensis) Türkiye'de ilk olarak 1915 yılında Kuleli Hastanesi'nde, görevli bir askerde Kural ve Akalın tarafından teşhis edilmiş, 1931'de büyükbaşlarda Berke, 1943'te küçükbaşlardan Golem, 1944 yılında ise Köylüoğlu ve Aktan *Brucella* cinsi bakterileri bildirmişlerdir (Cengiz, 2007).

B. melitensis'in sebep olduğu 4000'den fazla vakanın ortaya çıktığı alanlar olağanüstü salgınsal olarak tanımlanıyor olup bu ülkelerin başında Peru, Latin Amerika, Yunanistan, Meksika, İspanya, Irak, İran, Kuveyt gelmektedir. Brucelloz insan ve hayvanlarda bulaşıcılık oranı yüksek bir hastalık olup, dünya üzerinde yıllık olarak ortalama yarım milyon yeni vaka bildirilmektedir (Cengiz, 2007).

1.2. Genel Özellikleri

16S-rRNA'larının filogenetik analizine göre, *Brucella* cinsi, *Alphaproteobacteria* sınıfına, *Rhizobiales* takımına aittir (Corbel ve ark., 2005). Ayriyeten *Proteobacteria* klasının α -2 alt sınıfı ile yakından ilgilidir. DNA-DNA melezleme çalışmaları, bilinen 6 *Brucella* çeşidi arasında %90'dan daha fazla benzerlik sergilemektedir. *Brucella* türlerinin filogenetik ilişkisi Şekil 1.1'de görülmektedir. Uzun yıllar boyunca *Brucella* taksonomistleri, ince fenotipik ve antijenik farklılıklar ve diferansiyel konak özgüllüğüne dayanan altı klasik türü içeren bir sınıflandırma sistemi geliştirmişlerdir.

Brucella yaklaşık 0,6 ila 1,5 μ m arasında ölçülen Gram-negatif kokobasildir (kısa çubuklar). Spor yapmazlar ve kapsül veya flagelladan yoksundurlar ve bu nedenle hareketsizdirler. Dış hücre zarı, baskın bir lipopolisakarit (LPS) bileşenine ve üç ana protein grubuna sahip diğer Gram-negatif basillerinkine çok benzemektedir. *Brucella* metabolizması esas olarak oksidatifdir ve geleneksel ortamlardaki karbonhidratlar üzerinde çok az etki gösterirler. Aeroblardır, ancak bazı türler CO₂ eklenmiş bir atmosfer gerektirir (yüzde 5-10). 37 ° C'lik optimum sıcaklıkta etki yavaştır ve yeterli büyümeyi desteklemek için zenginleştirilmiş ortama ihtiyaç vardır. *Brucella* kolonileri uygun katı ortamlarda 2-3 gün içinde görünür hale gelir (Alton ve Forsyth, 1996).



Şekil 1.1: *Brucella* türlerinin filogenetik ilişkisi (Alton ve Forsyth, 1996)

1.2.1. Bakteri Türleri

Hastalığa sebep olan *Brucella* cinsinin başlıca türleri:

- 1- *B. melitensis* (koyun, keçi, sığır)
- 2- *B. abortus* (koyun, keçi, sığır, domuz)
- 3- *B. suis* (koyun, domuz ve keçilerde)
- 4- *B. ovis* (koçlarda epididimit etkenidir)
- 5- *B. neotomae* (*Neotoma lepida* adında bir çöl faresinden izole edilmiş olan bu tür, evcil hayvanlarda ve insanlarda hastalık yaptığı gözlemlenmiştir).
- 6- *B. canis* (insanlarda ve köpeklerde Brucelloz hastalığı yapar).

Brucella izolatlarının daha fazla olduğu bilinmektedir, çeşitli deniz memelileri türlerinde izolatların tanımlanması ile başlangıçta düşünüldüğünden daha yaygındır. Klasik türlerin bazıları biyovarlaraya ayrılır, ancak bu biyovarların bazılarının ayrımı çok küçük farklılıklara dayanır ve zor ve biraz sübjektif olabilir (Alton, 1996).

Üç tür (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) önemli insan patojenleridir; *B. canis* daha az öneme sahiptir. Türler üreaz ve H₂S üretimi, boya hassasiyeti, hücre duvarı antijenleri ve faj hassasiyeti ile ayrılır. Ana türler çoklu biyovarlaraya ayrılır.

Başlıca altı tür ve bu türlere ait 15 biyovarin varlığı bilinmekte iken (Erdoğu, 2018), son yıllarda *Brucella* cinsine *B. pinnipedia*, *B. cetaceae*, *B. microti*, *B. inopinata* ve *B. papionis* olmak üzere yeni türler dahil edilmiştir. *B. melitensis* (3 biyotip) temelde keçi ve koyunlarda; *B. abortus* (9 biyotip) manda ve sığırlarda; *B. suis* (5 biyotip) domuzlarda hastalık oluşturmaktadır. *B. canis* köpeklerde enfeksiyon yapmakta ancak insanlarda nadiren görülmektedir. *B. neotoma* kemirgenlerde enfeksiyon yapmaktadır. *B. ovis* koyunlardan izole edilmektedir. *B. neotomae* ve *B. ovis* insanlarda hastalık yapıcı değildir ve birer biyotipi bulunmaktadır. Vakaların büyük bir çoğunluğu en belirgin ve hastalık yapıcı olan *B. melitensis* yüzünden olmaktadır. Hastalık yapıcılık açısından bu türün ardından *B. suis* gelmektedir. *B. abortus* ise *B. melitensis* ve *B. suis*'e göre insanlarda daha hafif yapıda enfeksiyonlara sebep olmaktadır. İnsanlarda *B. neotomae*, *B. ovis* ve *B. suis* biyotip 2'ye bağlı hiçbir bulaşma görülmemiştir. *B. canis* ve *B. abortus* biyotip 5 ise insanlarda çok nadir enfeksiyona neden olmuştur (Taşçı, 2004; Aslan, 2015).

Bakterinin çoğalması sıvı besi yerlerinde 4-6'lık zincirler şeklindedir. Aerob koşullarda iyi çoğalırlar, CO₂ ile üremeleri arttırılır. Hususen *B. abortus* ilk

izolasyonda %5-10 karbondioksitli ortama ihtiyaç hissetmektedir. Kolonileri ufak, dairesel, şişik, transparan, çiğ tanesine benzeyen, akıcı S şeklindedir ekzotoksin oluşturmazlar. İlk izolasyonda S çeşidi koloni, eski kültürlerinde R çeşidi koloni meydana gelir. Normal boyalarla boyanmaları kolaydır. Modifiye Ziehl-Nelsen'de kırmızı rengi alırlar. En uygun çoğalma sıcaklığı 37°C 'dir, fakat 20-40°C de üreyebilirler. *Brucella*'lar kok, kokobasil veya kısa çubuklar şeklinde bulunup biraz içbükey olup ve uçları dairesel şekildedirler. Bilhassa üremeleri sıvı besiyerlerinde 4-6'lık zincirler şeklinde olmaktadır, asidik dirençleri düşüktür. Aerob koşullarda iyi çoğalırlar, CO₂ ile üremeleri arttırılır. Kuluçkada da 2 veya 3 gün içerisinde kolonileri gözlemlenebilir. Zengin besi yerlerinde düz kenarlı, içbükey, nemli ve parlak koloniler inşa ederler. Hemoliz ve pigmentler bu kolonilerde bulunamaz (Erol ve ark., 2011; Kara, 2011; Altay, 2008; Dubey ve ark., 2017).

B. abortus ve *melitensis*'in eski kültürlerdeki bazı kolonilerini esmer renkte gözlemlenmek mümkündür. *B. canis* ve *B. ovis* kolonileri olağan durumda, R koloni şeklinde ve pürüzlüdür. *Brucella* cinsi bakteriler katalaz testlerinde pozitifler ancak oksidaz testlerinde nadiren negatif çıkma ihtimalleri olmakla birlikte pozitifler. Karbonhidratları kullanarak asit veya gaz meydana getirmezler. Metil red, Voges-Proskauer negatifler. Ayrıca nitratları nitritlere indirgerler. Somatik A ve M antijenleri ve ayrı olarak yüzeysel L zarf antijeni mevcuttur (Altay, 2008).

İlk izolasyonda bir hayli yavaş çoğalan *Brucella* kolonileri ancak 2 gün sonra gözlemlenebilir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilen *Brucella* besi yerleri; Serum Patates İnfüzyon Agar, Tripticase Soy Triptase Agar, Serum Dekstroz Agar (SDA) ve Kanlı Agar olarak sıralanabilir (Erol ve ark., 2011; Kara, 2011; Altay, 2008; Dubey ve ark., 2017).

1.2.2. Brucelloz

Hastalık ilk kez 1887 senesinde Dr. Sir David Bruce tarafından Malta adasında, İngiliz bir askerinin dalağından izole edilmiştir. Bu hastalık; Akdeniz Humması, Malta Ateşi, Peynir Hastalığı, Mal Hastalığı gibi çeşitli adlandırmalara sahiptir. *Brucella* bakterisi zoonotik hastalıklara sebebiyet verebilecek olup, hayvanlardan insanlara geçen bir türdür.

1.2.2.1. İnsanlarda Brucelloz

Brucelloz semptomlar açısından tüm hastalıkları taklit edebilen bir hastalık kümesidir. Enfeksiyonun ortaya çıkışıyla hastalığın gelişip büyümesi arasındaki geçen süre 5 günden 5 aya kadar sürebilmektedir. Yaklaşık 2 veya 4 haftalık inkübasyon sonrası bazı belirtiler erkenden kendini gösterirken bazıları ise uzun süre gelişme sağlayabilir. Hastalık birden fazla organa etki ettiğinden farklı klinik şekillerde gözlemlenebilir ve uzun süreli sistemik bir enfeksiyon meydana getirebilir. Ateş yükselmesi, aşırı terleme, halsizlik, sırtta ağrı hissi, kas eklemler veya karında ağrı, gözle görülebilir hızlı kilo kaybı, şişmiş lenf düğümleri, öksürük, baş ağrısı gibi semptomlar görülebilir Güç kaybı, gündelik işleri yapamama ve sonucunda verimsizliğe bağlı iktisadi olarak olumsuz etkilenme ortaya çıkabilir (Erdoğan, 2018).

Brucelloz, hayvanlarla veya salgılarıyla doğrudan temas yoluyla, kirli süt ve süt ürünleri tüketilerek bulaşabilen önemli bir zoonozdur. Başlıca sirayet etme şekilleri halk arasında görülen temas ve gıda kaynaklı olanlardır. Hayvanlarla direkt temas olmasa dahi süt ürünleri veya sütün kendisi bu hastalığa yakalanmaya sebep olabilir.

Brucelloz, küçükbaş (koyun ve keçi) ve büyükbaş (sığır, domuz, manda gibi) hayvanların kontamine etleri, sütleri, idrarları, vücut sıvıları ve bu sıvıların bir kısmıyla hazırlanmış olabilecek ürünler ve hayvanların hamilelik maddeleri aracılığı ile insanlara bulaşabilir (Karadal ve ark., 2016; Cengiz ve Dolapçı, 1997; Sayı, 2013). *Brucelloz*, Türkiye’de ve dünyanın birçok ülkesinde geleneksel yollarla üretilen süt ve süt ürünleri tüketimi nedeniyle halk sağlığı yönelik büyük bir tehdit olarak bilinir (Gulbaz, 2016).

Hayvancılık ile uğraşan insan toplulukları yüksek risk altında sayılmaktadır. Sindirim veya temas yoluyla sirayet etmesinde en yüksek riskli meslek grupları, laboratuvar çalışanları, çiftçiler, veteriner hekimler, çobanlar ve kasaplar olarak sayılabilir.

1.2.2.2. Hayvanlarda Brucelloz

Hayvanlardaki etkisi ise daha ziyade kilo kaybı olmakla birlikte ekonomik zarara sebep olmaktadır. Hastalık, hayvanlarda 6-8 aylık iken düşüklere veya doğum sonrası ölümlere sebep olması açısından yavru atma hastalığıdır. Bir diğer belirtileri ise Mastitis (meme yangısı) ve topallıktır (Cengiz, 2007; Eren, 2004).

Atık bir olguda 1000 ila 10000 milyar bakteri yayılmaktadır. Bu bakteri sayısı 60.000 ila 600.000 gebe hayvanı enfekte etmeye yeterlidir (Saddique ve ark.2019). Tehlikenin ciddiyetini rakamlar desteklemektedir. Enfeksiyonlu bir hayvandan elde edilen süt veya et *Brucella* bakterilerinin taşıyıcısıdır. Şehirde tüketilen ısıtılmış süt ve süt ürünleri *Brucella* taşıma riski altındadır. Atık yapmış bir hayvan taşıyıcı statüsünde sayılıp vücudundaki *Brucella* etkenleri meme bezine yapışır ve sağılan süt ile dışarı saçılır. Bu şekilde sağılan ürünlerin oral olarak kaynatılmadan tüketilmesi, sindirim yoluyla hastalığın bulaşmasına sebep olur.

Hastalığın başlıca bulaşma şekli doğum esnasında ve kürtaj olma durumlarında gelen akıntılar olduğundan, bu hayvanların diğer sağlıklı olan hayvanlardan ayrı tutulmaları ve atık maddelerin, enfekte olan kısımların sürünün kalan kısmına, insan topluluklarına ve etraftaki diğer mezralara sirayet etmesinin engellenmesi için uygun bir şekilde yok edilmesi gerekmektedir. Mezralar ve alet edevatları hastalığın yayılmasını engellemek adına ayrıca dikkat ve özen gösterilmelidir. Kontamine olan gübreyi kullanmaktan en az 3 ay çekinilmelidir (Karadal ve ark., 2016; Cengiz ve Dolapçı, 1997; Sayı, 2013).

Brucelloz önlemek için bilinen enfekte hayvanlardan, asla pastörize edilmeden sütleri tüketmemek ve hastalığı taşıma riski olan hayvanlarla birarada bulunmamak, eldiven veya maske takmak gibi basit ama koruyucu yöntemler enfeksiyon olasılığını azaltır (Gulbaz ve Kamber, 2016).

1.2.3. Türkiye’de ve dünya’da *Brucella*

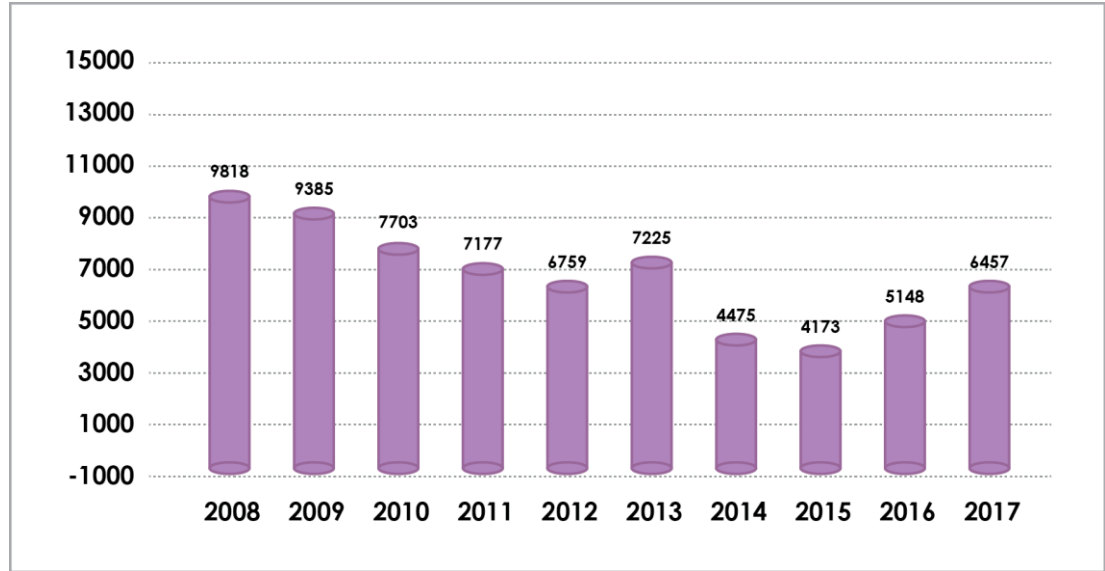
Brucella cinsi çeşitleri içinde *B. canis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus*, *B. suis* ve *B. neotomae* olacak şekilde altı çeşit saptanmıştır. *B. suis*’in beş, *B. abortus*’un dokuz ve *B. melitensis*’in üç adet biyotipi mevcuttur. Diğer çeşitlerdeyse hiçbir biyotip gözlemlenmemiştir (Eren, 2004; Atay, 2018).

