

**ANKARA İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE VE
BEYAZ PEYNİRLERDE BRUCELLA VARLIĞININ ELISA YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI VE BRUCELLA BAKTERİSİNİN KEFİRDE YAŞAM
SÜRESİNİN TAYİNİ**

Naile TAŞKIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2007
ANKARA**

Naile TAŞKIN tarafından hazırlanan ANKARA İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE VE BEYAZ PEYNİRLERDE *BRUCELLA* VARLIĞININ ELISA YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI VE *BRUCELLA* BAKTERİSİNİN KEFİRDE YAŞAM SÜRESİNİN TAYİNİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Güven Uraz
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: : Prof. Dr. Güven Uraz

Üye : Prof. Dr. Gülderen YENTÜR

Üye : Prof. Dr. Aysel Bayhan ÖKTEM

Tarih : 04/07/2007

Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Naile TAŞKIN

**ANKARA İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SOKAK SÜTLERİNDE VE
BEYAZ PEYNİRLERDE *BRUCELLA* VARLIĞININ ELISA YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI VE *BRUCELLA* BAKTERİSİNİN KEFİRDE YAŞAM
SÜRESİNİN TAYİNİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Naile TAŞKIN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Temmuz 2007

ÖZET

Bu araştırmada; ilk olarak 100 çiğ süt örneği ve 200 beyaz peynir örneği olmak üzere toplam 300 örnek ELISA yöntemiyle incelenmiştir. İncelenen 100 çiğ süt örneği; Ankara ili semt ve ilçelerindeki sokak sütçülerinden temin edilmiştir ve ELISA yöntemiyle *Brucella* Ig G Pozitifliği yönünden incelenmiştir. Buna göre 100 adet örneğin 16 (%16)'sı *Brucella spp.* yönünden pozitif bulunmuştur. İncelenen 200 beyaz peynir örneğinden; 100 tanesi Ankara'da bulunan değişik market ve semt pazarlarından, 50 tanesi Şırnak ilinden ve 50 tanesi ise Van ilinden temin edilerek ELISA yöntemiyle *Brucella* Ig G Pozitifliği yönünden incelenmiştir. Buna göre 200 adet örneğin hiçbirinde *Brucella* Ig G antikorları yönünden pozitiflik saptanamamıştır. Ayrıca bu araştırmada; *Brucella* bakterilerinin Kefirde canlı kalma süresi de araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda; *Brucella melitensis* 16M ve *Brucella abortus* 544suşlarından hazırlanan bakteriler kefir içerisindeki üç farklı bakteri yoğunluğunda ilk 0-24 saat aralığında canlılığını sürdürürken, 24 saatten itibaren üreyememektedir.

Bilim Kodu : 203.1.010
Anahtar Kelimeler : Kefir, *Brucella*, süt, peynir
Sayfa Adedi : 74
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Güven Uraz

**RESEARCHİNG *BRUCELLA* PRESENCE BY ELISA METHOD İN MİLK
AND CHEESE WHICH İS CONSUMED İN ANKARA TERRİTORY AND
OBTAINİNG LIFE-TİME OF *BRUCELLA* BACTERİA İN KEFİR
(M. Sc. Thesis)**

Naile TAŞKIN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
July 2007**

ABSTRACT

In this study, total 300 samples as 100 raw milk samples and 200 white cheese samples are investigated with Elisa Method. The first 100 raw milk samples are collected from milkman working in the streets of the Ankara's neighbourhoods and counties and investigated according to Brucella Ig G pozitive with ELISA method. According to test results, 16% of 100 samples is determined as positive. The other 200 white cheese samples are collected from different county's bazaars. 50 of them are collected from Şırnak, 50 of them are collected from Van and last 100 of them are collected from Ankara and investigated again according to Brucella Ig G pozitive with ELISA method. According to the results, no positive Brucella Ig G anticores are determined.

Also, in this study life time of bacterias in Kefir is investigated. According to this study's results, Brucella melitensis 16M and Brucella abortus 544 A bacterias exists with different bacteria intensities in the Kefir at the first 0-24 hours but after 24 hours, they can not be reproduced.

**Science Code : 203.1.010
Key Words : Kefir, Brucella, milk, cheese
Page Number : 74
Adviser : Prof. Dr. Güven Uraz**

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Hocam Prof. Dr. Güven URAZ'a, Refik Saydam Hıfzıssaha Araştırma Merkezinde çalışmama olanak sağlayan ve kıymetli tecrübelerinden yararlandığım Dr. Selçuk KILIÇ'a, araştırmada kullandığımız pastörize süt ve kefir örneklerinin teminini sağlayan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi bölümünden Salih ÖZCAN ve Nurten DOĞAN'a, ayrıca Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışmama olanak sağlayan Prof. Dr. Nedim SULTAN'a ve kıymetli tecrübelerinden yararlandığım Dr. Gülçin AKCA'ya ayrıca manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme ve nişanlım Güneş OYMAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.MATERYAL VE METOD.....	26
2.1. Süt Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Analize Hazırlanması.....	26
2.2. Süt Örneklerinin ELISA Yöntemiyle Çalışılması.....	27
2.3. Peynir Örneklerinin Toplanması, Taşınması ve Analize Hazırlanması.....	29
2.4. Peynir Örneklerinin ELISA Yöntemiyle Çalışılması.....	30
2.5. Kefir Örneklerinin Hazırlanması	32
2.6. Brucella Bakterilerinin Kefir'e İnokülasyon İçin Hazırlanması.....	33
2.7. Kontrol Grubu Kefir Örnekleriyle, Patojenli Kefir Örneklerinin SDA 'a Ekim Aşaması.....	36
2.8. Serum Dekstroz Agar'da Üreyen Bakteriler Arasında Brucella spp.'nin Varlığının Araştırılması.....	39
3.BULGULAR.....	42
3.1. Süt Örnekleriyle Yapılan ELISA Testi Sonuçları.....	42
3.2. Peynir Örnekleriyle Yapılan ELISA Testi Sonuçları.....	47

Sayfa

3.3. Brucella İnoküle Edilen Kefir Örneklerinde Brucella'nın Canlılık Süresinin Tespiti İçin Yapılan Çalışma Sonuçları.....	54
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	74

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Brucella genusundaki türler ve biovarların ayırıcı özellikleri.....	6
Çizelge 2.1. Serum Dekstroz (SDA)'lı besiyerinin hazırlanması.....	34
Çizelge 2.2. McFarland standart tüplerinin bulanıklık skalası.....	35
Çizelge 2.3. McFarland bulanıklık derecelerinde bulunan bakteri oranları.....	36
Çizelge 2.4. Kefir örneklerinde Brucella bakterilerinin canlılık süresinin belirlenmesi için yapılan işlem şeması.....	36
Çizelge 3.1. Toplanan çiğ süt örneklerinin Ig G pozitifliği yönünden değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 3.2. Süt örneklerinin Ig G pozitifliği sonuçları	44
Çizelge 3.3. İncelenen Beyaz peynir örneklerinin Ig G pozitifliği yönünden değerlendirilmesi.....	47
Çizelge 3.4. Beyaz peynir örneklerinin Brucella Ig G sonuçları (OD Değerleri).....	48
Çizelge 3.5. Süt ve Beyaz peynir örneklerinin ELISA testi sonuçlarının karşılaştırılması.....	53
Çizelge 3.6. Brucella inoküle edilen kefirlerden SDA' ekim sonrası 0-120 saat içerisinde Brucella spp.'lerin yaşama durumu.....	56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Çiğ süt örneklerinin toplandığı Ankara ili semtlerine göre dağılımları.....	27
Şekil 2.2. İl ve ilçelerden toplanan Beyaz peynir örneklerinin dağılımları.....	30
Şekil 2.3. <i>Brucella melitensis</i> 16 M suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluklarının 0-120 saat arasında SDA'a ekim aşaması.....	37
Şekil 2.4. <i>Brucella abortus</i> 544 suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluklarının 0-120 saat arasında SDA'a ekim aşaması.....	38
Şekil 2.5. <i>Brucella melitensis</i> 16 M suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluğunda SDA'a ekim sonrası <i>Brucella melitensis</i> 'in yaşam süresi.....	40
Şekil 2.6. <i>Brucella abortus</i> 544 A suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluğunda SDA'a ekim sonrası <i>Brucella melitensis</i> 'in yaşam süresi.....	41
Şekil 3.1. Toplanan çiğ süt örneklerinin Ig G pozitifliği açısından değerlendirilmesi.....	43
Şekil 3.2. Toplanan çiğ süt örneklerinin Ig G pozitiflik dağılımı.....	43
Şekil 3.3 Süt ve Beyaz peynir örneklerinin ELISA testi sonuçlarının karşılaştırılması.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

spp.

Species

G

Guanin

C

Sitozin

ark.

Arkadaşları

Kısaltmalar

Açıklama

LPS

Lipopolisakkarit

OMP

Dış membran proteinleri

CO₂

Karbondioksit

H₂S

Hidrojen Sülfür

SDA

Serum Dekstroz Agar

1.GİRİŞ

Bruselloz; *Brucella* cinsine ait mikroorganizmaların neden olduğu bulaşıcı, kronik ve subakut seyreden insan ve hayvanlarda gözlenen bir hastalıktır.

İlk olarak, Hippocrates tarafından yazılan *Epidemics*'de (M.Ö 450) Akdeniz ülkelerinde ve özellikle Yunanistan'da yaygın olarak gözlemlendiği, muntazam ve aralıklı ateş şeklinde seyreden bir hastalık olduğu belirtilmiştir [1].

1859 yılında bu hastalığın klinik özellikleri İngiliz Kraliyet kuvvetlerinde çalışan Morstan 'da görülmüştür [1].

Etmen ilk kez 1887 yılında David Bruce; ölen bir askerin dalağından izole etmiştir [2-4].

1895 yılında Profesör Bang; sığırlarda abort yapan etkenin küçük bir basil olduğunu gözlemlemiş ve buna *Bacillus abortus* adını vermiştir [1, 5].

1905 yılında Zammit; enfekte keçilerden izole etmiş ve keçi sütü ile enfekte insanların serumlarında spesifik antikorların varlığını gözlemlemiştir [5, 6].

1914 yılında Traum; ABD'de domuzların yavru atımına neden olan bakteriyi izole ederek buna *Bacterium abortus suis* ismini koymuştur [5, 6].

1920 yılında Mayer ve Schaw; abortus, suis ve melitensis gruplarını birleştirmişlerdir ve bu hastalığın ilk kez tespitini yapan bilim adamı David Bruce'un adına izafeten *Brucella*, yaptığı hastalığa da *bruselloz* adını vermişlerdir [5, 6].

Ülkemizde *Brucella* enfeksiyonu I.Dünya Savaşından beri bilinmektedir. Türkiye'deki çalışmalar 1915 yılında Kural ve Akalın tarafından bir hastada hastalığın tespiti için yaptıkları çalışmalarla başlamıştır [7].

1931 yılında Berke; *Brucella* enfeksiyonunu sığırlarda tespit etmiştir [6].

1944 yılında Köylüoğlu ve Aktan; Bandırma merinos çiftliğindeki koyunlardan tespit etmişlerdir [6].

1983 yılında İstanbuloğulları ve ark.; *B.canis* etmeni köpeklerde serolojik olarak belirlemişlerdir [6].

1988 yılında İzgür ve arkadaşları; Ankara’da at brucelosis prevelansının tespitine yönelik çalışmalar yapmışlardır [6].

Brucella’lar; küçük, 0,5–0,7µm eninde, 0,6–1,5µm boyunda hareketsiz, sporsuz, kirpiksiz kokobasillerdir. Kenarları hafif konveks ve uçları yuvarlaktır. Etkenler tek, çift, kısa zincir veya küçük kümeler halinde görülürler [8-10].

Küçük oldukları için moleküler hareketlerle yerlerinde titreşirler. Buna Braun hareket denir. Organizmadan yeni ayrılan S tipi kolonilerde ince bir kapsülün bulunduğu saptanır. Pasajlarda ve R koloni şekillerinde bu kapsül yapısı kaybolur [11-16].

Endospor ve flagella oluşturmazlar [8, 9, 17]. Aside dayanıklı değildirler. Ancak asit ve alkali ortamda bazik fuksin ile boyanırlar [9, 18, 19].

Brucella türleri 20–40 °C’de üreyebilmekle birlikte, en uygun üreme sıcaklıkları 37 °C’ dir. *Brucella*’ların üremeleri için optimum pH değeri 6,6- 7,4 ‘dür. Maksimum pH 8,7, minimum pH ise 5,8’ dir [20, 21].

Brucella türleri son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde Proteobacteria aleminde, Rhodospirilla sınıfında, Rhizobiales takımında, Brucellaceae ailesinde yer aldığı düşünülmektedir. *Brucella* cinsi içinde *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotome* ve *B.rangifer* olmak üzere yedi türü vardır.

Brucella türlerinin özellikleri aerobik, gram negatif, katalaz pozitif, üre pozitif ve oksidaz pozitifdir. Mac Conkey Agarda üreme özellikleri yoktur [20, 21].

Brucella bakterileri aerobiktir. Ancak *B.abortus* ve *B.ovis* ilk izolasyonları için %5–10 CO₂’ li ortama gereksinim duyarlar. Birkaç pasajdan sonra aerop koşullarda ürerler.

Brucella suşlarında oksidatif aktivitesi değişiklik gösterebilir [8, 9, 20, 22]. *Brucella* suşlarında proteolitik etki zayıftır. Sütte hafif alkali reaksiyon oluştururlar. İndol oluşturmazlar ve jelâtini eritmezler. Nitrat redüksiyon testi genellikle pozitifdir. Sülfür içeren aminoasitlerde H₂S üretim süresi ve miktarında farklılıklar gözlenir. *B.melitensis* en az süre yani 1günde ve en az miktarda, *B.abortus* orta süre yani 2 gün ve orta miktarda, *B.suis* en uzun süre yani 3–5 gün ve en fazla miktarda H₂S yaparlar [8, 13, 15, 16, 18, 20, 23].

Brucella suşlarının metabolizmaları oksitativdir [8, 9, 20, 22]. Karbonhidratlardan asit ve gaz yapmamakla birlikte glukozu az miktarda kullanırlar. *B.abortus* ve *B.ovis* biovar 2, 3, 4 suşlarında serum yokluğunda çok zayıf ürerler [8, 20].

Brucella türlerinin çoğunluğu hücre içi parazitidir. İlk izolasyonların da vitamin ve aminoasitte ihtiyaç duyarlar. Bazı suşlar nitrojen kaynağı içeren ortamlarda da gelişebilmektedir.

B. abortus’ a ait suşların gelişimi için eritrolun bulunması zorunludur. *B.abortus*’ a ait suşlar enerji kaynağı olarak glukozu kullanırlar. *Brucella* bakterileri gelişmiş bir solunum sistemine sahiptirler. Solunum sistemi yapısında flavoprotein ve inhibitörlere duyarlı sitokrom a₁, a₂, b, c ve O bulunur [8, 9, 20, 22]. *Brucella* bakterileri ekzotoksin oluşturmazlar [9].

Besi yerlerine belli oranlarda bazik fuksin, pironin, metil viyole ve tiyonin gibi boyalar konulabilir. Bu boyalar karşısında *B.abortus* yalnız tiyonin tarafından inhibe olur, *B.melitensis* inhibasyona uğramadan ürer, *B.suis* tiyonin dışındaki diğer boyalar

tarafından inhibe edilir ancak tiyoninden etkilenmeyerek üremeye devam eder [13, 15, 23, 24].

Brucella türleri için genellikle katı besi yerleri tercih edilir. Katı besi yerleri koloni oluşumunu sağladığı gibi form bozukluğunu da sınırlar [8, 9].

Periton, kan ve pleura boşluklarındaki sıvı materyalin kültürü için sıvı besi yeri kullanılır. *Brucella* türleri besi yerlerinde yavaş ürerler, üremeleri güçlük gösterir. Üremeleri için serum ve kan ile zenginleştirilmiş peptonlu ortam kullanılabilir. Özellikle gliserin, glukoz, serum konmuş besi yerleri ve yumurtalı besi yerin de ürerler. *Brucella* agar, karaciğer infüzyon agar, serum dekstrozo agar, albumin agar, beyin-kalp infüzyon besi yeri, tryptose soy agar, potato infüzyon agar ve tryptose agar üretilmeleri için kullanılabilecek besi yerleridir. Besi yerlerine nikotik asit, biotin, aminoasitler, tiamin, magnezyum, eritritol ve pantotenik asit eklenmesi üremeyi olumlu yönde etkiler [11, 13, 15, 16, 23, 25].

Katı besi yerinde 37 °C’de 2 günlük gelişmeden sonra *Brucella* suşları 0,5–10 mm büyüklüğünde smooth koloniler oluşturur. Smooth koloniler S tipinde, yuvarlak, düzgün kenarlı, kabarık, açık sarı ve ışık altında parlayan bir yüzeye sahiptir. Yaklaşık 2–4 gün içerisinde ürerler. Üreyenlerden yapılan pasajlar sonunda R formunda rough koloniler oluşur. Rough koloniler granüllü, mat ve daha büyük çaptadır. Açıkladığımız bu iki S (smooth) ve R (rough) formlarından başka, mukoid (M) ve intermedier (I) özellik gösteren koloni çeşitleri de vardır. Ayrıca *Brucella* türlerinin kimyasal maddelerden ve antibiyotiklerden etkilenmeleriyle L formlarında oluşur [11, 13, 15, 23, 25].

Brucella türlerinin identifikasyonlarında; H₂S oluşumu, Basic fuchsin’li ve Thionin’li besi yerlerinde üreyebilme özellikleri, üreaz pozitifliği, boya duyarlılığı, üremede CO₂ ihtiyacı ve monospesifik antiserumlarla aglutinasyon özelliklerinden yararlanılır. Ayrıca Weybridge (Wb), Tbilisi (Tb), Berkeley (Bk2) ve Firenze (Fi) fajlarından yararlanılarak duyarlılıklarına göre tiplendirilir [20, 26].

İdentifikasyonda ilk olarak kültür, metobolik, serolojik ve morfolojik özellikler incelenir. Ardından identifikasyonu doğrulamak amacıyla; fenol-asetik asit-suda çözünen proteinlerin elektroforetik ayırım patternleri, DNA nükleotid dizisi, DNA pürin-pirimidin baz içeriği, sitokrom a ve c bandlarının absorbsiyonu ve Brucella referans suşlarıyla ortak intrasellüler antijenlerin varlığının gösterilmesiyle olmaktadır (Çizelge 1.1) [16, 27, 28].

Brucella hücre duvarı lipopolisakkarit-protein tabakası ile sarılmış vaziyettedir. Polisakkarit zincirleri açıktadır. Lipit bileşikleri peptidoglikan tabakasına yakındır [8, 9, 108].

Çizelge 1.1. *Bruceella* genusundaki türler ve biovarların ayıncı özellikleri

Türler	Biovar	Rezervuar	Monospesifik antiserumlarla aglütinasyon			Fajlarla Lizis(RTD'da)				CO2 ihtiyacı	H2S Oluşumu	Basic fuchsın 20mg/ml	Thionin 20mg/ml	İnsanlar patojenitesi	için
			A	M	R	Tb	WB	Bk2	F1						
B.abortus	1	Siğir	p	n	n	L	L	L	L	(p)	n	p	n	p	
	2	Siğir	p	n	n	L	L	L	L	(p)	n	n	n	p	
	3	Siğir	p	n	n	L	L	L	L	(p)	n	p	p	p	
	4	Siğir	n	p	n	L	L	L	L	(p)	n	(p)	n	p	
	5	Siğir	n	p	n	L	L	L	L	n	n	p	p	p	
	6	Siğir	p	n	n	L	L	L	L	n	n	p	p	p	
	7	Siğir	p	p	n	L	L	L	L	n	n	p	p	p	
	8	Siğir	n	p	n	L	L	L	L	p	n	p	p	p	
	9	Siğir	n	p	n	L	L	L	L	n	n	p	p	p	
B.melitensis	1	Koyun, keçi	n	p	n	NL	NL	L	NL	n	n	p	p	p	
	2	Koyun, keçi	p	n	n	NL	NL	L	NL	n	n	p	p	p	
	3	Koyun, keçi	p	p	n	NL	NL	L	NL	n	n	p	p	p	
	1	Domuz	p	n	n	NL	L	L	PL	n	n	(n)	p	p	
	2	Domuz	p	n	n	NL	L	L	PL	n	n	n	p	Rapor edilmemiş	
	3	Domuz	p	n	n	NL	L	L	PL	n	n	p	p	p	
	4	Ren geyikler	p	p	n	NL	L	L	L	n	n	(n)	p	p	
	5	Sıçan, kemiriciler	n	p	n	NL	L	L	PL	n	n	n	p	p	
N.neotomae		Neotoma lepida	p	n	n	PL	L	L	L	n	n	n	n	Rapor edilmemiş	
B.ovis		Koç	n	n	n	NL	NL	NL	NL	p	n	(n)	p	Rapor edilmemiş	
B.canis		Köpek	n	n	n	NL	NL	NL	NL	n	n	n	p	p	

(p)= genellikle pozitif, n=Tüm türler negatif, (n)= genellikle negatif, p= tüm türler pozitif
 RTD= Rutin test dilüsyonu, Tb= T bilisi, WB= Veybridge, Bk2= Berkeley, F1= Firenze
 L= lizis, PL= parsiyellizis, NL= lizis olmayanlar

Hücre membranı genel lipoprotein membran içindedir. Vakuoller ve polisakkarit granüller sitoplâzma içinde dağınık bir konumdadır. Sitoplâzmanın osmiofobik bölgesindeki osmofilik filamentler arasında nükleoproteinler yer alır [8, 9, 20, 29].

Brucella bakterilerinin hücre duvarları muromik asit, mukopeptid, alanin, glutomik asit, glikosamin ve O-diaminopimelik içeren bir peptidoglikandır. *Brucella* dış membranı fosfotidilethanolamine 'e göre fosfotidilkolin yönüyle daha zengindir. Bu sayede LPS ile birlikte antibiyotiklere bağlanır. Polimixin B 'ye direncin bu şekilde olduğu düşünülmektedir [20, 30, 31].

Brucella bakterileri; ultrasonikasyon, fiziksel yöntemler ve dondurup çözme yöntemleriyle parçalanırsa konvansiyonel immün elektroforezde hiperimmün serumlara karşı 20 antijen eriyebilen özellikte elde edilir. Birçok *Brucella* antijeninin tüm suşlarda ortak olarak bulunduğu, ancak somatik LPS antijenlerinin smooth ve non smooth suşlar arasında önemli farklılıklar gösterdiği, dış membran proteinlerinin (OMP) ise, farklı türlerde değişik yapılarda olduğu belirlenmiştir. *Brucella* suşlarında bulunan en önemli antijenler; S ve R lipopolisakkarit kompleksleri, nativ hapten polisakkarit ve B polisakkarit ve en az 20 kadar protein ve glikoprotein antijenlerini içermektedir. LPS antijenleri hücre yüzeyinde, protein antijenleri hücre içinde yer alırlar [20, 32].

S kolonilerinin R koloni haline geçmesi durumunda antijenik yapılarında değişiklikler gözlenir. R kolonileri antijenik bir yapıda değildir. Brucelloz geçiren organizmaların yapısında çok sayıda antikor çeşitleri gözlenmiştir. Ayrıca Coombs testle açığa çıkarılabilen bloke edici antikorlarda mevcuttur [20, 33].

Brucella türleri antijenik olarak ortak komponentlere sahiptir. Bu ortak antijenik faktörler değişik *Brucella* suşları arasında farklıdır. *Brucella*'larda yüzeysel olarak yerleşen 2 antijenin (A ve M) oranının birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. *B.melitensis*'te bu oran A/M 1/20, *B.abortus*' ta bu oran A/M 20/1 ve *B.suis*'te ise bu oran yine A/M 20/1 olarak tespit edilmiştir.

B.melitensis de M antijeni fazla oranda bulunmaktadır. *B.abortus* ve *B.suis* de A antijeni M antijeni ile aynı oranda olmasına rağmen M antijeni düşük düzeyde bulunur [20, 30, 34, 35].

S Brucella LPS'leri sıcak fenol-su metoduyla fenol fazında ekstre edilerek ayrıştırılabilir. R Brucella LPS'leri ise sıcak fenol-su yönteminde su fazında bulunmaktadır [20].

Brucella'ya maruz kalmış derin kontaminasyonunu engellemede iodoformlar, etanol, sulandırılmış hipoklorid ve isopropil etkilidir [20, 33].

Brucella türlerinin yapısında plazmid bulunmamaktadır. Kromozomal genler sayesinde patojenite belirlenmektedir [8, 20].

Brucella türleri yüksek derecede birbirine yakınlık gösterir ve türler arasında çok az farklılıklar mevcuttur. DNA kompozisyonunun ağırlığı %56–58 G+C arasında seyreder [20, 33].

DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları ile bütün suşlar arasında 96 ± 4 DNA ilişkisi gösterilmiştir. Bütün suşlar DNA'ları kullanılan teknikler neticesinde tam bir homologdur [30, 36-39].

Brucella türlerinin diğer bakteri grupları ile olan akrabalıkları DNA-ribozomal RNA hibridizasyon çalışmaları yapılarak tanımlanmıştır. DNA homoloji çalışmaları sonucunda Brucella genusunun üyeleri ile guanin ve sitozin sahip diğer mikroorganizmalar ve fenotipik olarak benzer türler arasında homoloji göstermediği saptanmıştır. Son yıllarda faj izolatlarının çoğunluğu elde edilmiştir. Sonradan doğal S Brucella türleri litik özelliğe sahip olmuşlardır. Non smooth Brucella suşlarının litik bir faj suşu bulunmamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar neticesinde Brucella kültürlerinin R ve S suşları için litik fajların büyük bir kısmı farklı konakçı suşlarındaki fajlardan pasajlar neticesinde elde edilmiştir [8, 20].

Brucella kültürlerin özelliklerinde genetik olarak belirlenmiş çeşitleri sık olarak görülebilmektedir. Bu çeşitlilikler, CO₂ ihtiyacının kaybı, S koloni formundan R koloni formuna kadar olan değişimler, fajlar tarafından lizise bağlı duyarlılıklarındaki değişimler, H₂S yapımının kaybı ve antibiyotiklere ve boyalara göre dirençlerini kapsamaktadır [15, 16, 20, 28, 40, 41].

Brucella'lar dezenfektan ve ısıya karşı dayanıksızdırlar ayrıca antibiyotiklere duyarlıdırlar. Karanlık yerlerde, uterus akıntılarında ve sütte uzun süre yaşayabilirler. Pastörizasyon ısısında 15 dakikada ölürler. 60 °C'de 10 dakika canlı kalırlar. Suda 35 gün, toprakta 70 gün yaşarlar. Buzlukta 3-6 ay arasında canlı kalırlar. Etkenler % 0,1 süblimede birkaç dakika, % 2 formalinde 15 dakikada ve % 0,1 lizol içinde yine 15 dakikada ölürler, sütte haftalarca, Beyaz peynirde 2,5-3 ay, tereyağında 4 ay, soğutulmuş etlerde 14 gün, idrarda 30 gün, fötusda 75 gün, enfekte çiğ süttten yapılmış dondurmada 30 gün, % 10 tuz içeren salamura peynirde 45 gün, % 17 tuz içeren salamura peynirde 1 ay, nemli toprakta 60 gün, musluk suyunda 4-8 °C'de birkaç ay ve donmuş doku ve ortamlarda birkaç yıl yaşarlar [3, 8, 20, 30, 42, 43].

Dünya genelinde halk sağlığı açısından en önemli zoonozlardan biri *Brucelloz*' dur. Bu hastalık her yıl binlerce insanın sağlığını etkileyerek, iş gücü kaybına ve fizik yetersizliğine sebep olur. Hayvanlarda ise hastalık yavru atmaya, infertiliteye, genital organ enfeksiyonlarına ve süt veriminin azalmasına neden olarak büyük bir ekonomik kayba yol açar [20, 33].

Brucelloz primer olarak bir hayvan hastalığıdır ve insanda bu hastalık enfekte hayvanlarda doğrudan ya da dolaylı olarak temas ile ortaya çıkar. İnsanda *Brucelloz*'un epidemiyolojisi, enfeksiyonun hayvanlarda yayılışı ile doğrudan orantılıdır. İnsan enfeksiyonu başlıca olarak direkt temasla, solunum yoluyla ve sindirim yoluyla alırlar. Sindirim yoluyla enfeksiyon oluşumundan, enfekte süt ve süt ürünleri tutulmaktadır. *Brucelloz* görülmesi hayvanların hareketleri ve hayvanların doğum dönemleriyle birebir ilişkilidir. *Brucella spp*'ler meme, uterus ve gebe hayvanların buzağılarında yüksek düzeyde bulunurlar. *Brucella* enfeksiyonları

mevsimsel değişiklikler gösterirler. Sonbahar ve kış aylarında daha seyrek görülürken, ilkbahar ve yaz aylarında daha sık görülürler [44, 45].

İnsan Brucellozuna neden olan dört türü vardır. Bunlar *B.melitensis*, *B.abortus*, *B. suis* ve *B.canis*' dir. *B.abortus* en çok sığır, sonra domuz, keçi ve koyunlarda, *B. melitensis* en çok keçi, koyun ve sonra sığır ve domuzlarda, *B.suis*' in ise daha çok domuz ve sonra sığır ve at gibi hayvanlarda enfeksiyon yaptıkları bilinmektedir [13, 16, 27, 46].

Brucella türleri içinde *B.abortus* enfeksiyonları büyükbaş hayvancılıkla ilişkili olması nedeniyle hemen hemen dünyanın her yerinde görülmektedir. *B.melitensis* enfeksiyonları küçükbaş hayvancılığın yaygın olarak yapıldığı Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. *B.suis* ABD, Rusya ve Latin Amerika'da, *B.canis* ise Amerika, Avrupa'da ve Uzak Doğu'da az sayıda vakada görüldüğü rapor edilmiştir. [20, 47].

Brucella türleri içinde *B.abortus*, daha geniş coğrafi bölgede enfeksiyonlara sebep olduğu halde; *B.melitensis* insan Brucellozun en önemli sebebidir. Bu konuyla ilgili çok sayıda vaka tespit edilmiştir [20].

Brucelloz ile mücadele konusunda dünya genelinde çalışmalar yapılmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde *B.melitensis*' in sebep olduğu brucelloz halen yaygın bir şekilde devam etmektedir. Akdeniz ülkelerinde bu enfeksiyon birçok hastalık arasında en ön sıralarda yer almaktadır.

Türkiye'de yapılan çalışmalar sonucunda Brucellozun insanlar ve hayvanlar arasında yaygın olduğu bilinmektedir.1970-1980 yılları arasında 909 vaka, 1981-1990 yılları arasında 17.920 vaka ve 1991-1995 yılları arasında 34.217 vaka bildirilmiştir. TÜBİTAK'ın 1987 yılında tamamladığı projesinde toplumun çeşitli kesimlerinde alınan toplam 70.009 örnek incelenmiş, normal popülasyon da Brucella seropozitiflik oranı % 1,8 bulunmuştur. Bu oran risk gruplarında % 6' ya yükselmektedir. Ülkemizde vakaların çoğu *B.melitensis*' e bağlıdır.

Brucelloz insanlarda her yaş ve cinstе görölmektedir. Özellikle hayvanlarda sürekli temas içerisinde olan gruplarda Brucelloz hastalığına daha sık rastlanılmaktadır. Brucelloza yakalanma açısından riskli meslek grupları hayvan yetiştiricileri, veteriner hekimler, mezbaha işçileri, et sanayisinde çalışanlar ve araştırma laboratuvarında çalışan elemanlardır [6, 15, 48, 49]. *Brucella spp.* 4 farklı yolla bulaşır;

Solunum yolu ile bulaşma: Enfekte aerosollerin solunum yoluyla alınması sonucu bulaşma görölebilir. Genellikle laboratuvar çalışanları arasında görölen en yaygın bulaşma yoludur. Ayrıca hayvan bakıcıları, çiftçiler, çobanlar, kasaplar ve veteriner hekimlerde de solunum yoluyla bulaşma tehlikesi vardır [1, 12, 20].

Solunum yoluyla alınan minimum enfektif doz *B.abortus* ve *B.suis* için 100 mikroorganizmadan daha azdır, *B.melitensis* için 1300 mikroorganizmadır [50].

Konjunktiva yolu ile bulaşma: Canlı *Brucella* aşısının kazayla konjunktivaya sıçraması veya enfekte sıvıların ve kanların konjunktiva sonucu ile bulaşma gözlenebilir [15, 20, 51].

Sindirim yolu ile bulaşma: Taze ve pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi, et ve karaciğer gibi hayvansal gıdaların çiğ yada az pişmiş olarak tüketilmesi ile enfeksiyon oral yol ile bulaşabilir [15, 16, 20, 27].

B.melitensis 'in oral yolla etki gösterdiği enfektif dozu yaklaşık olarak 5×10^3 mikroorganizma, *B.suis* ve *B.abortus* için bu değerler yaklaşık olarak 10^6 - 10^7 mikroorganizmadır [50].

Cilt ve mukoza yolu ile bulaşma: Enfekte hayvanın idrar gibi salgıları, genital akıntıları ve düşük materyalinin hasarlı cilt ve mukoza ile teması ile bulaşma gözlenebilir [15, 16, 20].

Brucella'lar fakültatif intrasellöler patojenlerdir. Fagositik hücreler içinde canlı kalabilir ve çoğalmaya devam edebilirler. *Brucella* suşlarının hücre içinde yaşama

mekanizmaları çok ilgi çekicidir. Lipopolisakkaritler hücrede özel fagositik etki ile parazit haline dönüştürülür ve hücre içinde oksidatif yaşamayı önleyen bir faktör görevi görür. Yapılan sonraki çalışmalar neticesinde düşük moleküler ağırlıklı birleşenlerin bu tarz etkileri olabildiği görülmüştür. Ayrıca *B.abortus* ile ilişkili olarak da adenin ve guanin monofosfatın buna dahil edildiği kanıtlanmıştır, yüksek moleküler ağırlıklı birleşenlerin hücre içi yaşam sürdürüp sürdürmediği ise daha kanıtlanmamıştır [8, 18, 19].

Smooth tarzda ki kolonilerden elde edilen LPS antijenleri *Brucella* için virulans faktörleri olarak önemli rol oynamaktadır [8, 18, 19]. Yani *Brucella*nın major virulan etkisi azdır ve insan serumu ile öldürülmeye daha hassastır. Sığırlarda etkenin uterusu yerleşmesinde fetal dokularca eritritolin etkisi fazladır. Eritritol bir karbonhidrattır. Diğer hayvanlarda bu substratın sentezi oldukça azdır. Genel olarak *B.canis* ve *B.abortus*'a göre insanlar için *B.melitensis* ve *B.suis* daha virulandır [16, 52].

Brucelloz etkenleri konakçıya girdiklerinde fagosit edilmelerine rağmen hücre içinde canlılıklarını sürdürürler. Hücrelerin hücre içi myeloperoksidaz peroksit savunma mekanizmasını inaktive ederler [8, 19, 47].

Mikroorganizmalar vücuda girdikten sonra kan dolaşımı yoluyla lenf yumrularına taşınırlar. *Brucella* türleri toksin üretmezler. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritlerle enfeksiyonların patoloji ve septomlarına katkıda bulunurlar. Humoral antikorlar üretilir. Ancak hücresel bağışıklık savunma mekanizmaları hücre içi etkene gereksinim duyar. Hastalığın gelişimi enfeksiyonu oluşturan mikroorganizma türlerine, konakçı bağışıklık durumuna ve başka hastalıkların konakçıda bulunup bulunmaması gibi birçok etmene bağlıdır [12, 19, 47].

Brucella enfeksiyonunda yaklaşık üç hafta inkübasyon sürecinden sonra, septomlar aniden veya sonrasında ortaya çıkabilir. Bazen bu süreç bir haftadan üç aya kadar sürebilir. Brucelloz hastalığını klinik belirtileri diğer enfeksiyonlara benzemesi yönünden teşhisi zordur. Genelde ateş, titreme, gece terlemesi, halsizlik, yorgunluk,

kas ve eklem ağrıları ve şiddetli baş ağrısı gibi septomlar gözlenir. Ayrıca dalak, karaciğer büyümesi ve lenfaderopati de gözlenebilir. *Brucella* enfeksiyonlarının septomları kronik seyirli ya da uzun bir süreçte artan ve azalan bir seyir izler. Akut ve kronik Brucelloz komplikasyonları hastaların bazılarında birçok organ sistemini etkiler [8, 9].

Kardiyovasküler sistemde; bakteriyel emboli, endokarditis, Deri sisteminde; kronik ürtikerler, lekeler, Merkezi sinir sisteminde; beyin apseleri, İskelet sisteminde; spondilitis, artrit, osteomyelitis, Genito-üriner sistemde; granülomatöz, Akciğere ait sistemde; etkenlerin vücuda alınmasından sonra kemik iliği, dalak ve lenf nodüllerinde de yayılma göstererek anemi, trombositopeni ve leukopeni oluşturabilirler [53].

Sığırlar da görülen başlıca klinik bulgular ise kısırılık, yavru atma, mastitis ve orşitistir [9, 19]. Gebe hayvanlarda *Brucella spp*'ler plesanta da korioallontoik membrana yerleşerek abortlara sebep olur.

Brucelloz hastalığının kuluçka süresi 6–20 gün arasındadır. Hastalığın inkübasyon süresi mikroorganizmanın virulansına, giriş yoluna ve mikroorganizma sayısına göre değişiklik gösterir. *B.canis* ve *B.abortus* ile oluşan enfeksiyonlarda klinik tablo daha hafif olup ciddi komplikasyonlar daha az gözlenir. *B.melitensis* ile olan enfeksiyonlarda kronikleşme çok daha yüksektir. Hastalığın birbirinden farklı 4 klinik tablosu vardır [42, 54].

Aseptomatik enfeksiyon: Serolojik taramalar neticesinde ortaya çıkar. Klinik olarak belirgin değildir. Subklinik olguların klinik olgulara oranı *B.abortus*'da 8/1 iken, *B.melitensis*'de 1/1'in altındadır [42, 54].

Akut enfeksiyon: Hastalığın en tipik formudur. En sık rastlanan semptomlar; ateş, titreme, terleme, halsizlik, vücutta yaygın ağrılar ve iştahsızlıktır. Akşam saatlerinde üşüme ve titreme ile birlikte yüksek ateş belirtileri gözlenmeye başlar. Her gün birkaç derece artarak 8-10 günde 39-40 °C' ye ulaşır. Birkaç saat süren ateş sonunda

sabaha doğru terlemeyle son bulur. Tedavi sürecine başlanmamışsa ateş her gün kademe kademe düşer. İki hafta sonunda ateş normale iner. Hastada geçici bir iyilik hali gözlenir. 8–10 gün sonra aynı belirtiler tekrar gözlenmeye başlar. Hastalık ateşli-ateşsiz dönemler halinde sürer gider. Yetişkin hastaların % 80’inde büyük eklemlerde gezici ağrılar, bel sırt ağrısı şikâyetleri görülür. Ağrılar tedaviye başlanmazsa şiddetlenir [12, 55-57].

Subakut infeksiyon: Semptomların başlamasından itibaren 8 haftaya kadar olan olgular akut, 8–52 hafta arası olgular subakut olarak kabul edilir. Grip olduğu sanılan bir klinik tablodur. Subakut formda vakaların % 90’ında ilk 6 ayda daha çok olmak üzere, bir yıl içinde spontan iyileşme gözlenir [54].

Kronik infeksiyon: Brucelloz geçiren bazı hastalarda hastalığın semptomları başlangıçta sinsi olabilir. Akut ve kronik formları ayırt etmek zorlaşır. Şikâyetler teşhisten sonra bir yılı aşkın süredir devam ediyorsa kronik Brucelloz olarak tanımlanır. Bazı hastalarda kronik yorgunluk, depresyon ve eklem ağrıları gözlenir. Kronikleşme 40 yaşın altındakilerde daha sık olup, çocuklarda çok nadirdir [18, 54, 58].

Brucelloz tanısı, klinik ve laboratuvar bulgularının birlikte değerlendirilmesine dayanır. Brucelloz da klinik bulgularıyla ve otopsi bulgularıyla kesin tanı koyulmaz. Kesin tanı için bakteriyolojik ve serolojik testlere başvurulur.

Bakteriyoskopi

Kan, irin, uterus akıntısı, organ parçaları, plasenta, kotiledon ve fötüs mide içeriği gibi materyallerden hazırlanan preparatlar Köster ve Ziehl-Noelsan yöntemleri ile boyanarak muayene yapılır. Köster boyama ile boyanan preparatlarda *Brucella* bakterileri mavi renk içinde portakal renginde gözlenir. Ziehl-Noelsan ile boyanan preparatlarda ise; maviye boyanmış doku hücreleri içinde kırmızı renkte gözlenir. *Brucella* etkenlerini tanımada ayrıca Stemp ve Gram boyamalarından faydalanılır [56, 59- 61]

Kültür

Brucella' ların üretilmesi için katı, sıvı ve seçici besi yerleri kullanılır. Seçici besi yerlerinin içine etil violet, basitrasin, sikloheksimid, ve polimiksin B gibi çeşitli inhibitörlerin katılmasıyla selektif besi yerleri yapılır. Bu besi yerlerinde bazıları; Potato agar, Serum Dextrose Agar, Glycerol-dextrose agar ve Farrell's medium gibi besi yerleridir. Ekimler çift yapılarak birisi aerop ortamda, diğeri %5-10 CO₂ 'li ortamlarda üretilir. Üreyen koloniler boya testleri, kültürel, morfolojik, biyokimyasal, hayvan inokülasyonu ve serolojik olarak muayene edilerek identifiye edilir [11, 13, 15, 16, 20, 60].

Hayvan Deneyi

Süt ve idrar gibi kontamine materyal kas içi veya subkutan yolla ve şüpheli kültürler ve kontaminasyon ihtimali olan marazi maddeler intraperitoneal olarak kobaylara verilir. Sonuçlar bakteriyolojik ve serolojik olarak değerlendirilir.

Serolojik Testler

Brucelloz'un laboratuvar tanısında serolojik testler çok önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu testler, her hastanın özgül antikor durumunu göstermektedir. Serolojik testlerden sadece bir tanesi ile tanı yapmak imkânsız olduğu için, en az iki testin yapılması zorunludur. Bakteriyolojik tanıda etken izolasyonunun uzun sürmesi ve kronik olgularda genellikle olumsuz sonuçlar alınmasından dolayı serolojik testler daha çok tercih edilmektedir. Bu testlerin duyarlılık oranları % 65–95 civarındadır [10, 62]. Serolojik testler;

Serum Aglütinasyon Testi (SAT) yani (Standart Tüp Aglütinasyon Testi veya Wright Aglütinasyon Testi)

Brucellozun serolojik olarak tanısında eskiden beri kullanılan testlerden biridir. Günümüzde de halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Testin uygulanması oldukça basittir. Bu testte; seruma fizyolojik su ile iki katlı dilüsyon yapılır ve standart *Brucella* aglütinasyon antijeni eklenir. 37 °C’ de 48 saat inkübasyona bırakılır. Aglütinasyonun tüpün dibinde toplanması ve tüpteki sıvının berrak olması testin pozitif olduğunu gösterir. Bu teste kullanılan antijenler *B.abortus 119*, *B.suis*’ in S formu ve *B.melitensis*’ in S formudur. Serum Aglütinasyon Testi ile bakterinin yüzeyinde bulunan antijenlerle ya da yüzeyine yakın bulunan antijenlerle reaksiyona giren antikorların total miktarını ölçer. SAT’da; Ig M’ lerin, Ig A ve Ig G₁ ve Ig G₂ ’lerden daha yüksek reaksiyon verdiği, bu yüzden akut olguların teşhisinde kronik olgulara göre daha başarılı olunduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. SAT’da şüpheli titre görülen serumlar diğer serolojik testlerle de incelenmelidir [13, 16, 23, 52, 63].