B. melitensis’in bulunan 3 biyotipinden, birincisi İspanya, Latin Amerika, Malta ve Portekiz’de sıklıkla görülen bir biyotiptir. İkincisi ise çoğunlukla Yunanistan ve İtalya’da gözlemlenmektedir. Üçüncü biyotip ise Fransa ve Kuzey Afrikada yaygın bir şekilde görülmekle beraber, İspanya, Türkiye ve Yunanistan’da da bu tip vakalar bildirilmiştir. Batı ve Orta Asyada ikinci ve üçüncü biyotipler yaygın olmakla birlikte Kuveyt, Suudi Arabistan, Irak ve İran’da yaygın olarak her üç biyotip bulunmaktadır (Eren, 2004; Atay, 2018).

B. abortus birinci biyotip olarak sığırlardan dünya genelinde en çok izole edilen biyotiptir. Birinci, ikinci ve dördüncü Kuzey ve Güney Amerika'da sıklıkla karşılaşılan biyotiplerdir. Üçüncü ve altıncı biyotipler Afrika ve bir takım Asya bölgelerinde yaygın bir şekilde gözlemlenmektedir. Beşinci ve dokuzuncu biyotipler sık görülmezler (Eren, 2004; Atay, 2018).

1.2.3.1. Türkiye’de *Brucella* prevalansı ile ilgili yapılan araştırmalar

Aşağıda yer alan 2008-2017 yılları arasındaki vakaları gösterilmektedir. Tablodan da anlaşılacağı üzere 2008 yılında en üst seviyede meydana gelen vakalar yıllar içerisinde farkındalığın artırılması ve gerekli tedbirlerin alınmasıyla 2014 ve 2015 yıllarında gözlemlenen ciddi düşüş göstermiştir. Ancak 2016 ve 2017 yıllarında *Brucella* vakalarında tekrar artış gözlemlenmektedir (Anonim 2).



Şekil 1.1.2. Türkiye’de son yıllarda Brucelloz vakaları

Türkiye’de süt ve süt ürünlerinde *Brucella* bakterisi varlığı ile ilgili araştırmalar, düşük de olsa bu gıdalarda *Brucelloz* riskine işaret etmektedir.

Erdoğan ve ark., (2018), Kayseri’de, *Brucella* spp.’nin araştırılması amacıyla yaptıkları araştırmada 100 adet çiğ süt, 100 adet taze beyaz peynir ve 100 adet salamura beyaz peyniri olmak üzere toplam 300 örnek toplamışlar, süt örneklerinin birinde (%1) ve peynir örneklerinin ikisinden (%2) *Brucella* spp. Saptanırken salamura peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamıştır. Süt örneğinden elde edilen izolat, *Brucella abortus* biyotip 1, taze peynirden elde edilen izolatlar ise *Brucella melitensis* biyotip 3 olarak belirlenmiştir.

Karadal ve ark., (2016) Niğde’da pazarlardan 100 adet çiğ süt ve 50 adet peynir toplayarak *B. melitensis*’in varlığını araştırdıkları çalışmada incelenen örneklerin *B. melitensis* içermediğini belirlemişlerdir.

2016 yılında Kars’ta 315 numune üzerinde yapılan çalışmada 4 (%1,86) numunede PCR yöntemiyle *Brucella* saptanmıştır. Çıkan *Brucella* üzerinde gram boyama, oksidaz, katalaz ve H₂S testleri kullanmıştır (Gulbaz ve Kamber, 2016).

Altun ve ark., 2016 yılında Şanlıurfa’da 80 taze peynir üzerinde yapılan çalışmada ELİSA yöntemiyle %16,25 , PCR yöntemiyle ise %22,5 *Brucella* spp. olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada 178 adet çiğ süt örneğinden (48 inek süt, 65 koyun süt, 65 keçi süt) sırasıyla ELİSA tekniği ile %16,6 %6,1, %6,1 PCR tekniği ile %18,75, %7,6, %6,1 *Brucella* saptanmıştır.

Kala, 2009 yılında Burdur’da 100 taze peynir üzerinde yapılan çalışmada 5 örnek (%10) *B. abortus* ve 2 örnek ise (%4) *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Abdelkareem ve ark., 2008 yılında Trakya’da 75 farklı inekten alınan sütler incelendiğinde bunlardan üç tanesinde (%4) *Brucella* spp. saptanmıştır. İzolatların biri *B. melitensis* diğer ikisi *B. abortus* olarak tanımlanmıştır. PCR incelemelerinin sonucunda toplam 75 numunenin 17 (% 22,66)’ sinde *Brucella* spesifik DNA saptanmıştır. İzolatların biri *B. melitensis* diğer ikisi *B. abortus* olarak tanımlanmıştır. PCR incelemelerinin sonucunda toplam 75 numunenin 17 (% 22,66)’ sinde *Brucella* spesifik DNA saptanmıştır.

Öngör ve ark., tarafından 2006 yılında Elazığ’da yapılan çalışmada 40 peynir örneğinden immunomagnetic separation PCR yöntemle *Brucella* spp. izole edilmiştir. Ataş ve ark. tarafından 2005 yılında Sivas ilinde yapılan çalışmada 135 tane numuneden % 5.9 *Brucella* izole edilmiştir. Bu numunelerden dört tanesi (% 2.9) *B. melitensis* dört tanesi ise (%2.9) *B. abortus* olarak tanımlanmıştır. Alim ve Tomul, 2005 Sivas’ta 2003 yılında 42 peynir örneğinden 3 tane %7.1 ve 2004 yılında 47 taze peynir örneğinden ise 4 tane %8,5 *Brucella* spp. saptanmıştır. 2004 yılında Eren tarafından yapılan çalışmada Afyon yöresinden toplanan 100 adet çiğ süt ve 100 adet taze beyaz peynir, numunelerinden kültür yöntemleriyle *Brucella* türleri araştırılmıştır. Kültür yöntemiyle elde edilen süt numunelerinden 25 tanesinde *Brucella* türleri saptanmıştır. Bu 25 numuneden 5 tanesinin *B. abortus*, diğer 20 tanesinin ise *B. melitensis* olduğu sonucuna varılmıştır.

Sütlerde yapılan Ring testinde 35 numunede pozitiflik bulunmuştur. Pozitif örneklerin 15 tanesi ineklerden alınan sütlerde, 20 tanesi de koyunlardan alınan sütlerdi. Yine sütlerde yapılan Whey-AT testi ile 15 örnekte pozitiflik bulunmuştur. Toplanan taze peynir örneklerinin ise yalnız 2'sinde *Brucella* spp. üretilmişti .

Budağıc, 2003 yılında Kayseri'de yapılan çalışmada 100 adet beyaz peynir numunesinin 13'ünde *Brucelloz* etkenleri saptanmıştır. Pozitif 13 numunenin 12'si *B. melitensis*, 1 tanesi ise *B. abortus* olarak saptanmıştır. Gulluce ve ark., 2003 yılında Erzurum'da 120 adet beyaz peynir ELISA yöntemi ile %21,66'ında *B. abortus* antijeni saptanmıştır. Türütoğlu ve ark., 2001 yılında Burdur'da yapılan çalışmada 101 farklı inekten 404 adet, 113 farklı koyundan 226 süt numunesi temin edilmiş ve süt ring testinde inek sütlerinin %3'ünde, koyun sütlerinin ise %17,7'sinde *Brucella* saptanmıştır. Altun ve ark., 2002 yılında Ankara'da 300 süt üzerinde yapmış olduğu çalışmada hiçbir numunede *Brucella* saptanmamıştır.

Patır ve Dinçoğlu, 2001 Elazığ'da yaptıkları çalışmada, topladıkları 30 adet beyaz peynir numunesinin %3,3'ünde, 55 adet tulum peyniri numunesinin ise %1,8'inde *Brucella* spp. tespit edilmiştir. Adıgüzel tarafından 2001 yılında Erzurum'de yapılan çalışmada toplam 560 Çiğ süt numunesinden %17 oranında *Brucella* spp. izolasyonu yapılmıştır. Kalender ve ark., 2001 Elâzığ, Erzincan ve Tunceli'den 78 adet taze tulum peyniri örneğinin %20,5'inde *Brucella* spp. izole edilmiştir. Bu numunelerden %81,3'ü *B. melitensis* ve %18,7'si *B. abortus* olarak identifiye edilmiştir.

Sancak ve ark.'nın, 1993 yılında Van'da yaptığı 40 adet taze van otlu peynirde %17,5 oranında *brucella* spp. izole edilmiştir. Bu numunelerden %15'ini *B. melitensis*, %2,5'ini ise *B. abortus* olarak saptanmıştır. Tunçbilek tarafından 1984 yılında Ankara'da yapılan çalışmada 100 adet beyaz peynir %4 *Brucella* spp. izole edilmiştir. Bu numunelerden %1'ini *B. abortus*, %3'ünüde *B. melitensis* olarak saptanmıştır.

1990 yılında İstanbul'daki bazı semtlerde 100 adet numune ile yapılan çalışmada sekiz adet peynirde *Brucella* saptanmıştır. Bunlardan beş tanesi *B. abortus*, üç tanesi ise *B. melitensis* olarak neticelenmiştir (Namin, 1990).

Kenar tarafından 1990 yılında yapılan çalışmada, süt ring testi yöntemiyle süt numunesinden %13,93 Konya'da, %0,92 Kayseri'de, %24,15 Niğde'de ve %3 Nevşehir oranında *Brucella* spp. pozitif saptanmıştır. Sarısayın ve Eroğlum, 1987 yılı Marmara ve Trakya'daki 260 adet tereyağ ve kaymak numunesinde hiçbir *Brucella*

spp. tespit edilmemiştir. Ayaz tarafından 1986 yılında Ankara’de yapılan çalışmada 94 peynir numunesinden *Brucella spp.* hiçbir tespit edilmemiştir.

Sert ve Kıvanç tarafından 1984 yılında Erzurum’de yapılan çalışmada 30 adet peynir numunesinden hiçbir *Brucella spp.* tespit edilmemiştir. Mert, 1984 yılında Ankara’da yapılan çalışmada sunulan beyaz peynirlerde %19,3 oranında *Brucella spp.* %10 *B. abortus* %90 ise *B. melitensis* saptanmıştır.

1.2.3.2. Dünya’da süt ürünlerinde *Brucella* prevalansı ile ilgili yapılan araştırmalar

İslam ve ark.’nın 2019 yılında Bangladeş’te 115 süt ile yapılan çalışmasında, iki numunede (%1,7) *Brucella* izole edilmiştir. Ashrafganjooyi ve ark.’nın 2017 yılında İran’da 700 süt ile yapılan çalışmasında, %1,28 oranındaki numunede *Brucella* tespit edilmiştir. Lindahl-Rajala ve ark.’nın 2017 yılında Tajikistan’da 564 süt ile yapılan çalışmasında, %10,3 numunede *Brucella* bulunmuştur.

Dubey ve ark., (2017), Hindistan’da yaptıkları araştırmada, 85 süt örneğinden 23’ü (%27,05) süt ring testi ile *Brucella* antikorları için pozitif bulmuştur; ayrıca toplam 168 örneğin (145 süt ürünü ve 23 süt ring testi pozitif süt örneği, 14’ü PCR ile pozitif olarak saptamışlardır.

İran’ın Yazd bölgesinde, 2016 yılında, 198 çiğ süt numunesi ile yapılan çalışma sonucunda 4 numunede *B. abortus*, 1 numunede *B. melitensis* saptanmıştır (Jamali ve ark., 2016).

Mugizi ve ark., tarafından, 2015 yılında Uganda’da 207 süt ile yapılan çalışmada, 11 (%5,3) numunede *Brucella* saptanmıştır. Almariri, 2015 yılında, 2002-2007 yılları arasını kapsayan Suriye’de 2372 süt numunesi ile uzun soluklu çalışma gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak numunelerin 1352 adedi (%57’si) Süt Ring testi ile *Brucella* antikorları için pozitif bulunmuştur, 596 (25%) örnek PCR ile ve bakteriyolojik izolasyon yöntemleri pozitif olarak neticelenmiştir.

Ali tarafından 2014 yılında Irak’ta yapılan çalışmada 120 adet taze peynirden %9,16 *Brucella spp.* tespit edilmiştir.

Irak’ta 420 süt numunesi ile çalışma yürütülmüş ve numunelerin %24,2’si yani 62 tanesi pozitif çıkmıştır. Bu numunelerin de 33 tanesi *B. abortus*, 25 tanesi ise *B. melitensis* olarak belirlenmiştir (Abbas ve Aldeewan, 2009). Irak’ta 100 numune

üzerinde yapılan çalışmada süt, peynir ve dondurma numuneler ile *Brucella* incelemesi yapılmıştır. Numuneler sonucunda dört tane *B. abortus* ve beş tane de *B. melitensis* saptanmıştır (Abbas ve Talei, 2010).

Miyashiro ve ark., (2007), tarafından Brezilya'da 192 peynir ile yapılmış olan araştırmada, 37 (%19.27) numunede *Brucella* saptanmıştır.

Tantillo ve ark., (2001), tarafından İtalya'da PCR tekniği ile yapılmış olan çalışmasında 46 taze peynir örneğinden %21,7'sinde *Brucella* spp. saptanmıştır. Acedo ve ark., tarafından 1997 yılında Meksika'da yapılan çalışmada 335 peynir numunesinden %7,5 *Brucella* spp. bulunmuştur. 289 süt örneğinden %2,4 oranında *Brucella* spp. pozitif saptanmıştır.

1.2.4. Canlı Kalma

Brucella sıcaklık ve dezenfektanlara duyarlılık gösterirler. *Brucella* bakterileri; 60°C'ye ısıtıldıklarında 10 dakika içerisinde, %1 fenol eriyiğinde ise 15 dakika içerisinde ölürlere. Tereyağında 142 gün, süt içerisinde 17 gün hayatta kalabildiği, dondurmalarda 1 ay, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, insan idrarında en az 7 gün, 8°C'deki çeşme suyunda 57 gün, 25°C'deki çeşme suyunda ise 10 gün canlılığını koruduğu, hayvan gaitasında açık şekilde 100 gün canlı kaldığı bildirilmiştir (Erol ve ark., 2011; Kara, 2011; Altay, 2008; Dubey ve ark., 2017). Büyükbaş hayvan gaitasında açıkta yüz gün, ahırların yer ve duvar döşemesinde dört ay hayatta kaldığı raporlanmıştır (Eren, 2004; Dabanlıoğlu, 2005).

1.2.5. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Brucella spp. bakteriler gram negatif, hareketsiz, sporsuz, 0.6-1.5, 0.5-0,7 milimetre ölçülerinde kokobasillerdir. Hacimlerinin ufaklığından moleküler hareketle oldukları yerde titreşim hareketi gösterirler (Braunien hareket). Hakiki asit-fast olmadıkları halde zayıf asitlerle dekolarizasyona rezistanslı olduklarından modifiye Ziehl-Neelsen boyama yöntemi ile kırmızı renge boyanırlar. Kültürlerde teker teker bulunmalarına karşın dokulardan yapılan baskılarda gruplar şeklinde görülürler. Bipolar boyanma özellikleri yoktur. Kapsülleri S şeklinde ve mukoid koloni oluşturan yapılarda gösterilebilir. R kolonilerde ve pasajlarda bu kapsüllere rastlanmaz (Dabanlıoğlu, 2005).