Coombs Testi

Aglütinasyon blokajının ortaya çıkmasında kullanılan en iyi testtir. Aglütinasyon blokajı; antikorlar antijenlere bağlandıkları halde aglütinasyon reaksiyonu oluşturmamasını engelleyen bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Bu teste; SAT’ da aglütinasyon görülmeyen tüpler; tuzlu su ile üç kez yıkayıp yeniden süspansiyon yapıldıktan sonra her tüpe birer damla Coombs serumu damlatılır. 37 °C’ de 24 saat bekletilir. Sonra sonuçlar değerlendirilir. Coombs testi; özellikle negatif sonuç alınan ve düşük titrede antikor içeren kronik olguların belirlenmesinde önemlidir [12, 13, 16, 20, 23, 24, 48, 52, 64].

Merkaptoetanol (ME) veya Rivanol Testleri

Kronik bir enfeksiyonun akut alevlenmesinden şüphe duyuluyorsa bu test uygulanır. Bu hastalığın aktif olarak sürdüğünü gösteren Ig G antikorların varlığını belirlemek

gerekir. Bu amaçla total titrenin Ig M' ye ait kısmı için Merkaptotanol veya Rivanol kullanarak Ig M' deki disülfid bağları koparılır ve parçalanır sonrasında yüksek titrede Ig G saptanırsa alevlenme tanısı konabilir. Test bir hafta sonra uygulandığında titre artmış ise tanı kesinleşir [13, 23, 51, 63].

Mikroaglutinasyon Testi

Wright aglutinasyon testinin alternatifidir. Daha az antijen gerektiren ve daha kısa inkübasyon zamanına ihtiyaç olan testidir [63, 65].

Rose Bengal Plate Testi (RBPT)

Ekonomik olması ve kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle hem laboratuarda ve hem de tarama testi olarak sahada sıklıkla kullanılmaktadır. *B.abortus* S99 suşundan hazırlanan ve Rose Bengal boyası ile boyanan, yoğun Brucella antijeni kullanılarak yapılan, tek sulandırılmalı bir lam aglutinasyon testidir. Antijenin asidik pH derecesi 3,65 olup bu pH serumdaki Ig M aktivitesini engelleyerek Ig G' lerin reaksiyona katılmalarına yardımcı olur ve nonspesifik aglutininlerin etkinliğine engel olur [66-68]. Lam üzerine 0,03 ml antijen ve üzerine aynı miktar serum damlatılır ve 4 dakika karıştırılır ve aglutinasyon olup olmadığı gözlenir.

Lam Aglutinasyon Testi

Cam üzerinde serumla yapılan çabuk aglutinasyon testidir. Bu testin özgüllüğü ve duyarlılığı çevresel faktörlerden etkilenmesi nedeniyle pek tercih edilmez [15, 25, 63, 69].

Spot testi

Bu testte tam kan kullanılır. Bir damla kan üzerine Brucella bakteri süspansiyonu damlatılır ve aglutinasyon gözlenir.

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

Süt ve ürünlerinde *Brucella* türlerinin saptanması için geliştirilmiştir [15, 24, 28, 67, 69-71].

Klinik rolü henüz tam olarak ortaya çıkmamıştır. Brucelloz tanısında nüks olguların değerlendirilmesi ve tedavi sonrası gözlem açısından önemlidir.

Radioimmunoassay (RIA) Testi

Çok duyarlı bir testtir. Kronik ve akut olguları ayırt eder. Immünoglobulin gruplarını belirleyebilme özelliğine sahiptir [72, 73].

Kompleman Fiksasyon Testi

Coombs testi kadar duyarlı bir testtir. Ig G ve Ig M antikorları görev alır. CFT 60 ° C' de inaktivasyon esasına dayanır. Ig M' ler 60° C' de kısmen inaktif olur. Bu yüzden Ig G' leri daha iyi ölçer [13, 20, 23, 63].

Milk Ring Testi (MRT)

Sütte Brucelloz teşhisinde önemli bir testtir. Genellikle hayvancılıkla uğraşan bölgelerde bakteriyel kültür metotlarıyla birlikte uzun yıllar kullanılmıştır. MRT 'de diğer serolojik testlerde kullanılan antikorlar kullanılmaz. Ig A antikorları MRT oluşumunda daha aktiftir [74].

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Antijen ve antikor belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu testin ana prensibi; antijen- antikor kompleksine, enzim ile işaretli konjugat bağlanmasına ve substratın eklenmesine ve renk oluşumuna sebep olur [71].

Bu amaçla; genellikle 96 çukurlu Polyesteryn mikropleytlere antijen pasif biçimde adsorbe olur [1, 36, 61, 76, 84]. Ayrıca nitroselüloz pleytler, naylon boncuklar ve polyethylene pleytlerde kullanılabilir [75].

Antijen olarak Brucella'nın tüm hücreleri, dış membran proteinleri, smooth LPS, nativ haptin polisakkariti ve sitoplazmik proteinleri kullanılmıştır [63, 77, 79- 82].

Mikropleytlere adsorbe olan antijenlerin üzerine antikor ilave edilir. Antikor antijenlerle birleşir. Yıkama işlemi yapıldığı halde antijen ile birleşen antikor ortamdan ayrılmaz. Serum komponentlerinden antijenlerle birleşmeyenler yıkama ile uzaklaşırlar. Ortamda antikorum varlığı konjugat kullanılmasıyla anlaşılır. Eğer antikor ortamda varsa, konjugat antijen antikor kompleksi ile birleşir. Konjugat olarak alkalın fosfataz, horse redish peroksidaz ve galaktosidaz enzimleri ile işaretlenmiş olanlar kullanılır [83, 84].

Oluşan antikor, antijen ve konjugat kompleksine substrat eklenir. Substrat olarak ortofenil-diamin (OPD), 2,2-azino-3-etil bentiozalin 6-sülfonat (ABTS), 5-aminosalisilik asit, P-nitrofenil kullanılmaktadır [2, 38, 70, 86-88, 102]. Substratın enzim ile yapacağı reaksiyon sonucunda meydana gelen renk gözle ya da mikropate okuyucunda okunarak değerlendirme yapılır.

Brucelloz teşhisinde ELISA yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Serum ve sütte indirekt antikor aranması sığır Brucelloz teşhisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [4, 35, 62, 64, 83, 89].

Alerji Testleri

Bakteri nükleoproteinlerinden hazırlanan ‘‘Brucellargen’’ kültür filtratlarından hazırlanan Abortin ve Mellitin de cilt testinde antijen olarak kullanılır. Bugün kullanılan iki alerjen vardır. Bunlar lipopolisakkarid’ siz protein (Brucellin- INRA) ve F fraksiyonudur. Ama güvenilir bir test değildir.

Brucelloz hastalığının tedavisi destek ve özgül olmak üzere iki şekildedir. Destek tedavide; hasta her türlü gıda ile beslenebilmektedir. Ancak hastalığın ilk yedi gününde yatak istirahati yapması gerekir. Özgül tedavide ise; antimikrobik tedaviye başvurulur. Antimikrobik tedavi semptomları hafifletir ve hastalığın seyrini kısaltır [90].

Brucella bakterilerine in-vitro etkili antibiyotikler beta-laktamlar, tetrasiklinler, eritromisin, aminoglukozidler, trimetoprim, sulfametoksazol, kloromfenikol, rifampin ve bazı fluorokinolonlar' dır. Brucelloz tedavisinde kullanılan antibiyotikler mutlaka makrofajların içine girebilmeli ve bakterisid etkili olmalıdır. Brucelloz hastalığının tedavisinde kombine antimikrobiyal kullanımı gereklidir. Kombinasyon tedavisi her zaman daha üstündür. Monoterapide relaps oranları çok yüksektir.

Dünya Sağlık Örgütü 1981 yılında Brucelloz tedavisi için streptomisin ve tetrasiklin kombinasyonunu tedavi protokolü olarak belirlemişlerdir. Buna göre; streptomisin 1g/gün intramusküler tek doz 21 gün ve tetrasiklin 2g/gün oral (günde 4 kez 500mg) olacak şekilde planlamıştır [90].

Dünya Sağlık Örgütü 1986 yılında tedavi protokolünde değişiklik yapmıştır. Rifampisin ve doksisisiklin kombinasyonunu önermişlerdir. Rifampisin yerine streptomisin de kullanılabilir. Bu tedavi protokolüne göre ise; rifampisin sabah aç olarak 600–900 mg/gün ve doksisisiklin ise 200mg/gün tok karnına kombine olarak 6 hafta süreyle kullanılır [90].

Brucelloz, insanlara çoğunlukla süt, süt ürünleri ve kontamine etlerin tüketilmesi sonucu sindirim yoluyla geçmektedir. Türkiye'de özellikle kırsal kesimlerde çiğ süttten yapılan peynir, krema ve tereyağı önemli infeksiyon kaynağıdır. Kasaplardaki etler kontamine olsa bile Brucella infeksiyonu oluşum riski çok azdır. Çünkü etler pişirilirken ısısal işleme maruz kalır. Süt ürünlerinden biri olan yoğurt tüketimine bağlı bir Brucella infeksiyonu gözlenmez [48].

Gübre olarak infekte hayvan dışkısı kullanılırsa, sebzelerin kontamine olup bulaşmada rol oynayabileceği bildirilmiştir [27].

14 Şubat 2000 tarihli, 23964 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlemi Görmüş İçme Sütleri Tebliği’ne göre; Çiğ sütün tereyağı, krema ve krem şanti gibi süt ürünlerine işlenmeden önce daha uzun süre saklanabilmesini sağlamak ve sütteki mikroorganizma sayısını azaltmak amacıyla 57 °C ile 68 °C arasında en az 15 saniye süre ile ısıtıldığı, böyle sütlerin alkali fosfataz testinde pozitif reaksiyon gösterdiği; sütteki patojen mikroorganizmaların vejetatif formların tamamının, diğer mikroorganizmaların büyük bir kısmının sayısını indirmek amacıyla pastörizasyon işleminin; tüm mikroorganizmalar ve sporlarını yok etmek amacıyla sterilizasyon işleminin yapılması gerektiği; Brucelloz tespit edilmiş hayvanlarla birlikte aynı sürede bulunan sağlıklı hayvanlardan elde edilen sütün, ancak ısı işleminden sonra süt ve süt ürünleri üretiminde kullanılabileceği ifade edilmiştir [91]. Ülkemizde ve dünyada bu konu ile ilgili yapılan araştırmalardan başlıcaları aşağıda özetlenmiştir.

Carsson ve ark. (1976), ELISA’nın sensitifliği için yaptıkları çalışmalarında, ELISA’nın SAT’a göre 10 ile 100 kat daha sensitif olduğunu bildirmişlerdir [37].

Thoen ve ark. (1979), Brucella Soluble Antijeni’ni kullandıkları çalışmada, doğal olarak enfekte 16 inek ve enfekte olmayan 11 ineğin sütlerini, deneysel olarak enfekte edilen inek sütleri ile karşılaştırmışlar ve test sonucunda, ELISA ile Brucella antikorlarını ortaya koymuşlar ve ELISA’ nın daha sensitif olduğunu ancak bazı gelişmelere ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir [92].

Heck ve ark.(1982), aşıllı ve aşısız toplam 4551 serum örneğinde *B.abortus* antikorlarını araştırmış, bu amaçla örnekleri, SAT, CFT, Rivanol ve ELISA ile incelemiş, ELISA testinin daha hassas olduğunu ve SAT’ ın diğer klasik testlerle paralel çalıştığını bildirmiştir [93].

Abbasoğlu (1988), Ankara'nın farklı semtlerinde satılan 32 adet çiğ süt ve 100 adet poşet süt ve pastörize süt örneklerini, Brucella antikorları yönünden MRT ile araştırmıştır. 32 adet çiğ süt örneğinden 1'inde Brucella antikorlu saptanmıştır ancak 100 adet pastörize ve poşet süt örneklerinde Brucella antikorları saptanmamıştır [94].

Kerkhofs ve ark. (1990), sütte Ig G₁ , Ig G₂ ve Ig A antikorlarını, MRT ve ELISA yöntemleriyle analiz etmişlerdir. Araştırma sonucunda MRT ile % 58, ELISA ile Ig G₁ için %92,8 pozitif sonuç elde edilmiştir [89].

Yıldırıncı ve Nazlı (1991), İstanbul bölgesinde 50 adet değişik tulum peyniri numunesi *B.melitensis*' in mevcudiyeti yönünden analiz yapılmıştır ayrıca *B.melitensis* ilave edilen koyun ve inek sütleri ile deneysel tulum peyniri numuneleri hazırlanmıştır. Brucella grubu mikroorganizmaların izolasyonu için temel besi yeri olarak Tripticase Soy Agar kullanılmıştır ve besi yerine selektivite kazandırmak için antibiyotik ayrıca %5 serum dekstroze ve at serumu ilave edilmiştir. Çalışma sonunda piyasada satışa sunulan 50 adet tulum peyniri numunesinde Brucelloz etkenleri izole edilmemiştir. Ancak enfekte edilmiş sütlerle yapılan peynir örneklerinde olgunlaşmanın 30.gününe kadar *B.melitensis* izole etmişlerdir. Çalışma neticesinde peynirin tuz oranı, olgunlaşma süresi, rutubet oranı, pH değeri, depolama sıcaklığı ve su aktivitesinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır [95].

Sancak ve ark. (1993), Van ili 1992 yılı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında 40 adet taze otlu peynir numunesi Brucelloz riski yönünden incelenmiştir. Peynir örnekleri Farrel buyyon' lu besi yerine ekim yapılarak %10 CO₂ ortamda 37 ° C 'de 5 gün inkübe edilmiştir. Sonra Farrel agarda %10 CO₂ 'li ortamda 37 ° C' de 3-5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerden 7 tanesinde Brucella türleri izole edilmiştir ve 6'sı *B.melitensis*, 1'i ise *B.abortus* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada çiğ sütlerden yapılan otlu peynirlerde brucella bakterileri 40 güne kadar canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir [57].

Romero ve ark.(1995), çiftlik hayvanlarından toplanan süt örneklerinde yapılan PCR ve ELISA testleri neticesinde 56 adet süt örneği *Brucella spp.* yönünden pozitif bulunmuştur [96].

Güllüce ve Leloğlu (1996), tarafından yapılan çalışmada Kars ve çevresinde infeksiyon olduğu bilinen 22 yerleşim yerinden, enfekte ve aşısız 712 adet süt örneği alınmıştır ve antikorlar MRT ve ELISA ile saptanmıştır. Süt örneklerinde, ELISA ile 467 (%65,59), MRT ile 401 (%56,32)'inin pozitif olduğu bilinmiştir.

Nielsen ve ark.(1996), Kanada'daki enfekte olmamış sürülerden sağlamış oldukları 6232 adet süt örneği ile Arjantin ve Şili'deki enfekte olmuş sürülerden sağladıkları 202 adet süt örneği üzerinde ELISA ile yapmış oldukları incelemeler sonucunda, Şili'de ki enfekte sürülerden elde edilen örnekler için % 95'lik güven sınırı içinde çalışıldığında sensivitenin % 95,2 olduğunu, Arjantin'deki sürülerden sağlanan örnekler için ise, aynı güven sınırı içindeki sensivitenin % 98,7 olduğunu tespit etmişlerdir [97].

Acedo ve ark. (1997), Meksika'da 289 çiğ süt örneğinde ve 335 adet Meksika Beyaz yumuşak peynirlerinden *Brucella* türlerini izole etmek için yaptıkları çalışmada numuneleri ön zenginleştirmeye bıraktıktan sonra; glyserol ve dextrose ilavesiyle zenginleştirdikleri katı besi yerlerinde *Brucella* türlerini izole etmişlerdir. Çiğ süt örneklerinin 7 tanesi, peynir örneklerinin 25 tanesini pozitif olarak tespit etmişlerdir. Pozitif örneklerinin 21 adedi *B.abortus*, 7 adedi *B.melitensis* olarak belirlemişlerdir [98].

Bercovich ve ark.(1998), yapmış oldukları ELISA yöntemini, SAT, CFT ve RBPT ile mukayese etmişlerdir. Bu amaçla 11.132 adet Brucelloz ihtiva etmeyen koyun serumu üzerinde yaptıkları incelemede, SAT ve diğer serolojik testlerin kombinasyonu kullanıldığında, enfekte hayvanların % 75-88'inin *Brucella* ihtiva ettiğini, aynı hayvanlar ELISA incelediklerinde ise bu oranın %97-100 olduğunu kaydetmişlerdir [99].

Serpe ve ark. (2000), tarafından İtalya’da 100 adet Ricotta peyniri ve 150 adet Mozzarella peyniri ile yapılan çalışmada, geleneksel yöntemle ve PCR yöntemiyle türlerin varlığı yönünden çalışma yapılmıştır. Çalışmada *Brucella* türleri saptanamamıştır [73].

Kenar ve Altındış (2001), tarafından, Afyon merkez, Emirdağ ve Bolvadin ilçelerine bağlı altı farklı köyde farklı çiftliklerden 120 süt örneği toplanmıştır. Bu örnekler de *B.abortus* antijeni kullanılarak Ring testi ve aglütinasyon testi uygulanmıştır. Emirdağ’dan toplanan süt örneklerinin 6’sında (%5,0) pozitif sonuç gözlenmiştir. Rose Bengal Testi de yapılmış sonuçlar yine pozitif çıkmıştır. Diğer bölgelerde toplanan örneklerde test sonuçları negatif çıkmıştır. Sonuç olarak; bu çalışmada aynı alanda bulunan hayvanlar arasında infeksiyonun yaygın olduğu gözlenmiştir [100].

Türütoğlu ve ark. (2001), tarafından Burdur ve Burdur çevresinde 14 yerleşim yerinde bulunan koyundan 226 süt örneği, 101 inekten 404 süt örneği ve Burdur pazarlarında 53 koyun peyniri ve 61 inek peynir örneği toplanarak bakteriyolojik ve serolojik olarak incelenmiştir. Örneklerin bakteriyolojik muayenelerinde *Brucella* türleri izole edilememiştir. Serolojik testlerden Milk Ring Testi ve süt serumu ile aglütinasyon testi uygulanmıştır. Süt serumu ile aglütinasyon testinin (Whey-AT) sonucunda inek süt örneklerinin 9’unda, koyun süt örneklerinin 31’inde pozitiflik saptanmıştır. Serolojik testler sonucunda antikor titrelerine göre Burdur bölgesinde Brucelloz oranı ineklerde % 1, koyunlarda % 3,5 olarak tespit edilmiştir [101].

Kalender ve ark. (2001), Elazığ, Erzincan ve Tunceli illerinden örnek olarak 78 tane taze tulum peyniri numunesi toplamışlardır. Bu çalışmada; besi yeri olarak *Brucella* Selektif Agar, Serum Dekstrose Agar ve karaciğer infüzyon buyyon kullanarak %10 CO₂’li ve aerop ortamda 7–10 gün inkübasyona bırakmışlardır. Örneklerin 16’sında *Brucella spp.* suşu izole etmişlerdir. Bunların 13 tanesini *B.meliensis* ve 3 tanesini *B.abortus* olarak identifiye etmişlerdir [113].

Kerkhofs ve ark. (1990), serolojik pozitif test sonuçlarının, MRT ve ELISA ile değerlendirdiklerinde, pozitif sonuç veren örneklerin MRT % 58’inin, ELISA ile

%92,8'inin pozitif olduğunu bulmuşlar ve ELISA' nın MRT' den daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır [89].

Brucellozun önlenmesi evcil hayvanlarda Brucellozun kontrolü ve eradikasyonuna bağlıdır.

Halk çiğ ya da pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmemesi konusunda bilinçlendirilmelidir. Etlerin, sütlerin ve süt ürünlerinin pastörize edilmeden ya da pişirilmeden yenilmemesi, çiğ süttten yapılan ürünlerin ise en az iki ay bekletilmesi uygundur.

Mezbaha işçileri, veterinerler, hayvan bakıcıları, kasaplar ve laborantlar gibi risk altında çalışanların hayvan artıkları ile temas etmeleri engellenmelidir ve eldiven, gözlük gibi koruyucu önlemler almalıdırlar.

Hayvanları Brucellozdan korumak için aşı uygulamalarına önem verilmelidir. Brucella bakterisi ile enfekte olmamış süt kuzuları B.melitensis Rev 1 suşu aşısı ile, süt danaları ise B.abortus 19 suşu ile aşılanır.

Hastalısız sürülere hastalığın bulaşmasını önlemek amacıyla sürüye yeni katılacak hayvanların kontrolleri yapıldıktan sonra sürüye alınmalıdır. Sürüde enfekte olduğu saptanan hayvanlar sürüden uzaklaştırılmalıdır. İnfekte hayvanların buzağlarını emzirmelerine engel olunmalıdır. Hayvanlarda abort durumu söz konusu olursa plasenta ve fötüs gibi atıklar uygun bir şekilde imha edilmelidir. Hayvanların yaşam alanları ve kullanılan ekipmanlar düzenli aralıklarla dezenfekte edilmelidir. Süt ve süt ürünleri üreten firmalar hijyen kurallarına dikkat etmelidir ve pastörizasyona önem vermelidirler.

2. MATERYAL VE METOD

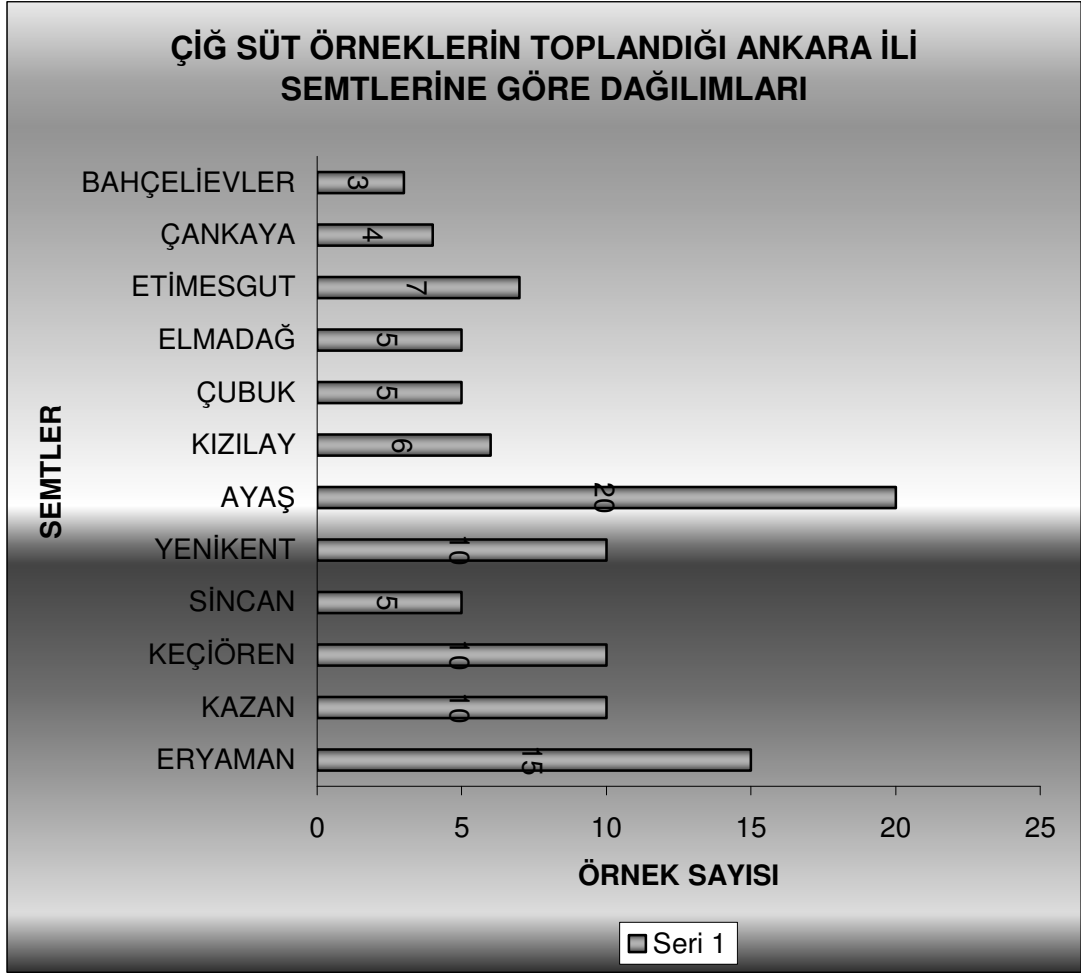
Bu araştırmada; ilk olarak 100 çiğ süt rneği ve 200 Beyaz peynir rneği olmak üzere toplam 300 rnek ELISA yöntemiyle *Brucella* Ig G antikorları yönünden test edilmiştir. Bu örneklerin içinde 100 süt rneği Ankara ili ve ilçelerindeki sokak stlerinden temin edilmiştir. Diğer 200 Beyaz peynir örneğinden; 100 tanesi Ankara’da bulunan değişik market ve semt pazarlarında satılan peynirlerden temin edilmiştir. Ayrıca çalışmada örnek çeşitliliğini artırmak için Van ilinden 50 Beyaz peynir rneği ve şırnak ilinden de 50 Beyaz peynir rneği olmak üzere 100 örnek ile de çalışılmıştır.

Ayrıca bu araştırmada; *Brucella* bakterilerinin Kefirde canlı kalma süresi de belirlenmiştir. Bu amaçla Kefir retimi yapılması için Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığından temin edilen *Brucella melitensis* 16 M (Biyotip 1, ATCC23456) ve *Brucella abortus* 544 A (Biyotip 1) sujlari kullanılmıştır.

2.1. Süt rneklerin Toplanması, Taşınması ve Analize Hazırlanması

Ankara ili ve ilçelerindeki sokak stlerinden toplam 100 adet çiğ süt örnekleri 100’er ml steril kaplara alınarak laboratuara getirilmiştir ve her süt örneğinde pipet yardımıyla 2ml steril Eppendorf tüpleri (Deltalab marka) içerisine alınmıştır ve numaralandırılmıştır. ELISA testi yapılıncaya kadar derin dondurucuda (Sanyo marka) -20   C’de saklanmıştır [114].

Çalışılan 100 adet çiğ süt rnekleri Ankara ili ve ilçelerindeki sokak stlerinden belirtilen oranlarda; Eryaman (n:15), Kazan (10), Keiren (10), Sincan (5), Yenikent (10), Ayaş (20), Kızılay (6), ubuk (5), Elmadağ (5), Etimesgut (7), ankaya (4) ve Bahçelievler (3) olmak üzere analiz için toplanmıştır.



Şekil 2.1.Çiğ Süt örneklerinin toplandığı Ankara ili semtlerine göre dağılımları.

2.2. Süt Örneklerinin ELISA Yöntemiyle Çalışılması

Bu işlemde NovaTec Immundiagnostica GmbH marka (Germany) Brucella IgG-ELISA Kitinin kullanma prosedürüne uyularak sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

- Epondorflarda muhafaza edilen süt örneklerinden 10µl alınarak 100µl sulandırma tamponuna konulmuştur.
- Daha sonra üretici firmanın önerdiği şekilde ELISA 96 kuyucuklu mikro ELISA plağının A1 kuyucuğu kör (boş) bırakılarak diğer kuyucuklara yine kullanma

prosedürünce uyularak iki negatif, bir pozitif kontrol koyulmuştur. Diğer kuyucuklara ise sulandırdığımız süt örneklerinden 100'er µl koyulmuştur.

- Sonra mikro plağın üzeri kağıt parafinle kaplanmıştır ve 37 °C' de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon tamamlandığında ELISA Yıkama Solüsyonun'dan 300µl kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır.
- Yıkama işlemi sonunda mikropalak kurulama kâğıdı üzerine ters çevrilerek fazla kalan sıvının giderilmesi sağlanmıştır.
- Daha sonra A₁ Kuyucuğu yani boş kuyucuk hariç diğer kuyucukların üzerine 100µl Brucella antiIgG konjugatı konulmuştur.
- Mikroplağın üzeri tekrar kâğıt parafinle kaplanmıştır.
- Ardından güneş ışığından koruyacak şekilde oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra aynı şartlarda ELISA Yıkama Solüsyonundan 300µl kullanılarak 3 kez yıkama işlemi tekrar yapılmıştır.
- Yıkama işleminin bitiminde tüm kuyucuklara 100µl substrat solüsyonu koyulmuştur.
- Ardından karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Daha sonra bütün kuyucuklara 100µl stop solüsyonu koyulmuştur.
- Sonra en geç 30 dakika içerisinde renk değişimi olan kuyucuklar tespit edilmiştir ve bekletilmeden ölçülmüştür.
- EL_{X800} (Biotech marka) ELISA okuyucusunda 450/620nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutulmuştur.

$$\frac{\text{Süt örneklerinin Optik Dansite değerleri} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Novatec-Units= NTU}] \quad (2.2)$$

Yukarıda görüldüğü gibi NovaTec Immundiagnostica GmbH marka Brucella IgG-ELISA Kiti kullanılarak örnekler ELISA okuyucusunda NTU biriminde Eş.2.2 örneğindeki gibi hesaplanarak yazıcıdan çıktısı alınmıştır.

Pozitif (P) ve Negatif (N) kuyucuklarındaki absorbands değerlerine göre belirlenen cut off değeri esas alınarak sonuçlar hesaplanmıştır. Cut-off absorbands değerini hesaplamak için negatif kontrollerin iki değerinin ortalaması alınmıştır ve bu ortalama değerine 0,25 eklenerek hesaplanmıştır.

1.Negatif Kontrol Değeri: 0,620

2.Negatif Kontrol Değeri: 0,640

1. ve 2. Negatif Kontrol Değerlerinin Ortalaması: $1,260 / 2 = 0,630$

Cut-Off Değeri: $0,630 + 0,25 = 0,88$

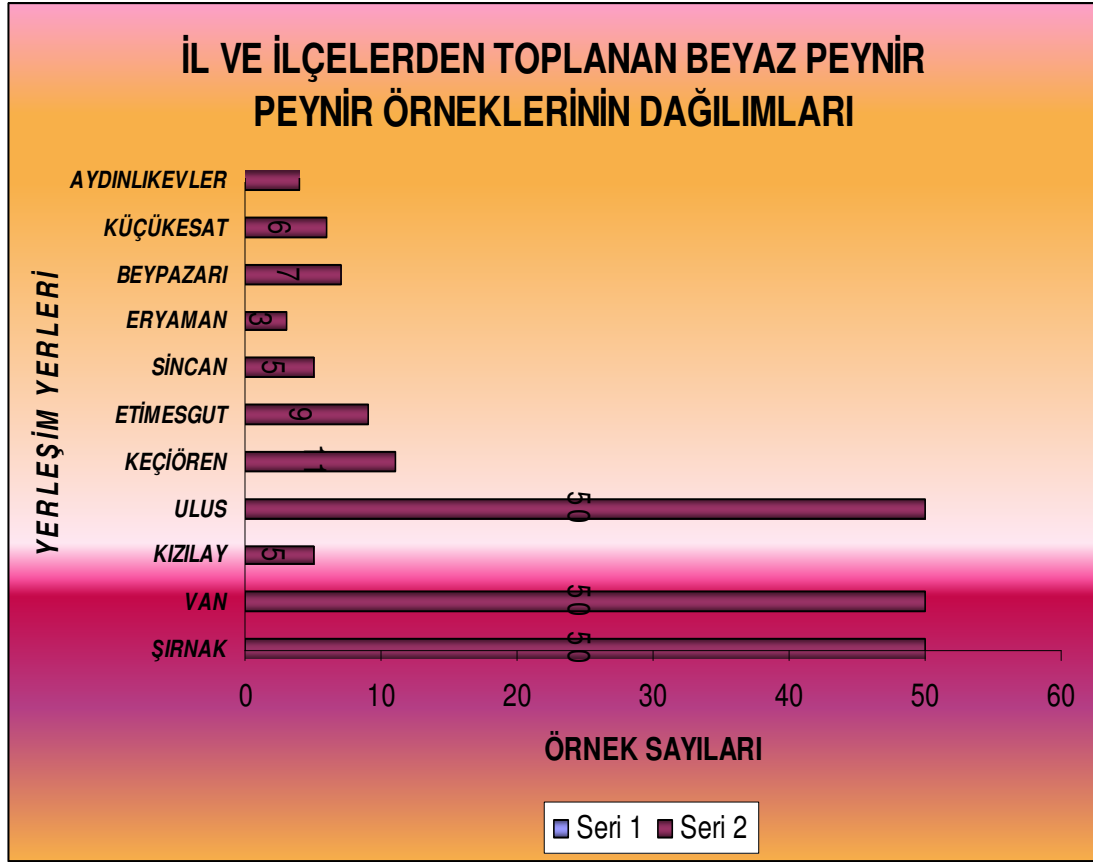
Cut-off değerininin % 10'dan daha az kalan absorbands değerleri negatif kabul edilmiştir. Negatiflik üst sınırı 0,792'dir. Çalıştığımız ELISA Kiti'ne göre ise absorbands değerlerinin pozitiflik üst sınırı değeri 3'dür.

$$0,792 < \text{ABSORBANS DEĞERİ} < 3$$

2.3. Peynir Örneklerinin Toplanması, Taşınması ve Analize Hazırlanması

Bu çalışmada; kullanılan Beyaz peynir örneklerinin 100 tanesi Ankara ili ve ilçe pazarlarında satışa sunulan Beyaz peynirlerden, ayrıca çalışılan örnek çeşitliliğini artırmak için 50 tanesi Van ili ve çevresinden, geri kalan 50 örnek ise Şırnak ili ve çevresinden toplanmıştır. Açıkta satışa sunulan Beyaz peynirlerden 50 gram alınmış ve soğuk zincir korunarak steril bir şekilde laboratuara taşınmıştır [113].

Çalışılan 200 Beyaz peynir örnekleri Ankara ili ve ilçelerinden ayrıca Van ve Şırnak illerinden belirtilen oranlarda; Şırnak (50), Van (50), Kızılay (5), Ulus (50), Keçiören (11), Etimesgut (9), Sincan (5), Eryaman (3), Beypazarı (7), Küçükesat (6) ve Aydınlıkevler (4) olmak üzere analiz için toplanmıştır.



Şekil 2.2. İl ve ilçelerden toplanan Beyaz peynir örneklerinin dağılımları

2.4. Peynir Örneklerinin ELISA Yöntemiyle Çalışılması

Bu araştırmada analiz için topladığımız 200 Beyaz peynir örneğinin her birinden 25 gram tartılmıştır ve steril kaplara koyulmuştur ve etiketlenmiştir. Daha sonra bu peynir örneklerinin her biri PBS içerisinde karıştırıcı ile homojenize edilmiştir. Daha sonra epondorf tüplerine koyulmuştur ve derin dondurucuda (-20°C 'de) kullanıncaya kadar saklanmıştır (PBS; litrede 8,2 g NaCl, 15,5 ml 0,5M Na_2HOP_4 ve 5,5 ml 0,5 M NaH_2PO_4 içermektedir.) [113].

Peynir örneklerinde Ig G antikoru aranması için ELISA testi yapılmıştır. Bu işlemde Immunolab GmbH marka(Germany) Brucella IgG-ELISA Kiti kullanma prosedürüne uyularak sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

- Standartlar, kontroller ve epondorflarda muhafaza edilen peynir örnekleri uygun mikrotitrelerde hazırlanmıştır.
- Daha sonra üretici firmanın önerdiği şekilde ELISA 96 kuyucuklu mikro ELISA plağının A₁ kuyucuğu kör(boş) bırakılarak diğer kuyucuklara yine kullanma prosedürünce uyularak sırasıyla bir negatif kontrol, iki Cut-off standartı, bir zayıf pozitif kontrol ve bir pozitif kontrol koyulmuştur. Diğer kuyucuklara ise 1/101 oranında sullandırdığımız peynir örneklerinden 100'er µl koyulmuştur.
- Sonra mikro plağın üzeri kapatılmıştır ve oda ısısında 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre bitiminde kuyucuklar içerisindeki sıvı nazik bir şekilde pipetlenerek atılmıştır. Ardından ELISA Yıkama Solüsyonundan 300µl kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır.
- Yıkama işlemi sonunda mikropalak kurulama kâğıdı üzerine ters çevrilerek fazla kalan sıvının giderilmesi sağlanmıştır.
- Daha sonra A₁ Kuyucuğu yani boş kuyucuk hariç diğer kuyucukların üzerine ELISA Kiti'nin içinde hazır bulunan 100µl Brucella antiIgG konjugatı konulmuştur.
- Mikroplağın üzeri tekrar kaplanmıştır.
- Ardından güneş ışığından koruyarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde bütün kuyucuklar aspire edilerek boşaltılmıştır.
- Daha sonra aynı şartlarda ELISA Yıkama Solüsyonundan 300µl kullanılarak 3 kez yıkama işlemi tekrar yapılmıştır.
- Yıkama işlemi bitince kuyucuklarda kalan rezidüel sıvıda uzaklaştırılmıştır.
- Her bir kuyucuğa ELISA Kiti'nin içinde kullanıma hazır bulunan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa boş kuyucukta dâhil olmak üzere 100µl koyulmuştur.
- Mikroplağın üzeri tekrar kaplanmıştır.
- Ardından karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Daha sonra reaksiyonu sonlandırmak için yine ELISA Kiti'nin içinde kullanıma hazır bulunan stop solüsyonundan bütün kuyucuklara 100µl koyulmuştur ve hafifçe çalkalanmıştır.

- Sonra en geç 30 dakika içerisinde renk değişimi olan kuyucuklar tespit edilmiştir ve bekletilmeden ölçülmüştür.
- EL_{x800} (Biotech marka) ELISA okuyucusunda 450/620nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutulmuştur.

Cut-off değerini hesaplamak için ELISA okuyucunda okunan 1.Cut-off Kontrol ve 2. Cut-off Kontrol değerlerinin ortalaması alınmıştır.

1. Cut-off Kontrol Değeri: 0,363

2. Cut-off Kontrol Değeri: 0,338

1. ve 2. Cut-off Kontrol Değerlerinin Ortalaması: $0,701 / 2 = 0,3505$

Cut-Off Değeri: 0,3505 U/ml

Cut-off değerinin %20'dan daha fazla kalan absorbans değerleri pozitif kabul edilmiştir. %20' dan daha az kalan değerler negatif kabul edilmiştir.

$$0.2804 < \text{ABSORBANS DEĞERİ} < 0.4206$$

2.5. Kefir Örneklerinin Hazırlanması

Araştırmada ilk olarak Ankara Üniversitesi Süt teknolojisi bölümünden temin edilen pastörize süt örnekleriyle aynı bölümde özel olarak 10 kontrol grubu kefir örneği hazırlanmıştır. Araştırmanın diğer bir aşamasında aynı pastörize süt örneklerinden 3 ayrı seri olarak (3x5x2)=30 adet hazırlanan patojenli kefir örnekleriyle çalışılmıştır. Toplam 40 kefir örneği incelenmiştir. Serilerin her birine ayrı olarak üretim aşamasında patojen bakteriler inoküle edilmiştir.

Kefir örneklerine inoküle edilen patojen bakteri türleri; *Brucella melitensis* 16 M ve *Brucella abortus* 544 A'dır.

40 kefir örneğinin 120 saat süresince pH değerleri pH metre (Radiometer analytical

marka) ile ölçülerek kaydedilmiştir. Bu çalışmada *Brucella* bakterilerinin kefirde canlı kalabilme süreleri araştırılmıştır.

Kontrol grubu kefir örneklerinin yapımı

Pastörize süt örneklerinden 200'er ml steril kaplara alınmıştır. Süt örneği içerisinde %3–5 oranında kefir tanesi ilave edilmiştir. 23 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu örnekler kontrol kefir örnekleri olarak çalışılmıştır.

Brucella inoküle edilen kefir örneklerinin yapımı

Pastörize süt örneklerinden patojenli kefir örnekleri hazırlanırken kontrol kefir örnekleri yapımındaki yol takip edilmiştir. Bu amaçla 200 ml' lik steril kaplara süt örnekleri alınmıştır. Pastörize sütlere %3–5 oranında kefir tanesi ilave edilmiştir.

2.6. Brucella Bakterilerinin Kefir 'e İnokülasyon İçin Hazırlanması

Brucella bakterileri için *Brucella melitensis* 16 M ve *Brucella abortus* 544 A suşları Serum Dekstroz Agar (SDA) da üretilmiştir. Serum Dekstroz Agar' ın (SDA) hazırlanması (Çizelge 2.1)'de gösterilmiştir.

Serum Dekstroz Agar' lı besi yeri; *Brucella spp.* floralı ve kontamine (süt, plasenta vb) olmayan materyallerden primer izolasyonu ve pasajlarla bakteri devamlılığının sağlanmasında ideal bir ortamdır.

Üretilen suşlardan daha sonra pepton saline içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. (Tuzlu pepton'un bileşiminde, Peptone 10,0 g/L ve NaCl 10,0 g/L vardır. 20,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Bu besiyeri berrak ve sarımsı kahverengidir).

Bu çalışmada Brucella bakterilerinin sayısı yaklaşık olarak, McFarland standart tüplerinin bulanıklığı skalası yardımı ile tayin edilmiştir. Bu yüzden McFarland standart tüplerinden 6, 8 ve 10 bulanıklık oranında bakteriler süspanse edilmiştir.

Çizelge 2.1. Serum Dekstroz (SDA)'lı besiyerinin hazırlanması

Formül:	Blood Agar Base No:2 ¹ (Oxoid)	40 g
	Steril inaktive at serumu	50-100 ml
	Dekstroz	40 ml
	105 ⁰ C'da 15 dakika otoklavlanır.	
	Distile su	1000 ml tamamlanır.
Hazırlanması:	Distile su eklenince karışımın 10 dakika kadar çökmesi beklenir. Agar eriyinceye kadar yavaşça ısıtılarak karıştırılır.	
Otoklavlama işlemi:	121 ⁰ C'da 15 dakika otoklavlanır.	
Soğutma işlemi:	55 ⁰ C' a kadar soğutulur.	
Serum ve dekstroz ekleme işlemi:	1 litre için At serumu (50–100 ml) ve Dekstroz (40 ml) eklenir.	
Petrilere dökülmesi ve etiketleme işlemi	Her petriye 20 ml olacak şekilde dökülür ve petrilere etiketleme işlemi yapılır.	

Fakat her bakteri için bu metot uygulanamaz. Çünkü her mikroorganizmanın, standart bulanıklık tüplerine göre meydana getirdiği yoğunluktaki miktarları aynı değildir. McFarland standart tüpleri hazırlamak için H₂SO₄ ve BaCl₂ 'ün molar eriyiklerinden % 1 'lik çözeltiler hazırlanmıştır ve Çizelge 1' de gösterilen oranlarda

¹ Blood Agar Base No:2 yerine Columbia Blood Agar Base veya adi Nutrient Agar Base'de kullanılabilir

karıştırılmıştır. Ayrıca Çizelge 1 'de bazı mikroorganizmaların tüp numaralarına göre ihtiva edebileceği mikrop sayısı ($\times 10^6$) gösterilmiştir.

Bakteri nevilerine göre mikroorganizmaların sayısında da değişme olur. Diğer bir ifade ile her bakteri No.1 McFarland tüpünde yaklaşık, 300×10^6 miktarında bulunmaz.

Çizelge 2.2. McFarland standart tüplerinin bulanıklık skalası

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
%1 H ₂ SO ₄	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
%1 BaCl ₂	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Bakteri hücre Sayısı milyon/ml	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000

McFarland 10 bulanıklık derecesi= 3×10^9 bakteri anlamına gelir.

McFarland 8 bulanıklık derecesi= $2,4 \times 10^9$ bakteri anlamına gelir.

McFarland 6 bulanıklık derecesi= $1,8 \times 10^9$ bakteri anlamına gelir.

Brucella melitensis 16 M ve *Brucella abortus* 544 A suşlarından hazırlanan bakteriler ayrı ayrı olarak McFarland No: 6, 8, 10 bulanıklık derecesindeki bakteri süspansiyonundan 3 farklı seri (3x5x2) olarak 200 ml kefir örneklerinin içerisine 1 ml oranında ilave edilmiştir. Böylece her bir bakteri süspansiyonu 1:200 oranında dilüye olmuştur. Sonuç olarak;

McFarland 10 bulanıklık derecesi= $3 \times 10^9 / 200 = 1,5 \times 10^7$ bakteri anlamına gelir.

McFarland 8 bulanıklık derecesi= $2,4 \times 10^9 / 200 = 1,2 \times 10^7$ bakteri anlamına gelir.