1.2.6. Değişik Ortamlardaki Yaşam Süreleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Brucellalar 60 °C'de 10 dakikada, %1 fenolde 15 dakika içinde ölürlür. Süt içerisinde 17 gün, %10 tuz ihtiva eden salamura peynirinde kırk beş gün, tereyağında 142 gün, düşük yapmış hayvan fetusunda ise 75 gün yaşar. Hayvanların yaşadığı ahır tozlarında 6 hafta, suda 10 hafta hayatta kalabilirler. Isıya ve iyonize radyasyona duyarlıdırlar. Karanlık yerlerde, süt, doku, gübre ve vajinal (uterus) akıntılarında uzun bir zaman hayatta kalabilirler. Dezenfektan ve antibiyotiklere farklı ölçülerde duyarlıdırlar. Etkenler %0,1 sublimate birkaç dakika içinde, %2 formalin ve %1 lizol içinde 15 dakika içinde ölürlür. *Brucella* türlerinin çoğu tetrasiklin, gentamisin ve rifampisine duyarlıdır. Birçok *Brucella* türü polimiksin, basitrasin, sefalosporin, nystatin ve linkomisine dirençlidir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

1.2.7. Üreme, Biyokimyasal ve Dirençlilik Özellikleri

Brucella spp. bakteriler çeşitli aminoasitleri içerisinde bulunduran karmaşık besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Nikotinamid, tiyamin ve biyotin üreyebilmeleri için temel ihtiyaçlarındandır. Kan ve serum üremelerini olumlu bir şekilde etkiler. *Brucella* spp. oksidatif metabolizma ile temel enerjisini elde eder. *B. abortus*'un bazı tipleri ve *B. ovis* üremek için %10 karbon dioksit ihtiyacı duyarlar. 20-40 °C arasında üreyebilmelerine rağmen optimum üreme koşulları 37 °C ve pH 6.6-7.4 dir. Bu bakterilerin izole edilişi ve üretilmeleri genellikle katı besi yerlerinde olur. Kolonileri küçük, kabartmalı, S şeklinde ve saydam renkli çiğ taneleri gibidir. *Brucella* spp. tipleri katalaz pozitif ve eritrositleri sindirmezler veya indol ve asetil metal karbonil (Voges-Proskauer) oluşturmazlar. Sitrat asitli besi yerlerinde üremezler, Metil red ve o-Nitrophenyl-Beta-D-galactopiranoside (ONPG) negatiftirler. *B. neotomae* dışında besiyerlerinde karbonhidratları asidize etmezler. *B. ovis*, *B. neotomae* ve *B. abortus*'un bazı suşları haricinde tüm *Brucella* türleri oksidaz pozitifdir. H₂S ve üreaz aktiviteleri değişkendir. *B. ovis* hariç diğer türler nitratları indirgerler (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

Brucella cinsi mikroorganizmalarda, şimdiye dek bir plazmidin varlığı saptanamamıştır. Bakterilerde pilus mevcut olmayıp konjugasyon bildirilmemiştir. *Brucella* spp. faj enfeksiyonunu takiben bazı antibiyotiklere rezistans oluşturduklarından transdüksiyon yaptıkları kabul edilmektedir. Doğal koşullar altında nadir olmakla beraber bakterilerin değişime uğradıkları bildirilmiştir (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

1.2.8. Koloni morfoloji özellikleri

“Smooth” *Brucella* cinsleri üreme esnasında çoğunlukla ayrışma eğilimi sergilerler. Bir kültürün koloni morfolojisinde geçirdiği transformasyon, antijenitesindeki ve enfeksiyon oluşturmadaki alışma sürecinde geçirdiği transformasyon ile yakından alakalıdır. İzole edilen yapıların tür ve biyotip teşhisinde kültürün koloni morfolojisi büyük önem taşır. Tüm zamanlarda “non-smooth” koloni halinde olan *B. ovis* ve *B. canis* hariç, diğer çeşitler izole edildiklerinde çoğunlukla “Smooth” koloni yapısına sahiptirler. “Non-smooth” kültürleri monospesifik A ve M antiserumları ve “Smooth” *Brucella* fajları ile sınıflandırmak uygun olmadığı için tiplendirme amacıyla “Smooth” koloniler seçilmesi gereklidir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

“Non-smooth” koloniler ‘rough’ (R), mucoid (M) ve intermed (I) koloni türleri olarak gruplandırılırlar. I kolonilerini S kolonilerinden ayırt etmek güçtür ancak hafifçe mat ve akriflavinle aglütinasyon tepkimelerinde çok ince tanecikler meydana getirirler. M kolonilerine öze ile temas edildiğinde ipliksi bir uzama sergilerler, koloniler transparan ve griye yakın bir renktedirler. R kolonileri kuru, mat ve tanecikli bir şekle sahip olup sarıya yakın bir renkleri vardır. Ayrışma derecesine bağlı olarak tuzlu suda otoaglütinasyon sergilerler (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

“Non-smooth” *Brucella* canlıları nötral pH’da değerlerinden düşük seviyede kolayca kendiliğinden aglütine olurlarken alkali pH’da değerlerinde sabit kalırlar. *Brucella* cinsi mikroorganizmalarda ayrışmalarda farklı yöntemler tespit edilmektedir. Bunlardan en kolay olanı %0.1’lik akriflavin çözeltisinde kolonilerin emülsifiye edilmeleridir. S koloniler homojen bir emülsiyon ortaya koyarken, “non-smooth” koloniler hemen aglütine olurlar. Bir diğer yöntemde kolonilerin kristal viyola boya solüsyonu ile boyanmalarındadır. S koloniler bu yöntemle boyanmazlar fakat, ayrışık koloniler kırmızı ve morun farklı tonlarında boyanırlar ve yüzeyleri yarı çapsal yarılmalar sergiler. Ayrışma kontrolünde koloniler stereoskopik mikroskopta, 45 derece açı ile eğik ışıkta mavi yeşil bir yansıma verirler, ayrışık kolonilerin rengi ise donuk sarı olarak gözlemlenir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

1.2.9. Üremeleri için gerekli besiyerleri ve özellikleri

Çoğunlukla yavaş ve zor üreyen *Brucella*'ların yerlerinde çoğalmaları güçtür. Bilhassa ilk izolasyonlarında besi yerlerine glukoz, asit sıvısı ve serum katılması üreme üzerine pozitif bir etkide bulunur. *B. abortus* biyotip 2 ve *B. ovis*, üremeleri için besi yerine %5-10 ölçüsünde eklenmiş seruma ihtiyaç duyarlar. *Brucella* spp.'in yeterli bir havalandırma olmadığı zaman sıvı besi yerlerinde üremeleri zayıftır. Durağan kuluçkadan 7 gün sonra smooth yapılar dipte hafif bir tortu bırakarak bir bulanıklık yaparlar. Non smooth yapılar dipte tanecikli bir tortu ve üstte film şeridi şeklinde bulunurlar. *Brucella* spp.' in durağan kuluçkada sıvı besiyerinde üretilmesi, "smooth" formdan "non smooth" forma geçişe yani ayrışmaya neden olur (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

Brucella spp.'nin izolasyonunda şimdiye dek birden fazla besiyeri oluşturulmuştur. Bu bakterilerin üretiminde yaygın olarak kullanılan temel besiyerleri serum-dextrose agar, serum-tryptose agar ve serum-tyrticase agardır. Bunlar ayrıca kullanılan seçilmiş besi yerlerine örnek oluşturur. Brucellaların bulaştıkları materyallerden izole edilmesinde diğer mikroorganizmaların üremelerini engellemek ve durdurmak için temel besi yerlerine farklı antibiyotiklerin ve boyaların katılması yoluyla birçok seçici besiyerleri geliştirilmiştir. Morgan; temel besi yerine %0.5 ölçüsünde eklenen Tween-40' ın *B. abortus* biyotip 2'nin üretiminde serumun görevini göreceğini bildirmiş ve basitrasin, polimiksin ve aktidion eklenen serum dekstroz agarın (SDA) bütün *Brucella* cinslerinin üremesine yardımcı ideal besiyeri olduğunu bildirmiştir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

1.2.10. Besiyerlerindeki kuluçka süreleri ve görünüşleri

Brucella kolonileri uygun ve katı besi yerlerine ekildikten sonra takriben üç günlük bir kuluçkadan sonra gözle görülebilir duruma gelirler. Besiyerlerine ekilmeleri üremeyi belirli bir zaman için erteleyebilir. Kolonilerin görünür hale 4. günde gelmemesi durumunda kültürlerin olumsuz değerlendirilmesinden evvel 8-9 günlük bir kuluçkaya bırakılması tavsiye edilir. Koloniler 3-4 günlük kuluçka sonrasında dolaysız güneş ışığı altında gözlemlendiklerinde 1-2 milimetre çapa sahip, bal renginde, transparan, düz kenarlı ve çiğ tanesi görünümündedirler. Zaman ile renkler koyulaşır hacimleri büyüye de transparan olarak kalırlar. Kolonilere üstten bakıldığında içbükey bir şekle sahip oldukları ve inci beyazı renginde oldukları gözlemlenir. Gram boyama yaparken,

gram negatif kokobasiller veya kısa basiller olarak görülen organizmaların kolonilerinden *Brucella*'ya özgü antiserumlarla lam aglutinasyon testi yapılır. Pozitif olan aglutinasyon testi, izole edilenin *Brucella* oluşunun ilk delilidir. Bundan sonraki uygulanacak prosesler tür ve biyotip teşhisini gerçekleştirmek içindir (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Aslan, 2015).

Örneklerden *Brucella* spp. izolasyon ve tanımlanması için, Fenotipik testler, süt ring testleri, aglutinasyon reaksiyonu testleri kullanılmıştır (Erol ve ark., 2011; Thakur ve ark., 2012).

1.3. İmmünoloji

Brucelloz'da hem humoral kaynaklı hemde hücresele bağışıklılık rol oynar. Humoral kaynaklı bağışıklığın meydana gelmesi yeniden bulaşma tehlikesinden korunma sağlar. Bunun yanında, Brucelloz'un bakterisidal fazı hücresele bağışıklığın meydana gelmesiyle gerçekleşir (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

Enfeksiyon, T lenfositlerin bir araya gelmesi ve makrofajların bakterisidal mekanizmalarını aktif hale getirici lenfokin salgısı ile kontrol altına alınabilir. Hücresele bağışıklığın meydana gelmesi sırasında *Brucella*'nın protein antijenlerine dair geç kalmış tip aşırı duyarlılık meydana gelir. Geç kalmış tip aşırı duyarlılık, bulaşmaya ket vuran histogranülomların oluşması açısından önem arzeder (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

Brucelloz'a karşı vücutsal sıvılardan oluşan yanıt gerçekleşirken önce IgM tipi antikorlar meydana gelir ve bundan 7-14 gün sonrasında IgG tipi antikorların meydana gelir. Bundan sonra her iki antikorun birim hacimdeki miktarı bilinen standart artar. İyileşme döneminde IgG sınıfı antikorların birim hacimdeki miktarı bilinen standardı birkaç aylık bir süre zarfında düşüş gösterir. Buna karşılık düşük düzeyde IgM antikorları enfeksiyonda birkaç yıl sonra da serumda bulunur. IgG tipi antikorların kalıcı olması durumunda ya da ikinci kez birim hacimde miktarı bilinen standarda yükselmesi halinde enfeksiyonun devam ettiğini veya nüksettiği anlamına gelir (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

Hastalık atlatıldıktan sonra tam olmamakla beraber bir bağışıklık kazanılır. Oluşan bu bağışıklık, görecelidir. Çünkü bu nüksedişler çok gözlemlenir ve bağışıklık kanda antikorlarının mevcut olması ile sağlanmaz. Elde edilen mevcut bilgiler ışığında etkili

bağışıklığın, hücresel tipte bağışıklık olduğu kanaatine vardırmaktadır. Sebebi ise *Brucella* enfeksiyonunun gecikmiş tipte bir aşırı duyarlılık oluşturmasıdır (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

1.4. Klinik

İnkübasyon zamanı 1-3 hafta arası değişkenlik gösterse de bile bazen 6 yahut 7 hafta sürmektedir. Zaman zaman titreme ile birlikte ateş yükselmesi de görülebilmektedir. Gece terlemeleri, yorgun ve halsizlik hissi, dizler, dirsekler veya beldeki ağrılar gibi klinik bulgular sergileyebilir. Ateş, özellikle *Brucella melitensis* enfeksiyonlarında 10-15 gün içerisinde 38-39 °C bazen daha uzun ateşli olmayan bir müddetten sonra yeni bir akım halinde nükseder (Ondülan Ateş). Seher vakti ve geceleri ateşin düşmesi ile terlemeler saptanır. Klinik olarak; kronik, subakut, subklinik ve akut bir gidişat tespit edilir. Hastalık çoğunlukla öğleden sonra artış gösteren bitkinlik, atralji, myalji, iştahsızlık, ateş ve gece yarısından sonra artan aşırı terleme ile devam eder (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

Akut olgularda sıklıkla gözlemlenen fiziki muayene sonuçları ise; hepatomegali, lenfadenomegali, splenomegali ve omurga üzerine baskıyla ağrı meydana gelmesidir. Subakut olgularda en gözlemlenebilir bulgular, asabiyet, baş ve bel ağrısı, ondülan tipi ateştir. Hastalığın bir seneden fazla devam etmesi durumunda kronik hale geldiği kanısına varılır. Brucelloz'da merkezi sinir sistemi tutulması %2-5, akciğer tutulumu %15-25, cilt semptomları %5, ürogenital sisteme yerleşme %2-40, karaciğer tutulumu %50, endokard tutulumu %84, göz tutulumu sonucu oftalmopatiler, retinopati, keratit ve üveit gelişebilmektedir (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

Farklı organ tutulumu ve yaygın spektrumlu bir hastalık olan Brucelloz'un dünya genelinde yaygın bir halk sağlığı problemi. Gelişmekte olan ülkelerde daha yaygın olduğu söylenebilir. Hayvanlara temasa bağlı bir şekilde 20-40 yaş aralığındaki insanlarda daha sık görülür. Seyrek olmakla birlikte *Brucelloz* kliniğinde psikiyatrik bozukluklara, vaskülit, pnömoniye, dermatite, döküntüye, eritema nodosuma, interstiyel nefrite, endokardiet ve üveite rastlanmaktadır (Eren, 2004; Cengiz, 2007).

1.5. Tedavi

Brucelloz tedavisi için tetrasiklin, streptomisin, rifampin ve doksisisiklin ikili veya üçlü kombine olarak en az 6 ile 8 haftalık bir süre ile kullanılmalıdır. Brucelloz'da tedavi ise, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın de tavsiye ettiği biçimde ikili, bazı vaziyetlerde de üçlü kombin antibiyotik uygulamasıdır. Bir antibiyotik uygulanmasının tedaviyi başarılı bir şekilde bitirmemesinin sebebi, seri direnç gelişimi ve bakterinin hücre içi olarak üreyebilmesi ve hastalığın relapsına yol açmasıdır (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Dabanlıoğlu, 2005).

1.6. Korunma

İnsanlarda Brucelloz'un önüne geçilmesi, hayvanlarda Brucelloz'un kontrolü ve yok edilmesine bağlıdır. Bu açıdan veterinerlerin beşeri hekimlerle koalisyon şeklinde çalışması büyük önem arz eder (Aslan, 2015; Kara, 2011).

Brucella bakterisi ile enfekte olmamış süt kuzuları *Brucella melitensis* Rev 1 suşu aşısı ile süt danaları ise *Brucella abortus* 19 suşu ile aşılanır (Erdoğan, 2018). Bilhassa kırsal bölgelerde ikamet eden insanların bu husustaki farkındalığı arttırılmalı, çiğ süttten süt ürünleri elde edilmesinin önüne geçilmelidir. Sütün pastörize edilerek, ısıl işlemde geçirilerek, peynirlerin tuzlanarak, satış noktalarında üretilme tarihleri belirtilerek, enfeksiyonun salgın olduğu bölgelerde kaşar ve tulum peyniri tüketilmelidir.

Enfeksiyonun temas yoluyla bulaşmasının önüne geçmek için; veterinerler, et paketleyicileri, hayvan bakıcıları, hayvan sağlık memurları, mezbaha çalışanları, hayvanların atıklarına dokunmamaları ve eldiven kullanmaları tavsiye edilmektedir. Isıl işlemde geçmemiş ve uzun süre kaynamamış süt ve bu süttten elde edilen peynir, dondurma, krema gibi ürünleri yenilmemelidir. Pastörize edildiği kesin olmayan süt ve süt ürünleri tüketilmemelidir (Aslan, 2015; Kara, 2011).

Alanda çalışmakta olan şahıslar, insanlara bulaştırmayı ve salgının hayvandan hayvana ve geride kalan başka sürülere edilgen olarak sirayet edişini engellemek için, muhafazayı sağlayıcı güvenli elbiseleri giymek ve kullanılmakta olan tüm aletleri dezenfekte etmek gibi basit ve temelde etkili olan tedbirleri almalıdırlar (Karadal ve ark., 2016; Cengiz ve Dolapçı, 1997; Ataş ve ark., 2007; Eren, 2004; Büyükcangaz ve ark., 2009; Mohamed, 2015; Abdelkareem ve ark., 2008).

Hayvan bakıcıları yavru atan hayvanların tüm atıkları ile atıkların değdiği yemleri ve atıkları elleri çıplak şekilde dokunmadan, gerekli tüm tedbirleri aldıktan sonra yok etmelidir. Atıklar çevreye rastgele atılmamalı, kedi ve köpeklere verilmemeli, ahır ve ağıllar dezenfekte edilmelidir. Yavru atımı meydana geldiği durumlarda bir veteriner hekime acilen haber verilmeli ve hastalık tanısı konulduktan sonra hayvanlara mutlaka aşı yapılmalıdır (Eren, 2004; Cengiz, 2007; Dabanlıoğlu, 2005).

Buna ek olarak, genç hayvanlara aşı yapılmasına dikkat edilmelidir. Çünkü insanlarda brucellozun önüne geçilmesi hayvanlarda hastalığın kontrolüne ve yok edilmesine bağlıdır. İnsanlarda kullanılabilecek bir aşı yapılan tüm çalışmalara rağmen henüz mevcut değildir (Aslan, 2015; Kara, 2011).