McFarland 6 bulanıklık derecesi= $1,8 \times 10^9 / 200 = 0,9 \times 10^7$ bakteri anlamına gelir.

Oluşan son bakteri yoğunluğu (Çizelge 2.3)’de görülmektedir. Daha sonra her bir örnek 23 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bu kefir örnekleri patojenli kefir örnekleri olarak çalışılmıştır.

Çizelge 2.3. McFarland bulanıklık derecelerinde bulunan bakteri oranları

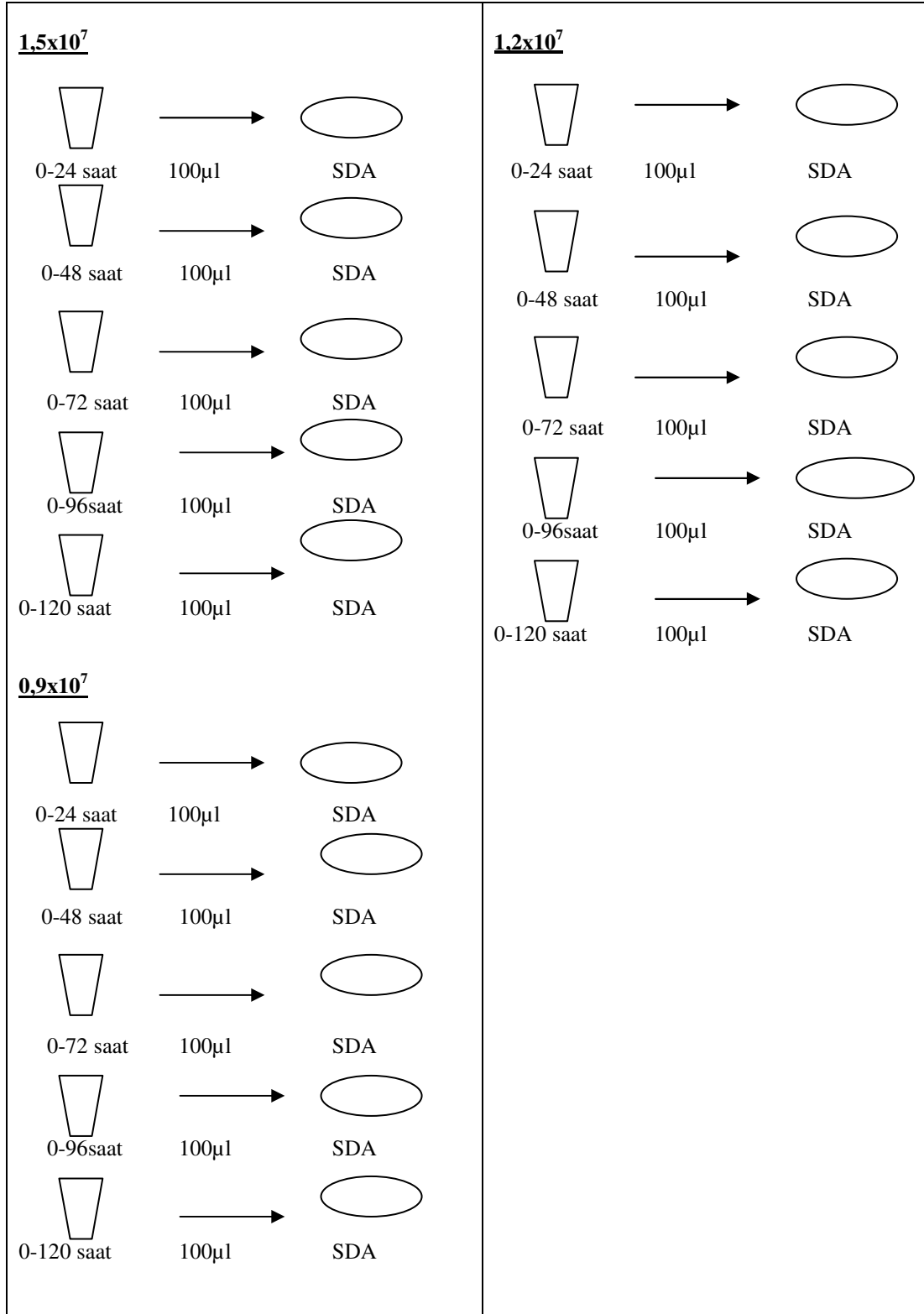
McFarland bulanıklık derecesi No:10	$1,5 \times 10^7$ /ml
McFarland bulanıklık derecesi No:8	$1,2 \times 10^7$ /ml
McFarland bulanıklık derecesi No:6	$0,9 \times 10^7$ /ml

2.7. Kontrol Grubu Kefir ve Patojenli Kefir Örneklerinin SDA’a Ekim Aşaması

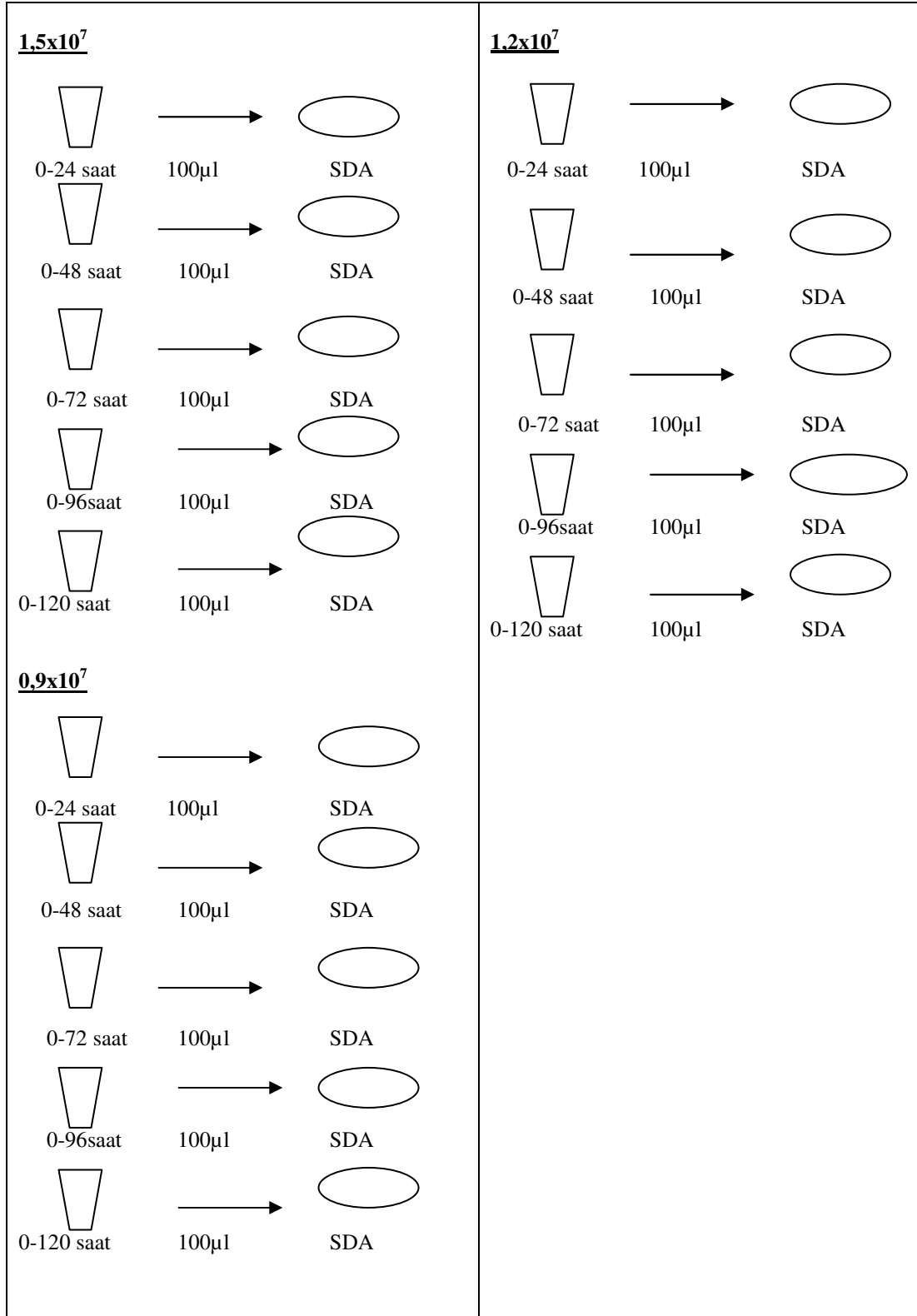
Kefir örneklerinin 120 saat boyunca pH değerleri belirlenmiştir. 25 °C’ de 24 saatlik kontrol kefir örneklerinden ve patojenli kefir örneklerinden 100µl steril pipetle alınarak Serum Dekstroz Agar’ a ekim yapılmıştır. Steril şartlarda drigalski spatülü yardımıyla besi yeri yüzeyine yayılmıştır. Besi yerine ekim işlemi yapıldıktan sonra 37 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. 48–72–96–120 saatlik zaman diliminde tüm kefir örneklerinde de aynı yol takip edilmiştir. Tüm kefir örneklerinde *Brucella*’nın canlılık süresi araştırılmıştır. Kefir örnekleri 48–72–96–120. saatlerde +4 °C’ de muhafaza edilmiştir

Çizelge 2.4. Kefir örneklerinde *Brucella* bakterilerinin canlılık süresinin belirlenmesi için yapılan işlem şeması

	<u>1.gün</u>	<u>2.gün</u>	<u>3.gün</u>	<u>4.gün</u>	<u>5.gün</u>	
Kontrol						→ p H: 5
$1,5 \times 10^7$						→ p H: 5,1
$1,2 \times 10^7$						→ p H: 5,2
$0,9 \times 10^7$						→ p H: 5,2



Şekil 2.3. *Brucella melitensis* 16 M suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluklarının 0-120 saat arasında SDA'a ekim aşaması

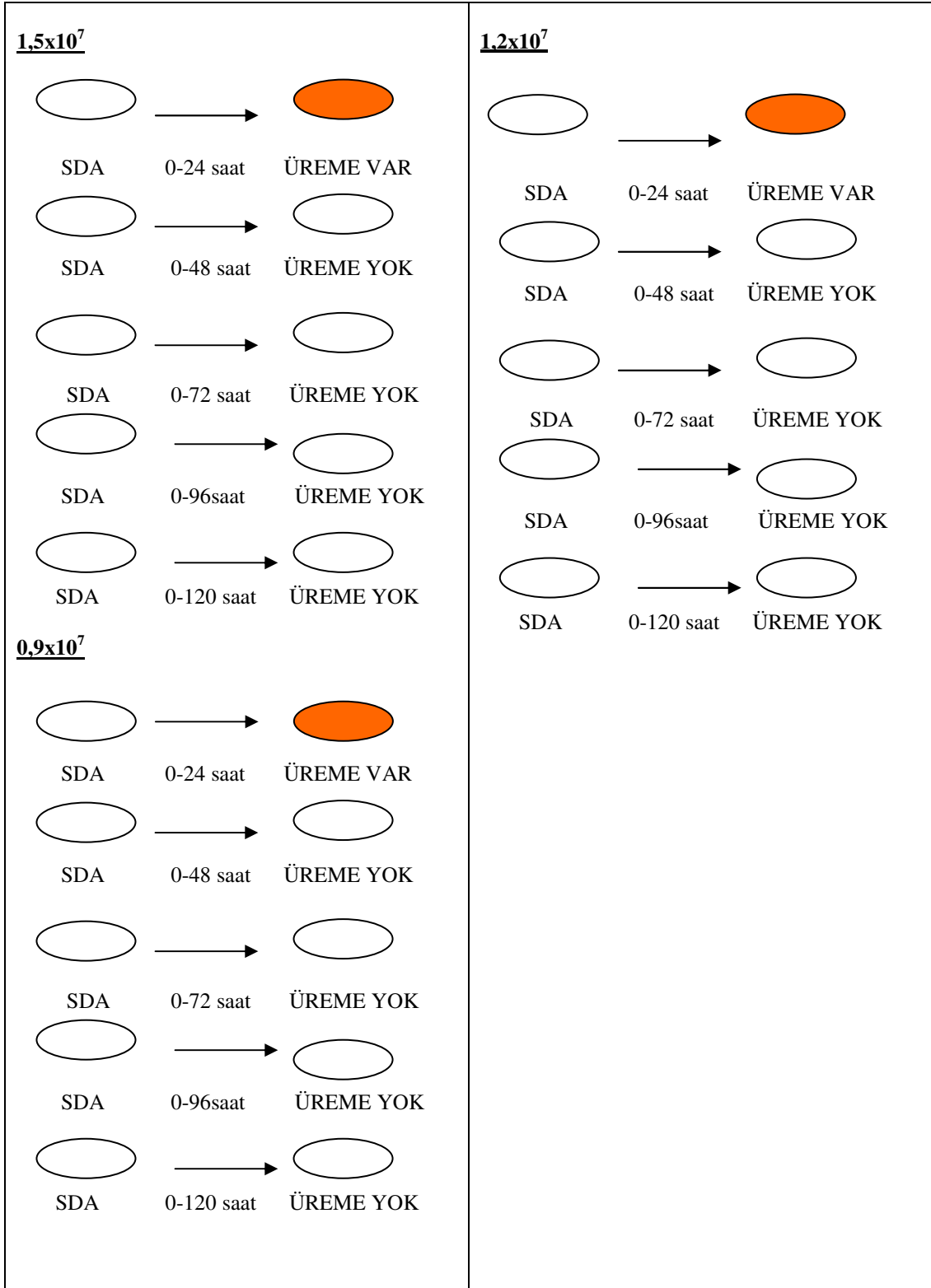


Şekil 2.4. *Brucella abortus* 544 suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluklarının 0-120 saat arasında SDA'a ekim aşaması

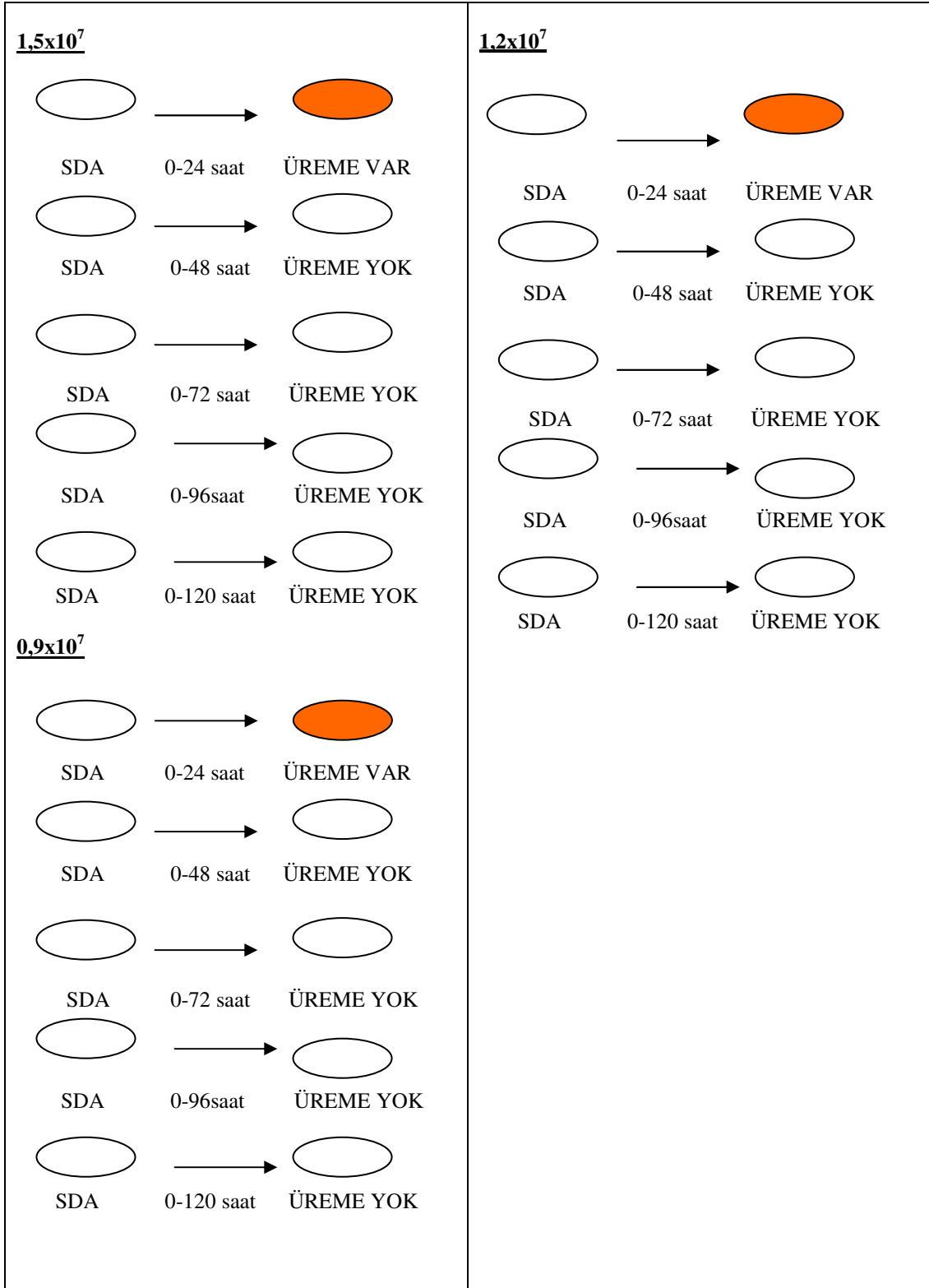
2.8. Serum Dekstroz Agar’da Üreyen Bakteriler Arasında *Brucella spp*’nin Varlığının Araştırılması

Kefir mikroflorasında *Brucella* bakterilerinin yaşam sürelerini belirlemek için Serum Dekstroz Agarda üreyen bakteriler tek tek çalışılmıştır. Her güne ait her bir plakta üreme kontrolü ile identifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Plaklarda gözlenen her bir farklı koloniden Gram boyama yapılarak bakteri morfolojisi değerlendirilmiştir.

Gram boyamada “Gram negatif küçük kokobasil, kokoid veya kısa basil” morfolojisinde bakterilerin görüldüğü ve *Brucella spp.* için uyumlu olduğu düşünülen kolonilerden de Polivalan aglütinasyon yöntemiyle *Brucella melitensis* 16M (Biyotip1) ve *Brucella abortus* 544 A (Biyotip 1) test edilmiştir.



Şekil 2.5. *Brucella melitensis* 16 M suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluğunda SDA' a ekim sonrası *Brucella melitensis*'in yaşam süresi



Şekil 2.6. *Brucella abortus* 544 A suşundan hazırlanan üç farklı bakteri yoğunluğunda SDA' a ekim sonrası *Brucella melitensis*'in yaşam süresi

3. BULGULAR

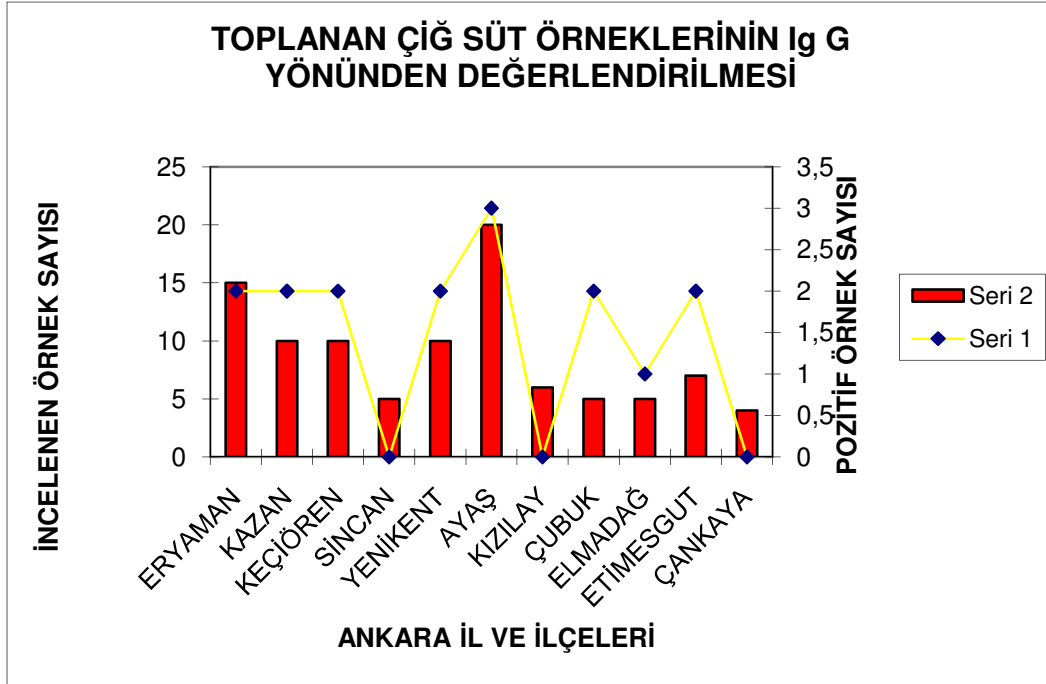
3.1. Süt Örnekleriyle Yapılan ELISA Testi Sonuçları

Ankara ili semt ve ilçelerindeki sokak sütçülerinden toplam 100 adet süt örneği alınmıştır ve ELISA yöntemiyle *Brucella* Ig G Pozitifliği yönünden incelenmiştir.