İnsanların *Brucella*'dan korunması; direkt olarak özellikle keçi, koyun, domuz ve sığır gibi evcil hayvanların enfeksiyon açısından kontrolü ve enfeksiyonun yok edilmesi ile ilgilidir. Hayvanlarda bilhassa sığırlar arasındaki *Brucella*'nın kontrolü için dünya FAO/WHO uzmanlar heyeti birbirine bağlı üç program önermektedir:

1. Hayvanları hastalıklardan korumaya çalışmak.
2. Testlerle hastalanan hayvanların belirlenip, acilen mezbahaya sevk edilmesini sağlamak.
3. 4-8 aylığa ulaşan dişi danaların S-19 aşısı ile aşılanmalarını sağlamak.

Bu öneriler ışığında Ülkemizde 1983 yılında Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından yirmi altı yılda tamamlanması planlanan ve Türkiye'ye 218 milyarlık bir katkıda bulunacak "**Türkiye *Brucellosis* Mücadele Projesi**" hazırlanmış ve çalışmalara başlanmıştır. Koyun ve keçilerin aşılanmasında *B. melitensis*'in suş Rev1 kullanılmaktadır.

Brucella'dan korunmak için uygulanması gerekli olan tedbirleri aşağıdaki gibi sayabiliriz:

- Risk altındaki çalışanların (et paketleyicileri, laborantlar, mezbaha çalışanları, hayvan bakıcıları ve veteriner hekimler) eldiven kullanmaları, tüm ekstremitelerini örten kıyafetler giymeleri, gözlük takmaları.
- *Brucella* bakterisinin konakçı spektrumuna kümes hayvanları da dahil edildiğinden, bilhassa, hastalıklı olan kümes hayvanının kesiminde tedbir alınması ve çiğ olan yumurtaların tüketilmemesi,

- Sütlerin ısıtılması prosesi, görme,
- Taze peynir imalatında yeterince tuzlanması ve asgari 2 ay bekletildikten sonra tüketilmesi (Her peynir tenekesinin üzerinde mayalanma tarihi bulunma mecburiyetinin koyulması),
- Etlerin tamamen pişirilmeden tüketilmemesi,
- Salgından etkilenen bölgelerde hayvan dışkıları ile kontamine olmuş sebzelerden de enfekte olunabileceği düşünülüp, sebzelerin iyice temizlenip pişirildikten sonra tüketilmesine dikkat edilmeli,
- Brucelloz şüphesi olan kişilerin cinsel ilişkiye girmesi engellenmeli,
- Son olarak Brucelloz vakalarının kati suretle Sağlık Bakanlığı'na bildirilerek o bölgenin Brucelloz açısından geniş çapta incelemeye alınması sağlanmalıdır (Eren, 2004; Kara, 2011; Dabanlıoğlu, 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 2.1.1 ve şekil 2.1.1 de sırasıyla analizde kullanılan cihazların listesi ve fotoğrafları görülmektedir.

Çizelge 2.1.1. Kullanılan cihazlar listesi.

Cihaz İsmi	Model ve Kod	Markası
Otoklav Cihazı	OT40L	Nüve
Biyolojik Kabin	Class II	Delta
İnkübatör (Etüv)	En 055	Nüve
İnkübatör (Etüv)	MIN-550	Microtest
Hassas Terazı	GR-200	AND
Su Banyosu (Benmari)	NB5	Nüve
Etüv	ED 240	BİNDER
Buzdolabı	AL370EY	Altus
Stomacher Cihazı	T2AL250V	Easy MIX
Steril Tek Kullanımlık Pipetler	No: 012018	FIRATMED



Biyolojik Kabin
Class II DELTA



Su Banyosu (Benmari)
NB5 NÜVE



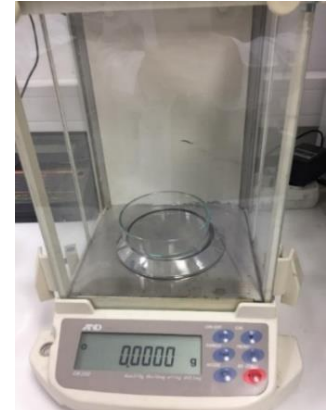
Stomacher Cihazı
Easy MIX



Stomacher Cihazı
Easy MIX



Koloni Sayım Cihazı



Hassas Terazi
GR-200 AND



İnkübatör (Etüv)
En 055- NÜVE



İnkübatör (Etüv)
MIN-550 Microtest



Etüv
ED 240 BİNDER

Şekil 2.1.1. Analizde kullanılan cihazlar

2.1.2. Kullanılan Malzemeler

Çizelge 2.1.2’de Kullanılan malzeme listesi görülmektedir.

Çizelge 2.1.2. Kullanılan malzeme listesi.

Sıra No	Malzeme Adı	Markası & Kodu	Miktar ve Birim
1	<i>Brucella</i> Agar Base (Himedia).	M074	1 Adet
2	<i>Brucella</i> Selective Supplement SVL (Himedia).	FD161	2 Adet
3	Urea Agar Base (Himedia)	M112	1 Adet
4	Urea 40% (Himedia)	FD048	1 Adet
5	Oxidase test strip (130717 (Bioanalyse)	STR00150	2 Adet
6	Lam	İSOTHERM	1 Adet
7	Steril Stomacher Poşeti, PE, Filtreli	190x300 mm	2 Adet
8	Steril Petri kutusu - P.S.	90 x 17 mm	1 Adet
9	5% Koyun Kanlı Agar 20x90mm	SP-1021	1 Adet
10	MacConkey Agar 500 G	Merck 105465.0500	1 Adet
11	Gram boyama (kristal violet, lugol, alkol, safranin) seti	BesLab	500 ml

2.1.3. Numune Alma

Bu çalışma İstanbul/Beylikdüzü’nde pazar yerleri ve yerel marketlerde açık olarak satılan süt ürünlerinde *Brucella* varlığını araştırmak amacıyla yapılmıştır. Araştırmanın yapıldığı 45 adet, peynir, 25 adet süt, 15 adet tereyağı ve 15 adet kaymak olmak üzere toplam 100 adet ambalajsız açık satılan numune 17.03.2019 – 2.12.2019 tarihleri arasında ilçenin farklı semt parekende marketleri ve semt parekende

pazarlarından (Beylikdüzü Pazarı, Gürpınar Pazarı, Beygah Pazarı) temin edilmiştir. Toplanan tüm numuneler aseptik şartlarda, steril numune poşetlerine alınmış ve her biri hassas terazide 25 gr olarak tartılarak Stomacher poşetlerine konulmuştur. Çizelge 2.1.3’de alınan numunelerin ayrıntılı listesi görülmektedir.

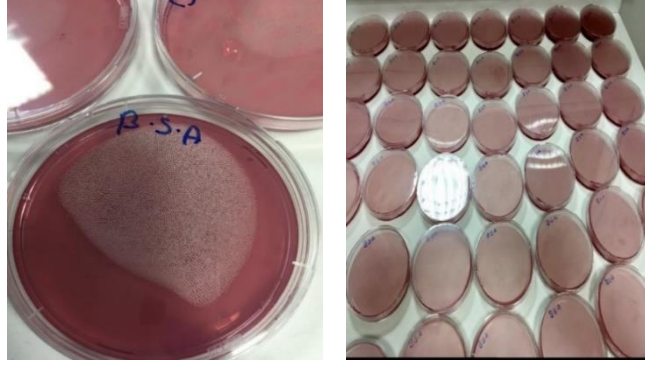
Çizelge 2.1.3. Alınan numuneler.

Numuna Alma Yeri	Peynir	Süt	Kaymak	Tereyağ
Beylikdüzü Halk Pazarı	30	11	10	9
Gürpınar Halk Pazarı	2	1	0	0
Beygah Pazarı	2	4	2	1
Market (1) Beylikdüzü	0	3	2	1
Market (2) Beylikdüzü	0	2	0	0
Market (3) Gürpınar	0	1	0	0
Market (4) Beylikdüzü	5	0	0	0
Market (5) Beylikdüzü	0	0	1	1
Market (6) Beylikdüzü	5	0	0	0
Market (7) Beylikdüzü	1	2	0	3
Market (8) Beylikdüzü	0	1	0	0
Toplam	45	25	15	15

2.1.4. Kullanılan Besiyerleri - Besiyeri hazırlama

2.1.4.1. *Brucella* Selektif Agar

Brucella Agar Base (Hİ-M074), 43,1 gram miktarında hassas terazide tartılmış, balon jojeye aktarılmış ve üzerine distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra su banyosuna alınarak berraklaşınca kadar kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında 40-45 °C’ye soğutulmuş ve pH ayarlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika, 1.2 atm’de otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılınca 45-50°C’ye soğutulmuştur. Tekrar pH kontrol edilmiştir. Supplement (Hİ-FD161) 10 ml distile su ve 10 ml %99’luk methanol ile karıştırılmış ve besiyerine aktarılmıştır. Aseptik olarak steril % 5 v / v inaktive edilmiş At Serumu eklenmiş (RM1239, 56 ° C’de 30 dakika ısıtılarak inaktive edildi) ve fuksinli Besiyeri için %0,1’lik basic fuchsin (ChemBio CB2475-02) besiyerine aktarılarak besiyeri iyice karıştırılmıştır. Ortaya çıkan karışım steril petri kaplarına dökülmüştür (Şekil 2.1.2’de görülmektedir).



Şekil 2.1.2. Fuksin eklenmiş Brucella Selektif Agar

2.1.4.2. MacConkey Agar

MacConkey Agar dehidre besiyeri (Merck 105465.0500) hassas terazide 50,0 gram tartılmış ve bir litrelik balon jojeye aktarılmıştır. Üzerine bir litrelik distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Besiyeri su banyosunda berraklaşmaya kadar kaynatılmıştır. Berraklaştıktan sonra oda ısısında 45-50 C'ye soğuması beklenmiş ve pH ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika, 1.2 atm'de otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45-50 °C'ye soğutulmuş ve pH kontrol edildikten sonra steril petri kaplarına dökülerek katılaşması beklenmiştir (Şekil 2.1.3).

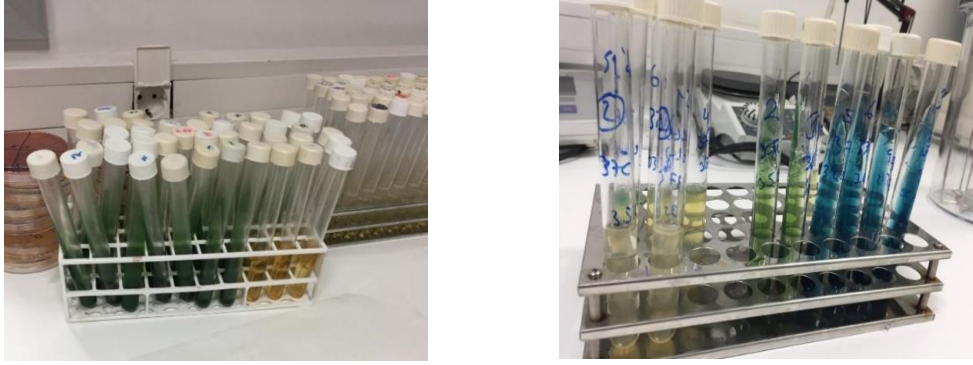


Şekil 2.1.3. MacConkey Agar.

2.1.4.3. Simmons Citrate Agar Besiyeri Hazırlama

Simmons Citrate Agar Dehidre Besiyeri (Merck VM323501), hassas terazide 22,5 gr tartılmış ve bir litrelik balon jojeye aktarılmıştır. Üzerine distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Besiyeri su banyosuna alınarak berraklaşmaya kadar kaynatılmıştır. Berraklaşan besiyeri su banyosundan alınarak, oda sıcaklığında 45-50 °C'ye

soğutulmuş ve pH ayarlanmıştır. Kapaklı deney tüplerine 8 ml aktarılmıştır. Besiyerin bulunduğu tüpler 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri 45-50 °C'ye soğutulmuş ve tüpler yatık şekilde tezgahlara dizilerek soğutulmuştur. Kullanılana kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 2.1.4).



Şekil 2.1.4 Sitrat ve Hareket Testi.

2.1.4.4. Motility Test Medium

Motility Test Medium (BBL- Ref:211436/Lot:6131860), 22 gr besiyeri hassas terazide tartılmış ve bir litrelik balon jojeye aktarıldıktan sonra, üzerine distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Besiyeri su banyosuna alınarak berraklaşınca kadar kaynatılmıştır. Berraklaşan besiyeri su banyosundan alınarak, oda sıcaklığında 45-50 °C'ye soğutulmuş ve pH ayarlanmıştır. Steril kapaklı deney tüplerine 9 ml aktarıldıktan sonra, besiyerinin bulunduğu tüpler 121 °C'de 15 dakika, 1.2 atm'de otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan tüper dik şekilde soğutulmuş ve buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.4.5. Urea Agar Base

Urea Agar Base (Himedia, M112) 2,4 gram miktarında tartılmış ve 100 ml'lik balon jojeye aktarıldıktan sonra distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Çözülene kadar su banyosunda kaynatılmış ve oda sıcaklığında 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra ve pH 6,8 °C ± 0,2 olarak ayarlanmıştır. 115°C'de 20 dakika otoklavlanlanmış ve otoklavdan çıkınca 45-50°C'ye soğutulduktan sonra supplement (Urea %40) (Himedia, FD048) eklenmiştir. Eşit miktarlarda steril petri kaplarına dökülerek katılaşınca kadar

beklenmiş ve buzdolabında 4°C’de muhafaza edilmiştir. Şekil 2.1.5’de Urea Agar Base yapımı görülmektedir.



Şekil 2.1.5. Urea agar base yapımı.

2.1.5. Steril FTS Hazırlama

Steril %0,85 Sodyum Klorür (Merck 1.06404.1000) 9 g ; Distile su 1litre içinde çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan 45-50 °C’ye soğutulmuş ve Kullanılana kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

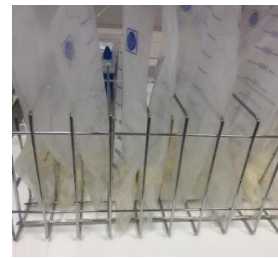
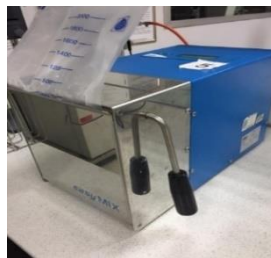
25 gr tartılarak her bir numuneden steril stomacher poşetine konulmuştur. Numune 75 ml steril Fizyolojik Tuzlu Su ile sulandırılmıştır. Steril poşetlerindeki numuneler homojenizatör cihazlar (stomacher) (Easy MIX, T2AL250V) ile homojen hale getirilmiştir. Her stomacher poşetindenki numuneden *Brucella Agar* besiyerine 2 paralel ekim şeklinde 0,5 ml aktarılarak drigalski spatülü ile yayılmıştır. Parelel

ekimlerin ikişer adeti aerobik ve mikroaerofilik şartlarda 37 °C’de yedi gün inkübe edilmiştir. Üreyen şüpheli koloniler pasajlanarak saflaştırıldıktan sonra MacConkey (Merck 105465.0500) Agar’a aktarılmıştır. 37 °C’de yedi gün inkübe edilmiş ve Laktoz (+) pembe koloniler elenmiştir. Ancak laktoz (-) renksiz koloniler için diğer testlerin yapımına devam edilmiştir. Şüpheli kolonilere katalaz testi uygulanmıştır. Çıkan sonuçlarda negatif olanlar (-) elenmiş ve pozitif (+) olanlar ise oksidaz testine tabii tutulmuştur. Oksidaz testi yapılırken sonuçlar (-) değişken ya da (+) mor renkte olunca testlere devam edilmiştir. Şüpheli koloniler Simmons Citrate Agar (Mercak VM323501) tüplerine pasajlanmıştır. 37 °C’de yedi gün inkübe edilmiştir. Bir haftanın sonunda çıkan sonuçlar eğer (+) mavi ise elenmiş, (-) yeşil ise hareket testine geçilmiştir. Hareket testi için her bir numuneye ikişer tüp Motility Test Medium (BBL Ref:211436/Lot:6131860) hazırlanmıştır. MacConkey’den alınan koloniler bu tüplere inokule edilmiştir. Bir tüp 37 °C’de diğer tüp ise 20 °C’de yedi gün inkübe edilmiştir. Sonuçlar eğer 37 °C (+) ve 20 °C (+) yani hareketli ise sonuçlar elenmiştir. Ama 37 °C (-) ve 20 °C (-) yani hareketsiz ise üreaz testi yapılmıştır. Ürea Agar’a yapılan ekimler 37 °C’de yedi gün inkübe edilmiştir, sonuçlar pozitif (+) pembe (-) sarı/turuncu olunca hemoliz testine geçilmiştir. Hemoliz testi için hazır kanlı agar (SP-1021) kullanılmıştır. MacConkeyden alınan koloniler kanlı agara ekim yapılmıştır. 37 °C’de yedi gün inkübe edilmiştir. Hemoliz sonucu pozitif (+) ise izolat elenmiş ancak negatif ise aglütinasyon testine geçilmiştir. Aşağıda uygulanan tüm testlerin yapılışı özetlenmiştir:

Çizelge 2.1.4. İzole edilmiş *Brucella* spp’nın biyokimyasal testleri (Aras ve ark.2009).