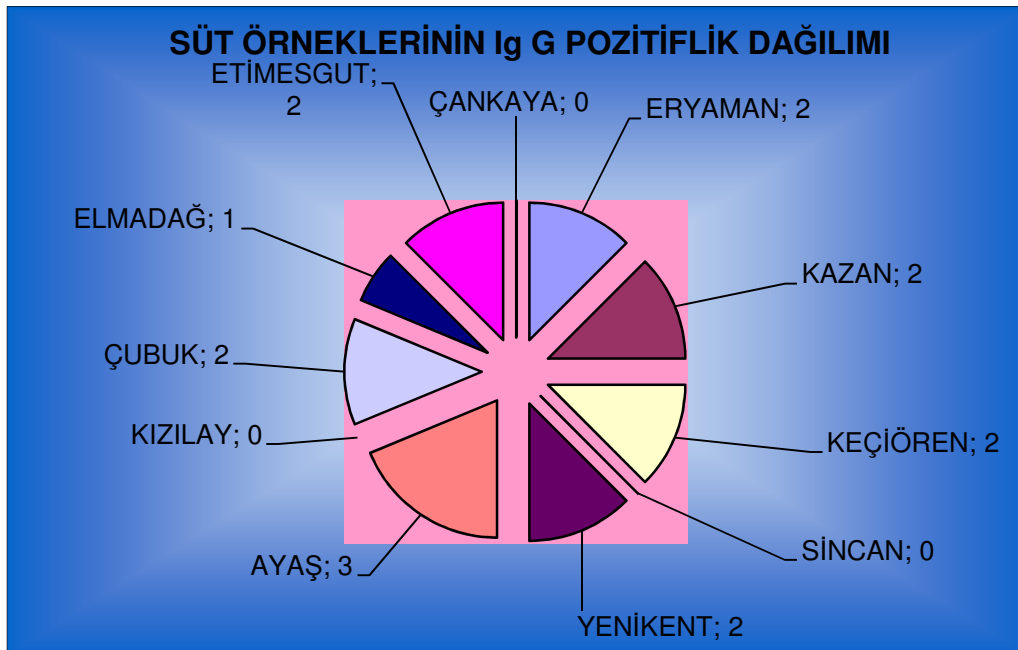
Buna göre 100 adet örneğin 16 (%16)' sı *Brucella spp.* yönünden pozitif bulunmuştur. 16 örneğin 2'si Eryaman, 2'si Kazan, 2'si Keçiören, 2'si Yenikent, 3'ü Ayaş, 2'si Çubuk, 1'i Elmadağ ve 2'si Etimesgut bölgelerindeki sokak sütlerinde *Brucella spp* yönünden pozitif çıkmıştır.

Çizelge 3.1. Toplanan çiğ süt örneklerinin Ig G pozitifliği yönünden değerlendirilmesi

ANKARA İL VE İLÇELERİ	İNCELENEN ÖRNEK SAYISI	POZİTİF ÖRNEK SAYISI
ERYAMAN	15	2
KAZAN	10	2
KEÇİÖREN	10	2
SİNCAN	5	0
YENİKENT	10	2
AYAŞ	20	3
KIZILAY	6	0
ÇUBUK	5	2
ELMADAĞ	5	1
ETİMESGUT	7	2
ÇANKAYA	4	0
TOPLAM	100	16



Şekil 3.1. Toplanan çiğ süt örneklerinin Ig G pozitifliği açısından değerlendirilmesi



Şekil 3.2. Toplanan çiğ süt örneklerinin Ig G pozitiflik dağılımı

Çizelge 3.2. Süt örneklerinin Brucella Ig G sonuçları (OD Değerleri)

Süt Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
1	Eryaman	0,405	NEGATİF
2	Eryaman	0,530	NEGATİF
3	Eryaman	2,980	POZİTİF
4	Eryaman	2,830	POZİTİF
5	Eryaman	0,039	NEGATİF
6	Eryaman	0,335	NEGATİF
7	Eryaman	0,759	NEGATİF
8	Eryaman	0,419	NEGATİF
9	Eryaman	0,180	NEGATİF
10	Eryaman	0,507	NEGATİF
11	Eryaman	0,228	NEGATİF
12	Eryaman	0,568	NEGATİF
13	Eryaman	0,738	NEGATİF
14	Eryaman	0,497	NEGATİF
15	Eryaman	0,719	NEGATİF
16	Kazan	2,183	POZİTİF
17	Kazan	0,633	NEGATİF
18	Kazan	0,313	NEGATİF
19	Kazan	2,710	POZİTİF
20	Kazan	0,556	NEGATİF
21	Kazan	0,687	NEGATİF
22	Kazan	0,760	NEGATİF
23	Kazan	0,743	NEGATİF
24	Kazan	0,098	NEGATİF
25	Kazan	0,724	NEGATİF
26	Keçiören	0,610	NEGATİF
27	Keçiören	0,53	NEGATİF
28	Keçiören	0,140	NEGATİF
29	Keçiören	0,022	NEGATİF
30	Keçiören	2,850	POZİTİF
31	Keçiören	0,141	NEGATİF
32	Keçiören	0,050	NEGATİF
33	Keçiören	0,227	NEGATİF
34	Keçiören	0,480	NEGATİF
35	Keçiören	2,400	POZİTİF
36	Sincan	0,136	NEGATİF
37	Sincan	0,631	NEGATİF

Çizelge 3.2. (Devam) Süt örneklerinin Brucella Ig G sonuçları (OD Değerleri)

Süt Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
38	Sincan	0,496	NEGATİF
39	Sincan	0,331	NEGATİF
40	Sincan	0,406	NEGATİF
41	Yenikent	0,007	NEGATİF
42	Yenikent	0,026	NEGATİF
43	Yenikent	2,980	POZİTİF
44	Yenikent	0,036	NEGATİF
45	Yenikent	0,013	NEGATİF
46	Yenikent	0,022	NEGATİF
47	Yenikent	0,250	NEGATİF
48	Yenikent	0,040	NEGATİF
49	Yenikent	0,001	NEGATİF
50	Yenikent	2,500	POZİTİF
51	Ayaş	0,410	NEGATİF
52	Ayaş	2,830	POZİTİF
53	Ayaş	0,224	NEGATİF
54	Ayaş	0,142	NEGATİF
55	Ayaş	0,138	NEGATİF
56	Ayaş	0,684	NEGATİF
57	Ayaş	0,721	NEGATİF
58	Ayaş	0,402	NEGATİF
59	Ayaş	0,544	NEGATİF
60	Ayaş	0,418	NEGATİF
61	Ayaş	2,690	POZİTİF
62	Ayaş	0,228	NEGATİF
63	Ayaş	0,568	NEGATİF
64	Ayaş	0,312	NEGATİF
65	Ayaş	0,338	NEGATİF
66	Ayaş	2,960	POZİTİF
67	Ayaş	0,040	NEGATİF
68	Ayaş	0,181	NEGATİF
69	Ayaş	0,510	NEGATİF
70	Ayaş	0,421	NEGATİF
71	Ayaş	0,340	NEGATİF
72	Kızılay	0,746	NEGATİF
73	Kızılay	0,535	NEGATİF
74	Kızılay	0,228	NEGATİF
75	Kızılay	0,015	NEGATİF
76	Kızılay	0,440	NEGATİF
77	Kızılay	0,701	NEGATİF
78	Çubuk	0,145	NEGATİF
79	Çubuk	0,900	POZİTİF

Çizelge 3.2.(Devam) Süt örneklerinin Brucella Ig G sonuçları (OD Değerleri)

Süt Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
80	Çubuk	1,440	POZİTİF
81	Çubuk	0,200	NEGATİF
82	Çubuk	0,060	NEGATİF
83	Elmadağ	2,750	POZİTİF
84	Elmadağ	0,170	NEGATİF
85	Elmadağ	0,550	NEGATİF
86	Elmadağ	0,315	NEGATİF
87	Elmadağ	0,670	NEGATİF
88	Etimesgut	1,660	POZİTİF
89	Etimesgut	0,185	NEGATİF
90	Etimesgut	0,745	NEGATİF
91	Etimesgut	0,431	NEGATİF
92	Etimesgut	0,063	NEGATİF
93	Etimesgut	1,920	POZİTİF
94	Etimesgut	0,480	NEGATİF
95	Çankaya	0,172	NEGATİF
96	Çankaya	0,020	NEGATİF
97	Çankaya	0,537	NEGATİF
98	Çankaya	0,780	NEGATİF
99	Bahçelievler	0,345	NEGATİF
100	Bahçelievler	0,014	NEGATİF

Cut-off değerininin % 10'dan daha az kalan absorbans değerleri negatif kabul edilmiştir. Negatiflik üst sınırı 0,792'dir. Çalıştığımız ELISA Kiti'ne göre ise absorbans değerlerinin pozitiflik üst sınırı değeri 3'dür.

$$0,792 < \text{ABSORBANS DEĞERİ} < 3$$

3.2. Peynir Örnekleriyle Yapılan ELISA Testi Sonuçları

Bu çalışmada; kullanılan Beyaz peynir örneklerinin 100 tanesi Ankara ili semt ve ilçe pazarlarında satışa sunulan Beyaz peynirlerden, diğer 100 örnekten ise; 50 tanesi Van ili ve çevresinden, geri kalan 50 örnek ise Şırnak ili ve çevresinden toplanmıştır ve ELISA yöntemiyle Brucella Ig G Pozitifliği yönünden incelenmiştir.

Buna göre 200 adet örneğin hiçbirinde Brucella Ig G antikorları yönünden pozitiflik saptanamamıştır.

Çizelge 3.3. İncelenen Beyaz peynir örneklerinin Ig G Pozitifliği yönünden değerlendirilmesi

ALINDIĞI YER	İNCELENEN ÖRNEK SAYISI	POZİTİF SAYISI	ÖRNEK
ŞIRNAK	50	0	
VAN	50	0	
ANKARA İLİ VE İLÇELERİ			
KIZILAY	5	0	
ULUS	50	0	
KEÇİÖREN	11	0	
ETİMESGUT	9	0	
SİNCAN	5	0	
ERYAMAN	3	0	
BEYPAZARI	7	0	
KÜÇÜKESAT	6	0	
AYDINLIKEVLER	4	0	
TOPLAM	200	0	

Çizelge 3.4.Beyaz peynir örneklerinin Brucella Ig G sonuçları (OD Değerleri)

Peynir Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
1	ULUS	0,055	NEGATİF
2	ULUS	0,016	NEGATİF
3	ULUS	0,001	NEGATİF
4	ULUS	0,128	NEGATİF
5	ULUS	0,047	NEGATİF
6	ULUS	0,007	NEGATİF
7	ULUS	0,014	NEGATİF
8	ULUS	0,017	NEGATİF
9	ULUS	0,026	NEGATİF
10	ULUS	0,036	NEGATİF
11	ULUS	0,003	NEGATİF
12	ULUS	0,001	NEGATİF
13	ULUS	0,068	NEGATİF
14	ULUS	0,037	NEGATİF
15	ULUS	0,049	NEGATİF
16	ULUS	0,017	NEGATİF
17	ULUS	0,012	NEGATİF
18	ULUS	0,141	NEGATİF
19	ULUS	0,043	NEGATİF
20	ULUS	0,007	NEGATİF
21	ULUS	0,011	NEGATİF
22	ULUS	0,030	NEGATİF
23	ULUS	0,040	NEGATİF
24	ULUS	0,013	NEGATİF
25	ULUS	0,015	NEGATİF
26	ULUS	0,069	NEGATİF
27	ULUS	0,123	NEGATİF
28	ULUS	0,010	NEGATİF
29	ULUS	0,031	NEGATİF
30	ULUS	0,011	NEGATİF
31	ULUS	0,030	NEGATİF
32	ULUS	0,035	NEGATİF
33	ULUS	0,012	NEGATİF
34	ULUS	0,263	NEGATİF
35	ULUS	0,013	NEGATİF
36	ULUS	0,010	NEGATİF
37	ULUS	0,045	NEGATİF
38	ULUS	0,012	NEGATİF
39	ULUS	0,222	NEGATİF

Çizelge 3.4.(Devam) Beyaz peynir örneklerinin Brucella Ig G sonuçları (OD Değerleri)

Peynir Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
40	ULUS	0,019	NEGATİF
41	ULUS	0,024	NEGATİF
42	ULUS	0,053	NEGATİF
43	ULUS	0,004	NEGATİF
44	ULUS	0,022	NEGATİF
45	ULUS	0,048	NEGATİF
46	ULUS	-,016	NEGATİF
47	ULUS	0,009	NEGATİF
48	ULUS	0,005	NEGATİF
49	ULUS	-,004	NEGATİF
50	ULUS	-,006	NEGATİF
51	KIZILAY	-,004	NEGATİF
52	KIZILAY	0,005	NEGATİF
53	KIZILAY	-,005	NEGATİF
54	KIZILAY	-,002	NEGATİF
55	KIZILAY	-,005	NEGATİF
56	ERYAMAN	-,006	NEGATİF
57	ERYAMAN	-,006	NEGATİF
58	ERYAMAN	-,003	NEGATİF
59	ETİMESGUT	0,006	NEGATİF
60	ETİMESGUT	0,009	NEGATİF
61	ETİMESGUT	-,005	NEGATİF
62	ETİMESGUT	-,004	NEGATİF
63	ETİMESGUT	-,001	NEGATİF
64	ETİMESGUT	-,003	NEGATİF
65	ETİMESGUT	-,002	NEGATİF
66	ETİMESGUT	-,004	NEGATİF
67	ETİMESGUT	0,007	NEGATİF
68	KEÇİÖREN	-,00	NEGATİF
69	KEÇİÖREN	-,009	NEGATİF
70	KEÇİÖREN	-,006	NEGATİF
71	KEÇİÖREN	-,006	NEGATİF
72	KEÇİÖREN	-,004	NEGATİF
73	KEÇİÖREN	-,009	NEGATİF
74	KEÇİÖREN	-,005	NEGATİF
75	KEÇİÖREN	-,001	NEGATİF
76	KEÇİÖREN	-,008	NEGATİF
77	KEÇİÖREN	0,001	NEGATİF
78	KEÇİÖREN	-,005	NEGATİF
79	BEYPAZARI	-,005	NEGATİF
80	BEYPAZARI	-,006	NEGATİF

Çizelge 3.4.(Devam) Beyaz Peynir Örneklerinin Brucella Ig G Sonuçları (OD Değerleri)

Peynir Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
81	BEYPAZARI	-,008	NEGATİF
82	BEYPAZARI	-,007	NEGATİF
83	BEYPAZARI	-,008	NEGATİF
84	BEYPAZARI	-,007	NEGATİF
85	BEYPAZARI	-,007	NEGATİF
86	KÜÇÜKESAT	-,007	NEGATİF
87	KÜÇÜKESAT	-,004	NEGATİF
88	KÜÇÜKESAT	-,003	NEGATİF
89	KÜÇÜKESAT	-,006	NEGATİF
90	KÜÇÜKESAT	-,008	NEGATİF
91	KÜÇÜKESAT	-,005	NEGATİF
92	SİNCAN	-,006	NEGATİF
93	SİNCAN	-,010	NEGATİF
94	SİNCAN	-,017	NEGATİF
95	SİNCAN	-,002	NEGATİF
96	SİNCAN	0,001	NEGATİF
97	AYDINLIKEVLER	-,018	NEGATİF
98	AYDINLIKEVLER	-,017	NEGATİF
99	AYDINLIKEVLER	-,013	NEGATİF
100	ŞIRNAK	0,003	NEGATİF
101	ŞIRNAK	0,003	NEGATİF
102	ŞIRNAK	-,009	NEGATİF
103	ŞIRNAK	-,008	NEGATİF
104	ŞIRNAK	-,016	NEGATİF
105	ŞIRNAK	-,017	NEGATİF
106	ŞIRNAK	-,016	NEGATİF
107	ŞIRNAK	-,012	NEGATİF
108	ŞIRNAK	-,015	NEGATİF
109	ŞIRNAK	-,014	NEGATİF
110	ŞIRNAK	-,006	NEGATİF
111	ŞIRNAK	-,010	NEGATİF
112	ŞIRNAK	-,011	NEGATİF
113	ŞIRNAK	-,004	NEGATİF
114	ŞIRNAK	-,003	NEGATİF
115	ŞIRNAK	-,007	NEGATİF
116	ŞIRNAK	0,008	NEGATİF
117	ŞIRNAK	0,010	NEGATİF
118	ŞIRNAK	-,006	NEGATİF
119	ŞIRNAK	-,008	NEGATİF
120	ŞIRNAK	-,010	NEGATİF
121	ŞIRNAK	-,002	NEGATİF

Çizelge 3.4.(Devam) Beyaz Peynir Örneklerinin Brucella Ig G Sonuçları (OD Değerleri)

Peynir Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
122	ŞIRNAK	-,001	NEGATİF
123	ŞIRNAK	-,002	NEGATİF
124	ŞIRNAK	0,006	NEGATİF
125	ŞIRNAK	-,000	NEGATİF
126	ŞIRNAK	0,002	NEGATİF
127	ŞIRNAK	-,009	NEGATİF
128	ŞIRNAK	-,009	NEGATİF
129	ŞIRNAK	-,010	NEGATİF
130	ŞIRNAK	-,010	NEGATİF
131	ŞIRNAK	-,011	NEGATİF
132	ŞIRNAK	-,004	NEGATİF
133	ŞIRNAK	-,007	NEGATİF
134	ŞIRNAK	-,003	NEGATİF
135	ŞIRNAK	-,000	NEGATİF
136	ŞIRNAK	-,004	NEGATİF
137	ŞIRNAK	-,004	NEGATİF
138	ŞIRNAK	-,008	NEGATİF
139	ŞIRNAK	-,002	NEGATİF
140	ŞIRNAK	-,004	NEGATİF
141	ŞIRNAK	-,003	NEGATİF
142	ŞIRNAK	0,001	NEGATİF
143	ŞIRNAK	0,001	NEGATİF
144	ŞIRNAK	-,012	NEGATİF
145	ŞIRNAK	0,002	NEGATİF
146	ŞIRNAK	0,005	NEGATİF
147	ŞIRNAK	-,012	NEGATİF
148	ŞIRNAK	0,008	NEGATİF
149	ŞIRNAK	-,004	NEGATİF
150	VAN	0,003	NEGATİF
151	VAN	0,004	NEGATİF
152	VAN	-,011	NEGATİF
153	VAN	-,022	NEGATİF
154	VAN	-,010	NEGATİF
155	VAN	-,003	NEGATİF
156	VAN	-,005	NEGATİF
157	VAN	-,012	NEGATİF
158	VAN	-,014	NEGATİF
159	VAN	-,009	NEGATİF
160	VAN	-,021	NEGATİF
161	VAN	-,020	NEGATİF
162	VAN	-,011	NEGATİF

Çizelge 3.4.(Devam) Beyaz Peynir Örneklerinin Brucella Ig G Sonuçları (OD Değerleri)

Peynir Örnekleri	Alındığı yer	OD Değeri	SONUÇ
163	VAN	-,014	NEGATİF
164	VAN	-,005	NEGATİF
165	VAN	-,009	NEGATİF
166	VAN	-,019	NEGATİF
167	VAN	-,021	NEGATİF
168	VAN	-,023	NEGATİF
169	VAN	-,016	NEGATİF
170	VAN	-,021	NEGATİF
171	VAN	-,017	NEGATİF
172	VAN	-,021	NEGATİF
173	VAN	-,018	NEGATİF
174	VAN	-,020	NEGATİF
175	VAN	-,019	NEGATİF
176	VAN	-,021	NEGATİF
177	VAN	-,022	NEGATİF
178	VAN	-,011	NEGATİF
179	VAN	-,023	NEGATİF
180	VAN	-,023	NEGATİF
181	VAN	-,022	NEGATİF
182	VAN	-,017	NEGATİF
183	VAN	-,023	NEGATİF
184	VAN	-,025	NEGATİF
185	VAN	-,017	NEGATİF
186	VAN	-,015	NEGATİF
187	VAN	-,023	NEGATİF
188	VAN	-,024	NEGATİF
189	VAN	-,024	NEGATİF
190	VAN	-,017	NEGATİF
191	VAN	-,019	NEGATİF
192	VAN	-,018	NEGATİF
193	VAN	-,014	NEGATİF
194	VAN	-,010	NEGATİF
195	VAN	-,023	NEGATİF
196	VAN	-,016	NEGATİF
197	VAN	-,022	NEGATİF
198	VAN	-,011	NEGATİF
199	VAN	-,017	NEGATİF
200	VAN	-,015	NEGATİF

Cut-off değerinin %20'dan daha fazla kalan absorbans değerleri pozitif kabul edilmiştir. %20' dan daha az kalan değerler negatif kabul edilmiştir.

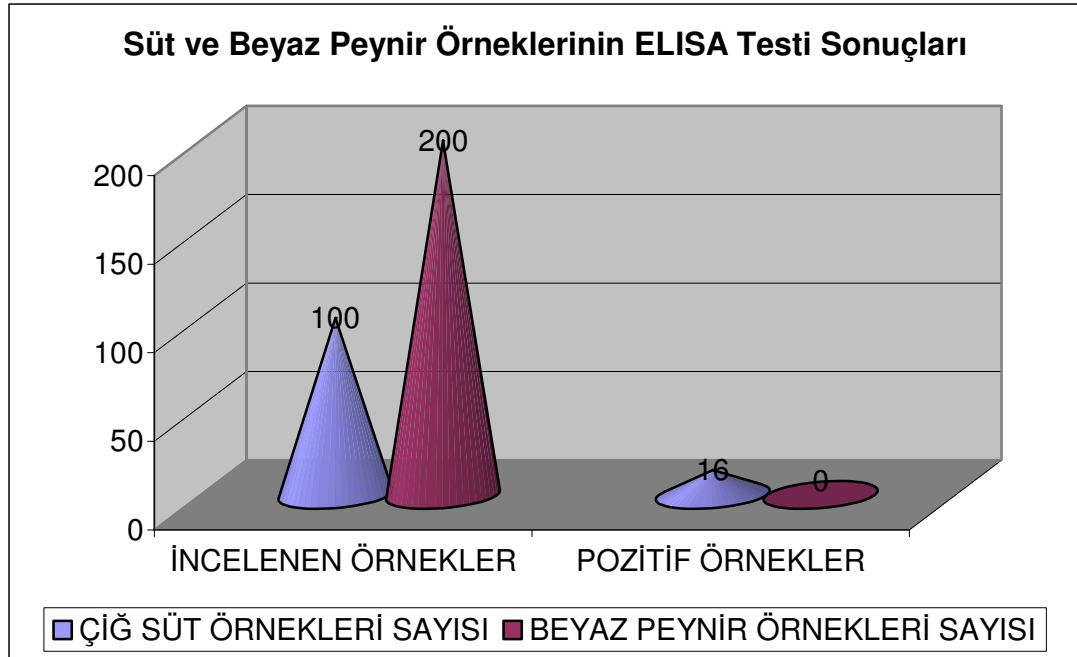
$$0,2804 < \text{ABSORBANS DEĞERİ} < 0,4206$$

Bu araştırmada; 100 çiğ süt rneği ve 200 Beyaz peynir rneği olmak üzere toplam 300 rneği ELISA yöntemiyle Brucella Ig G antikorları yönünden araştırılmıştır.