Testler	<i>Brucella</i>	Açıklama
Morfoloji	Küçük kokobasil	
Hareket 37 °C’de	-	
Hareket 20 °C’de	-	
Mac Conkey’de Laktoz fermentasyonu	-	
Hemoliz	-	
Katalaz	+	
Oksidaz	+	<i>B. ovis</i> , <i>B. neotomae</i> ve bezende <i>B. abortus</i> 'un bazı suşları (-)

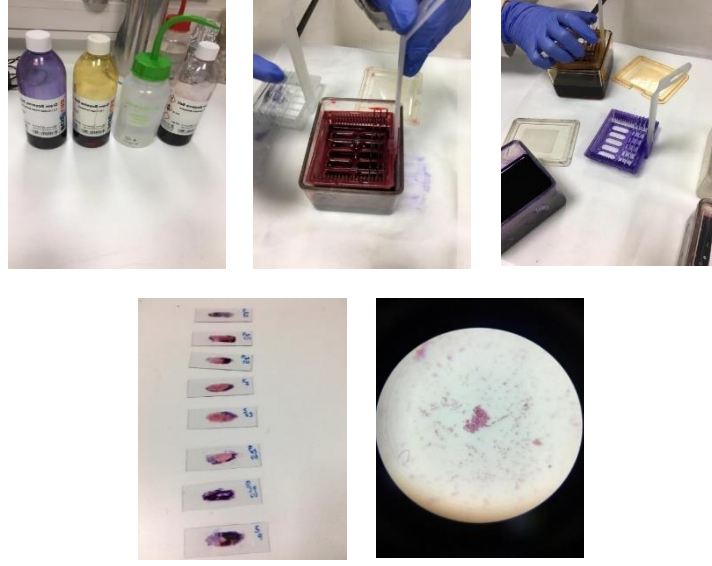
Üreaz	+	<i>B. ovis</i> ve bezende <i>B. abortus</i> 'un bazı suşları (-)
Sitrat Kullanımı	-	
A- <i>Brucella</i> antiserumu ile aglütinasyon	<i>B. melitensis</i> (az) <i>B. abortus</i> (çok) <i>B. suis</i> (çok)	
M- <i>Brucella</i> antiserumu ile aglütinasyon	<i>B. melitensis</i> (çok) <i>B. abortus</i> (az) <i>B. suis</i> (az)	



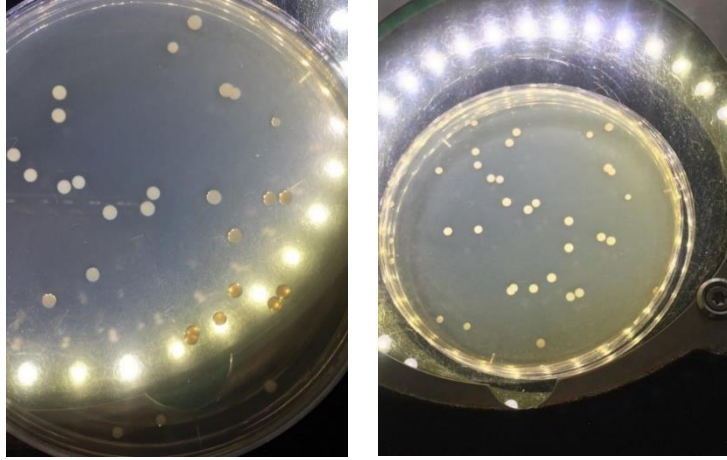
Şekil 2.2.1. Numuna hazırlama.

2.2.2. Gram Boyama

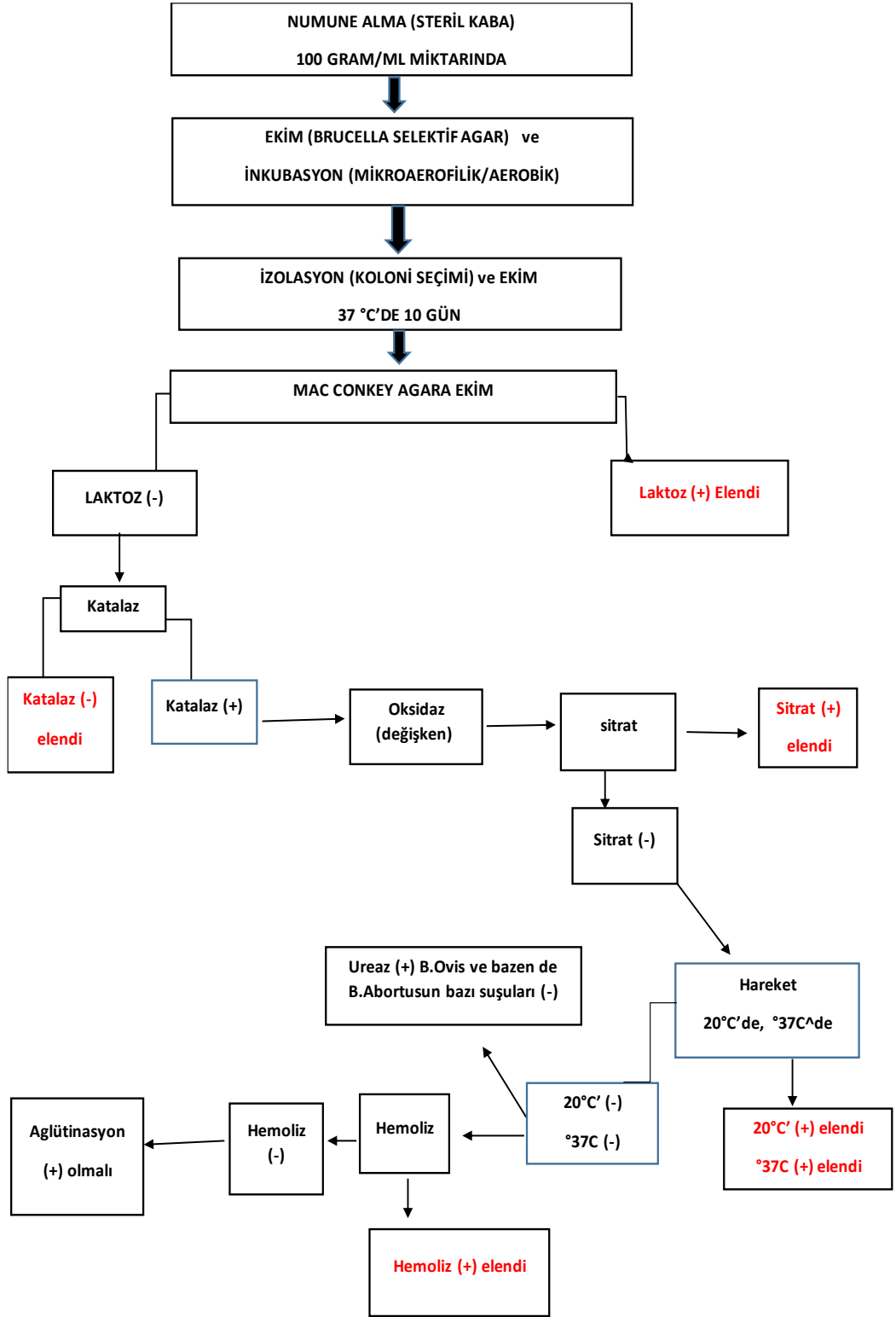
Steril FTS'den (steril %0,85 Sodyum Klorür (Merck 1.06404.1000) çözeltisi) alınarak lam üzerine damlatılmış ve izole edilen kolonilerden öze ile alınarak FTS içerisinde yayılması sağlanmıştır. Yayma kurutulduktan sonra üç defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Üç dakika boyunca kristal violet'da bekletilerek su ile yıkanmıştır. Preparat üzerine lugol çözeltisi eklenerek bir dakika boyunca bekletilmiş ve bolca distile su ile yıkanarak arındırılmış ve 15-30 saniye aralığında etil alkolde dekolarizasyon işlemi yapılmıştır. Lamlar bol distile suyla yıkanmış ve bir dakika boyunca safranin (sulu fuksin) de bekletildikten sonra tekrar distile suyla yıkanmış ve kurutma işleminin ardından immersiyen yağı damlatılmıştır. 100X immerisyon objektifinde mikroskop altında incelenmiştir. Şekil 2.2.2'de Gram Boyama ve Şekil 2.2.3'de Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından fotoğraflanan *Brucella* kolonileri görülmektedir. Ayrıca Şekil 2.2.4. *Brucella* izolasyon ve identifikasyon aşamaları izlenmektedir.



Şekil 2.2.2. Gram Boyama.



Şekil 2.2.3. TC. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından fotoğraflanan Brucella kolonileri.



Şekil 2.2.4. Brucella izolasyon ve identifikasyon aşamaları.

2.2.3. Süt Ring Testi

Steril tüpe 1 ml süt numunesinden konulmuş ve sütün üzerine bir damla antijen (PENDİK, SRT/01/17) ilave edilerek karıştırılmıştır. Bir saat 37 °C’de inkubatörde bekletilmiştir. Sütün üst yüzeyinde mavi halka oluşumu pozitif reaksiyonu işaret eder. Halka oluşmuyorsa sonuç negatiftir (Arda, 1990). Şekil 2.2.5’te Süt Ring Testi aşamaları görülmektedir.



Şekil 2.2.5. Süt Ring Testi

2.2.4. Biyokimyasal testler

2.2.4.1. Katalaz Testi

Lam üzerine % 3’lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) birer damla olarak damlatılmış ve şüpheli koloniler, Agardan alınarak lam üzerinde hidrojen peroksit ile muamele

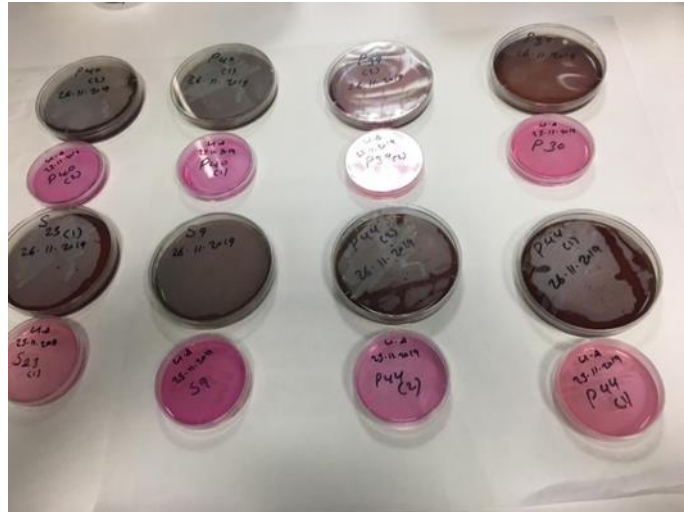
edilmiş ve ortaya çıkan kabarcıklar gözle görülebilir gaz çıkışıyla pozitif olarak değerlendirilmiştir (Alton, 1988; Abdelkareem ve ark.,2011). Şekil 2.2.7’de katalaz, üreaz ve oksidaz testleri görülmektedir.

2.2.4.2. Oksidaz Testi

Sitokrom c oksidaz enziminin varlığını tespit etmek için kullanılan bir testtir. Etkenin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Identification Sticks Oxidase (Bioanalyse, STR00150) kiti kullanılmıştır. Oksidaz çubuğunda çıkan sonuçta mor renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Alton, 1988; Dolapçı, 2016). *Brucella* spp. genellikle oksidaz pozitifdir, ancak *B. ovis*, *B. neotomae* ve bazende *B. abortus*'un bazı suşları negatif sonuç verebilir (Alton, 1988; Dolapçı, 2016; Aras ve ark., 2009).

2.2.4.3. Üreaz Testi

%40' lık üre solüsyonu, etkenin üreaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmıştır (MacFaddin, 1985). Şüpheli, kolonilerinden yoğun bir süspansiyon hazırlayarak, %40 oranında Urea Solution (Himedia, FD048) eklenmiş, üre agar (Himedia, M112) base besiyeri yüzeyine bir öze dolusu inoküle edilmiş ve 18-24 ° C'de 35-37 ° C'de bir inkübasyondan sonra pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. *Brucella* spp. genellikle oksidaz pozitifdir, ancak *B. ovis* ve bezen de *B. abortus*'un bazı suşları negatif sonuç verebilir (Aras ve ark., 2009). Şekil 2.2.6’de üreaz testi ve kanlı agara ekim.



Şekil 2.2.6. Üreaz testi ve kanlı agara ekim.

2.2.4.4. Hareketlilik Testi

Şüpheli kolonilerden Motility Test Medium (BBL- Ref:211436/Lot:6131860) içeren tüplere iğne uçlu öze ile aktarılmış, inkubasyondan sonra değerlendirilmesi yapılmıştır. Mikroaerofilik koşullarda 37 °C ve 22'de °C'de 4 gün süreyle, ekim çizgisinde büyüme belirgin olana kadar inkübe edilmiştir. Hareketliliği belirlemek için tüp ışığa tutularak ekim çizgisine bakılmıştır. Pozitif hareketlilik testi, ekim hattından uzayan bulanık bir alanla belirlenir. Negatif bir testte ekim hattı boyunca gelişme görülür ancak, ancak çizgiden çevreye yayılan bir bulanık opak alan yoktur (Dolapçı, 2016). Şekil 2.1.4'de görülmektedir.

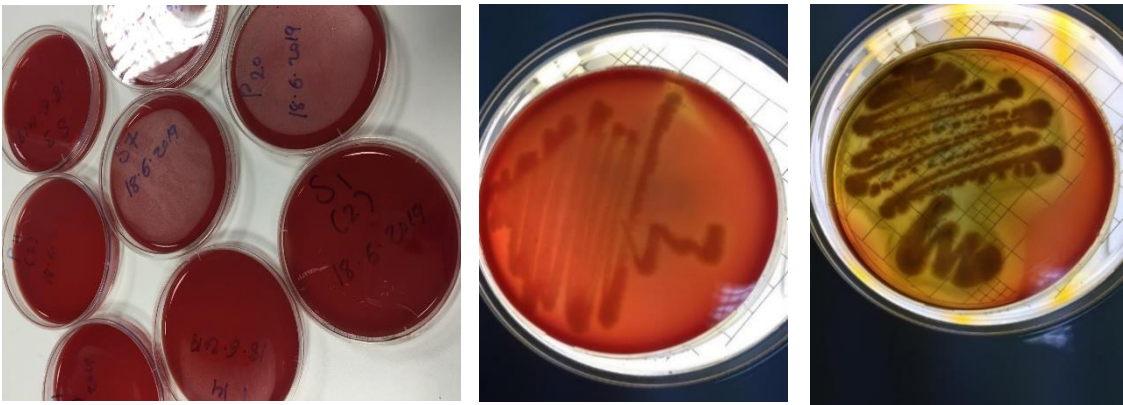
2.2.4.5. Kanlı Agar Ekim ve Hemoliz Testi

MacConkey Agardan alınan koloniler kanlı agar besiyerine (5% Koyun Kanlı Agar) (SP-1021) pasaj yapıldıktan hemoliz oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmiş ve hemoliz var ise elenmiştir.

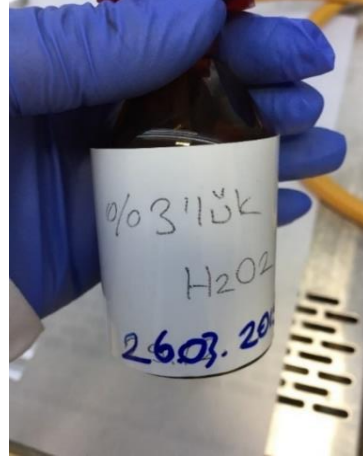
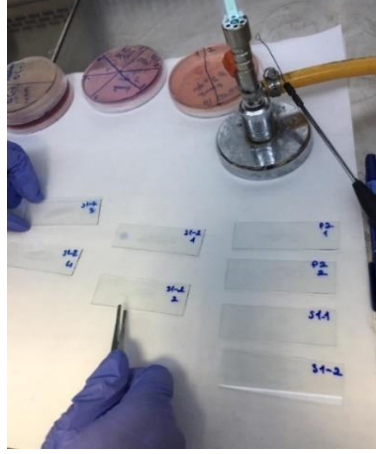
Ancak hemoliz yoksa diğer testlerin yapımına devam edilmiştir (Aras ve ark., 2009). Şekil 2.2.7'da şüpheli kolonilerden kanlı agara ekim ve hemoliz testi görülmektedir.

2.2.4.6. Sitrat testi

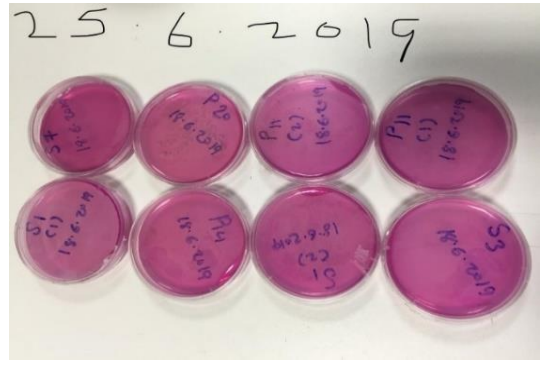
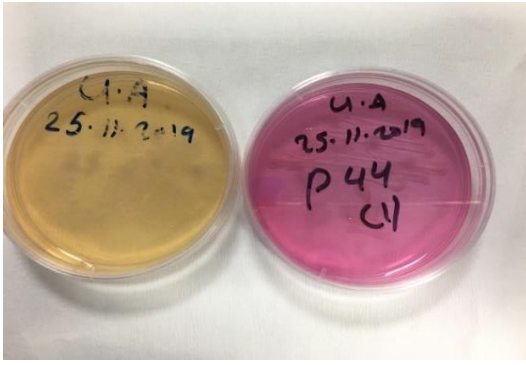
Sitrat testi (Mercak VM323501), bir organizmanın sitratı tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanma yeteneğini tespi eder. Amonyum dihidrojen fosfat ve sodyum sitrat, sırasıyla tek azot ve karbon kaynağı olarak işlev görür, sitrat kullanımı alkaline reaksiyonu üretir ortamın rengi yeşilden parlak maviye dönüşür (organizma sitrat pozitifdir). Sitrat kullanımı yok ise rengi değişmeden kalır (yeşil) (organizma sitrat negatifdir) (Alton, 1988; Dolapçı, 2016). Şekil 2.1.4'da görülmektedir.



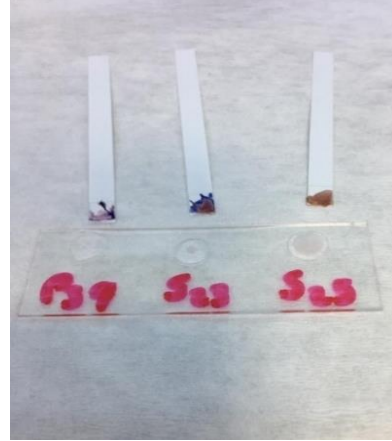
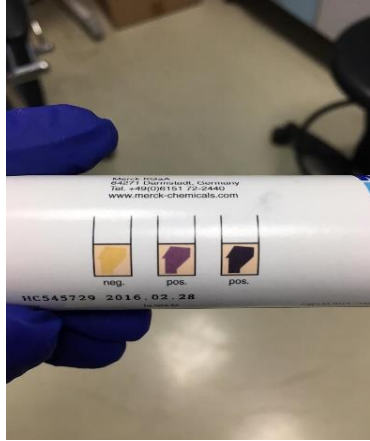
Şekil 2.2.7. Şüpheli kolonilerden kanlı agara ekim ve hemoliz testi.



Katalaz testi



Üreaz testi



Oksidaz testi

Şekil 2.2.8. Katalaz, üreaz ve oksidaz testleri

2.2.5. Aglutinasyon Reaksiyonu

B. melitensis, *B. abortus* ve *B. suis*, A (abortus) ve M (melitensis) olarak isimlendirilen, ısıya dayanıklı, aglutinasyon reaksiyonlarından sorumlu, yüzey antijenlerine sahiptirler. *B. abortus* ve *B. suis*'de A antijeni fazla, M antijeni az, *B. melitensis*'de ise M antijeni fazla, A antijeni az miktarda bulunur (Bilgehan, 2000; Arda, 2000). Bu prensibe dayanılarak geliştirilen aglutinasyon reaksiyonu uygulanmış ve sonuçları bir dakika içinde oluşan aglutinasyon durumuna göre okunarak değerlendirilmiştir. A ve M mono spesifik anti serumları ile A+M *Brucella* anti serumu TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü *Brucella* Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. İzole edilen her koloni bir mono spesifik sera anti-A, ve anti-M ile karıştırılarak aglutinasyon için incelenmiştir. Çıkan sonuç negatif (-) olduğunda numune elenmiş ancak pozitif (+) olduğunda *Brucella* bakterisinin olduğu sonucuna varılmıştır (Eren, 2004).

2.2.6. İdentifikasyon ve Doğrulama

Yüz koloni üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde olarak ortaya çıkan beş şüpheli koloni, doğrulamak amacıyla soğuk şartlarda TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilmiştir.

TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde, söz konusu izolatların tür tayinleri standart yöntemlere göre yapılmıştır (Alton GG ve ark., 1988). Uygulanan yöntemler aşağıda görüldüğü gibidir:

2.2.6.1. Kullanılan solüsyon ve besiyerleri:

Serum Dekstroz Agar (SDA)

Boyalı besiyerleri;

- A) Thionin besiyeri
- B) Bazik Fuksin besiyeri
- C) Safranin besiyeri

Antibiyotik içeren besiyerleri;

- A) Streptomisin besiyeri
- B) Penisilin besiyeri

i-eritritol besiyeri

Pepton salin solusyonu;

Akriflavin solusyonu;

Kristal viyole stok solusyonu:

1. A Solusyonu
2. B Solusyonu
3. Stok Kristal Viyole Solusyonu
4. 1/40' lık Kristal Viyole Solusyonu

Üre besiyeri (Christensen Medium)

Kurşun asetatlı kağıtlar

Oksidaz çubuğu

Brucella fajları

Brucella anti serumları

- A) A+M *Brucella* poliserum
- B) *Brucella* monospesifik A ve M antiserumları
- C) *Brucella* Rough (R) antiserum

2.2.6.2. Test Prosedürü

***Brucella* genus seviyesinde identifikasyon**

İzolatların cins düzeyinde tanımlanması amacıyla, konvansiyonel yöntemler (koloni morfolojisi, Gram boyama, üreme özellikleri, akriflavin testi, oksidaz ve üreaz testi), smooth ve rough kolonilerin ayırımı, poliklonal serum ile lam aglütinasyonu (*Brusella* anti-A+M poliserumu ile lam aglutinasyon testi) ve Polimeraz Zincir rekasyonu yöntemleri uygulanmıştır. Faj testleri olarak, fajların rutin test dilüsyonunun (RTD) saptanması, Tibilisi fajı ve R/C fajı ile lizis testi yapılmıştır.

Şüpheli kolonilere polivalan (A+M) anti-*Brucella* serumu ile lam aglütinasyon testi uygulanmıştır. Etkenin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Oxidase test stripleri kullanılmıştır. Taze hazırlanmış *Brucella* spp. kültüründen bir öze dolusu alınarak, 22 °C 'deki oksidaz çubuğuna değiştirilmiş ve reaksiyonun oluşması için 2 dakika beklendikten sonra oksidaz çubuğu ucundaki bölgenin mor renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Üreaz Testi (Christensen's Metodu) için besiyeri hazırlanması amacıyla % 39'luk Üre solusyonu kullanılmıştır. Steril tüplere paylaştırılan yarı-katı besiyeri içine şüpheli izolatların öze yardımıyla ekimleri yapılmıştır. Besiyerinin renginin pembeye dönüşmesi pozitif olarak

değerlendirilmiştir. *Brusella* spp.'in tip tayinlerinde kültürün koloni morfolojisi önemli olduğundan, koloniler 45°C'lik oblik ışıkta stereoskopik mikroskopla görüntülenmiş ve daha sonra aynı amaçla akriflavin solüsyonu ile kolonilerin aglutinasyon özellikleri değerlendirilmiştir ve hepsinin S tipi koloni olup olmadığı gözlenmiştir. Rough (R) ve smooth (S) kolonilerin ayırımında ayrıca Kristal viyole solüsyonu kullanılmıştır. Tbilisi fajı ve R/C fajı ile lizis değerlendirmesi için, yatık Trypticase soy agar tüplerinde üreyen suşlar agar yüzeyinden yıkanarak toplanmış ve Mac Farland 4'e göre yaklaşık 1×10^9 /ml bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan fajların rutin test dilüsyonları (RTD) belirlenmiştir. Her bir bakteri suspansiyonundan steril bir svab ile agar yüzeyine yapılan ekimlerin üzerine 20-30 µl Tbilisi ve R/C fajları damlatılmıştır. Petriler kuruduktan sonra %5-10 CO₂ içeren ortamda ve aerobik olarak 37 °C'de, 24 saat inkübe edilerek sonuçlar lizis durumuna göre değerlendirilmiştir.

Tür ve biyotip tanısında kullanılan yöntemler

İzolatların cins düzeyinde tanımlanması amacıyla, Karbondioksit (CO₂) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H₂S) üretimi, Tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme, A ve M monospesifik anti-serumlar ile aglutinasyon, Safranin O içeren besiyerinde üreme testleri yapılmıştır.

İzolatların karbondioksit (CO₂) gereksinimi tesbiti için, SDA yatık besiyerlerine ekilen bakterilerin hem aerobik hem de %5 CO₂'li ortamda 5-8 gün inkübasyon sonunda üreme (koloni sayısı) açısından değerlendirilerek, üreme için CO₂'e gereksinim duyup duymadığını ortaya koyulmuştur. İzolatların Hidrojen Sülfür H₂S üretim özellikleri kurşun asetat strip metodu ile incelenmiştir. H₂S üretimi tesbiti için, kurşun asetatlı kağıt şeritler, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirilmiştir. Birinci tüpler %5-10 CO₂ içeren etüvde, diğerleri ise aerob koşullarda 37°C'de, 4 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kağıtlarda oluşan renk değişikliğine göre değerlendirilmiştir. Süre sonunda kağıtlarda siyahlaşma olması H₂S üretimi açısından pozitif kabul edilmiştir. Sonuçlar üreme durumlarına göre değerlendirilmiştir. A ve M Monospesifik Anti-serumlar ile aglutinasyon testi için, her bir suştan alınan bir öze dolusu yoğun kültür 0.25 ml fizyolojik tuzlu su içinde suspanse edilmiştir. Bir lam üzerine A ve M monospesifik anti-serumlardan birer damla konularak üzerlerine birer damla incelenecek suşun suspansiyonundan eklenmiş

ve reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglutinasyon durumuna göre değerlendirilmiştir.

Çalışmada incelenen izolatların *B. abortus* S19 suşundan ayrımı amacıyla i-eritritol (1 µg/ml) içeren SDA besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel yatay şeritler halinde dört izolat olacak şekilde inoküle edilmiştir. Petriler 37 °C'de, %5-10 CO₂' li ortamda inkübe edilmiştir. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben i-eritritol içeren besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirilmiştir. Safranin-O , Tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme deneyi için, inkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanmış ve yaklaşık 1x10⁹/ml bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlanmıştır. Her bir bakteri suspansiyonundan steril bir svab ile test ve kontrol suşlarının tiyonin ve bazik fuksinin içeren besiyerine ekimleri yapılmıştır. İzolatlar tiyonin (1/50.000), bazik fuksin (1/50.000), safranin-O (1/10.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel yatay şeritler halinde inoküle edilmiş ve 37 °C'de, %5-10 CO₂' li ortamda inkübe edilmiştir. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben besiyerlerinde üreme durumuna göre değerlendirilmiştir.



Anti serum A ve M



Aglütinasyon

Şekil 2.2.9. Aglutinasyon reaksiyonu.

3. BULGULAR

Bu çalışmanın yapıldığı İstanbul/Beylikdüzü ilçesinde numunelerin alınacağı semt pazarları ve marketleri dolaşarak ilgili yerler belirlenmiş ve 45 adet peynir, 25 adet süt, 15 adet tereyağı ve 15 adet kaymak olmak üzere toplamda yüz numune 17.03.2019 – 2.12.2019 tarihleri arasında temin edilmiştir.

Peynirlerden izole edilen 45 koloni, süt numunelerinden izole edilen 25 koloni, tereyağından izole edilen 15 koloni, kaymaktan izole edilen 15 koloni şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Kolonilere bakıldığında 2-3 mm çapında yuvarlak, sarı bal renginde, şeffaf, düz kenarlı, koloniler gözlenmiştir. Kolonilere üst taraftan bakıldığında bombeli, inci beyazlığında oldukları gözlemlenmiştir. Kolonilerin S tipi olduklarına kanaat getirilmiş ve izolasyonu ve yukarıda bahsedilen diğer testleri yapılan *Brucella* kolonileri “TC. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü”ne soğuk zincirde götürülmüştür. Ancak şüpheli 5 koloninin hiçbiri *Brucella* olarak identifiye edilmemiştir.

Şekil 2.2.10’da şüpheli numunelerin “T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü” tarafından gönderilen sonuç raporu görülmektedir.



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ



AB-0158-T
2019-10713-1
14.01.2020

Rapor No: 2019-10713
Rev. No: 0

MUAYENE VE ANALİZ RAPORU

Numuneyi Gönderen	PIHAN MOHAMED	Numunenin Ambalajı	KUTU
Numuneyi Gönd. Adresi	- Fax:() -	Num. Üretici Firma Adı	PIHAN MOHAMED
Num.Gönd.Yaz.Tar./Say.	27.12.2019	Numunenin Üretim Tarihi	---
Numune Geliş Amacı	Özel İstek	Num. Son Kullanma Tarihi	---
Numunenin Türü	Siğır	Numunenin seri/Parti No	---
Numune Miktarı	5	Num.Lab.Geld.Tar./Saat	27.12.2019
Numune Kabul Şekli	Analize Uygun	Analizin Baş. Bitiş Tarihi	27.12.2019 14.01.2020

YAPILAN ANALİZLER

Adı	Metodu	Numune Cinsi	Numune Adı	Kabul No	Sonuçlar
*Brusella cinsine ait mikroorganizmaların tür, biyotip ve aşı suşları (S-19, REV-1) seviyesinde identifikasyonları	(A.BRÜ.01) İşletme İçi Metot	Brucella spp. İzolatı	süt	2019-10713-1	Gönderilen numunede Brucella cinsi mikroorganizma tespit edilmemiştir.
*Brusella cinsine ait mikroorganizmaların tür, biyotip ve aşı suşları (S-19, REV-1) seviyesinde identifikasyonları	(A.BRÜ.01) İşletme İçi Metot	Brucella spp. İzolatı	kaymak	2019-10713-2	Gönderilen numunede Brucella cinsi mikroorganizma tespit edilmemiştir.
*Brusella cinsine ait mikroorganizmaların tür, biyotip ve aşı suşları (S-19, REV-1) seviyesinde identifikasyonları	(A.BRÜ.01) İşletme İçi Metot	Brucella spp. İzolatı	peynir-1	2019-10713-3	Gönderilen numunede Brucella cinsi mikroorganizma tespit edilmemiştir.
*Brusella cinsine ait mikroorganizmaların tür, biyotip ve aşı suşları (S-19, REV-1) seviyesinde identifikasyonları	(A.BRÜ.01) İşletme İçi Metot	Brucella spp. İzolatı	peynir-2	2019-10713-4	Gönderilen numunede Brucella cinsi mikroorganizma tespit edilmemiştir.
*Brusella cinsine ait mikroorganizmaların tür, biyotip ve aşı suşları (S-19, REV-1) seviyesinde identifikasyonları	(A.BRÜ.01) İşletme İçi Metot	Brucella spp. İzolatı	peynir-3	2019-10713-5	Gönderilen numunede Brucella cinsi mikroorganizma tespit edilmemiştir.

Batı Mah. Erol KAYA Cad. No:1 34890 Pendik-İSTANBUL.Telefon : 0 216 390 12 80 Faks : 0 216 354 76 92 Web:
<http://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/pendik> E-Posta : pendik.vke@tarimorman.gov.tr, pendikvke.nku@tarimorman.gov.tr

Şekil 2.2.10. Şüpheli numunelerin “TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü” tarafından gönderilen sonuç raporunu göstermektedir

4. TARTIŞMA

Gelişmiş olan birçok ülkede az görülen bir hastalık olan Brucelloz, ülkemizde olduğu gibi gelişmeye devam eden diğer ülkelerde ve hayvancılık bölgelerinde hala önemini korumaktadır. Sığırlarda kısırlık, yavru atımı ve süt veriminde azalmaya neden olduğundan ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı aşikar olan bu hastalığın insanlara da bulaşarak halk sağlığı açısından tehlike oluşturduğu kaçınılmaz bir gerçektir. Bu çalışmalarda ve daha önce yapılmış diğer çalışmaları incelediğimizde, alınan süt, peynir, tereyağı ve kaymak gibi numunelerde *Brucella*'nın saptanmış olması ülkemizde halen geleneksel usuller ve hijyenik olmayan ortamlarda çiğ sütün tehlikelerine aldırış edilmeden peynir üretimine devam edildiğini göstermektedir.