Yapılan alışmalar neticesinde; incelenen 100 çiğ süt örneğinin 16' sı Brucella Ig G antikorları yönünden pozitif çıkmıştır. 200 Beyaz peynir örneğinde ise; Brucella Ig G antikorları yönünden pozitiflik saptanamamıştır.

Çizelge 3.5. Süt ve Beyaz peynir rneklerinin ELISA testi sonuçlarının karşılaştırılması

ÖRNEKLER	İNCELENEN ÖRNEK SAYISI	POZİTİF ÖRNEK SAYISI
ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİ	100	16
BEYAZ PEYNİR ÖRNEKLERİ	200	0
Toplam	300	16



şekil 3.3. Süt ve Beyaz peynir rneklerinin ELISA testi sonuçlarının karşılaştırması

3.3. *Brucella* İnoküle Edilen Kefir Örneklerinde *Brucella*'nın Canlılık Süresinin Tespiti İçin Yapılan Çalışma Sonuçları

Araştırmada pastörize sütlerden hazırlanan 40 kefir örneğiyle çalışılmıştır. Bu kefir örneklerinden 10'u kontrol amaçlı kefir, 30 tanesi inkübasyon öncesinde *Brucella spp.* inoküle edilen kefir örnekleridir. Kefir örneklerine inoküle edilen patojen bakteri türleri; *Brucella melitensis* 16 M ve *Brucella abortus* 544 A'dır. Bu bakterilerden 2 farklı seri olarak $0,9 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$ ve $1,5 \times 10^7$ bakteri yoğunlukları ile 0-120 saat arasında SDA' a ekim yapılmıştır. Daha sonra 0-120 saat arasında SDA' da üreyen bakteriler tek tek çalışılmıştır.

Kefir mikroflorasında *Brucella* bakterilerinin yaşam sürelerini belirlemek için yaptığımız bu çalışma sonucunda; *Brucella melitensis* 16M ve *Brucella abortus* 544 A bakterileri kefir içerisindeki her üç bakteri yoğunluğunda ilk 0-24 saat aralığında canlılığını sürdürürken, 24 saatten itibaren üreyememektedir. *Brucella spp.* için uyumlu olduğu düşünülen kolonilerden de Polivalan aglütinasyon yöntemiyle *Brucella melitensis* 16 M (Biyotip1) ve *Brucella abortus* 544 A (Biyotip 1) test edilmiştir.

Kefir mikroflorasında *Brucella* bakterilerinin yaşam sürelerini belirlemek için yaptığımız bu çalışma sonucunda; *Brucella melitensis* 16M ve *Brucella abortus* 544 A bakterileri kefir içerisinde $0,9 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$ ve $1,5 \times 10^7$ oranlarındaki bakteri yoğunluklarının 0-120 saat arasında SDA' a ekim sonrası bakteri yoğunluğunda ilk 0-24 saat aralığında canlılığını sürdürürken, 24 saatten itibaren üreyemediği belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Brucella inoküle edilen kefirlerden SDA' ekim sonrası 0-120 saat içerisinde *Brucella spp.*'lerin yaşama durumu

	Bakteri Yoğunlukları	0- 24 saat	24- 48 saat	48- 72 saat	72- 96 saat	96- 120 saat
<i>B. melitensis 16M</i>	$0,9 \times 10^7$	□	-	-	-	-
	$1,2 \times 10^7$	□	-	-	-	-
	$1,5 \times 10^7$	□	-	-	-	-
<i>B. abortus 544A</i>	$0,9 \times 10^7$	□	-	-	-	-
	$1,2 \times 10^7$	□	-	-	-	-
	$1,5 \times 10^7$	□	-	-	-	-

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Brucelloz; dünyanın birçok bölgesinde insan ve hayvanlar üzerinde yaygın olarak gözlenen zoonoz hastalıklar arasındadır [42, 87].

Bu hastalığın bulaşmasına sebep olan başlıca kaynaklar; infekte hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerin çiğ olarak tüketilmesi ve özellikle çiğ süttten yapılan peynirlerin, dondurmaların ve kremaların tüketilmesidir [97, 103, 104].

Brusella enfeksiyonuna, hayvan yetiştiriciliği yapılan her ülkede sıkça rastlanılmaktadır. Özellikle ülkemizde kırsal kesimlerde kendine özgü özellikleri olan, her yöreye özgü peynir türleri üretilmektedir. Peynir hammaddesi olan süt, insanlara yararlı olduğu kadar mikroorganizmaların gelişmesi için ideal bir kültür ortamı oluşturur. Küçük aile işletmelerinde geleneksel yöntemlerle ve kontrolsüz olarak üretilen peynirlerin yapımında kullanılan sütler mayalanma sıcaklığı olan 32-34 dereceye kadar ısıtıldıktan sonra mayalandıklarından, mikrobiyal yönden emin olunmayan bir ürün elde edilmektedir. Peynirlerin tüketiciye ulaşmasına kadar geçen süre içerisinde de çeşitli kontaminasyonlar görülebilmektedir. Bu şekilde çiğ süttten imal edilen peynirlerde hem tüketici sağlığını hem de peynirin kalitesini olumsuz etkileyen patojen ve diğer arzu edilmeyen mikroorganizmaların bulunma olasılığı vardır. Bu mikroorganizmaların sayıları ve çeşitleri; peynirin p H değeri, rutubet oranı ve olgunluk süresine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Peynirde olgunlaşmanın ilk günlerinde genel mikroorganizma sayısının yüksek olduğu ancak olgunlaşma süre uzadıkça zamana bağlı olarak azaldığı görülmektedir.

Bu çalışma ile de Ankara ili ve ilçelerindeki sokak sütçülerinden temin edilen çiğ sütlerde, Ankara'da bulunan değişik market ve semt pazarlarında satılan Beyaz peynirlerde ayrıca çalışılan örnek çeşitliliğini artırmak için Van ve Şırnak illerindeki değişik market ve semt pazarlarından satılan Beyaz peynirlerde ELISA yöntemiyle Brucella Ig G antikorları yönünden pozitifliği test edilmiştir. Ayrıca son zamanlarda gündemde olan Kefir içerisinde *Brucella* bakterisinin yaşam süresi belirlenmiştir. Kefir Orta Asya' da, Türk Cumhuriyetlerinde ve Rusya'da yaygın olarak

tüketilmektedir [109]. Kefir mikroflorasında laktik asit bakterileri, maya ve asetik asit bakterileri bulunur. Kefirde laktozu fermente edemeyen ve eden mayalarla birlikte laktik asit bakterileri simbiyotik olarak yaşamaktadır [69, 110]. Kefir oluşumunda fermentasyon sırasında laktozdan laktik asit oluşumu, etil alkol ve karbondioksit oluşumu, proteinlerin parçalanması ve kefir aromasının oluştuğu belirtilmektedir. Kefir bileşimi içerisindeki bu çeşitlilikten dolayı ve p H'sının 4,5-5 aralığında olmasından dolayı yoğurt p H'sı ile benzer özellik gösterdiği için Kefir' de *Brucella* bakterilerinin yaşam süresi araştırılmıştır.

Sunulan bu çalışmada ilk olarak; Ankara ili ve ilçelerindeki sokak sütçülerinden temin edilen 100 adet çiğ süt örneğinin 16'sinde (%16) *Brucella* Ig G antikorları yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. *Brucella* spp. yönünden pozitif çıkan 16 çiğ süt örneklerinin 2'si Eryaman, 2'si Kazan, 2'si Keçiören, 2'si Yenikent, 3'ü Ayaş, 2'si Çubuk, 1'i Elmadağ ve 2'si Etimesgut bölgelerinden temin edilmiştir.

Kerkhofs ve ark. (1990), tarafından sütte Ig G₁, Ig G₂ ve Ig A antikorlarını, MRT ve ELISA yöntemleriyle analiz etmişlerdir. Araştırma sonucunda MRT ile % 58, ELISA ile Ig G₁ için % 92,8 pozitif sonuç elde edilmiştir [89].

Romero ve ark.(1995), tarafından çiftlik hayvanlarının sütleri üzerinde PCR ve ELISA metodlarını kullanarak yaptıkları *Brucelloz* çalışmasında, 56 adet süt örneğinde *Brusella* spp. tespit etmişlerdir [96].

Güllüce ve Leloğlu (1996), tarafından Kars merkez ve ilçelerine bağlı, 22 yerleşim biriminden, aşısız ve infekte sürülerden 712 adet süt örneği toplanmış, ELISA ve MRT ile çalışılmıştır. *B. abortus* 'a karşı oluşan antikorlar saptanmıştır. Süt örneklerinde ELISA ile 467 (%65.59), MRT ile 401 (% 56.32) pozitif sonuç belirlenmiştir [108].

Kenar ve Altındış (2001), tarafından Afyon merkez, Emirdağ ve Bolvadin ilçelerine bağlı altı farklı köyde farklı çiftliklerden 120 süt örneği toplanmıştır. Bu örnekler de *B.abortus* antijeni kullanılarak Ring testi ve aglütinasyon testi uygulanmıştır.

Emirdağ'dan toplanan süt örneklerinin 6'sında (%5,0) pozitif sonuç gözlenmiştir. Rose Bengal Testi de yapılmış sonuçlar yine pozitif çıkmıştır. Diğer bölgelerde toplanan örneklerde test sonuçları negatif çıkmıştır. Sonuç olarak; bu çalışmada aynı alanda bulunan hayvanlar arasında infeksiyonun yaygın olduğu gözlenmiştir [100].

Kasmoğlu (2002), tarafından yapılan çalışmada Kırıkkale'den 35 çığ süt örneklerinde *Brucella* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyi araştırılmıştır. Ancak ığ süt örneklerinde *Brucella spp.* saptanamamıştır [105].

Bu araştırma neticesinde; süt örneklerinde *Brucella* Ig G antkору bulunma yüzdesi ülkemizde ve diğer ülkelerde çalışmalar yapan araştırıcıların bulguları ile uyum göstermektedir. Hayvan yetiştiriciliği yapılan her yerde enfekte hayvanların sütlerinde *Brucella* Ig G antkору bulunmaktadır.

Sunulan bu çalışmada ikinci olarak; Ankara ili ve ilçe pazarlarında satışa sunulan 100 adet Beyaz peynir örnekleri ile çalışılan örnek çeşitliliğini artırmak için Van ve şırnak illerinden 50'şer Beyaz peynir rnekleri ELISA yöntemiyle *Brucella* Ig G antikorları yönünden incelenmiştir. Ancak alışılan 200 Beyaz peynir örneğinin hiç birinde *Brucella* Ig G antikorlarına rastlanılmamıştır.

Mert (1984), tarafından yapılan çalışmada, 150 peynir örneğinin 29'unda (%19,33) *Brucella spp.* izole edilmiştir. İzole edilen örneklerden 3'nn *B.abortus* ve 26'sının *B.melitensis* olduğu belirlenmiştir. Pastörize edildiği bildirilen sütlerden yapılan peynirlerde *Brucella* izole edilmezken, Peynir retimi yapıldıktan 5 gün sonra alınan örneklerde % 20'inin üstünde izole edildiği, Peynir retimi yapıldıktan 12 gün ve daha sonrasında peynirlerde izolasyon yapılmadığı belirtilmiştir [106]. Bu çalışmada izolasyon olduğu için tespit edilmiştir. Bizim çalışmada ise antikor aranması nedeniyle tespit edilmemiştir.

Ayaz (1986), tarafından Ankara'da satılan Beyaz peynirlerde Brucelloz etkeninin tespiti için yaptığı çalışmada 94 peynir rneğinde *Brucella* etkenine rastlamadığını

bildirmiştir [76]. Bu araştırmada da izolasyon çalışması yaptığı halde Ankara ilinde tespit edememiştir.

Yıldırıncı ve Nazlı (1991), tarafından İstanbul bölgesinde 50 adet değişik tulum peyniri numunesi *B.melitensis* 'in mevcudiyeti yönünden analiz yapılmıştır ayrıca *B.melitensis* ilave edilen koyun ve inek sütleri ile deneysel tulum peyniri numuneleri hazırlanmıştır. *Brucella* grubu mikroorganizmaların izolasyonu için temel besi yeri olarak Tripticase Soy Agar kullanılmıştır ve besi yerine selektivite kazandırmak için antibiyotik ayrıca %5 serum dekstroze ve at serumu ilave edilmiştir. Çalışma sonunda piyasada satışa sunulan 50 adet tulum peyniri numunesinde Brucelloz etkenleri izole edilmemiştir. Ancak enfekte edilmiş sütlerle yapılan peynir örneklerinde olgunlaşmanın 30.gününe kadar *B.melitensis* izole etmişlerdir. Çalışma neticesinde peynirin tuz oranı, olgunlaşma süresi, rutubet oranı, pH değeri, depolama sıcaklığı ve su aktivitesinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır [49].

Tunçbilek (1992), tarafından Ankara'da tüketime sunulan 100 adet Beyaz peynir örneğinin 4'ünden (%4) *Brucella* etkenini izole etmiş, bu etkenlerinin 1'i *B.abortus*, 3'ü *B.melitensis* olduğu saptanmıştır. 100 örneğin 76'sı çiğ sütlerden, 24'ü pastörize sütlerden hazırlanmıştır. *Brucella* izolasyonlarının tümünün çiğ sütlerden yapılan peynirlerde olduğu saptanmıştır [111].

Sancak ve ark.(1993), tarafından Van ili 1992 yılı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında 40 adet taze otlu peynir numunesi Brucelloz riski yönünden incelenmiştir. Peynir örnekleri Farrel buyyon'lu besi yerine ekim yapılarak %10 CO₂ ortamda 37 ° C 'de 5 gün inkübe edilmiştir. Sonra Farrel agarda %10 CO₂ ' li ortamda 37 ° C' de 3-5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerden 7 tanesinde *Brucella* türleri izole edilmiştir ve 6'sı *B.melitensis*, 1'i ise *B.abortus* olarak identifiye edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada çiğ sütlerden yapılan otlu peynirlerde brucella bakterileri 40 güne kadar canlılığını sürdürdüğü belirlenmiştir [57]. Bu çalışmada peynirlerde bakterilerin izolasyonu çalışmasıdır.

Öztürk ve Nazlı (1996), tarafından deneysel olarak *B.melitensis* Rev 1 suşu ile infekte ettikleri koyun ve inek sütlerinden tulum peyniri yapmışlardır. Olgunlaşmanın 30. gününden itibaren *B.melitensis* izole edememişlerdir. Bunun nedeni olarak tulum peynirlerinde olgunlaşmanın sonuna doğru tuz oranının artmasına ve p H' ının 5,1-5,2 değer aralığında olmasına bağlanmıştır [107].

Acedo ve ark.(1997), tarafından Meksika'da 289 çiğ süt örneğinde ve 335 adet Meksika Beyaz yumuşak peynirlerinden *Brucella* türlerini izole etmek için yaptıkları çalışmada numuneleri ön zenginleştirmeye bıraktıktan sonra; glyserol ve dextrose ilavesiyle zenginleştirdikleri katı besi yerlerinde *Brucella* türlerini izole etmişlerdir. Çiğ süt örneklerinin 7 tanesi, peynir örneklerinin 25 tanesini pozitif olarak tespit etmişlerdir. Pozitif örneklerinin 21 adedi *B.abortus*, 7 adedi *B.melitensis* olarak belirlemişlerdir [98].

Serpe ve ark.(2000), tarafından İtalya'da 100 adet Ricotta peyniri ve 150 adet Mozzarella peyniri ile yapılan çalışmada, geleneksel yöntemle ve PCR yöntemiyle türlerin varlığı yönünden çalışma yapılmıştır. Çalışmada *Brucella* türleri saptanamamıştır [73]. Bizim araştırma sonuçlarında da peynirlerde *Brucella* antikorlarına rastlanmamıştır.

Kalender ve ark (2001), tarafından Elazığ, Erzincan ve Tunceli illerinden örnek olarak 78 tane taze tulum peyniri numunesi toplamışlardır. Bu çalışmada; besi yeri olarak *Brucella* Selektif Agar, Serum Dekstrose Agar ve karaciğer infüzyon buyyon kullanarak %10 CO₂'li ve aerop ortamda 7–10 gün inkübasyona bırakmışlardır. Örneklerin 16'sında *Brucella spp.* suşu izole etmişlerdir. Bunların 13 tanesini *B.meliensis* ve 3 tanesini *B.abortus* olarak tanımlamışlardır [113]. Bu çalışmada SDA besiyeri izolasyon amacıyla seçilerek kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda da Kefir'de *B. melitensis* ve *B. abortus* izolasyonları için seçilerek kullandığımız besiyeri de SDA' dır.

Kasımoğlu ve ark.(2002), tarafından yapılan çalışmada Kırıkkale'den toplanan 35 inek peyniri ve 35 koyun peyniri örneklerinde varlığı araştırılmıştır. Test bulgularına

göre, 35 koyun peynirinin 5'inde (% 14,2) *B.melitensis* izole edilmiştir. 35 inek peyniri örneklerinde ise *Brucella spp.* saptanamamıştır [105]. Ankara iline yakın Kırıkkale ilinde *Brucella* bakterilerinin izolasyonuna yönelik bir çalışma olmasına olmasına rağmen inek sütlerinden hazırlanan peynir örneklerinde *Brucella spp.*'lerine rastlanılmamıştır.

Buğdaycı (2003), tarafından Kayseri ilindeki ilçe ve semt pazarlarında tüketime sunulan 100 adet koyun ve inek peynirinin % 13'ünde Brucelloz etkenleri tespit edilmiştir. Bunlarından 12 tanesi koyun peynirinden ve 1 tanesi taze inek peynirinden izole edilmiştir [53].

Bu araştırmalar sonucunda Beyaz peynirlerde *Brucella* Ig G antikorunun pozitiflik yüzdesi ülkemizde ve diğer ülkelerde çalışmalar yapan araştırmacıların bulgularının bazıları ile uyum göstermektedir. Araştırdığımız peynir örneklerinde *Brucella* Ig G antikorunu aradığımız için *Brucella* Ig G antikorunu yönünden negatif sonuçlar elde edilmiştir. Ancak *Brucella* antijeni ve izolasyon çalışmaları yapılmamıştır. Ayrıca taze peynirlerle ve uzun süre olgunlaşmış peynirler arasında mikroorganizma sayılarında büyük farklılıklar vardır. Peynirde olgunlaşma süresi uzadıkça zamana bağlı olarak mikroorganizma sayısının azaldığı görülmektedir. Araştırdığımız peynir örneklerinin olgunlaşma süreci hakkında net verilerimiz olmadığı için de *Brucella* Ig G antikorunu yönünden negatif sonuçlar elde etmiş olabiliriz. Ayrıca Ig G antikorları yüksek oranda pozitif gözlenirken Beyaz peynirlerde antikor tespit edilememiş olması peynirlerin pastörizasyonunda Ig G yıkımına uğramış olabileceğini hatırlatmaktadır.

Sunulan bu çalışmada ayrıca; Kefir'de *Brucella* bakterilerin 0-120 saatlik süre içerisinde yaşam süresine bakılmıştır. Kefir mikroflorasında *Brucella* bakterilerinin yaşam sürelerini belirlemek için yaptığımız bu çalışma sonucunda; *Brucella melitensis* 16 M ve *Brucella abortus* 544 A bakterileri suşlarından hazırlanan $0,9 \times 10^7$, $1,2 \times 10^7$ ve $1,5 \times 10^7$ oranlarındaki bakteri yoğunluklarını içeren Kefirler üretilmiştir. Bu kefir örneklerinden 0-120 saat arasında SDA' a ekim sonrası bakteri yoğunluğunda ilk 0-24 saat aralığında canlılığını sürdürürken, 24 saatten itibaren üreyemediği belirlenmiştir. Çalışılan Kefir örneklerinin pH'sı 4,5- 5 aralığındadır.

Oysa *Brucella* bakterilerinin minumum üremesi için gerekli pH 5,8 'dir. Kefir'in yapıldığı süte ilk inoküle edilen bakteriler Kefir üretiminden hemen sonra 0-24 saat aralığında canlılıklarını koruyabilmişlerdir. Ancak 24-120 saat aralığında ürememişlerdir.

Brucelloz ile mücadele edebilmek için halk bilinçlendirilmelidir. Çiftlik hayvanları aşılanmalı, enfekte hayvanları sürüden ayırıp tedavilerinin yapılması sağlanmalıdır. Süt ve süt ürünlerinin özellikle Beyaz peynir üretiminde hijyen kurallarına uyularak teknolojiye yararlanılmalıdır. Çiğ süttten yapılan peynirlerin tüketilmemesi konusunda halk bilinçlendirilmelidir ve bu peynirler 2- 3 aylık olgunlaşma süresinden sonra tüketilmelidir. Beyaz peynirler 2-3 aylık olgunlaşma süresinden sonra tüketilmelidir.