Ülkemizde hayvancılıkla uğraşan bölgelerde ortaya çıkan haberleri de takip ettiğimizde vatandaşlarımızın konuyla ilgili olarak ciddi bir bilince ulaşması gerektiği anlaşılmaktadır. Özellikle hayvancılıkla uğraşan insanların kendi alanlarında devlet destekli eğitimler alması gereği kaçınılmaz bir gerçektir.

Bu araştırmada, yüz numune içerisinde son olarak elde edilen sonuçlara göre beş adet izolatın hiçbiri *Brucella* olarak tanımlanamamıştır. *Brucella* cinsi bakteri antijenlerinin *Yersinia enterocolitica* O9, *Franciella tularensis*, *Vibrio cholera*, *E. coli* O116 ve O157, *Xanthomonas maltophilia* gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır. Aglutinasyon testlerinde çapraz reaksiyonlar sonuçların yorumlanmasını güçleştirebilir (Corbel ve ark., 1989; Kılıç ve ark., 2013; Dabanlıoğlu, 2005). Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilmiş olan şüpheli numunelerin, *Brucella* spp. olarak tanımlanamamış olmasının sebebi aglutinasyonda yanlış pozitif reaksiyon olabilir. Sonuç olarak bu araştırmada, yüz numuneden soyutlanan izolatların hiçbiri *Brucella* olarak tanımlanamamıştır. Süt ve süt ürünleri ile ilgili yapılan Altun, (2002); Sarısayın ve Eroğlum, (1987); Ayaz, (1986); Sert ve ark., (1985) 'nın sonuçları da buna benzerdir.

Ülkemiz'de çiğ süt örnekleri üzerinde yapılan bazı araştırmalarda *Brucella* spp. varlığı %0 ile %28.8 (Erdoğan ve ark., 2018; Altun ve ark., 2017; Gulbaz ve Kamber, 2016; Abdelkareem ve ark., 2011; Eren, 2004; Altun ve ark., 2002; Adıgüzel, 2001) arasında değişmektedir. Erdoğan ve ark.'nın araştırmasında (2018), Kayseri'de konvansiyonel

ve moleküler yöntemiyle, 100 çiğ süt *Brucella* spp. yönünden incelenmiş ve süt örneklerinin birinde (%1) *Brucella* spp. saptanırken, elde edilen izolat, *Brucella abortus* biyotip 1 olarak belirlenmiştir. Altun ve ark., 2017 yılında Şanlıurfa'da 178 adet çiğ sütle (48 inek süt, 65 koyun süt, 65 keçi süt) yaptığı çalışmada ELISA tekniği ile sırasıyla %16,6, %6,1, %6,1, PCR tekniği ile %18,75, %7,6, %6,1 *Brucella* saptanmıştır. Gulbaz ve Kamber, tarafından 2016 yılında Kars'ta 215 çiğ süt numunesi ile yapılan çalışmada 4 (%1,86) numunede PCR yöntemiyle *Brucella* belirlenmiştir. Abdelkareem ve ark., 2011 yılı'nda, Trakya'da 75 farklı inekten alınan sütleri incelendiğinde üç tanesinde (%4) *Brucella* spp. saptanmıştır. İzolatların biri *B. melitensis* diğer ikisi *B. abortus* olarak tanımlanmıştır. PCR incelemelerinin sonucunda toplam 75 numunenin 17 (% 22,66)' sinde *Brucella* spesifik DNA saptanmıştır. Altun ve ark., 2002 Ankara'da 300 adet çiğ süt üzerinde yapılan çalışmanın hiçbirinde *Brucella* spp. tespit edilememiştir. Adıgüzel tarafından 2001 yılında Erzurum'da yapılan çalışmada toplam 560 çiğ süt numunesinden %17 oranında *Brucella* spp. izolasyonu yapılmıştır.

Dünya'da ise süt örneklerinde %1.28-%25 arasında değişen oranda *Brucella* saptanmıştır (Islam ve ark., 2019; Lindahl-Rajala ve ark., 2017; Ashrafganjooyi ve ark., 2017; Jamali ve ark., 2016; Mugizi ve ark., 2015; Almariri, 2015; Ali, 2014; Abbas ve Aldeewan, 2009; Acedo ve ark., 1997). Örneğin; Islam ve ark.'nın 2019 yılında Bangladeş'te 115 süt üzerinde yaptığı çalışmada, iki numunede (%1,7) *Brucella* izole edilmiştir. Ashrafganjooyi ve ark.'nın 2017 yılında, İran'da 700 süt numunesi ile yaptığı araştırmada, %1,28 oranındaki numunede *Brucella* belirlenmiştir. Tacikistan'da 564 süt ile yapılan çalışmada, %10,3 numunede *Brucella* tespit edilmiştir (Lindahl-Rajala ve ark., 2017).

Jamali ve ark.'nın 2016 yılında İran'ın Yazd bölgesinde, bakteriyolojik izolasyon yöntemleri ile 198 çiğ süt numunesi ile yapılan çalışması sonucunda 4 numunede *B. abortus*, 1 numunede *B. melitensis* saptanmıştır. Mugizi ve ark., 2015 yılında Uganda'da 207 süt üzerinde yapılan çalışmasında, on bir (%5,3) numunede *Brucella* izole edilmiştir. Ali tarafından 2014 yılında Irak'ta yapılan çalışmasında 120 adet süttten %9,16 *Brucella* spp. tespit edilmiştir. Abbas ve Aldeewan, 2009 yılında yayınladığı makalesinde; Irak'ta 420 süt numunesi üzerinde çalışma yürütülmüş ve numunelerin %14,7'si yani 62 tanesi pozitif çıkmıştır. Bu numunelerden 33 tanesi *B. abortus*, 25 tanesi ise *B. melitensis* olarak sonuçlanmıştır, Süt Ring testi ile 102 tanesi (%24'ü) *Brucella* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Acedo ve ark. 1997

yılında tarafından Meksika’da yapılan çalışmada, 289 süt örneğinden %2.4 oranında *Brucella* spp. pozitif saptanmıştır.

Türütoğlu ve ark.’nın, 2001 yılında Burdur’da yapılan çalışmasında 101 farklı inekten 404 adet, 113 farklı koyundan 226 süt numunesi temin edilmiş ve süt ring testi yöntemiyle inek sütlerinden 40 tanesinde (%17,7) koyun sütlerinin ise 12 tanesinde (%3) *Brucella* saptanmıştır. Kenar, tarafından 1990 yılında yapılan çalışmada süt ring testi yöntemiyle numunelerde %13,93 Konya’da, %0,92 Kayseri’de, %24,15 Niğde’de ve Nevşehir’de ise %3 oranında *Brucella* spp. pozitif saptanmıştır.

Yapılmış olunan, İstanbul’daki bu çalışmada 25 çiğ süt örneğinden süt ring testinde 4 adet (%16) pozitif sonuç elde edilmiştir. Ancak süt ring testi pozitif olan numunelerin hiçbirinde *Brucella* izole ve identifiye edilememiştir. Bunun nedeni; aglütinasyonda yanlış pozitif reaksiyonu veya bunun yanında çiğ sütün sonradan kontaminasyonu da olabilmektedir. Bu sonuçlara benzer başka çalışmalar da yapılmıştır (Dubey ve ark.,2017; Almariri, 2015; Abbas ve Aldeewan, 2009; Eren, 2004; Türütoğlu ve ark., 2001; Kenar, 1990). Dubey ve ark., tarafından 2017 yılında Hindistan’da yapılan araştırmada, 85 süt örneğinden 23’ü (%27.05) Süt Ring testi ile *Brucella* antikorları için pozitif bulunmuştur. Ayrıca toplam 168 örneğin (145 süt ürünleri ve 23 (süt ring testi pozitif süt örneği)), 14’ü PCR ile pozitif olarak saptamışlardır. Almariri, 2015 yılında, 2002-2007 yılları arasını kapsayan Suriye’de 2372 süt numune ile uzun soluklu çalışma gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak 1352 numunenin %57’si Süt Ring testi ile *Brucella* antikorları için pozitif bulunmuştur, ancak sadece 596 (25%) örnek PCR ile ve bakteriyolojik izolasyon yöntemleri pozitif olarak neticelenmiştir. Bu yapılan araştırmalarda da bazı sütlerde süt ring testi pozitif olduğu halde *Brucella* izole ve identifiye edilememiş olması benzerdir.

Türkiye’de ve diğer ülkelerde peynir örnekleri ile yapılan araştırmalarda, *Brucella* spp. izolasyon oranları (%2-%20,5) aralığında saptanmıştır. (Erdoğu ve ark., 2018; Altun ve ark., 2017; Kara, 2011; Kale, 2009; Ataş ve ark., 2007; Öngör ve ark., 2006; Alim ve Tomul, 2005; Eren, 2004; Gulluce ve ark., 2003; Budağıc, 2003; Kasımoğlu, 2002; Kalender ve ark., 2001; Patır ve Dinçoğlu., 2001; Namin, 1990; Sancak ve ark., 1993; Ayaz, 1986 Tunçbilek, 1984; Mert, 1984).

Erdoğu ve ark., tarafından 2018 yılında Kayseri’de yapılan çalışmada toplam 100 adet taze beyaz peynir ve 100 adet salamura beyaz peynir numunesi toplamışlar, beyaz peynir örneklerinin ikisinden (%2) *Brucella* spp. saptanmış, ancak salamura peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamıştır. Taze beyaz peynirden elde

edilen izolatlar *Brucella melitensis* biyotip 3 olarak belirlenmiştir. Altun ve ark., 2017 yılında Şanlıurfa'da 80 taze peynir üzerinde yapılan çalışmada ELISA yöntemiyle %16,25, PCR yöntemiyle ise %22,5 oranında *Brucella* spp. olarak tanımlanmıştır. Kale, 2009 yılında Burdur'da 100 taze peynir ile yapılan çalışmada 5 örnek (%10) *B. abortus* ve 2 örnek ise (%4) *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Ataş ve ark., 2007 Sivas ilinde yapılan çalışmada 135 peynir numunesinden %5,9 *Brucella* izole etmiştir. Bu izolatlardan dört tanesi (%2,9) *B. melitensis* dört tanesi ise (%2,9) *B. abortus* olarak sınıflandırılmıştır.

Öngör ve ark., tarafından 2006 yılında, Elazığ'da yapılan çalışmada 40 peynir örneğinden immunomagnetic separation PCR yöntemiyle %5 *Brucella* spp. izole edilmiştir. Alim ve Tomul, 2005 Sivas'ta 2003 yılında yaptıkları çalışmada, 42 peynir örneğinin 3 tanesinde (%7,1) ve 2004 yılında 47 taze peynir örneğinin ise 4 tanesinde (%8,5) *Brucella* spp. saptamıştır. Budağcı, 2003 yılında, Kayseri'de yaptığı çalışmasında 100 adet beyaz peynir numunesinin 13'ünde Brucelloz etkenleri saptamıştır. Pozitif 13 numunenin 12'si *B. melitensis* 1 tanesi ise *B. abortus* olarak belirlenmiştir. Gulluce ve ark., 2003 yılında Erzurum'da 120 adet beyaz peynir örneğinde ELISA yöntemi ile %21,66'ında *B. abortus* antijeni saptamıştır. Patır ve Dinçoğlu tarafından, 2001 yılında Elazığ'da yaptıkları çalışmada, topladıkları 30 adet beyaz peynir numunesinin %3,3'ünde, 55 adet tulum peyniri numunesinin ise %1,8'inde *Brucella* spp. tespit edilmiştir. Kalender ve ark., (2001), Elâzığ, Erzincan ve Tunceli'den 78 adet taze tulum peyniri örneği toplamışlar ve örneklerin %20,5'inde *Brucella* spp. izole edilmiştir. Bu numunelerden %81,3'ü *B. melitensis* ve %18,7'si *B. abortus* olarak tanımlanmıştır. Namin (1990)'in İstanbul'daki bazı semtlerde 100 adet numune ile yaptığı çalışmada sekiz adet peynirde *Brucella* saptanmıştır. Sancak ve ark. (1993), Van'da yaptıkları çalışmada, 40 adet taze van otlu peynirde %17,5 oranında *Brucella* spp. izole etmiştir. Bu numunelerden %15'ini *B. melitensis*, %2,5'ini ise *B. abortus* olarak saptanmıştır. Namin'in, 1990 yılında İstanbul'daki bazı semtlerde 100 adet numune ile yaptığı çalışmada sekiz adet peynirde *Brucella* saptanmıştır. Bunlardan beş tanesi *B. abortus*, üç tanesi ise *B. melitensis* olarak belirlenmiştir. Ayaz, tarafından 1986 yılında Ankara'da yapılan çalışmada toplanan 94 peynir numunesinin hiçbirinde *Brucella* spp. tespit edilememiştir. Sert ve Kıvanç, tarafından 1984 yılında Erzurum'da yapılan çalışmasında, 30 adet peynir numunesinden hiçbirinde *Brucella* spp. saptanamamıştır. Tunçbilek'in, 1984 yılında Ankara'da yaptığı çalışmasında 100 adet beyaz peynirden %4 *Brucella* spp. izole

edilmiştir. Bu numunelerden %1'i *B.abortus*, %3'ü *B.melitensis* olarak saptanmıştır. Mert'in, 1984 yılında Ankara'da yaptığı çalışmasında beyaz peynirlerde %19,3 oranında *Brucella* spp. belirlenirken, bunların %10'u *B. abortus*, %90'ı ise *B. melitensis* olarak tespit edilmiştir.

Dünya'da ise peynir örneklerinde çok sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir. Tüm çalışmalar incelendiğinde peynirlerde pozitif çıkma oranı (%7.5-%21.7) oldukça yüksektir (Kara ve ark. 2011 Abbas ve Talei, 2010; Miyashiro, ve ark. 2007; Tantillo ve ark., 2001; Acedo ve ark., 1997). Abbas ve Talei, (2010), Irak'ta 100 peynir numunesinde *Brucella* incelemesi yapmıştır. Sonuç olarak peynirlerden 3 tane *B. abortus* ve 5 tane de *B. melitensis* identifiye edilmiştir. Miyashiro ve ark. tarafından, 2007 yılında, Brezilya'da 192 peynir ile yapılan çalışmada, 37 (%19.27) numunede *Brucella* identifiye edilmiştir. Tantillo (2001) tarafından, İtalya'da PCR tekniği ile yapılan çalışmasında 46 taze peynir örneğinde %21.7 oranında *Brucella* spp. saptanmıştır. Acedo ve ark. 1997 yılında tarafından Meksika'da yapılan çalışmada 335 peynir numunesinden %7.5 *Brucella* spp. bulunmuştur.

Peynirden yüksek oranda *Brucella* saptanmış olmasının sebebi, yüksek düzeyde *Brucella* içeren sütlerin yeterli ısıl işlem uygulanmadan hammadde olarak kullanılmasından kaynaklanabilir. Ayrıca peynirin üretim prosesi, olgunlaşma süresi, örnekleme büyüklüğü ve yöntemi, izolasyon yöntemleri gibi birçok neden izolasyon oranı üzerinde etkili olabilmektedir.

Türkiye'de ve diğer ülkelerde kaymak ve tereyağ örnekleri ile çok az sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir ve tüm çalışmalar incelendiğinde, bu araştırmada olduğu gibi pozitif çıkma oranı oldukça (%0 -%1) düşüktür (Gulbaz ve Kamber, 2016; Abbas, ve Talei, 2010; Sarısayın ve Eroğlum, 1987). Gulbaz ve Kamber, tarafından 2016 yılında Kars'ta 50 tereyağ numunesinde *Brucella* spp. hiç saptanmamıştır. Abbas ve Talei'nin 2010 yılında yapılan çalışmasında ise Irak'ta 100 krema üzerinde *Brucella* incelemesi yapılmıştır. Sonuç olarak kremalardan 1 tane (%1) *B. abortus* identifiye edilmiştir. Sarısayın ve Eroğlum tarafından, 1987 yılında yapılan araştırmada, Marmara Bölgesi'nde topladıkları 260 adet tereyağ ve kaymak numunesinden hiçbirinde *Brucella* spp. tespit edilememiştir.

Eren tarafından, 2004 yılında, Afyon yöresinden yapılan çalışmada toplanan 100 adet çiğ süt ve 100 adet taze beyaz peynir, numunelerinden kültür yöntemleriyle *Brucella* türleri araştırılmıştır. Kültür yöntemiyle elde edilen süt numunelerinden 25 tanesinde *Brucella* türleri saptanmıştır. Bu 25 numuneden 5 tanesinin *B. abortus*, diğer 20

tanesinin ise *B. melitensis* olduğu sonucuna varılmıştır. Sütlerde yapılan Ring testinde 35 numunede pozitiflik bulunmuştur. Pozitif örneklerin 15 tanesi ineklerden alınan sütlerde, 20 tanesi de koyunlardan alınan sütlerdi. Yine sütlerde yapılan Whey-AT testi ile 15 örnekte pozitiflik bulunmuştur. Toplanan taze peynir örneklerinin ise yalnız 2'sinde *Brucella* spp. üretilmiştir.

5. SONUÇ

Araştırmanın yapıldığı İstanbul/Beylikdüzü ilçesinde numunelerin alınacağı semt pazarları ve marketleri dolaşarak ilgili yerler belirlenmiş ve 45 adet peynir, 25 adet süt, 15 adet tereyağı ve 15 adet kaymak olmak üzere toplamda yüz numune temin edilmiştir. Yüz tane numune içerisinde son olarak elde edilen bulgulara göre beş adet şüpheli numune T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilmiştir. Ancak bu şüpheli numunelerde *Brucella* varlığı tespit edilememiştir. İstanbul'da Beylikdüzü'nde satılan süt ve süt ürünlerinde *Brucella* bakterisine rastlanmamış olması sevindiricidir. Ancak tüm bunlara rağmen *Brucella*'nın her hâlükârda ciddi bir tehlike oluşturduğu gerçeğini değiştirmemektedir. Bu konuda İstanbul çapında daha fazla örnekle ve daha çok yerden numune alınarak daha geniş çapta araştırmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- (1) **Abbas, B.A., Talei, A.B.** (2010). Isolation, identification and biotyping of *Brucella spp.* from milk product at Basrah Province. *Basrah Journal of Veterinary Research.*, 9(1), 152-162.
- (2) **Abbas, B.A., Aldeewan A.B.** (2009). Occurrence and epidemiology of *Brucella spp.* in raw milk samples at Basrah Province. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 12, No 2, 136-142, Basrah University, Iraq.
- (3) **Abdelkareem, A. A., İkiz, S., Ak, S.** (2011). Trakya Yöresinde Yetiştirilen Sığırların Sütlerinden *Brucella* Türlerinin Varlığını Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırılmalı Olarak Araştırılması.Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- (4) **Acedo, E., Diaz, M.E., Leon, A.B.** (1997). Incidence of *Brucella spp.* in raw milk and fresh regional cheese. *Aliment*; 281: 57-60.
- (5) **Adıgüzel, A.** (2001). Erzuruma Bağlı Bazı Köylerden Toplanan Sütlerde *Brucella Abortus* Natikorlarının Araştırılması. Yüksek lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- (6) **Al-Jaboury, E. I., Abdullah, F. A.** (2018). Detection of *Brucella* species in apparently healthy cows and goats raw milk by PCR. *Basrah Journal of Veterinary Research.*, 17(1), 176-191.
- (7) **Al-Mariri, A.** (2015). Isolation of *Brucella melitensis* strains from Syrian bovine milk samples. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(1), 40-48.
- (8) **Altay, G.** (2008) Kültür pozitif 70 *Brucella* hastanesinin klinik ve laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının E-test yöntemi ile incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

- (9) **Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., Verger, J. M.** (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. 13-61, Institut National de la recherche Agronomique (INRA), Paris.
- (10) **Alton, G.G., Forsyth, J.R.L.** (1996). *Brucella*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8572/>. Erişim Tarihi:04.09.2020
- (11) **Aslan, S.** (2015). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Brucella* İzolatlarının Epidemiyolojik Özelliklerinin Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Tanalysis ve Pulsed Field Gel Elektrophoresis Yöntemleri İle Tesbiti.Doktora Tezi. TC. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü *Tıbbi Mikrobiyoloji*, Anabilim Dalı Adana.
- (12) **Ataş, M., Poyraz Ö., Alim A., Ataş A. ve Çelik A.** (2007). Sivas İl Merkezi'nde satışa sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin *brucella* bakterileri yönünden incelenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, Cilt 64, Say (2):9-14.
- (13) **Atay, E.,** (2018). *Brucelloz* ve Ekonomik Yüzü. *Halk Sağlığı Dergisi*, 3(3), 71-84.
- (14) **Aras, Z., Ateş M. ve Uçan U.** (2009). *Brucella* suşlarının identifikasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 25,1-2;51-59.
- (15) **Arasoğlu, T., Güllüce M., Özkan, H., Adıgüzel ,A. Şahin, F.** (2013). PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43:501-508. doi:10.3906/sag-1205-121.
- (16) **Alim, A., Tomul, Z.D.** (2005). Investigation of *Brucella* in the fresh cheese samples sold at the bazaars of district in Sivas Center, Turkey. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 39: 219-23.
- (17) **Altun, B., Besler, T. & Ünal S.** (2002). Ankara'da satılan sütlerin değerlendirilmesi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 11(2), 45-55.
- (18) **Altun, S. K., Yiğin, A., Gürbilek, S. E., Gürbüz, S., Demirci, M., Keskin, O., Tel, O. Y.** (2017). An Enzyme-linked immunosorbent assay

- for *Brucella* specific antibody and real-time PCR for detecting *Brucella* spp. in milk and cheese in Şanlıurfa, Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*, 37(1), 39-42.
- (19) **Ali, A.N.** (2014). Diagnosis of *Brucella* melitensis infection in goats milk by milk ring test and Polymerase chain reaction. *Magazin of Al-Kufa University for Biology*, 6(1): 2073-8854.
- (20) **Anonim 1.** Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2009). ‘*Brucelloz* İle Mücadele Yönetmeliği’. Sayı: 27189. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/04/20090403-6.htm>. Erişim Tarihi: 04.09.2020.
- (21) **Anonim 2.** *Brucelloz* İstatistik Verileri, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-brucelloz/istatistik>. Erişim Tarihi: 03.02.2020.
- (22) **Ashrafganjooyi, S.H., Saedadeli, N., Alamian, S., Khalili, M., Shirazi, Z.** (2017) Isolation and biotyping of *Brucella* spp. from sheep and goats’ raw milk in southeastern Iran. *Tropical Biomedicine*, 34(3): 507–511.
- (23) **Ayaz, Y.** (1986). Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde *Brucellosis* etmenlerinin araştırılması. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Enstitüsü Dergisi*, 5: 109-16.
- (24) **Budağcı, K.** (2003). Kayseri İlinde çiğ sütlerden yapılan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. aranması. Doktora tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul.
- (25) **Büyükcangaz, E., Şen, A., Kahya, S.** (2009). Isolation and biotyping of *Brucella Melitensis* from aborted sheep and goat fetuses. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33(4): 311-316.
- (26) **Cengiz, A.T., Dolapçı G.İ.** (1997). *Brucella*’ların özellikleri ve *Brucelloz*’da tanı yöntemleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 50(1), 41-46.
- (27) **Cengiz, M.**, (2007). *Brucelloz*: 76 Olgunun Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Şişli Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, İstanbul.

- (28) **Corbel, M.J., Banai, M., Genus, I.** (2005). *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Springer; vol. 2: pp. 370-86.
- (29) **Corbel, M.J.** (1989). Microbiology of the genus *Brucella*. In: Young EJ, Corbel MJ, ed. *Brucellosis: clinical and Laboratory Aspects*, Florida USA: Crc Pres Inc: 54-67.
- (30) **Dabanlıoğlu, B.** (2005). Erzincan İli ve Yöresinde *Brucelloz* Seroprevalansı ve Seropozitif Olguların Klinik Bulgularla İlişkisi. Doktora Tezi. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- (31) **Dubey, P., Patel, K.B., Patel, B.K., Chauhan, H.C., Chandel, B.S.Ç., Patel, S S., Rajgor, M.** (2017). Molecular detection of *Brucella* organism from milk and milk products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4),1086-1091.
- (32) **Dolapçı, İ.** (2016). Bakterilerde izolasyon, tanı ve identifikasyon yöntemleri, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD.
<https://dSPACE.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/41250/Bakterilerde%20izolasyon%20ve%20identifikasyon.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, Erişim Tarihi:04.09.2020.
- (33) **Erdoğu, S., Abay S., Aydın, F.** (2018). Çiğ süt ve peynirlerden *Brucella spp.* izolatların fenotipik ve moleküler yöntemler ile biyotiplendirilmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(2), 94-102.
- (34) **Eren, E.** (2004). Afyon bölgesinde toplanan süt ve peynir örneklerinden *Brucella* türlerinin saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- (35) **Erol, İ, Eyigör A., Ayaz, D., Soyutemiz, E., Çalıcıoğlu, M.** (2011). Gıda Güvenliğinin Temel Prensipleri. 2. Baskı. ISBN 978-975-06-1062-2 Anadolu Üniversitesi.
- (36) **Gulbaz, G., Kamber, U.** (2016). The detection of *Brucella* bacteria with PCR and bacteriological method in raw milk and some of the dairy products which are consumed in Kars. *Bulletin of University of*

- Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 73(1), 127-132.DOI:10.15835/buasvmcn-vm: 11820.
- (37) **Gulluce, M., Adıgüzel A., Algur Ö. F.** (2003). Erzurum bölgesinde temin edilen çeşitli peynir örneklerinde *Brucella* antijenlerinin ELISA ile saptanması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 33:356-360.
- (1) **Islam, S., Giuliano Garofolo, G., Sacchini, L., Dainty, A.C., Khatun, M., Sukumar Saha, S., Islam, A.** (2019). First isolation, identification and genetic characterization of *Brucella abortus* biovar 3 from dairy cattle in Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*, 5(4), 556-562. DOI: 10.1002/vms3.193
- (38) **Jamali, F., Emad, S., ve Mosadegh, A.** (2016). Prevalence of *Brucella* species in raw milk produced in the industrial and traditional production units in Yazed. *International Journal of Medical Laboratory*, 3(3), 191-197.
- (39) **Kara, R.** (2011). Geleneksel Bir Peynir: Afyon Tulum Peynirinin Karakterizasyonunu ve Deneysel Olarak İnokule Edilen *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* Suşlarının Üreme ve Canlı Kalma Yeteneklerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar. Article.
- (40) **Karadal, F., Ertaş Onmaz, N., Bağcı, C., Yıldırım Y., AL S., Abay S.** (2016). Niğde ilinde satışa sunulan koyun-keçi sütü ve peynirlerinde *Brucella melitensis* ve biyotiplerinin araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 13(2), 101-108.
- (41) **Kale, A.S.,** (2009). Burdur Yöresinde Tüketime Sunulan Taze Peynir ve Peynirlerde *Brucella spp.* varlığı.Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- (42) **Kenar, B. ve Altındış M.** (2001). Afyon bölgesi süt örneklerinde *Brucella* antikoru araştırması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 58 (3), S:87-92.
- (43) **Kenar, B.** (1990). Konya, Nevşehir ve Kayseri illerinde koyun ve sığır Brusellozisinin Sero-survey epidemiyolojik araştırılması. *Veterinarium*. 1: 34-37.
- (44) **Kalender, H., Celal, Ö., Arslan, N.** (2001). Taze tulum peynirlerinden izolasyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 31(3-4): 184-186.

- (45) **Kılıç, S., Çelebi, B., Bayram, Y., & Çitil, B.** (2013). *Francisella tularensis* antikorları ile *Brucella* çapraz reaksiyonlarının araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*; 70(2): 65-70.
- (46) **Lindahl-Rajala, E., Hoffman, T., Fretin, D., Godfroid, J., Sattorov, N., Boqvist, S. & Lundkvist, A.** (2019). Detection and characterization of *Brucella spp.* in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), 53-67. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005367>.
- (47) **Madkour, M.M.** Madkour Bruselloz. Springer-Verlag. Berlin 2001. Çev. Zeki Yumuk, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.
- (48) **Mugizi, D.R., Muradrasoli, S., Boqvist, S., Erume, J., Nasinyama, G.W., Waiswa, C., Mboowa, G., Klint, M., Magnusson, U.** (2015). İsolation and molecular characterization of *Brucella* isolates in cattle milk in Uganda. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International. Volume 2015, Article ID 720413. | <https://doi.org/10.1155/2015/720413>
- (49) **Mohamed, G.** (2015). Molecular Epidemiology of *Brucellosis* in Egypt, Diagnostic Procedures, Proteomics and Pathogenesis Studeies. Doctoral dissertation. Freien Universitat, Berlin.
- (50) **MacFaddin J. F.** (1985). Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williamsand Wilkins, Baltimore, Md.
- (51) **Mert, A.** (1984). Ankara Yöresinde Pazarlanan Taze Beyaz peynirlerde *Brucella*'ların Varlığı Üzerinde Araştırma. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- (52) **Miyashiro, S., Eliana Scarcelli, E., Piatti1, R.M., Campos1, F.R., Vialta, A., Keid, L.B., Dias, R.A., Genovez, M.E.** (2007). Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of b19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:17-22.
- (53) **Namin, A.S.,** (1990). İstanbul'da Bazı Semt Pazarlarına Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinde *Brucella* Bakterilerinin Aranması. Yüksek Lisans

Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı İstanbul.

- (54) **Öngör, H., Çetinkaya, H., Karahan, M.& Bulut, H.** (2006). Evaluation of immunomagnetic separation–polymerase chain reaction in direct detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from cheese samples. *Foodborne Pathogens and Disease*; 3: 245-50.
- (55) **Parlakgöl, D.** (1993). *Brucella* ve *Listeria* bakterilerini peynirden ayırabilmek için balıklı besiyerinin geliştirilmesi ve İstanbul'da satılan peynirlerde bu bakterilerin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 23(4) :239-43.
- (56) **Patır, B., Dinçoğlu, A.H.** (2001). Elazığ'da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde *Brucella spp.* varlığı üzerinde araştırmalar. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*; 15: 15-22.
- (57) **Plommet, M., Fensterbank, R., Vassal, L., Auclair, J., Mocquot, G., Vachot, J.C., Courault, M., Musset, D.** (1988). Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. *Le Lait*, INRA 68(2): 115-20.
- (58) **Saddique, A., Ali, S., Akhter, S., Khan, I., Neubauer, H., Melzer, F., Khan, A.U., Azam, A., & El-Adawy, H.** (2019). Acute febrile illness caused by *Brucella abortus* infection in humans in Pakistan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(21), 4071.
- (59) **Sancak, Y.C., Boynukara, B., Yardımcı, H.** (1993). Van otlu peynirlerinde *Brucella*'ların varlığı ve dayanma süresi üzerine bir araştırma. *Veterinarium*, 4: 1
- (60) **Sayı, O.** (2013). Sığır ve Koyun Abortlarından *Brucella spp.* İzolasyonunda Farklı Selektif Besiyerlerin Karşılaştırılması.Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- (61) **Sert, S., Kıvanç, M.** (1984). Erzurum piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kaliteleri üzerine bir araştırma. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(3-4): 79-89.
- (62) **Stackebrandt, E.; Murray, R.G.E.; Truper, H.G.** (1988). "*Proteobacteria* classis nov., a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the "Purple Bacteria and Their Relatives"". *International*

- Journal of Systematic Bacteriology*. 38 (3): 321–325.
doi:10.1099/00207713-38-3-321.
- (63) **Sarısayın, F. & Eroğlum, M.** (1987). Marmara ve Trakya bölgesinde üretilen tereyağ, krema (kaymak) ile bunlardan yapılan pasta ve dondurmanın insanlardaki *Brucella* infeksiyonu yönünden kontrolü. *Pendek Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsü Dergisi*, Ayrı baskı, cilt:x sayı:1.
- (64) **Taşçı, F.** (2004) Gıda Kaynaklı *Brucellosis* ve önemi. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23, 1-2-3: 137-142.
- (65) **Thakur, S. D., Vaid, R. K., Panda, A. K., & Saini, Y.** (2012). Marine mammal brucellosis: a new dimension to an old zoonosis. *Current Science*, 902-910.
- (66) **Türütoğlu, H., Mutluer B., Uysal Y.** (2003). Burdur Yöresinde toplanan sütlerin *Brucella* infeksiyonu yönünden araştırılması. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(4) ,1003-1009.
- (67) **Tantillo, G., Di Pinto, A., Vergara, A., Buonavoglia, C.** (2001). Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *Journal of Food Protection*, 64; 164-7.
- (68) **Tunçbilek, M.** (1984). Ankara Piyasasında Satılan Taze Peynirlerin *Brucellosis* Riski Yönünden Ğncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- (69) **Yıldırıcı, G.** (1993). İstanbul piyasasında satışa sunulan tulum peynirlerinde *Brucella* etkenlerinin mevcudiyeti üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, İstanbul Üniv Sağ Bil Ens, İstanbul 1993.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgileri

Ad-Soyad: Riham Mohamed Hamid MOHAMED

Doğum tarihi: 25.5.1977

Doğum yeri: Yemen

Adress: İstanbul-TÜRKİYE

E-Mail: rehammohammed.1977@gmail.com

Eğitim bilgileri

Üniversite (Lisans)

Tıp Doktorluk Lisans Diploması- Halep Üniversitesi- Suriye

Yüksek Lisans

İstanbul Aydın Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Güvenliği Anabilim Dalı