Sonuç olarak; Ankara ili ve ilçelerindeki sokak sütçülerinden temin edilen çiğ sütlerde yapılan çalışmada incelenen 100 çiğ süt örneğinin 16 tanesinde (%16) *Brucella spp.* tespit edilmiştir. Ülkemizde ve diğer ülkelerde hayvan yetiştiriciliği yapılan yerlerde enfekte olmuş hayvanların sütlerinde *Brucella* Ig G antikoruna rastlamak mümkündür. Ankara'da bulunan değişik market ve semt pazarlarında satılan Beyaz peynirlerde ayrıca çalışılan örnek çeşitliliğini artırmak için Van ve Şırnak illerindeki değişik market ve semt pazarlarından satılan Beyaz peynirlerde ELISA yöntemiyle *Brucella* Ig G antikorları yönünden pozitiflik oranı toplam 200 örnekte test edilmiştir. Fakat *Brucella* Ig G pozitifliğine hiçbir örnekte rastlanılmamıştır. Ancak bu sonuçtan yola çıkılarak Beyaz peynir örneklerinde *Brucella* Ig G yoktur denilemez. Çünkü biz bu çalışmada antikor aradık eğer antijen arasaydık elde ettiğimiz sonuçların pozitiflik oranının yüksek olacağı düşünülmektedir. Ayrıca araştırdığımız peynir örneklerinin olgunlaşma süreci hakkında market ve semt pazarlarından temin ettiğimiz için kesin bir bilginiz yoktur. Araştırdığımız 200 adet Beyaz peynir örneklerinde Beyaz peynirlerin sütlerin pastörizasyon işlemleri, peynirlerin üretim aşaması ve peynirlerin olgunlaşma süresi sonrasında *Brucella* antikorlarının protein yapıları bozulabilmektedir. Bu yüzden örneklerde *Brucella* Ig G antikorunu tespit edilememiştir. Ayrıca Kefir içerisinde *Brucella* bakterisinin yaşam süresi araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre; Kefir' de

p H'nın düşük olması ve alkali ve laktik asit gibi fermentasyon ürünlerini içermesi nedeniyle Brucella bakterileri canlılıklarını uzun süre muhafaza edememiştir. Kefir'in yapıldığı süte ilk inoküle edilen bakteriler Kefir üretiminden hemen sonra 0-24 saat aralığında canlılıklarını koruyabilmişlerdir. Ancak 24-120 saat aralığında ürememişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Martin-Mazuelos, E., Nogales, M. C., "Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers", *J. Clin. Microbiol*, 32 (8): 2035-2036 (1994).
2. Byrd, J. W., Heck, F. C., Hidalgo, R. J., "Evolution of the Enzym-Linked Immunosorbent Assay for detection *Brucella abortus* antibodies", *J.Vet, Res.*, 40: 896-898 (1979).
3. Akşit, F., "Eskişehir ve çevresinde tüketilen sütlerde antikor varlığı", *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 17(3-4): 193-199 (1987).
4. Rahaley, R. S., Denis, S. M., Smeltzer, M. S., " Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep", *Vet. Rec.*, 12: 467-470 (1983).
5. Pellicer, T., Ariza, J., Foz, A., et. al., " Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis", *J. Infect Dis.*, 157 (5): 918-924 (1988).
6. Gültekin, M., " Brucellozun laboratuvar tanısındaki sorunlar ve Türkiye'deki epidemiyoloji", *28. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Antalya, 15 (1998).
7. Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., Sanborn, M.R." Preliminary Development of a Diagnostic Test for Brucella Using Polymerase Chain Reaction", *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 216-227 (1990).
8. Alton, G.G., Jones, L.M, Angus, R.D. Verger J.M, " Techniques for the Brucellosis Laboratory", *İns. National Dela Recherche Agronomique*, Paris, 147 (1986).
9. Arda, M., Mimbay, A., Aydın, N., " Özel Mikrobiyoloji Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar", *A.Ü. Veterinerlik. Fakültesi Yayınları*, Ankara, 386 (1995).
10. Disarno, A., Izzi, R., Sandulli, S., Santagata, N., "*Brucella melitensis* Isolation From Fresh Sheep Cheese-Etiology and Epidemiology Industrie Alimentary", *J. Clin. Microbiol*, 31:3 (1992).
11. Akan E, " Tıbbi Mikrobiyoloji ", *Oba Kitabevi*, Konya, 173-184 (1986).
12. Arnow, Smaron M, Ormiste V., " Brucellosis in a group of travelers to spain", *JAMA*, 251 (4): 505-507 (1984).
13. Bilgehan, H., "Klinik Mikrobiyoloji Tanı, 2.Basım", *Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi*, İzmir, 224-229 (1995).

14. Helvacı S., " Brucella", Klinik Mikrobiyoloji, Kılıçturgay K., **Güneş Tıp Kitabevi**, Bursa, 135-139 (1994).
15. Özsan K., "Brucellosis'in tarihçe ve etiyolojisi", **24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi**, Kayseri, 56-64 (1990).
16. Young E.J., " Brucella Species", Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., **Churchill Livingstone Inc.**, New York, 2053-2060 (1995).
17. Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelbrerg, E.A., " Rewiev of Medical Microbiology", **Lange Medikal Publications**, California, 242-244 (1989).
18. Bilgehan, H., "Brucella", Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları , **Barış Yayınları**, İzmir, 181-194 (1996).
19. Young, E.J., Corbel, M.J., " Brucellozis", Clinical and Laboratory Aspects, **Boca Raton**, Florida, 11-23 (1989).
20. Anonymous, "Joint FAO/WHO expert committee on *Brucellosis* sixth report", **WHO technical report series**, Geneva, 740 (1986).
21. Frobisher, M., " Fundamentals of Microbiology 8nd ed.", **Press of W.B. Saunders company**, Philadelphia, London, Toronto, 740 (1968).
22. Kasımoğlu, A., " Determination of Brucella spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kırıkkale", **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr**, 109(7): 324-326 (2002).
23. Sutra, L., Caffin, J. P., Dupray, G., "Role of Milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring testi", **Vet. Microbiol.**, 12: 359-366 (1986).
24. Elberg, S. S., Henderson, D. W., " Respiratory pathogenicity of *Brucella*", **J. Infect. Dis.**, 82: 302-306 (1948).
25. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Leloğlu, N., Akay, Ö., "Özel mikrobiyoloji", Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 741, **Atatürk Üniversitesi Basımevi**, Erzurum, 197-223 (1992).
26. Corbel, M.J., Brinley-Morgan, N.J., "Genus *Brucella* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Krieg, N. R., Holt, J.G., **Williams and Wilkin**, London, 1:377-389 (1984).
27. Akhan, S. A, Akova, M., " *Brucellozis*", Temel İç Hastalıkları, 1. Baskı, İlçin, G., Ünal, S., Süleymanlar, G., **Güneş kitapevi**, Ankara, 2240-2244 (1996).

28. Corbel, M.J., " International committee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of Brucella", *Int. J. Syst. Bacteriol*, 38 (4): 450-452 (1988).
29. Milgrom, F., Flanagan, T.D., "Medical Microbiology", *Churchill Uvings*, London, 349-352 (1982).
30. Anonim, " Bacteriological Analytical Manual", AOAC international 8.ed., *Gaithersburg*, USA, 587 (1995).
31. Unat, E.K., " Tıp Bakteriyoloji ve Virolojisi", *Dergah Tıp Yayınları*, İstanbul, 679-695 (1987).
32. Corbel, M.J., " Recent advances in the study of Brucella antigens and their serological cross-reactions", *Vet. Bull.*, 55(12): 927-947 (1985).
33. Bilgehan, H., Serter, "Klinik Mikrobiyoloji", *Ege Üniversitesi Tıp Yayınları No.117*, İzmir, 198-205 (1978).
34. Sözen, T.H., " Brucellozda Çeşitli Sistem Bulguları", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Brucelloz Sempozyumu*, Ankara, 47-49 (2000).
35. Sutherland, S. S., " Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Complement Fixation Test for the Detection of Specific Antibody in Cattle Vassinated and Challenge with *Brucella abortus*", *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (1): 44-47 (1985).
36. Tantillo, G., Pinto, A.D.I., Vergara, A., Buonavoglia, C., " PCR For The Direct Detection Brucella spp. in Milk and Cheese", *Journal of Food Protection*, 64 (2): 164-167 (2001).
37. Carsson, H., Hurvell, B., Lindbera, A., A., "Enzyme- Linked Immunosorbent Assay for titration of antibodies *B.abortus* and *Yersinia enterocolitica*", *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 84: 168-176 (1976).
38. Cargill, C., Lee, K., Clarke, I., "Use of an Enzyme- Linked Immunosorbent Assay in bovine *Brucellosis* eradikation program", *Aust. Vet. J.*, 62: 49-52 (1985).
39. Özsan, M., " Brucelloz'un Tarihçe ve Etiyolojisi", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Brucelloz Sempozyumu*, Ankara, 21-29 (2000).
40. Corbel, M.J., " DNA analysis of Brucella species", *Brucella and brucellosis in man and animals*, Tümbay, E., Hilmi, S., Ang, Ö., *Ege University Pres*, İzmir, 11-25 (1991).

41. Servent, A.A., Bourg, G., Ramuz, M., et. Al., " DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*", **J. Bacteriol**, 170 (10): 4603-4607 (1988).
42. Altekruze, S.F., Timbo, B.B., Mawbroyi, J.C., " Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, **Journal of food protection**, 61:3 (1998).
43. Beşe, M., "Yurdumuz koyunlarında Brucellos enfeksiyon serolojik, kültürde üretme ile allerjil reaksiyonlar arasındamukayeseli deneyler", **Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayınları**, 99: 35-38 (1959).
44. Madkour, M.M., "Harrison's Principles of Internal Medicine, 14.ed.", Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., **Mc Graw-Hill Companies**, New York, 969-971 (1998).
45. Raux, J., " *Brucellosis* hastalığının halk sağlığı yönünden önemi", **Uluslar arası Brucellosis sempozyumu hayvan hastalıkları merkez araştırma enstitüsü yayınları**, No: 9, İstanbul, 78-93 (1989).
46. Corbel, M.J., "Brucellosis", **Emerg. Infect. Dis.**, 3(2): 1-15, (1997).
47. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W., Schreckenberger, P.C., "Winn WL Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", **JB Lippincott Company**, Philadelphia, 34-45 (1992).
48. Sözen, T.H., " Brucelloz. Enfeksiyon Hastalıkları", Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, 486-491 (1996).
49. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri, **Sağlık Bakanlığı Matbaası**, Ankara, 10-12 (1995).
50. Elberg, S. S., Henderson, D. W., " Respiratory pathogenicity of *Brucella*", **J. Infect. Dis.**, 82: 302-306 (1948).
51. Young, E.J., " An overview of human brucellosis", **Clin Infect Dis**, 21: 283-290 (1995).
52. Young, E.J., " An overview of human brucellosis", **Clin Infect Dis**, 21:283-290 (1995).
53. Buğdaycı, K., "Kayseri İlinde Çiğ Sütlerden Yapılan Taze Beyaz Peynirlerde *Brucella* spp. Aranması", Doktora tezi, **İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst.**, İstanbul, 12-13, 38-40 (2003).
54. Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., "Pathogenic Microorganismus in Milk and Dairy Products", *Revue Scienfig, Que et Technique Del Office International Des Epizoties*, 16:20 (1997).

55. Ariza, J., Corredoira, J., Pallares, R., et. al., “ Characteristics of and risk faktors for relapse of brucellosis in humans”, *Clin. Infect Dis.*, 20: 1241-1249 (1995).
56. Lennette, H.E., Spaulding, H.E., Truant. P.J., " Manuel of Clinical Microbiology 2nd ed.”, *American Society for Mcrobiology*, Washington, 250-269 (1974).
57. Sancak, Y. C., Boynukara, B., Yardımcı, H., “ Van Otlı Peynirlerinde Brucella’ların Varlığı ve Dayanma Süresi Üzerinde Bir Araştırma”, *Journal of Konya Animal diseases Research Institute*, 4 (1):1-3 (1993).
58. Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., "Mikrobiyoloji 2000”, *Asya Tıp Yayınları*, İzmir, 362-400 (2000).
59. Akman, M., Gülmezoğlu, E., "Tıbbi Mikrobiyoloji”, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 480-485 (1976).
60. Arda, M., Mimbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö., "Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyöz Hastalıklar”, *Atatürk Üniversitesi Kars Veterinerlik Fakültesi Yayınları*, Erzurum, 197-220 (1992).
61. Moyer, N.P., " Manual Clinical Microbiology, 6.ed.”, Murray, P.R, Baron, E.J., Tenofe, F.C., *Amerikan Society for Microbiology* , Washington D.C., 457-462 (1991).
62. Heck, F.C., Williams, J.D., Prvett, J., Sanders, J., Zink, D.L., “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum”, *Amer. J. Vet. Res.*, 41: 2082-2094 (1980).
63. Young, E.J., "Serologic diagnosis of human brucellosis”, Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature, *Rev Infect Dis.*, 13:359-372 (1991).
64. Heizmann, W., Botzenhart, K., Döller, G., et. al., " Brucellosis”, Serological methods compared, *J Hyg Camb.*, 95: 639-653 (1985).
65. Balcı, İ., Güngör, S., Berktaş, M., “ Mikro ve makrotitrasyon- ELISA plaklarında yapılan Brucella mikroaglutinasyon testi sonuçlarının kalsik Wright aglutinasyon testi ile karşılaştırılması”, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 24: 170-173 (1994).
66. Davies, G., "The Rose Bengal Plate Test”, *Bull.Int. Epiz.*, 76:717-720 (1971).

67. Morgan, B. W. J., "Techniques in the identification and classification of *Brucella*", *Academic Press*, London and New York, 287 (1966).
68. Ünel, S., "Rose Bengal Plate Test ve Önemi", *Türk Mikrobiol. Cem. Dergisi*, 2: 47-52 (1972).
69. Moyer, N.P., Evins, G.M., Pigott, N.E., et.al., "Comparison of serologic screening tests for brucellosis", *J. Clin. Microbiol.*, 25 (10): 1969-1972 (1987).
70. Hall, M., Thone, C. O., "Preparation of biologically active components of *Mycobacterium bovis*, using triton X-100 or Potassium Chloride", *Amer. J. Vet. Res.*, 44 (8): 1602-1604 (1983).
71. Özbal, Y., "Temel İmmünoloji 1. Baskı", *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 285 (1994).
72. Parrat, D., Nielsen, K.H., White, R.G., Payne, D.J.H., "Radioimmunoassay of IgM, IgG and IgA *Brucella* antibodies", *The Lancet*, 1: 1075-1078 (1977).
73. Serpe, L., Battisti, A., Alfano, F., Gallo, P., "PCR Determination of *Brucella* spp. in Milk Products, Made and Commercialized in the Campania Region", *Industrie Alimentare*, 39 (388): 5-7 (2000).
74. Sutra, L., Caffin, J. P., Dupray, G., "Role of Milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test", *Vet. Microbiol.*, 12: 359-366 (1986).
75. Yardımcı, H., "Koyunlarda *Brucella melitensis* infeksiyonlarının aglütinasyon, Rose Bengal ELISA testleriyle ortaya konması ve bu testlerin teşhisindeki değerleri üzerinde bir araştırma", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (1989).
76. Ayaz, Y., "Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde Brucellosis etkenlerinin araştırılması", *Etlik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg.*, 5: 109-116 (1986).
77. Gilbert, G.L., Hawes, L.A., "The antibody response to *Brucella*", Immunglobulin response measured by enzyme-linked immunosorbent assay and conventional tests, *Aust. N. Z. J. Med.*, 11: 40-45 (1981).
78. Bilgehan, H., "Brucella", Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, *Barış Yayınları*, İzmir, 122-124 (1996).
79. Goldbaum, F.A., Leoni, J., Wallach, J.C., Fossati, C.A., "Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis", *J. Clin. Microbiol.*, 31 (8): 2141-2145 (1993).

80. Hinchliffe, P., "Brucellosis", ELISA In the Clinical Microbiology Laboratory, Wreghitt, T.G., Capner, P.M., **Public Health Laboratory Service GI**, London, 154-163 (1990).
81. Hunter, S.B., Bibb, W.F., Shih, C.N., et.al., "Enzyme-linked immunosorbent assay with major outer membrane proteins of *Brucella melitensis* to measure immune response to *Brucella* species", **J. Clin. Microbiol.**, 24 (4): 566-572 (1986).
82. Sippel, J.E., El-Masry, N.A., Farid, Z., "Diagnosis of human brucellosis with ELISA", **The Lancet**, 19-21 (1982).
83. Sutherland, S.S., "Evolution of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle with *Brucella abortus*", **Vet. Mikrobiol.**, 10: 23-35 (1984).
84. Thoen, C.O., Hopkins, M. P., Armbrust, A. L., Angus, R.D., Pietz, E.D., "Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in sera of *Brucella suis* infected swine", **Can. J. Cam. Med.**, 44: 294-298 (1980).
85. Brewer, R. A., Stuart, F. A., Corbel, M. J., "An indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in porcine sera", **Br. Vet. J.**, 495-500 (1983).
86. Thoen, C. O., Armbrust, A. L., Eacret, W. G., Eacret, R., Harrington, J., Brown, G. M., "Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Test for Characterizing the A and M antigens of *Brucella*", **Jour. Clin. Mic.**, 9: 485-487 (1980).
87. Thoen, C. O., Bruner, J. A., Lunchsinger, W., Pietz, E. D., "Detection of *Brucella* antibodies of different immunoglobulin classes in cow milk by enzyme-linked immunosorbent assay", **Amer. J. Vet. Res.**, 44 (2): 306-308 (1983).
88. Thoen, C. O., Mills, K., Hopkins, P. M., "Enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculosis exotic animals", **Amer. J. Vet. Res.**, 40 (5): 833-835 (1980).
89. Kerkhofs, P., Botton, Y., Thiange, P., Dekeyser, P., Limet, N., "Diagnosis of Bovine Brucellosis by Enzyme Immunoassay of milk", **Vet. Microbiol.**, 24: 73-80 (1990).
90. Akova, M., Uzun, O., Akalin, H. E., et al., "Quinolones in treatment of human brucellosis", Comparative trial ofloxacin- rifampin versus doxycycline- rifampin, **Antimicrob Agents Chemother**, 37: 1831 (1993).

91. Anonim, "Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlemi Görmüş İçme Sütleri Tebliği", **Resmî Gazete**, 23964 (14 Şubat 2000).
92. Thoen, C. O., Pietz, D., Armbrust, A., Harrington, R., "Enzyme immunoassay for detecting *Brucella* antibodies in cows milk", **J. Clin. Microbiol.**, 10: 222-225 (1979).
93. Heck, F. C., Deyoe, B. I., Williams, J. D., "Antibodies to *Brucella abortus* in sera from strain 19 vaccinated cows as determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and conventional serologic methods", **Vet. Immunol. Immunopathol**, 3: 629-634 (1982).
94. Abbasoğlu, U., "İnsan serumlarında ve bazı süt örneklerinde *Brucella* antikorlarının araştırılmasıyla ilgili bir çalışma", **Mikrobiyol. Bült.**, 22: 25-29 (1988).
95. Yıldıcı, H., Esendal, Ö. M., Aydın, N., "Sığır *Brucellosis*'inin Serum Aglutinasyon, Komplemant Fiksasyon ve Immunocomb Testleriyle Teşhisi", **Etlik Veteriner Mikrobiyolojisi Derg.**, Ankara, 8 (3): 24-33 (1996).
96. Romero, C., Pardo, M., Grillo, M.S., Diaz, R., "Evaluation of PCR and Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples For Diagnosis of Brucellosis in Dairy", **Cattle, Journal of Clinical Microbiology**, 33: 3 (1995).
97. Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Basse, J., Nicoletti, P., Kelly, W., "Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis", **Prev. Vet. Med.**, 26: 17-32 (1996).
98. Acedo, E., Diaz, M. E., Leon, A. B., "Incidencia de *Brucella spp.*", En Leche Cruda Y Queso Fresco Regional, **Alimentaria**, 57-60 (1997).
99. Bercovich, Z., Güler, L., Baysal, T., Screuder, B. E. C., Van Zijderveld, F. G., "Evaluation of the currently used diagnostic procedures for the detection of *Brucella melitensis* in sheep", **Small Ruminant Research**, 31 (1): 1-6 (1998).
100. Kenar, B., Altındış, M., "Afyon bölgesi süt örneklerinde *Brucella* antikor araştırılması", **Türk Hij. Den. Biyol. Derg.**, 58 (3): 87-92 (2001).
101. Herman, L., Ridder, D.H., "Identification of *Brucella spp.* By Using The Polymerase Chain Reaction", **App. and Env. Microbiology**, 2099-2101 (1992).

102. Hornitzky, M., Searson, J., “ The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected and vaccinated cattle”, *Aust. Vet. J.*, 63: 172-174 (1986).
103. İnal, T., “Süt ve süt ürünleri hijyen ve teknolojisi”, *Final Ofset*, İstanbul, 148 (1990).
104. İstilotti, R., “ İsolation Brucella spp. from fresh sheep cheese etiyoledi and epidemioloji”, *Industrie Alimentari*, 31: 13-15 (1992).
105. Kasımoğlu, A., “ Determination of Brucella spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kırıkkale”, *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 109(7): 324-326 (2002).
106. Mert, A., “Ankara yöresinde pazarlanan taze Beyaz peynirlerde Brucella’ların varlığı üzerinde araştırma”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 22-30 (1984).
107. Öztürk, G.,Nazlı, B., “Deneyisel olarak enfekte edilen sütle yapılan tulum peynirlerinde Brucella melitensis’in mevcudiyeti üzerine çalışmalar”, *Pendik Vet.Mikrobiyal. Enst. Derg.* 27: 123-142 (1996).
108. Güllüce, M.,[“Kars ve Çevresinde Sığırlarda *Brucella abortus*’a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması”, Doktora Tezi, *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi*, Kars, 35-38, 43-56 (1993).
109. Atasever, M., Uçar, G., Köse, Z., “ Muhafaza süresince Kefirin kimyasal, mikrobiyolojik ve duyusal niteliklerindeki değişimler”, *Tarım ve Köy Dergisi*, 137: 68-72 (2001).
110. Loreton, T., Mosterty, J.F., Viljoen, B.C., “ Microbial flora associated with South African household kefir”, *Sourth African Journal of Science*, 99(1-2): 92-94 (2003).
111. Tunçbilek, M., “Ankara piyasasında satılan taze peynirlerin *Brusellosis* riski yönünden incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 48 (1992).
112. Güllüce, M., Adıgüzel, A., Algur, Ö., “Erzurum bölgesinde temin edilen çeşitli peynir örneklerinde Brucella antijenlerinin ELISA ile saptanması”, *Türk Mikrobiyal Cem. Dergisi*, 33: 356-360 (2003).
113. Kalender, H., Özcan, C., Arslan, N., “ Taze tulum peynirlerinden Brusella izolasyonu”, *Türk Mikrobiyal Cem. Dergisi*, 31: 184-186 (2001).

114. Adıgüzel, A., “Erzurum’a bağı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde *Brucella abortus* antikorların ELISA ile araştırılması”, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 21 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TAŞKIN, Naile
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 02.03.1982 Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 280 53 44
Faks : 0 (312) 320 40 50
e-mail : nailetaskin@hotmail.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2004
Lise	Eryaman Süper Lisesi	2000

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005-2007	Gamed Ltd.Şti.	Satış Temsilcisi

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Tenis, Yüzme, Bowling, Sinema

